

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Martin Ston

Vývoj a optimalizace robustního tlakového modulátoru pro
multidimenzionální plynovou chromatografii

Development and optimization of a robust pressure modulator for
multidimensional gas chromatography

Dizertační práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2018

Tato dizertační práce byla finančně podpořena projektem č. 894513 Grantové agentury Univerzity Karlovy a projekty specifických vysokoškolských výzkumů (SVV 2012-265201, 2013-267215, 2014-260084, 2015-260205, 2016-260713) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. července 2018

.....

Dizertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2012-2016 během mého postgraduálního studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za jeho pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Dále svým rodičům a přítelkyni za jejich všestrannou podporu během celé doby studia.

Abstrakt:

Komprehenzivní plynová chromatografie (GC×GC) je moderní a pokročilá analytická metoda určená k separaci velmi komplexních vzorků, kde klasická plynová chromatografie nemá dostatečnou separační účinnost. Umožňuje kompletní simultánní analýzu vzorku na dvou odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.

Během práce byly sestrojeny modulátory se třemi typy řídicích jednotek a byl vyvinut robustní pulzní tlakový modulátor (PFM), přičemž jeho parametry byly vždy optimalizovány tak, aby byl použitelný s kombinacemi kolon o různých rozměrech. Optimalizovaný modulátor umožňuje práci s kolonami o rozměrech 10-60 m délky a 0,15-0,25 mm vnitřních průměrů pro první dimenzi a s kolonami o rozměrech 1-10 m délky a 0,25-0,32 mm vnitřních průměrů pro druhou dimenzi.

Na sestavách s PFM byly pro demonstraci jeho funkčnosti provedeny analýzy komplexních reálných vzorků, jako jsou vzorky esenciálních olejů, ropných derivátů či biologických vzorků. Na vybrané kombinaci kolon byla porovnána účinnost PFM s účinností komerčního kryofokusačního modulátoru firmy Zoex, kterým byl vybaven stejný plynový chromatograf. Průměrná opakovatelnost retenčních časů, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, byla u PFM přibližně 2,0 % (kryofokusační přibližně 0,5 %) a ploch píků přibližně 3,5 % (kryofokusační přibližně 1,0 %). Výsledkem lze říci, že pulzní tlakový modulátor je při správném nastavení všech parametrů použitelným nástrojem modulace. Komerční kryofokusační modulátor je však stále robustnější a účinnější, avšak výhodou PFM je jeho velmi nízká pořizovací cena a velmi nízké provozní náklady. Pro naši laboratoř to znamenalo přibližnou denní cenu provozu přístroje s PFM 75 Kč oproti 750 Kč při použití kryofokusačního modulátoru.

Klíčová slova:

Tlakový modulátor, multidimenzionální plynová chromatografie, komprehenzivní plynová chromatografie, multifaktorová optimalizace

Abstract:

Comprehensive gas chromatography (GC×GC) is a modern and advanced analytical method designed to separate very complex samples, when the separation efficiency of classical gas chromatography is not sufficient. GC×GC allows complete simultaneous analysis of a sample on two different columns, interconnected by special interface called the modulator.

Three types of control units were set up and a robust pulse flow modulator (PFM) was developed in this work. PFM working parameters have been always optimized to allow combinations of columns with different sizes. Optimized PFM allows application of columns with 10-60 m length and 0.15-0.25 mm internal diameters for the first dimensions and with 1-10 m length and 0.25-0.32 mm internal diameters for the second dimension.

For demonstration reasons, analyses of complex real samples, such as essential oils, oil derivatives and biological samples, were performed. PFM was compared with the commercial cryofocustion modulator Zoex for the selected column set and one sample (a mixture of volatile solvents) on a gas chromatograph equipped with both modulators. The average repeatability of retention times, expressed as a relative standard deviation, was approximately 2.0 % for PFM (cryofocustion about 0.5 %) and of the peak areas was approximately 3.5 % (cryofocustion about 1.0 %). As a result, it can be stated, that PFM is applicable modulation tool when all parameters are set correctly. Unfortunately, the commercial cryofocustion modulator is still more robust and more efficient. However, the advantages of PFM are very low initial costs and almost zero operating costs. An approximate daily operation costs of a PFM device are 75 CZK per day compared to 750 CZK per day when using a cryofocustion modulator.

Keywords:

Pressure modulator, multidimensional gas chromatography, comprehensive gas chromatography, multifactorial optimization

Prohlášení o spoluautorství

Prohlašuji, že se Mgr. Martin Ston podílel na níže uvedených publikacích měrou uvedenou v závorkách:

- [1] **Ston, M.**; Cabala, R.; Bierhanzl, V. M.; Krajicek, J.; Bosakova, Z.: Improved flow modulator construction for GC × GC with quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **2016**, 54, 1481–1488. (90 %)

- [2] Bierhanzl, V. M.; Bursová, M.; **Ston, M.**; Čabala, R.; Seydlová, G.: Simultaneous analysis of polar and non-polar components of cell membrane phospholipids by GC-MS. *Chemical Papers* **2016**, 70, 1309–1315. (20 %)

- [3] Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; **Ston, M.**; Kotora, P.; Ferenczy, V.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Seydlová, G.: Direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography, and gas chromatography of *Bacillus subtilis* phospholipids. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **2016**, 147, 1385–1391. (20 %)

- [4] Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; **Ston, M.**; Kubinec, R.; Szabó, A. H.; Podolec, P.: Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol and phosphate. *Journal of Separation Science* **2015**, 38, 67–72. (10 %)

- [5] Krajicek, J.; Havlikova, M.; Bursova, M.; **Ston, M.**; Cabala, R.; Exnerova, A.; Stys, P.; Bosakova, Z.: Comparative Analysis of Volatile Defensive Secretions of Three Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method. *Plos One* **2016**, 11, 1–19. (10 %)

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Obsah:

1 Cíle práce	- 9 -
2 Teoretická část	- 10 -
2.1 Multidimenzionální plynová chromatografie	- 10 -
2.3 Teorie GC×GC	- 13 -
2.3.1 Ortogonalita	- 13 -
2.3.2 Píková kapacita	- 14 -
2.3.3 Rozlišení	- 14 -
2.3.4 Citlivost	- 15 -
2.4 Modulátory	- 15 -
2.5 Pulzní tlakový modulátor	- 18 -
2.6 Varianty pulzního tlakového modulátoru	- 20 -
2.7 GC×GC-MS	- 22 -
2.8 Praktické využití GC×GC	- 23 -
2.9 Fosfolipidy	- 24 -
2.10 Obranné látky ploštic	- 25 -
3 Experimentální část	- 26 -
3.1 Chemikálie	- 26 -
3.2 Přístrojové vybavení	- 26 -
3.3 Příprava směsi analytů	- 28 -
3.4 Reálné vzorky	- 28 -
3.4.1 Analýza fosfolipidů	- 28 -
3.4.2 Analýza obranných látek ploštic	- 29 -
3.5 GC×GC-FID	- 30 -
3.6 GC×GC-MS	- 30 -
3.7 GC×GC-FID+MS	- 31 -
3.8 GC×GC-MS + kryofokusace	- 31 -
3.9 Sestavení pulzního tlakového modulátoru	- 31 -
4 Výsledky a diskuze	- 32 -
4.1 Modulátor	- 32 -
4.1.1 Sestavení řídicí jednotky	- 32 -

4.1.2 Sestavení modulátoru.....	- 40 -
4.1.3 Úpravy modulátoru	- 44 -
4.1.4 Reprezentativní řídicí jednotka na výstavu.....	- 45 -
4.1.5 Dočasná řídicí jednotka	- 49 -
4.2 Optimalizace.....	- 51 -
4.2.1 Pulzní tlakový modulátor	- 51 -
4.2.2 Optimalizace modulace.....	- 52 -
4.2.3 Optimalizace kolon, kapilár a jejich spojů.....	- 60 -
4.2.4 Testovací směsi.....	- 61 -
4.3 Přechod z GC×GC-FID na GC×GC-MS.....	- 67 -
4.4 Porovnání účinnosti s kryofokusačním modulátorem ZOEX	- 68 -
4.5 Analýza levandulového extraktu	- 72 -
4.6 Analýza toxikologických vzorků	- 75 -
4.7 Analýza fosfolipidů	- 77 -
4.8 Analýza obranných látek ploštic	- 79 -
4.9 Analýza vybraných parfémů	- 80 -
5 Shrnutí	- 83 -
6 Závěr.....	- 85 -
7 Seznam zkratk a symbolů	- 86 -
8 Seznam publikací a konferenčních příspěvků	- 88 -
9 Použitá literatura.....	- 90 -
10 Přílohy	- 107 -
I - Článek I.....	- 107 -
II - Článek II.	- 115 -
III - Článek III.	- 122 -
IV - Článek IV.....	- 129 -
V - Článek V.	- 135 -
VI - Propagační leták k řídicí jednotce.....	- 154 -
VII - Potvrzení o vystavovaném modulátoru	- 156 -

1 Cíle práce

Obecným cílem této dizertační práce je vývoj a optimalizace pulzního tlakového modulátoru (PFM) pro komprehenzivní plynovou chromatografii (GC×GC). Modulátor bude sloužit k analýzám reálných vzorků a bude kriticky porovnán s komerčním kryogenním modulátorem firmy Zoex na stejném stroji za stejných pracovních podmínek.

Práce navazuje na moji diplomovou práci, ve které byl prototyp modulátoru podobného principu sestaven a otestován na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Dizertační práce se více zaměřuje na samotnou aplikaci a podstatu principu PFM, jakož i samotné provedení řídicí jednotky modulátoru.

Komerčním systémům pro GC×GC dominují velmi spolehlivé, účinné a robustní kryofokusační modulátory. Jejich provozní i pořizovací náklady jsou však pro pracoviště velkou finanční zátěží. Proto se začaly objevovat různé jiné varianty modulátorů, které budou svou účinností srovnatelné, ale jejich pořízení a provoz bude výrazně levnější. Právě takové jsou modulátory tlakové, kam se pulzní tlakový modulátor řadí. Náklady na pořízení tohoto modulátoru jsou oproti komerčně dodávaným modulátorům zlomkové a na provoz stačí jen mobilní fáze běžné spotřeby plynového chromatografu.

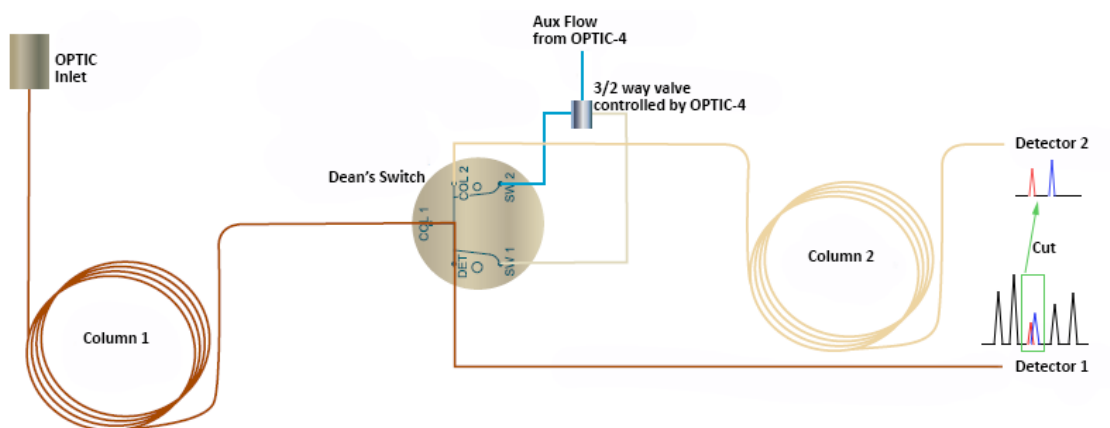
Konkrétní cíle dizertační práce tedy jsou:

- 1) vývoj řídicí jednotky modulátoru
- 2) optimalizace podmínek pulzního tlakového modulátoru
- 3) spojení pulzního tlakového modulátoru s hmotnostním detektorem
- 4) porovnání jeho účinnosti s komerčním kryofokusačním modulátorem Zoex
- 5) analýzy vybraných reálných vzorků

2 Teoretická část

2.1 Multidimenzionální plynová chromatografie

Při analýze komplexních vzorků, obsahujících i tisíce analytů, se klasická plynová chromatografie (GC) může potýkat s nedostatečnou separační účinností a omezenou píkovou kapacitou systému. Tento problém lze teoreticky řešit postupným zvětšováním délky kolony, což však kvůli tlakovým podmínkám není možné dělat neomezeně dlouho; nebo například použitím vícerozměrné, multidimenzionální GC [1]. Omezíme-li se pouze na dvě kolony, hovoříme o dvoudimenzionální GC. Pokud je zapotřebí rozdělit jen pár kritických píků z celé analýzy, s výhodou lze použít tzv. heart-cut techniku. Ta umožňuje určitou vybranou část vzorku po neúplné separaci na jedné koloně rozdělit na další koloně o jiné selektivitě [2]. Musí se však počítat s posuny retenčních časů a narůstající časovou náročností analýzy v závislosti na počtu a délce analýz na druhé koloně. Avšak instrumentální řešení této techniky je poměrně nenáročné. Na konec první kolony je nutné připojit Deanův tlakový přepínač (angl. Dean's switch), který je schopen pomocí přidavného průtoku nosného plynu řízeného trojcestným ventilem určit cestu efluentu z první kolony, např. buď do detektoru, nebo do druhé kolony. Načasování trojcestného ventilu pak umožňuje výběr zóny efluentu z první kolony k analýze na druhé koloně (Obr. 2.1.1.) [3].

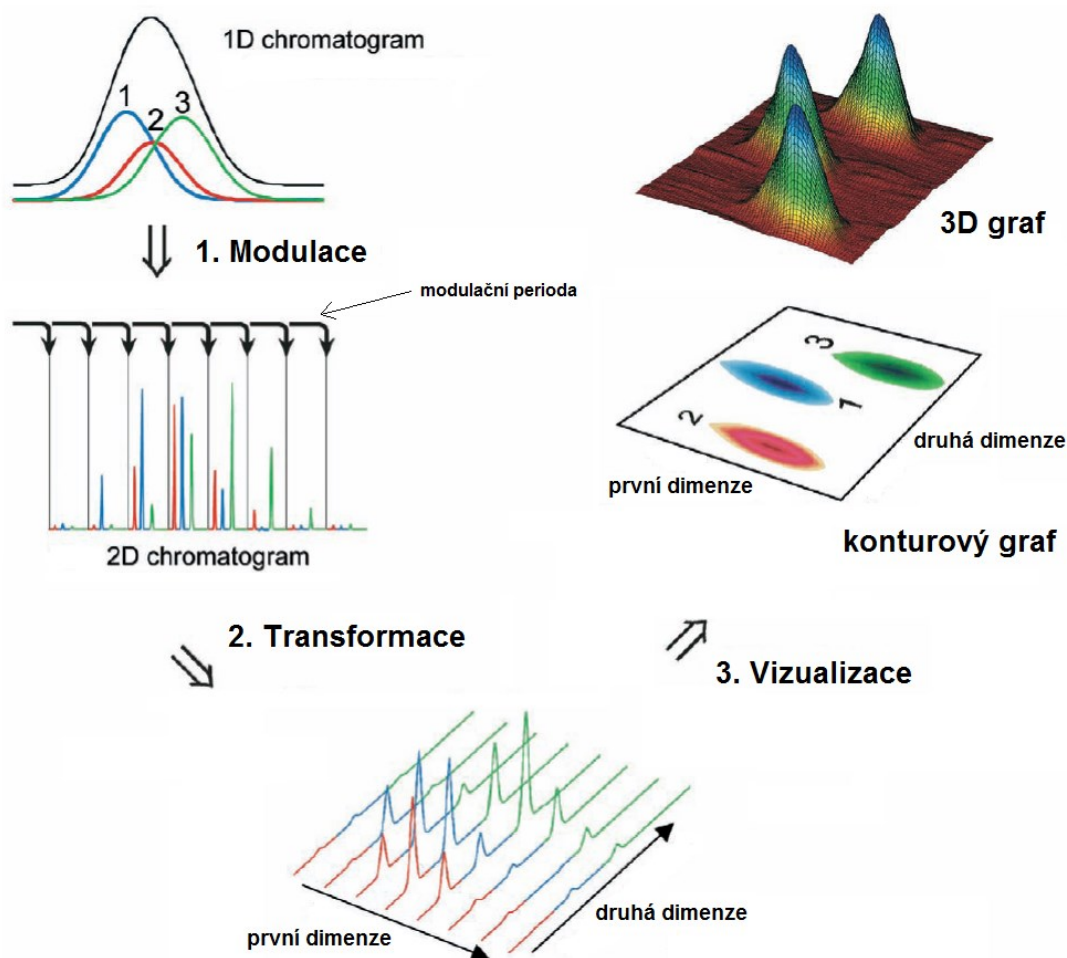


Obr. 2.1.1.: Schematické znázornění jednoho z možných řešení využití Deanova tlakového přepínače pro heart-cut techniku a princip jeho funkce (<https://www.glsciences.eu/html/optic-4-multiple-columns-configuration.html>).

2.2 Komprehenzivní plynová chromatografie

Pokud je ale zapotřebí rozdělit mnohem více nerozdělených píků, je možné například použití takové techniky, která umožní separaci na první i druhé koloně po celou dobu analýzy. V tomto případě hovoříme o komprehenzivní (celostní) plynové chromatografii (GC×GC). Tady už je instrumentální náročnost poměrně vyšší, protože je zapotřebí tzv. modulátor. Ten zajišťuje opakované, reprodukovatelné, velmi rychlé a kvantitativní dávkování efluentu z první kolony do druhé kolony po celou dobu analýzy [4].

Vyhodnocování analýz je u GC×GC oproti klasické GC komplikovanější z důvodu trojrozměrného prostoru, kdy identitu analytu charakterizují dva retenční časy (první kolona osa x , druhá kolona osa y) a jeho množství intenzita signálu na ose z . Množství analytu je úměrné objemu prostorového tělesa, vznikajícího integrací v mezích eluce analytu v těchto osách (v ideálním případě rotačního kuželu, výšku tělesa představuje osa z), které je prostorovým ekvivalentem klasického píku v GC [5]. Měřicí systémy GC×GC jsou však totožné s těmi pro klasickou GC. Produkují surová data ve formátu klasické GC a pro jejich vyhodnocení pak musí být speciálním softwarem transformována na odpovídající formát. Na obrázku 2.2.1. je vysvětlen princip, jak jsou modulované úzké píky převáděny do projekce konturového grafu a do 3D grafu. Nejdříve je klasický chromatogram rozdělen v ose x po časových úsecích, které mají délku rovnající se právě době trvání modulační periody. Modulační perioda je časový úsek (nejčastěji 2-12 s, cyklicky se opakující po celou dobu analýzy), během kterého je efluent z první kolony zachycen v dávkovací smyčce a poté nadávkován na druhou kolonu. Tyto úseky jsou poté otočeny o úhel 90° vůči časové ose a vytvoří tak 2D chromatogram. V něm jsou následně provedeny interpolace a vznikne konturový graf, kde na ose x je retenční čas na první koloně (min), na ose y je retenční čas na druhé koloně (s) a na ose z je odezva detektoru zobrazená do vrstevnic [6].



Obr. 2.2.1.: Postup zpracování surových dat (2D chromatogramu) do 3D formátu (upraveno a převzato z Dallüge, J. a kol., 2003, [8]).

Pro správnou funkci GC×GC systému je nezbytné splnit několik důležitých podmínek: a) dílčí analýza v druhé dimenzi musí být dokončena během modulační periody, b) analýza na druhé koloně nesmí znehodnotit úroveň separace látek dosaženou na první koloně, c) ortogonalita systému, která znamená kompletní nezávislost separačních mechanismů v obou dimenzích. Ortogonalitu lze dosáhnout např. použitím dvou kolon rozdílné polarity (nejčastěji první kolona nepolární a druhá kolona středně polární nebo polární) [7, 8].

U kolon je ještě potřeba věnovat pozornost jejich rozměrům. První kolona má zpravidla klasické rozměry, například 30 m délky a 0,25 mm průměr. U druhé kolony je délka kratší (nejčastěji 1-5 m), ale její průměr je závislý na použitém druhu modulátoru.

Termální modulátory vyžadují průměr druhé kolony menší a tlakové modulátory průměr větší. Je to dáno odlišným principem dávkování efluentu. Při použití např. kryofokusačního modulátoru (patří do skupiny termálních modulátorů) dochází k vymražení (imobilizaci) analytů ve skladovací kapiláře i při kontinuálním průchodu mobilní fáze. Ta v okamžiku prudkého ohřátí vymražených míst způsobí odpaření a přesun analytů (jejich rychlé nadávkování) do druhé kolony. Pokud je nastaveno průtokové optimum pro separaci na první koloně, bude separace na druhé koloně probíhat zcela mimo její průtokové optimum z důvodu jejích odlišných rozměrů. Ale i tato minimálně účinná separace na druhé koloně hraje v GC×GC zásadní roli. A protože musí být zachováno rozlišení dosaženého na první koloně a na druhé koloně je separována pouze malá konkrétní frakce efluentu z první kolony, stačí zde i nižší účinnost separace [9].

Naproti tomu tlakový modulátor (PFM) využívá k dočasnému uskladnění efluentu z první kolony objem skladovací kapiláry. Externím tlakem mobilní fáze, který je střídavě přepínán mezi začátkem a koncem skladovací kapiláry dochází střídavě k jejímu plnění a vyplachování (dávkování) během modulační periody. Přerušením dodatečného tlaku na konci skladovací kapiláry a vložením jiného tlaku na její začátek vede k nadávkování celého obsahu skladovací kapiláry na začátek druhé kolony. Tlak na konci skladovací kapiláry navíc slouží k zásobení druhé kolony mobilní fází během jejího plnění efluentem z první kolony [10].

2.3 Teorie GC×GC

2.3.1 Ortogonalita

Důležitým pojmem u GC×GC je ortogonalita. Tu lze vyjádřit několika způsoby: matematicky (vektory jsou nazývány ortogonálními, je-li jejich skalární součin nulový) nebo statisticky (míra statistické nezávislosti dvou množin proměnných). Pro GC×GC je důležitá definice chemicko-analytická: retenční časy získané v obou dimenzích musí být statisticky nezávislé, nekorelované (kompletní nezávislost separačních mechanismů v každé dimenzi). Toho lze dosáhnout odlišnou volbou stacionární fáze kolon, avšak úplná othogonalita je prakticky nedosažitelná. Jako možné rozdíly separačních

mechanismů kolon, které se v praxi používají, může být rozdíl jejich polarity (polární×nepolární), mechanismu separace (absorpce×adsorpce) nebo například optické aktivity (nechirální×chirální) [11-13].

2.3.2 Píková kapacita

Píková kapacita je definována jako největší počet píků, které dokáže chromatografický systém od sebe rozdělit při zachování zadaného minimálního rozlišení ve zvoleném časovém intervalu.

Teoretická píková kapacita systému při sériovém zapojení dvou kolon bez modulátoru je prostý součet píkových kapacit obou kolon, avšak u GC×GC je výsledná hodnota dána součinem píkových kapacit kolon. To znamená vzrůst teoretické píkové kapacity (účinnosti) systému až o několik řádů. V praxi je však píková kapacita GC×GC systému jen o málo vyšší než u klasické GC [14, 15]. To je způsobeno nesplněním přísných teoretických kritérií pro GC×GC, např. transformované píky v první dimenzi jsou širší než v případě klasické GC nebo rychlost vzorkování efluentu je malá. U GC×GC systému jsou obvykle v první dimenzi píky o něco málo širší díky nižší hodnotě průtokové rychlosti nosného plynu. Ta je nutným kompromisem mezi rozdílnými optimálními lineárními průtokovými rychlostmi obou kolon lišících se svými vnitřními průměry. Pokud je nastavena optimální průtoková rychlost na první koloně, na druhé koloně, která je menšího nebo většího průměru, ale především několikanásobně kratší délky, je rychlost zcela mimo optimum. Při snaze alespoň přiblížit tlakové podmínky optimální průtokové rychlosti na druhé koloně je opět mimo optimum průtoková rychlost na první koloně [16].

2.3.3 Rozlišení

Rozlišení je u GC×GC díky dvěma dimenzím poněkud složitější. U klasické GC je rozlišení vztaženo k nejbližšímu píku pouze po jedné časové ose (retenční čas, osa x). U GC×GC jsou však časové osy dvě (retenční časy na dvou kolonách, osy x a y), a proto existují hodnoty rozlišení pro obě časové osy R_x , R_y , kdy pro konkrétní pík lze vypočítat

rozlišení v rámci projekce do každé osy. Navíc je zde rozlišení R_s pro nejbližší pík v rovině vytvořené osami x a y . To znamená, že pro každý pík mohou existovat tři hodnoty rozlišení: R_x , R_y a R_s . Výpočet R_s je poměrně komplikovaný, více je mu věnováno v mé diplomové práci [99], případně článku [17].

2.3.4 Citlivost

Nezanedbatelnou výhodou GC×GC je zvýšení citlivosti metody v důsledku zvětšení poměru signál-šum. K tomu dochází díky zvýšení výšky píků při zachování přibližně stejného šumu v důsledku kryogenního záchytu analytů nebo tlakové komprese zón efluentu dávkovaných na druhou kolonu. Klasický pík je v případě modulace rozdělen na určitý počet velmi úzkých píků, jejichž počet závisí na délce modulační periody. Tyto úzké píky mají poté přibližně šířku 60-100 ms v polovině jejich výšky. A jelikož součet ploch modulovaných píků se rovná ploše nemodulovaného píku, musí se zvýšit jejich výška [18].

2.4 Modulátory

Nejdůležitější částí GC×GC systému je modulátor, který umožní zachycení malé frakce vzorku eluujícího z první kolony (efluentu) a jeho následné rychlé nadávkování do druhé kolony. Vše za podmínky, že není znehodnocena úroveň separace látek dosažená na první koloně. Modulátory lze obecně rozdělit podle toho, na jakém principu jsou založeny: termální nebo tlakové. Termální modulátory využívají pro zachycení analytů efluentu zchlazení a opětovné ohřátí krátkého úseku kapiláry, tlakové využívají pomocného vnějšího tlaku mobilní fáze [19].

Termální modulátory se dále dělí na vysokoteplotní (heater-based) modulátory a kryogenní (kryofokusační) modulátory. Vůbec první modulátor v historii GC×GC byl zaveden Phillipsem v roce 1991 a řadí se do první kategorie [20]. Jeho princip je založen na termodesorpci, kde krátký úsek povrchu kapiláry byl potažen vrstvou zlaté fólie tloušťky 40 μm , do které byly vkládány pulzy elektrického proudu o vhodné délce a frekvenci a které úsek kapiláry ohřívaly. Jakmile se analyt dostal do smyčky

modulátoru umístěné mimo termostatovanou část chromatografu, nastala jeho sorpce na stacionární fázi a zachycení v krátké zóně díky relativně nízké teplotě kapiláry. Poté byl do odporové folie puštěn proudový pulz, čímž došlo k náhlému zvýšení teploty a tím k desorpci analytu.

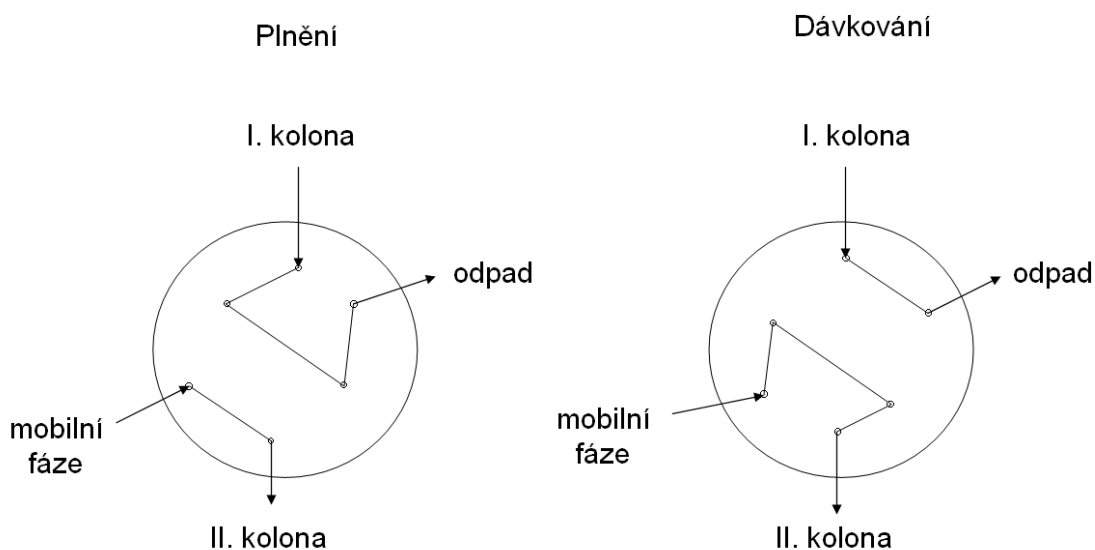
U kryogenních modulátorů je zapotřebí k ochlazení části kapiláry chladící médium, kterým je nejčastěji kapalný dusík, suchý vzduch nebo oxid uhličitý. V roce 1997 sestrojil Marriott první kryogenní modulátor chlazený pomocí kapalného oxidu uhličitého jako náhradu za kapalný dusík [21]. V dnešní době je hojně používán tzv. dvoutryskový (two-jets) systém, ve kterém je na krátký úsek smyčky kapiláry spojující obě separační kolony trvale přiváděn jednou tryskou zchlazený plynný dusík (teplota $-189\text{ }^{\circ}\text{C}$) a střídavě druhou tryskou horký dusík (teplota až $400\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ochlazením části kapiláry tryskou se zchlazeným dusíkem je ve smyčce zadržen efluent tak, aby byl následně rychle uvolněn a nadávkován do druhé kolony po ohřátí stejné části kapiláry pomocí trysky s horkým dusíkem. Podobně pracuje čtyřtryskový (four-jets) systém, kde je však místo smyčky vždy dvojice trysek se zchlazeným a horkým dusíkem [22-24].

V současné době jsou často používána zařízení s kryogenními modulátory pro jejich vysokou účinnost modulace a robustnost. Jejich hlavní předností je schopnost produkce velmi úzkých píků v chromatogramu (60 ms šířka píku v polovině jeho výšky), které jsou nutné pro dosažení vysoké účinnosti separace [25, 26].

Při běžném provozu v laboratoři představují tyto modulátory nemalou finanční zátěž z důvodu vyšších pořizovacích nákladů a velké spotřeby chladícího média (z praxe naší laboratoře přibližně 240 l kapalného dusíku maximálně na 10 dnů provozu). A proto probíhá neustálý vývoj a zdokonalování tlakových modulátorů. Ty lze rozdělit podle základního principu činnosti na tři druhy: modulátor s diferenciálním tokem (differential flow modulator, DFM), modulátor s přepínaným tokem (flow switch modulator, FSM) a pulzní tlakový (fluidní) modulátor (pulsed flow modulator, PFM) [27, 28].

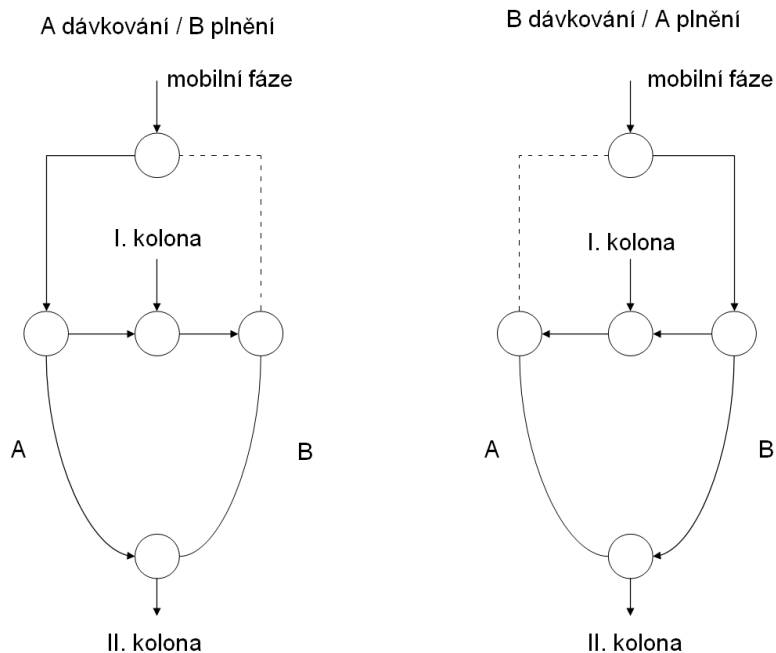
Principem funkce DFM je činnost šesticestného ventilu, který je zapojený mezi první a druhou kolonu. Na obrázku 2.4.1 je schematicky znázorněna jeho funkce. Ventil umožňuje rychlé přepínání mezi kapilárami tak, aby při plnění byla smyčka plněna efluentem z první kolony a po přepnutí ventilu byl obsah smyčky dávkován na druhou kolonu. Při analýze se však nedávkuje vše z první kolony do kolony druhé, ale pouze

přibližně 80 %. To je způsobeno tím, že i když je přepínání ventilu velmi rychlé, v době dávkování se část efluentu z první kolony odvádí do odpadu [29, 30].



Obr. 2.4.1: Princip differential flow modulátoru (upraveno podle Seeley, J. V. a kol., 2000, [29]).

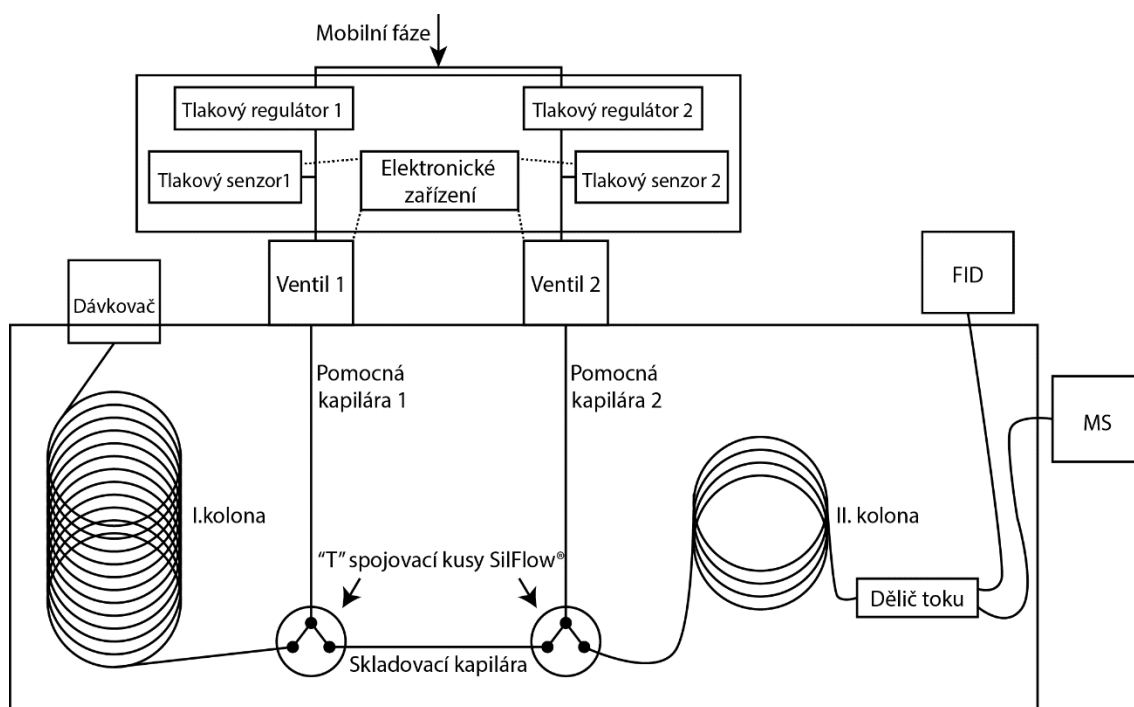
FSM jako vylepšený nástupce DMF pracuje na podobném principu a to tak, že trojcestný ventil rychle přepíná pomocný přívod nosného plynu mezi dvě krátké kapiláry (A a B na obr. 2.4.2). Tyto kapiláry jsou vyvedeny z děliče toku umístěného na výstupu z první kolony a obě opět ústí do druhé kolony. Základní princip modulátoru spočívá v rychlém přepínání trojcestného ventilu tak, aby efluent z první kolony proudil buď do jedné, nebo do druhé krátké kapiláry. V okamžiku, kdy se jedna krátká kapilára plní efluentem z první kolony, z druhé se předchozí frakce dávkuje do druhé kolony. Zde se dávkuje všechen efluent z první kolony do druhé kolony [31-34]. Na obrázku 2.4.2 je schematicky znázorněna jeho funkce.



Obr. 2.4.2: Princip flow switch modulátoru (upraveno podle Seeley, J. V. a kol., 2007, [34]).

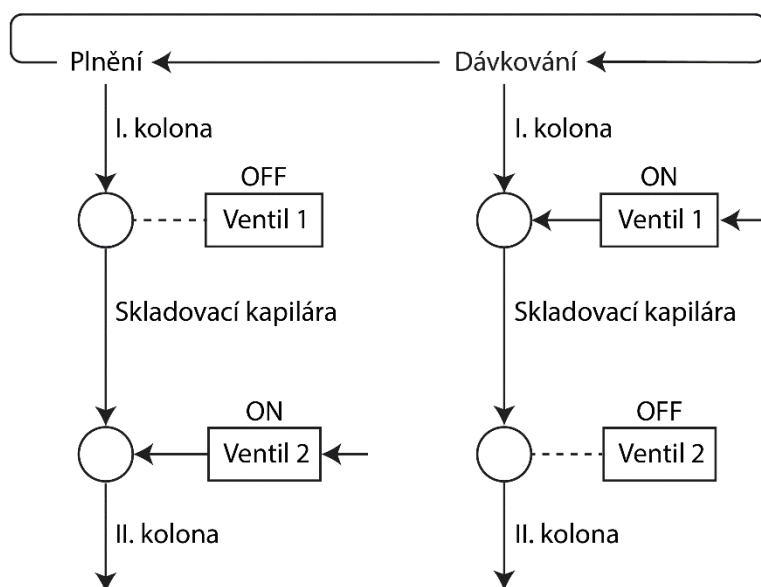
2.5 Pulzní tlakový modulátor

Schematické znázornění modulátoru je na obrázku 2.5.1. Dva dvoucestné ventily, na jejichž vstup je přiváděna mobilní fáze, jsou spojeny pomocnými kapilárami se spojovacími prvky. Ty jsou mezi sebou propojeny skladovací kapilárou. Do prvního spojovacího prvku vede konec první kolony (I.), z druhého spojovacího prvku vede začátek druhé kolony (II.). Otvírání obou ventilů je časováno řídicí jednotkou tak, že na velmi krátký okamžik (pulz, doba otevření prvního ventilu je řádově stovky milisekund) prochází plyn kapilárou označenou jako pomocná kapilára 1 a ve zbytku modulační periody (celkový čas od počátku tlakového pulzu do začátku následujícího pulzu) prochází plyn kapilárou označenou jako pomocná kapilára 2 (doba otevření druhého ventilu je řádově jednotky sekund). Tento proces se neustále periodicky opakuje v každé modulační periodě po celou dobu analýzy. Skladovací kapilára zde slouží k zachycení efluentu z první kolony, který je následně nadávkován zvýšeným proudem pomocného plynu vyvolaným tlakovým pulzem z pomocné kapiláry 1 do druhé kolony. Pomocná kapilára 2 je především určena pro zásobení druhé kolony mobilní fází, protože kolona v druhé dimenzi zde má větší průměr než kolona v první dimenzi a vyžaduje tak vyšší průtok nosného plynu [35-38].



Obr. 2.5.1: Schema pulzního tlakového modulátoru.

Na obrázku 2.5.2 je znázorněn princip a časování PFM.



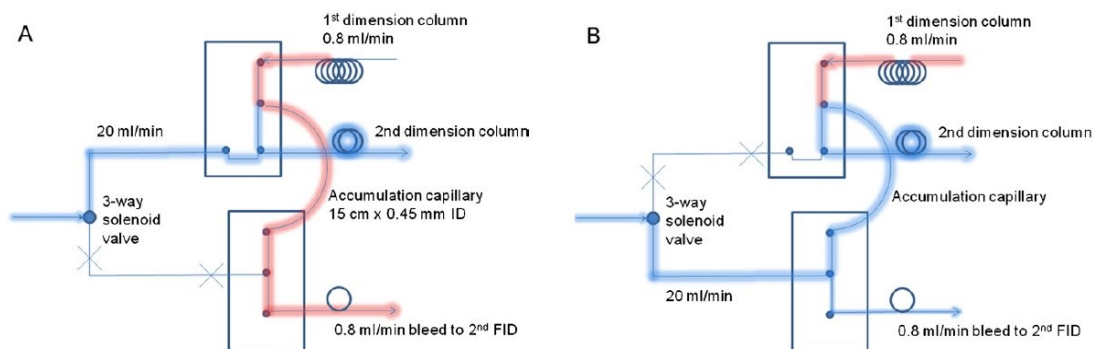
Obr. 2.5.2: Princip a časování pulzního tlakového modulátoru.

Mezi přednosti tohoto modulátoru patří vysoká účinnost dávkování bez ztrát, relativně jednoduché konstrukční řešení bez pohyblivých částí uvnitř temperované části plynového chromatografu (a tím jeho teplotní nezávislost) a především nízké provozní a pořizovací náklady. Nevýhodami jsou produkce širších píků ve srovnání s kryogenním modulátorem (šířka okolo 120 ms v polovině výšky píku), ředění efluentu z první kolony dodatečným tokem mobilní fáze při analýze na druhé koloně a tím ztrátě citlivosti (ve srovnání s kryogenním modulátorem) nebo vyšší průtokový objem plynu na výstupu z druhé kolony omezující jeho použití v kombinaci s hmotnostním detektorem [39-41].

Velmi citlivě zde musí být dodrženo několik zásad nastavení tlaku a objemového průtoku v kapilárách, aby bylo dosaženo optimální modulace. Například je potřeba nalézt optimální dobu modulační periody, která bude přesně odpovídat času potřebného k naplnění objemu skladovací kapiláry. Toto lze provést úpravou rozměrů skladovací kapiláry, nastavením pracovních tlaků a úpravou času modulační periody.

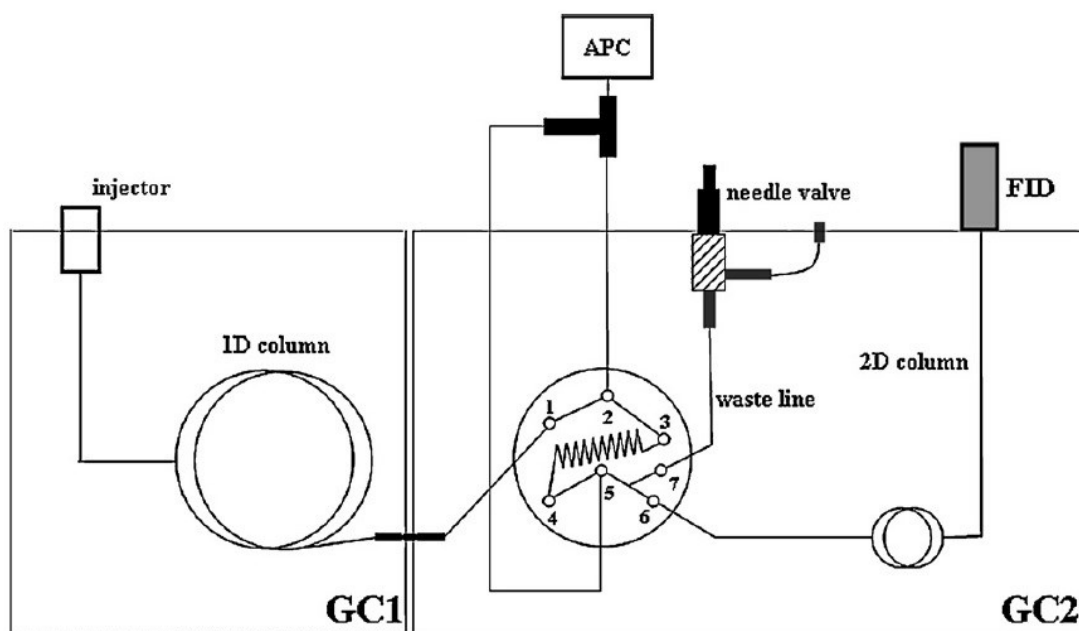
2.6 Varianty pulzního tlakového modulátoru

Na principu PFM bylo publikováno i několik různých změn, které by mohly vést ke zlepšení jeho separační účinnosti. Na konci roku 2011 J. F. Griffith publikoval tzv. reverse-flow differential flow modulátor (Obr. 2.6.1) [42]. Je to vlastně úprava pulzního tlakového modulátoru s tím rozdílem, že obsah skladovací kapiláry se dávkuje z opačného směru tak, aby došlo vždy k úplnému nadávkování obsahu skladovací kapiláry na začátek druhé kolony. Při přeplnění skladovací kapiláry zde přebytný efluent odchází pryč ze systému, ne do druhé kolony jako u klasického zapojení. Tato úprava snižuje riziko zahlcení druhé kolony a tím zlepšuje separační účinnost systému. Mezi hlavní nevýhody však patří přílišná komplikovanost celého systému a velmi obtížné nalezení optimálních pracovních podmínek.



Obr. 2.6.1: Princip reverse-flow differential flow modulátoru. A: plnění skladovací kapiláry, B: dávkování obsahu skladovací kapiláry na druhou kolonu. Obrázek ze článku J. F. Griffith [42].

Na principu sedmicestného ventilu, ke kterému jsou pomocí mikro kanálu připojeny obě kolony, je založen modulátor skupiny prof. Tranchidy (Obr. 2.6.2) [43]. Použitím tohoto modulátoru je dosaženo lepšího tvaru píků, což opět vede k větší separační účinnosti. Hlavní nevýhodou je právě použití ventilu, který se nachází přímo v termostatované části plynového chromatografu a i při použití vysoce kvalitního materiálu má stále určitou teplotní kapacitu (setrvačnost), která ovlivňuje teplotu a tím i analýzy. Navíc opět dochází k mírným časovým prodlevám při přepínání ventilu.



Obr. 2.6.2: Schema loop-type modulátoru skupiny prof. Tranchidy. Obrázek ze článku Tranchida a spol. [43].

2.7 GC×GC-MS

Použití hmotnostních detektorů u GC×GC, jejichž signál bývá občas označován jako čtvrtá dimenze, má svá omezení [44]. Velký důraz je zde kladen na rychlost detektoru kvůli velmi rychlým analýzám na druhé koloně. Pro kvantitativní analýzy je zapotřebí alespoň 7 skenů (bodů) na pík, což u kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru naráží na jeho omezení. Přehledná závislost je uvedena v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Vzájemná závislost maximálního měřeného hmotnostního rozsahu a doby trvání skenu pro různé frekvence sběru dat (při konstantní rychlosti skenu 10 000 m/z/s) při použití kvadrupólu.

Rychlost sběru dat [Hz]	50	33	25	20
Maximální rozsah spektra [m/z]	200	303	400	500
Doba trvání skenu [ms]	20	30,3	40	50

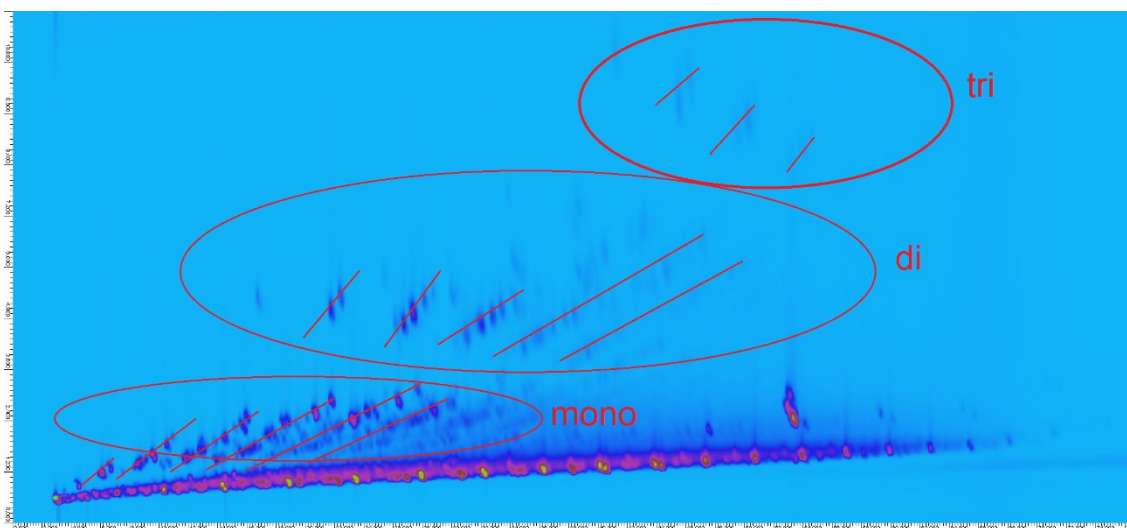
Z tohoto důvodu jsou vhodnými detektory Time-of-Flight (TOF), které mají analyzátoři nejen rychlé (100 Hz i více pro rozsah spektra 1000 m/z), ale lze s nimi dosáhnout i vysokého rozlišení m/z [45]. Ostatní druhy hmotnostní analyzátorů nejsou používány například z důvodu finančních (orbitrap, iontová cyklotronová rezonance) [46, 47].

Ještě více omezené je použití hmotnostní detekce u GC×GC s PFM [48]. Jelikož při použití tohoto druhu modulátoru je průtok mobilní fáze druhou kolonou až desetinásobně vyšší (např. u kolony s průměrem 0,25-0,32 mm to je více než 25 ml/min), nelze k takovému systému připojit hmotnostní detektor přímo z důvodu omezeného čerpacího výkonu vakuového systému. Řešením tedy nutně musí být buď zvýšení čerpacího výkonu vakuového systému, nebo snížení průtoku jdoucího do hmotnostního detektoru [49]. První varianta je technicky obtížná a nákladná, u komerčních přístrojů mnohdy nemožná. V případě druhé možnosti v úvahu připadá buď snížení průměru kolon a kapilár v systému, a tím i výsledného průtoku v něm, nebo u stávajícího systému dávkovat do detektoru pouze část výstupu z druhé kolony (dělič toku). U obou možností dochází ke snížení citlivosti metody z důvodu snížení množství analytu přicházejícího do detektoru. V případě použití kolon s velmi malým průměrem (pod 0,15 mm) je však nutné počítat z důvodu velkého odporu kapilár s vysokým tlakem mobilní fáze na vstupu systému, který by se s rostoucí teplotou dále zvyšoval [50, 51].

2.8 Praktické využití GC×GC

V praxi se můžeme setkat se širokým uplatněním GC×GC. Často používaným přístrojem pro GC×GC je ten s kryogenním modulátorem a s Time-of-Flight hmotnostním analyzátozem (GC×GC-TOF-MS, příkladem je systém Pegasus 4D-C firmy LECO). Toto zapojení vykazuje vysokou robustnost, reprodukovatelnost i opakovatelnost, avšak i vysoké náklady [52].

V některých případech komplexních vzorků může být hledání homologických řad usnadněno právě pomocí GC×GC kvalitativní analýzy. Výhodou je zde právě použití druhé kolony, kde při vyhodnocování chromatogramů převedených na konturové grafy jsou homologické řady patrné na přímkách (Obr. 2.8.1) [99].



Obr. 2.8.1: Konturový GC×GC chromatogram motorové nafty, kde jsou znázorněny mono-, di- a tri-substituované aromatické uhlovodíky a homologické řady. Obrázek pro ilustraci převzat z mé diplomové práce [99].

Na počátcích éry GC×GC byly mezi prvními komplexními reálnými vzorky, u kterých byly kvantitativně stanoveny jejich většinové složky, ropné deriváty [53-55]. V nejčastějších případech se jednalo o stanovení aromatických heterocyklických látek v benzínu [56-60], leteckém petroleji [61] a naftě [62-66]. Tyto aromatické heterocyklické látky můžeme dále rozdělit na sirné, nebo obsahující kyslík a dusík. Při analýzách ropných derivátů, jako jsou benzín, petrolej, letecký petrolej, motorová

nafta či motorové oleje, lze tedy určit nejen kvalitativní zastoupení látek, ale také jejich množství [67-69].

Mezi jeden ze způsobů, jak porovnávat pohonné hmoty mezi sebou, patří jejich srovnání z hlediska obsahu sirných produktů pocházejících z ropy. Ty mají zásadní vliv na kvalitu daného paliva, protože usazováním těchto látek a především jejich zplodin v motorech dochází ke snižování výkonů motorů. Navíc jejich spalováním vznikají zplodiny poškozující katalyzátory výfukových soustav. Hmotnostní obsah síry se u surové ropy pohybuje v rozmezí 0,5-3,0 % v závislosti na jejím původu. Nejčastěji se jedná o thiofeny, benzothiofeny, dibenzothiofeny a benzonaftothiofeny [70].

S využitím GC×GC se můžeme dále setkat při analýze látek v potravinách [71, 72], dále se provádějí analýzy přírodních olejů a tuků [73, 74], analýzy pesticidů [75], vonných olejů [76-78], alergenů v parfémeh [79] či životním prostředí [80-83].

GC×GC lze použít i ve farmaceutickém průmyslu [84] či v kombinaci s SPME jako účinný nástroj pro detekci markerů rakoviny plic z dechu pacienta [85].

2.9 Fosfolipidy

Měření těchto látek bylo v naší laboratoři uskutečněno díky spolupráci s Katedrou genetiky a mikrobiologie Univerzity Karlovy. Jejich výzkum fosfolipidů jako hlavní složky cytoplazmatické membrány u gram-pozitivní tyčinkovité bakterie *Bacillus subtilis* vedl k úzké spolupráci s naší GC laboratoří, kde byly nejdříve měřeny jednotlivé části fosfolipidů [86-88]. Pomocí fosfolipázy C byly tyto velké molekuly štěpeny na nepolární části (mastné kyseliny) a polární fosforylované části. Podle jejich zastoupení v cytoplazmatické membráně lze získat přehled o odpovědích bakterie na stresové prostředí. Pro svoji komplikovanou polaritu (polární a nepolární část molekuly) byly tyto analyty vybrány jako modelové vzorky pro demonstraci funkce modulátoru.

Fosfolipidy patří mezi složené lipidy obsahující fosfor a jsou hlavní částí všech buněčných membrán spolu s glykolipidy, cholesteroly a bílkovinami. Jsou to amfipatické molekuly s hydrofobním acylovým řetězcem a hydrofilní polární částí. Jejich základní strukturou je glycerolový skelet, na který jsou navázány dvě mastné kyseliny a kyselina fosforečná. Tato struktura může být dále esterifikovaná např. cholinem, ethanolaminem,

glycerolem nebo serinem. Fosfolipáza C štěpí regioselektivně vazbu mezi glycerolem a kyselinou fosforečnou [89-91].

2.10 Obranné látky ploštic

Skupina profesora Pavla Štyse na Katedře biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy se mimo jiné zabývá výstražnými a obrannými látkami ploštic (*Heteroptera*). V rámci spolupráce byly analyzovány jejich obranné látky pomocí SPME GC-MS [92] a GC×GC-FID/MS.

Ploštice (Hemiptera: Heteroptera) vytváří pro svou obranu před predátory těkavé sekrety, které obsahují velké množství látek různé polarity. Obsahují různé zastoupení alkoholů, aldehydů, nerozvětvených alkanů, ketonů, kyselin a jejich esterů. Složení vždy závisí na pohlaví, vývojovém stádiu jedince, jeho potravě či ročním období [93-98].

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Použitými chemikáliemi byly pentan, hexan, heptan, dekan, toluen, aceton, acetonitril, 2,2,4-trimethylpentan, 2-methoxy-2-methylpropan, diethylether, dichlormethan, trichlormethan, methanol, ethanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, methylacetát, ethylacetát, *tert*-butylacetát. Vše zakoupeno u firmy Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) v p.a. čistotě.

3.2 Přístrojové vybavení

Část práce byla provedena na plynovém chromatografu GCMS-2010 s plamenově ionizačním detektorem a část na plynovém chromatografu GCMS-2010 vybaveného hmotnostním detektorem (kvadrupól, QP2010 Plus) a plamenově ionizačním detektorem (oba dva přístroje od Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko). Druhý chromatograf byl doplněný kryofokusačním modulem pro GC×GC (ZOEX, Houston, USA). Nosným plynem byl nejprve dusík (99,999 % Linde Technoplyn, Česká republika) a následně helium (99,999 % Linde Technoplyn, Česká republika).

Měření byla uskutečněna na kolonách v přehledu Tabulky č. 2.

Tabulka č. 2: Použité kolony.

Výrobce	Název kolony	Délka [m]	Vnitřní průměr [mm]	Tloušťka filmu [μm]
J&V, USA	HP-5MS	60	0,25	0,25
	DB-5MS	30	0,25	0,25
		15	0,25	0,25
Supelco, USA	Supelcowax 10	2	0,25	0,25
		1	0,25	0,25
Chrompack, USA	CP-Sil 5CB	10	0,15	0,12
Restek, USA	Rtx-200	20	0,15	0,15
	Rxi-5sil MS	20	0,15	0,15
		2	0,25	0,25
	Stabilwax	20	0,15	0,15

Všechny použité kapiláry (vše Supelco, USA) byly nepokryté a jsou zobrazeny v Tabulce č. 3:

Tabulka č. 3: Použité kapiláry.

Účel kapiláry	Délka [cm]	Vnitřní průměr [mm]
Pomocná č. 1	40	0,32
	40	0,25
Pomocná č. 2	40	0,25
	50	0,32
	150	0,32
	10	0,32
Skladovací	35	0,32
	35	0,25
	70	0,25
	100	0,25
Z děliče toku	50	0,10
	30	0,25

Spojovací prvky SilFlowTM (SGE Analytical Science, Australia) byly později vyměněny za křemenné kusy (Fused Silica „Y“ Connector, Supelco, PA, USA). Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v LabSolution (GC solution 2.53, Shimadzu) a GC Image 2.0 (Zoex, Houston, USA).

Ventily (225T011 2wNC 12vdc, NResearch, NJ, USA) a vedení plynu (Swagelok, Ohio, USA) byly v laboratoři již připraveny, elektronická krabice (první typ: U-KK12-231, EZK; reprezentativní: Hliníková přístrojová krabička U-16-9) a veškerá elektronika (rezistory, kondenzátory, krystaly, svorkovnice, fotosenzitivní plošné spoje, monochromatický alfanumerický maticový LCD displej s řadičem, dutikové lišty, oboustranné kolíky, uhlíkový trimr) byly zakoupeny u firmy GME electronic v Praze.

Tlakové regulátory byly Model 4000 (Parker Hannifin, PA, USA).

Pro míchání směsi byla použita třepačka (Vortexgenie 2, Scientific Industrie, Hampshire, Velká Británie).

K pipetování vzorků sloužily automatické pipety 1-10 µl, 20-200 µl a 100-1000 µl (Biohit, Helsinky, Finsko). K dávkování do plynového chromatografu byl použit autosampler AOC-20i (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) se stříkačkami o objemech 0,5 a 10 µl (Hamilton, Reno, USA).

3.3 Příprava směsi analytů

Byly připraveny celkem dvě směsi látek na testování modulátoru. Směs 11 obsahovala tyto látky: hexan, heptan, butyl-methyl ether, ethylacetát, *tert*-butylacetát, 2,2,4-trimethylpentan, 1-oktanol, 2-propanol, 2-methylpropanol, aceton a toluen. Směs 17 obsahovala tyto látky: pentan, hexan, heptan, toluen, aceton, acetonitril, 2,2,4-trimethylpentan, 2-methoxy-2-methylpropan, dichlormethan, trichlormethan, ethanol, 2-propanol, 2-methylpropanol, 1-butanol, methylacetát, ethylacetát, *tert*-butylacetát. Vždy bylo pomocí automatické pipety odměřeno přesně 1000 μ l každé látky do skleněné lahvičky, lahvička uzavřena víčkem a směs byla poté důkladně promíchána na třepačce. Pro měření na GC $\times$ GC-FID byla směs měřena nezředěná, při měření na GC $\times$ GC-MS byla směs naředěna do dekanu v poměru 1:10 000 (v/v).

3.4 Reálné vzorky

Byly měřeny tyto vzorky: benzín Natural 95 (Shell, benzínová stanice Šumperk, listopad 2012), petrolej (Severochema, Liberec, 1990), motorová nafta (Shell, benzínová stanice Šumperk, listopad 2012), Sheron (nemrznoucí přísada do nafty, Shell), toxikologické vzorky (získány z Oddělení toxikologie, Ústavu soudního lékařství a toxikologie, VFN v Praze; jedná se o kyselý extrakt v ethylacetátu ze séra) a extrakty levandule (celkem tři vzorky: reálný extrakt získaný extrakcí vodní parou od JERGYM Liberec a dva zakoupené vonné oleje do aromatické lampy firmy Pajoma a privátní značky drogerie DM).

3.4.1 Analýza fosfolipidů

1 mg fosfolipázy C (izolát z bakterie *Bacillus cereus*, 73 IU/mg, Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) byl rozpuštěn v 1 ml 1 mmol/l roztoku uhličitanu amonného o pH 7,3 a 100 μ l toho roztoku bylo pipetováno do vialky se vzorkem, který byl získán od Katedry genetiky a mikrobiologie. Hydrolýza trvala 3 hodiny při teplotě 37 °C v ultrazvukové lázni a poté následovaly tři po sobě jdoucí extrakce 200 μ l hexanu. Spojené organické fáze byly odpařeny pod proudem dusíku. Zbývá vodná fáze

po extrakci hexanem (polární část) byla přibližně na polovinu objemu zbavena vody ohřátím pod proudem dusíku a silylována. Bylo připipetováno 400 μ l směsi HMDS (Hexamethyldisilazane, Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) a acetonitrilu v poměru 1:1 (v/v) a vialka umístěna do termostatu na 40 min při 90 °C bez uzavěru. Poté bylo ke směsi přidáno 50 μ l acetonitrilu a 50 μ l BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamid BSTFA, Supelco, Bellefonte, USA) a vzorek už s uzavřeným uzávěrem byl umístěn na 60 min do termostatu při 75 °C.

Při přípravě methylesterů mastných kyselin bylo k odparku po extrakci hexanem přidáno 200 μ l derivatizačního roztoku methanolátu sodného. Ten byl připraven rozpuštěním 2 g hydroxidu sodného (p.a. čistota, Penta, Česká republika) ve 100 ml methanolu. Po 5 min byl roztok zneutralizován přidáním 38% HCl (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo). Následně bylo ke vzorku přidáno 10 μ l acetylchloridu (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) a reakční směs byla ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Poté následovaly tři extrakce 200 μ l pentanu. Spojené organické fáze byly odpařeny pod proudem dusíku a připravené methylestery byly rozpuštěny ve 100 μ l heptanu.

Měření na GC byla provedena za těchto podmínek: dávkováno bylo 0,5 μ l vzorku, teplota injektoru 280 °C, teplota transfer line do MS 220 °C, teplota iontového zdroje 200 °C. Hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z maximální rychlostí 10000 m/z/s. Teplotní program: počáteční teplota 100 °C byla zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C a poté nechána izotermálně 1 min. Doba analýzy byla 15 min.

Pro GC×GC byly použity jako první kolona (Rxi-5Sil MS 20 m $\times$ 0,15 mm $\times$ 0,15 μ m), jako druhá kolona (Supelcowax 10 5 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m), jako skladovací kapilára (35 cm $\times$ 0,25 mm) a pomocné kapiláry (40 cm $\times$ 0,32 mm).

3.4.2 Analýza obranných látek ploštic

Odběr těkavých látek probíhal na druhu ploštic *Pyrrhocoris apterus* pomocí metody SPME na vláknu CAR/PDMS/DVB. Ploštice byla umístěna do 50ml skleněné injekční stříkačky a mírně (neletálně) stlačena pístem. Při tomto podráždění bylo čichem ověřeno

uvolnění sekretů, koncem stříkačky bylo protaženo SPME vlákno a plošnice ponechána ve stříkačce v inkubátoru při 40 °C po dobu 90 minut. Poté následovalo rychlé manuální dávkování (1 minuta desorpce) do GC.

Měření na GC byla provedena za těchto podmínek: dávkování 1 min spittless, teplota injektoru 250 °C, teplota transfer line do MS 250 °C, teplota iontového zdroje 200 °C. Hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 35-500 m/z. Teplotní program: počáteční teplota 35 °C (po 3 min) byla zvyšována rychlostí 5 °C/min na 130 °C a poté 20 °C/min na 250 °C nechána izotermálně 5 min. Doba analýzy byla 32 min.

Pro GC×GC byly použity jako první kolona (Rxi-5Sil MS 20 m × 0,15 mm × 0,15 μm), jako druhá kolona (Supelcowax 10 5 m × 0,25 mm × 0,25 μm), jako skladovací kapilára (35 cm × 0,25 mm) a pomocné kapiláry (40 cm × 0,32 mm).

3.5 GC×GC-FID

Měření na plynovém chromatografu GC-2010 s plamenově ionizačním detektorem (FID) s dusíkem jako mobilní fází byla provedena za těchto podmínek: sběr dat 200 Hz, časová konstanta zesilovače 10 ms, teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 280 °C, vypnutý gas saver, nastavení konstantního vstupního tlaku do kolony, split poměr nastaven na 1:100, objem dávkovaného vzorku 1 μl. U plamenově ionizačního detektoru byla průtoková rychlost vzduchu 400 ml/min, vodíku 40 ml/min a make-up dusíku 20 ml/min.

Měření s heliem jako mobilní fází byla provedena za stejných podmínek jako při měření s dusíkem, ale u plamenově ionizačního detektoru byla průtoková rychlost vodíku nastavena na 20 ml/min a make-up dusíku 10 ml/min.

3.6 GC×GC-MS

Měření na plynovém chromatografu GC-2010 s hmotnostním detektorem (MS) s heliem jako mobilní fází byla provedena za těchto podmínek: teplota detektoru 200 °C, teplota transfer line do MS 250 °C, teplota injektoru 280 °C, měření ve scan modu

v rozsahu 33-275 m/z při rychlosti 50 spekter za sekundu, vypnutý gas saver, nastavení konstantního vstupního tlaku do kolony, split poměr nastaven na 1:100, objem dávkovaného vzorku 0,1 μ l. Reálné vzorky pro měření bylo nutno naředit do dekanu v poměru 1:10 000 (v/v).

3.7 GC×GC-FID+MS

Měření na plynovém chromatografu GC-2010 s FID a MS s heliem jako mobilní bylo použito stejných podmínek jako měření v kapitole 3.5 a 3.6. Pouze byl konec druhé kolony připojen na dělič toku-splitter (Splitter 022ID C, P/N 123632, SGE Analytical Science, Australia), ze kterého vedly dvě nepokryté kapiláry k jednotlivým detektorům: 50 cm $\times$ 0,1 mm do MS a 30 cm $\times$ 0,25 mm do FIDu.

3.8 GC×GC-MS + kryofokusace

Měření na plynovém chromatografu GC-2010 s MS s heliem jako mobilní fází bylo použito stejných podmínek jako měření v kapitole 3.6. První kolona byla Rxi-5sil MS (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m), druhá Supelcowax 10 (2 m $\times$ 0,1 mm $\times$ 0,1 μ m) a jako skladovací smyčka byl použit další 1 m druhé kolony. Čas pulzu horkého dusíku byl 375 ms a studeného 3625 ms. Jako chladivo byl použit kapalný dusík (99,999 % Linde Technoplyn, Česká republika).

3.9 Sestavení pulzního tlakového modulátoru

Během měření na tuto dizertační práci byly navrženy a postaveny celkem tři typy řídicí jednotky pro GC×GC modulátor. K jednotlivým typům blíže v oddílu 4 Výsledky a diskuze.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Modulátor

Dizertační práce byla naplánována souběžně s řešením uděleného grantu GAUK č. 894513 s názvem Nový pulzní tlakový modulátor pro komprehenzivní plynovou chromatografii. Ten byl rozplánován pro řešení na následující roky následovně:

- 1) Odstranění nedostatků a vylepšení současného prototypu pulzního tlakového modulátoru
- 2) Optimalizace pracovních podmínek
- 3) Porovnání modulátoru s komerčním
- 4) Modifikace modulátoru pro použití s MS detektorem

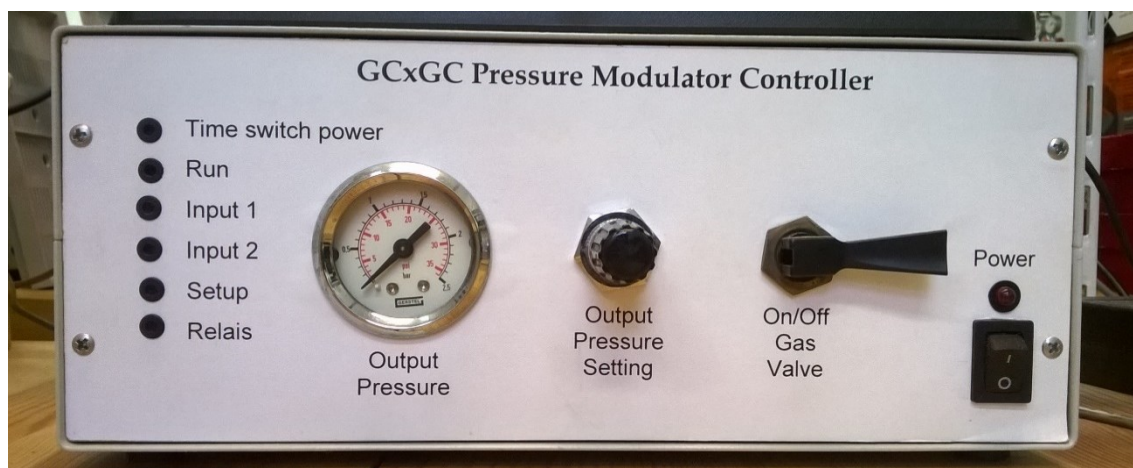
Jelikož se modulátor skládá z více částí, je potřeba tyto části přesně definovat. Jako řídicí jednotka bude dále označen přístroj, který kombinuje vedení plynu, jeho tlakové a časové nastavení. Jako řídicí elektronika bude dále označováno elektronické zařízení umožňující odečítat tlak plynu z tlakových senzorů a nastavovat časování jednotlivých ventilů. Dále modulátor zahrnuje externí část sestávající ze dvou dvoucestných ventilů umístěných nad kolonovým termostatem a soustavy kapilár a jejich spojek v kolonovém termostatu plynového chromatografu (Obr. 2.5.1).

Byly navrženy a postaveny tři typy řídicích jednotek pro GC×GC modulátor. První typ (dočasná řídicí jednotka, kapitola 4.1.5) byl vylepšením stávající z diplomové práce, druhý typ byl kompletně předělaný (postavený ve dvou kusech; druhý kus byl nainstalován do laboratoře plynové chromatografie na Katedře analytické chemie, Univerzita Pardubice) a třetí typ byl shodný s druhým, jen byl postaven pro prezentaci na výstavách.

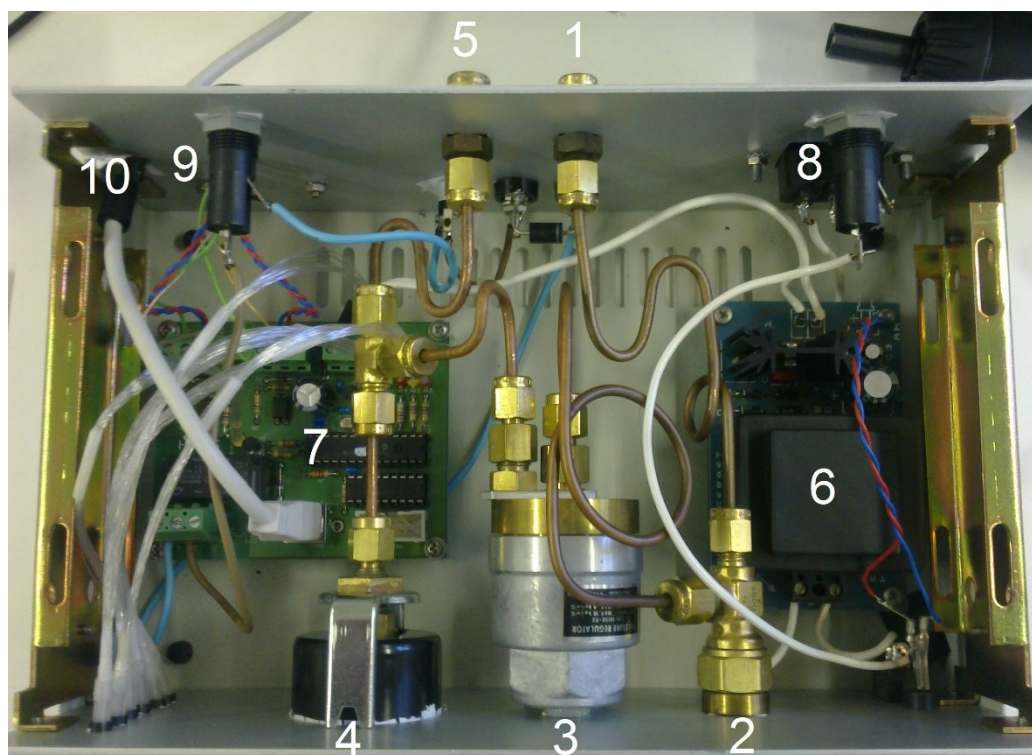
4.1.1 Sestavení řídicí jednotky

Princip modulátoru vychází z článku Amirava a kol. [35], kdy je efluent z první kolony zachycen ve skladovací kapiláře a v přesně určený čas nadávkován na začátek druhé kolony. K zachytávání a dávkování efluentu je využito tlaku a průtoku plynu (stejný jako mobilní fáze) z externího zdroje přiváděného do modulátoru pomocí kapilár. Pro správnou funkci modulátoru je potřeba řídit čas a tlak plynu, proto k tomuto

účelu byla při měření na mou diplomovou práci (zabývala se GC×GC [99]) sestrojena velmi jednoduchá řídicí jednotka (Obr. 4.1.1 a Obr. 4.1.2). Ta však vykazovala určité nedostatky a byla proto kompletně předělána tak, aby byly všechny získané poznatky z diplomové práce použity pro zjednodušení a zefektivnění její práce.



Obr. 4.1.1: Přední panel původní řídicí jednotky používané při měření v rámci diplomové práce.



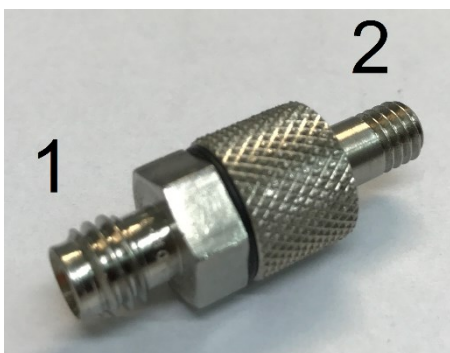
Obr. 4.1.2: Vnitřní uspořádání původní řídicí jednotky: (1) vstup plynu, (2) uzávěr plynu, (3) tlakový regulátor, (4) ručičkový manometr, (5) výstup plynu, (6) trafo na 12 V, (7) elektronické časovací relé, (8) vstup 230 V, (9) výstup 12 V, (10) komunikace se softwarem na PC pro řízení relé přes USB.

Došlo k úplné přestavbě stávající řídicí jednotky (Obr. 4.1.3). Předchozím používáním řídicí jednotky bylo zjištěno, že stávající nastavování tlaku pomocí tlakového regulátoru a ručičkového manometru je pro použití modulátoru značně nepřesné a nereprodukovatelné. Dále bylo velmi nepraktické provádět změny průtoku mobilní fáze v pomocné kapiláře 1 pouze pomocí rozměrů této kapiláry. V případě nutnosti výměny kolon za kolony jiných rozměrů to vždy znamenalo i výměnu pomocných kapilár.

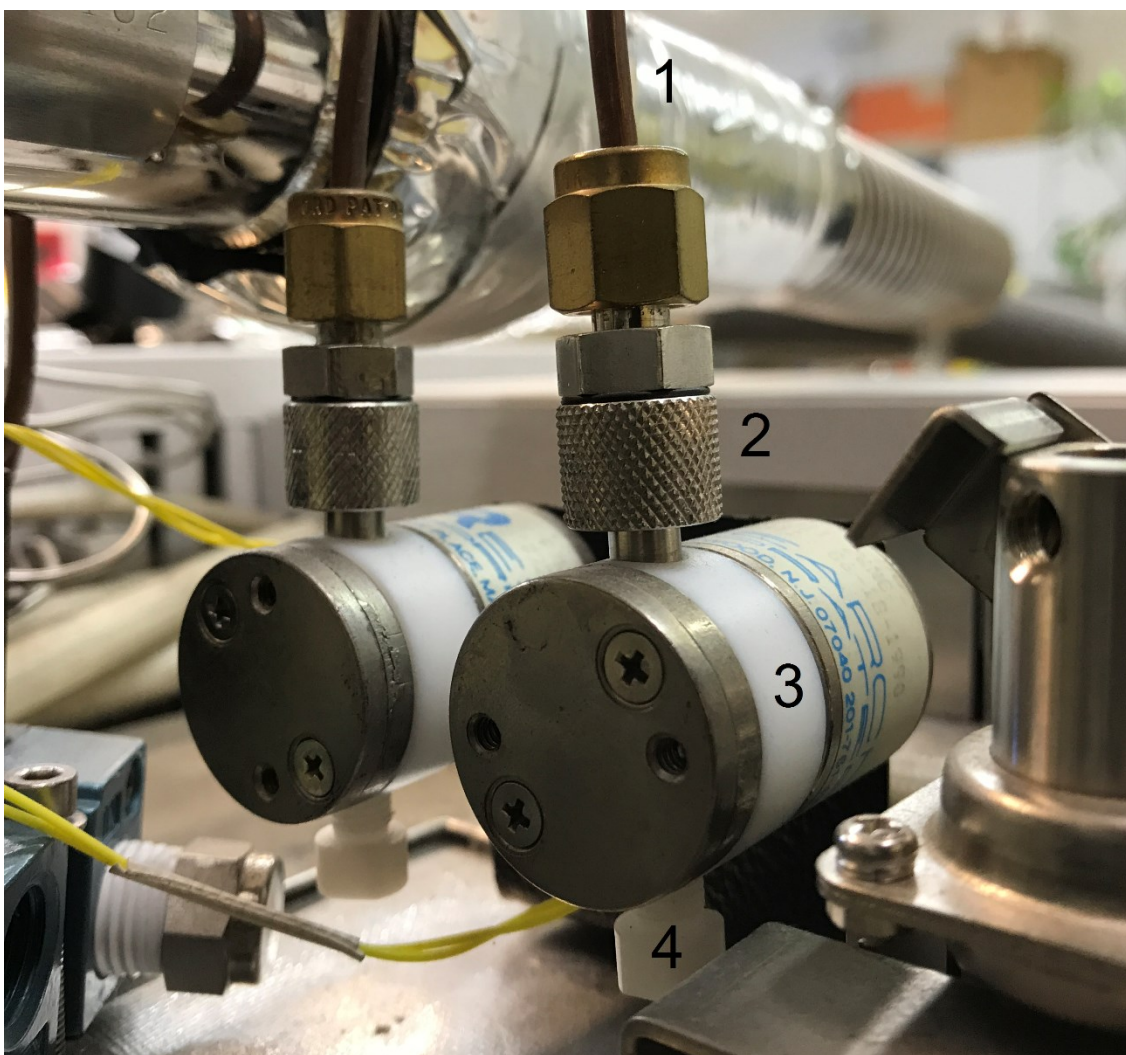


Obr. 4.1.3: Sestavování řídicí jednotky.

Ručičkový manometr spojený s mechanickým tlakovým regulátorem pro nastavení tlaku trojcestného ventilu byl nahrazen dvěma analogovými tlakovými senzory a dvěma velmi přesně nastavitelnými tlakovými regulátory (Obr. 2.5.1). Ty byly spojeny nejdříve teflonovými hadičkami se dvěma externími dvoucestnými ventily. Postupem času však byly tyto hadičky nahrazeny měděnými trubičkami pro klasické vedení plynu z důvodu zabránění difuze kyslíku ze vzduchu přes stěnu hadičky do mobilní fáze. Toto bylo zjištěno později při použití hmotnostního detektoru, kde se po delší odstávce měření (např. po víkendů) zvýšil šum způsobený plyny okolního vzduchu v hadičkách. Pro napojení vedení plynu do ventilu byly vysoustruženy zcela nové závity na spojky, které kombinovaly závit Swagelok a závit do ventilu (Obr. 4.1.4). Tímto bylo dosaženo spojení mezi přívodem plynu a ventilem, které při nastavených tlacích vykazovalo dobrou těsnost (Obr. 4.1.5).

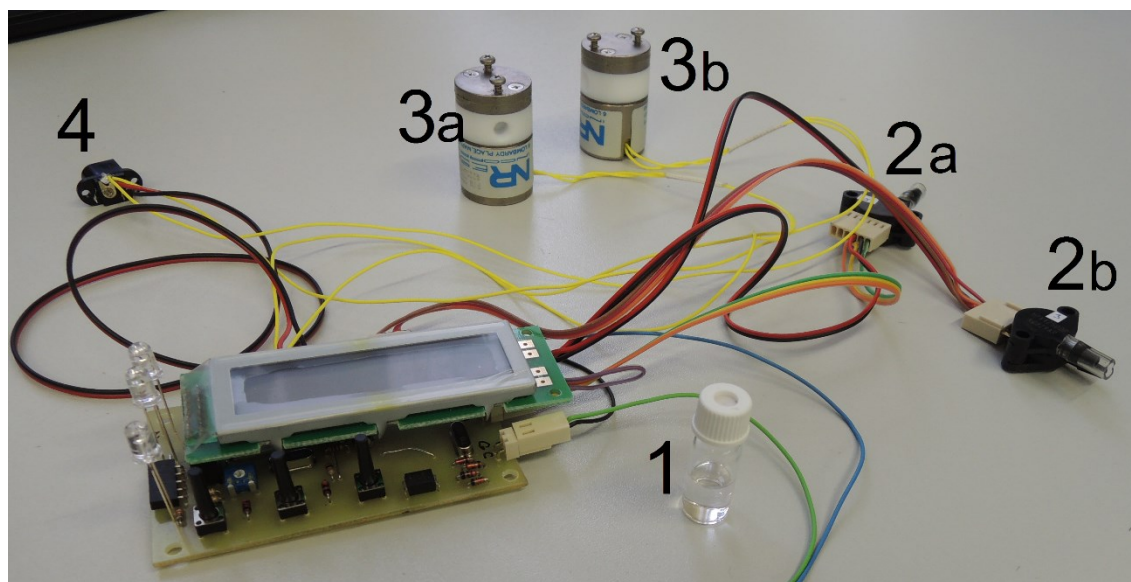


Obr. 4.1.4: Spojka kombinující závit Swagelok (1) a závit do ventilu (2).



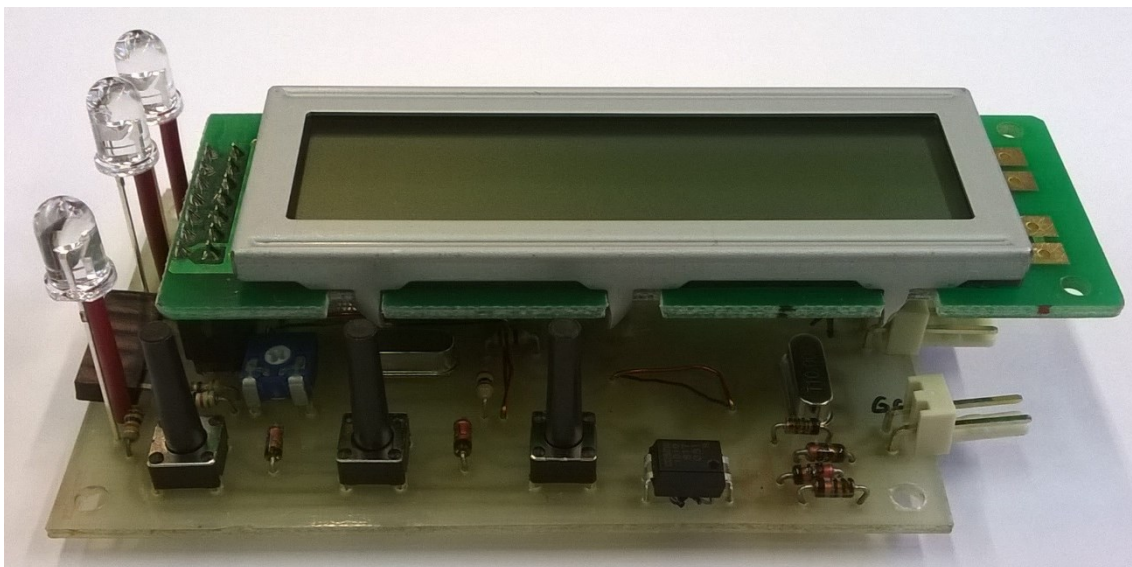
Obr. 4.1.5: Detail ventilu napojeného pomocí spojek ke zdroji nosného plynu v měděném vedení: (1) připojení vedení plynu, (2) nová spojka, (3) ventil, (4) napojení kapiláry z modulátoru do ventilu.

Přepínací relé pro časování doby otevření jednotlivých cest v trojcestném ventilu bylo nahrazeno novým elektronickým zařízením, ve kterém procesor řídí časování obou dvoucestných ventilů (ventily se vždy střídaly v otevření; když byl první otevřen, byl druhý uzavřen a naopak) a zároveň zobrazoval na jeho LCD displeji tlaky ze senzorů, které byly připojeny na vedení plynu k ventilům (Obr. 4.1.6).

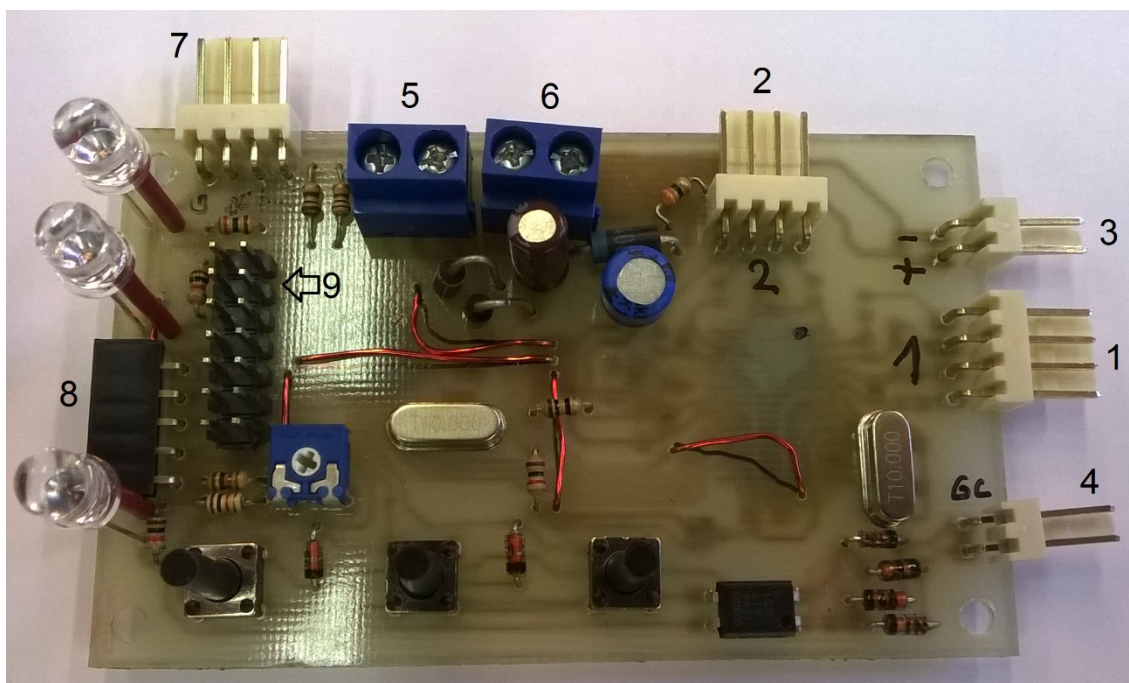


Obr. 4.1.6: Porovnání velikosti řídicí elektroniky se standardní 1,5ml vialkou (1). Dále jsou vidět připojené dva tlakové senzory (2a a 2b), dva dvoucestné ventily (3a a 3b) a konektor pro připojení zařízení k 12V zdroji (4).

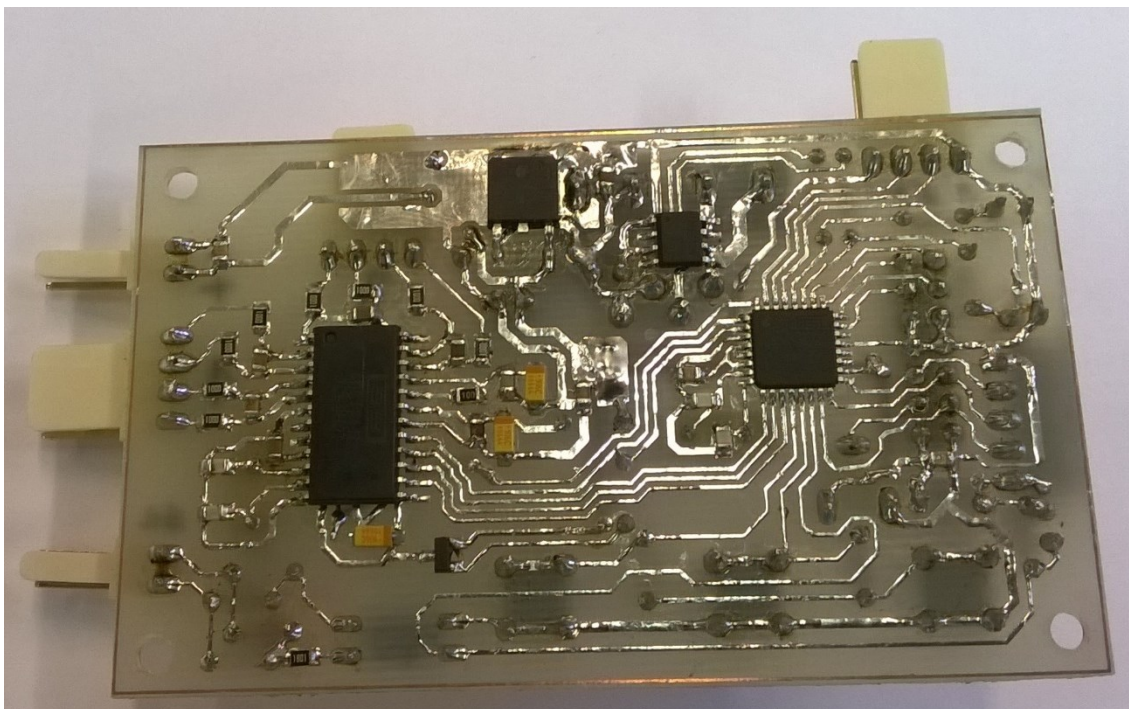
Řídicí elektronika byla kompletně navržena a sestavena pro použití do modulátoru panem RNDr. Miloslavem Semlerem, Ph.D. Jedná se o jednovrstvý leptaný plošný spoj o velikosti 5×10 cm, který obsahuje LCD displej a 32 bitový procesor, do kterého je naprogramován řídicí firmware (Obr. 4.1.7-4.1.9).



Obr. 4.1.7: Celkový pohled na řídicí elektroniku včetně připojeného LCD displeje.

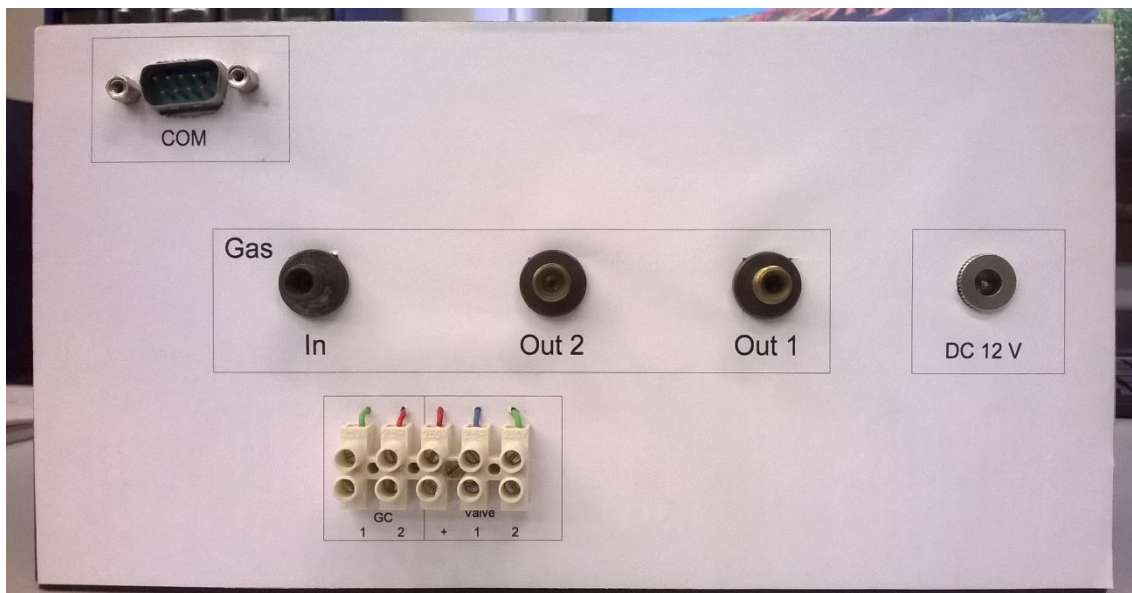
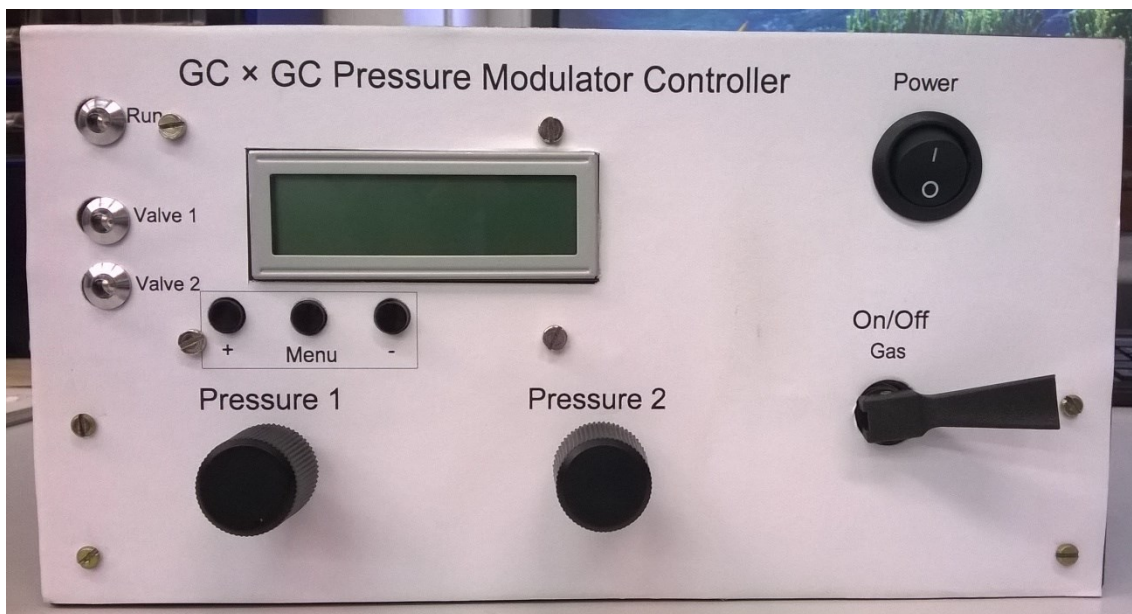


Obr. 4.1.8: Přední strana plošného spoje řídicí elektroniky bez LCD displeje. Konektory pro připojení: (1) tlakový senzor č. 1, (2) tlakový senzor č. 2, (3) napájecí zdroj 12 V, (4) analogový výstup z plynového chromatografu, (5) ventil č. 1, (6) ventil č. 2, (7) COM port pro komunikaci s PC, (8) přímý vstup do procesoru k update firmwaru, (9) LCD konektor.

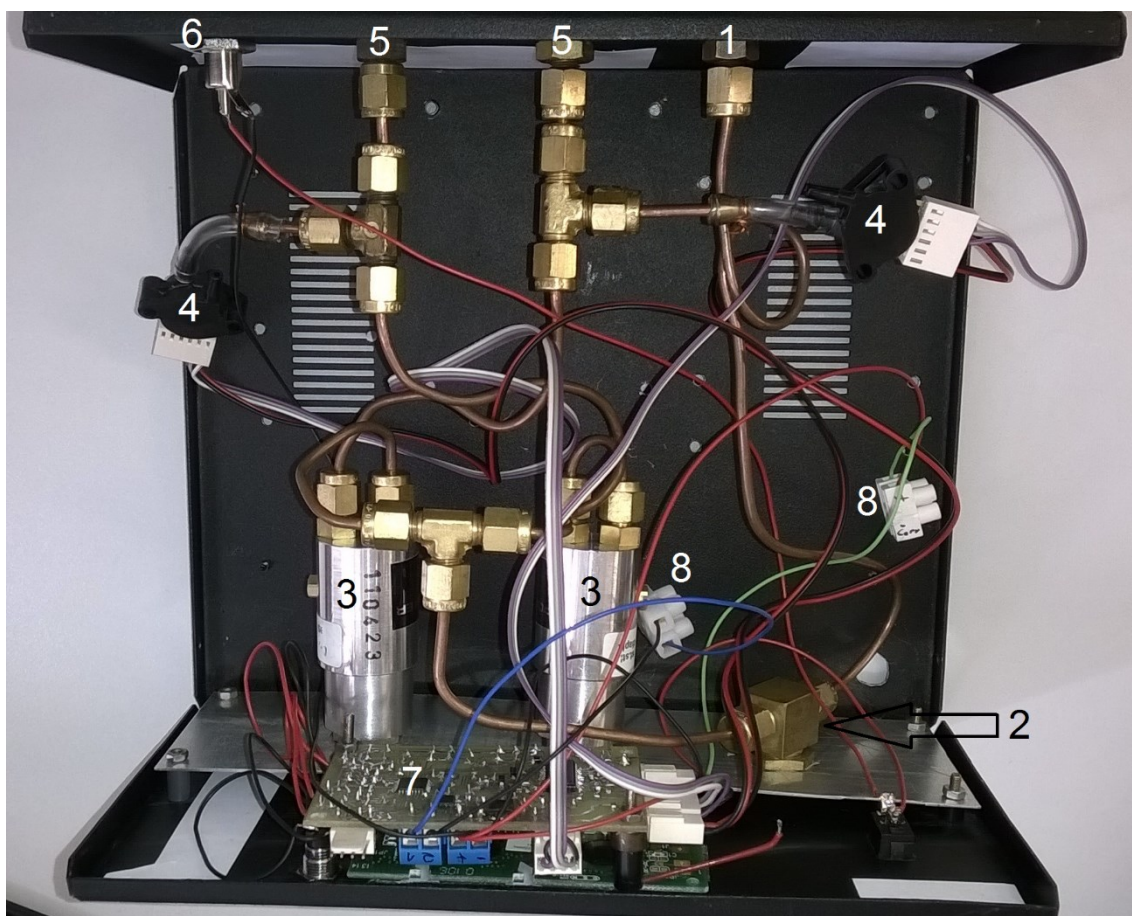


Obr. 4.1.9: Zadní strana plošného spoje řídicí elektroniky.

Časování jednotlivých ventilů lze nastavit pomocí tlačítek na řídicí jednotce a pomocí mechanických regulátorů tlaku lze nastavit odpovídající tlaky plynu procházející do modulátoru. Oproti původní řídicí jednotce byly vynechány dva různé interní napájecí zdroje. Původní řídicí jednotka byla připojena k síti na 230 V, kde 12V napájecí zdroj v ní byl určen pro ventily a 6V napájecí zdroj pro relé. Nyní je celá řídicí jednotka napájena pouze externím zdrojem 12 V, protože řídicí elektronika již byla pro toto napětí uzpůsobena. Tím došlo nejen k úspoře místa v krabici řídicí jednotky, ale i zvýšení bezpečnosti, aby případné probíjení do plechové krabice již nepředstavovalo riziko úrazu (Obr. 4.1.10 a 4.1.11).



Obr. 4.1.10: Přední a zadní strana nové řídicí jednotky.



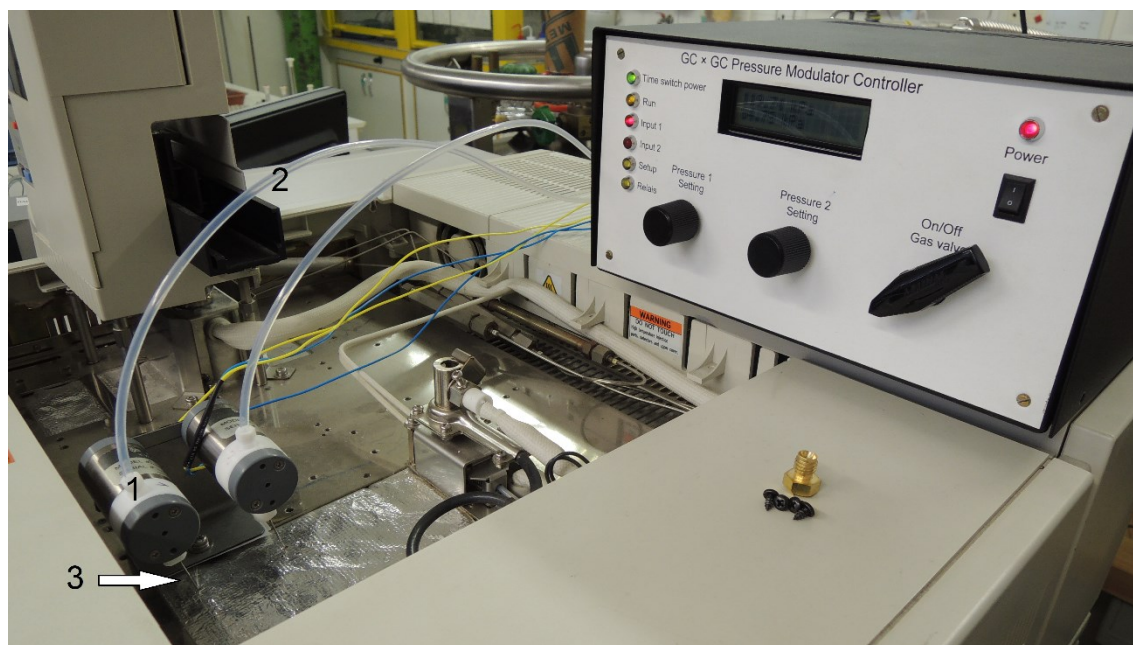
Obr. 4.1.11: Vnitřní uspořádání nové řídicí jednotky: (1) vstup plynu, (2) uzávěr plynu, (3) tlakový regulátor, (4) senzor tlaku, (5) výstup plynu, (6) vstup 12 V, (7) řídicí elektronika, (8) koncovky pro el. připojení ventilů.

Řídicí elektronika v řídicí jednotce byla propojena s analogovým výstupem (označeným jako Rele 92) na plynovém chromatografu pro synchronizaci doby nástřiku vzorku a tím začátku modulace.

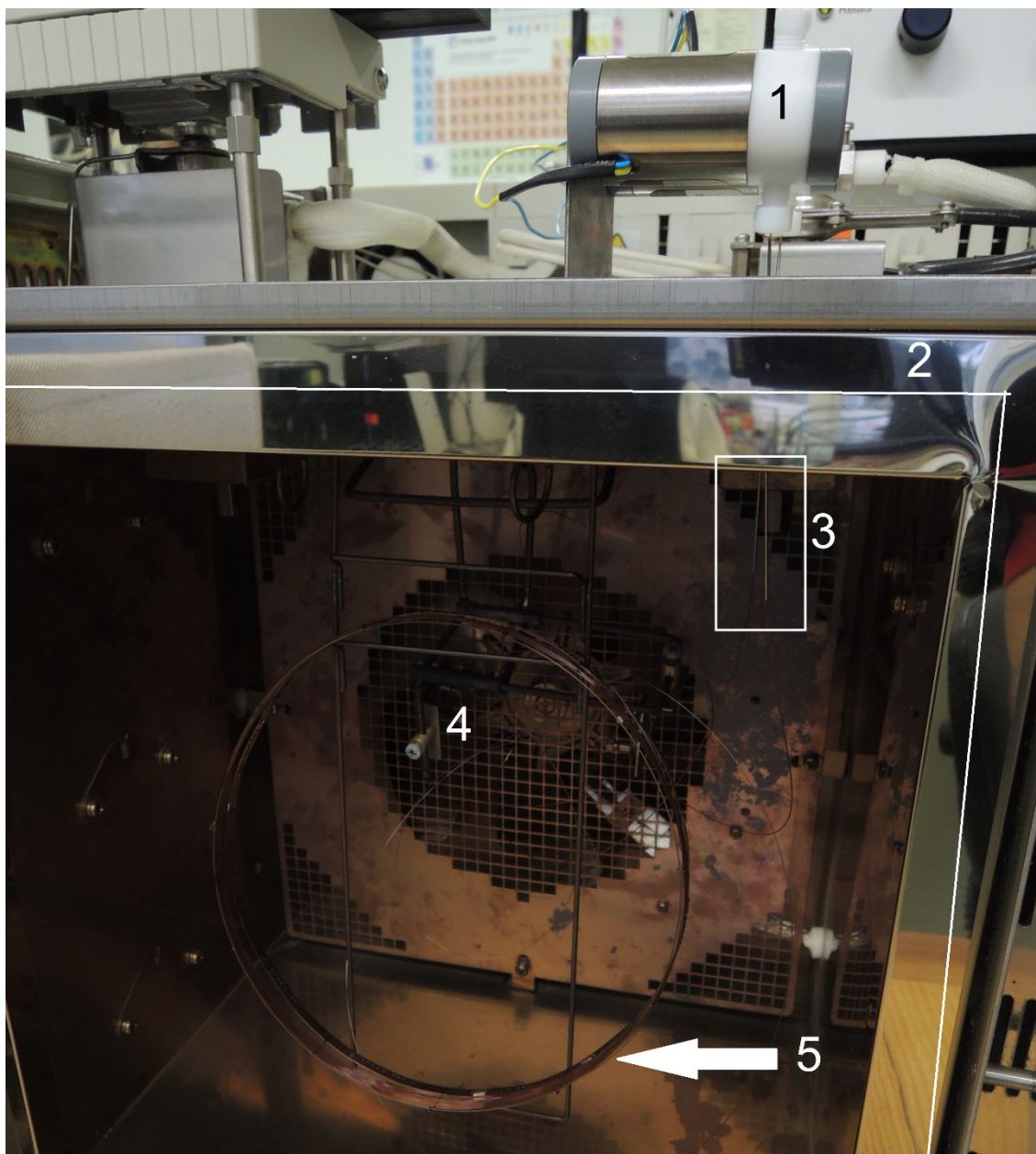
4.1.2 Sestavení modulátoru

Řídicí jednotka byla umístěna na horní část plynového chromatografu a byla připojena ke zdroji helia, přes 12V externí zdroj k elektrické energii a pomocí dvou slabých kabelů k Rele 92 na výstupu z plynového chromatografu. Ventily byly přišroubovány na horní plechovou kostru kolonové pece plynového chromatografu tak, aby mohly být shora připojeny vedením plynu k řídicí jednotce. Horní stěnou kolonové

pece plynového chromatografu byly protaženy úzké ocelové trubičky z jehel lékařských stříkaček tak, aby skrz ně mohly vést obě pomocné kapiláry z ventilů do spojovacích prvků kolon (Obr. 4.1.12 a 4.1.13).



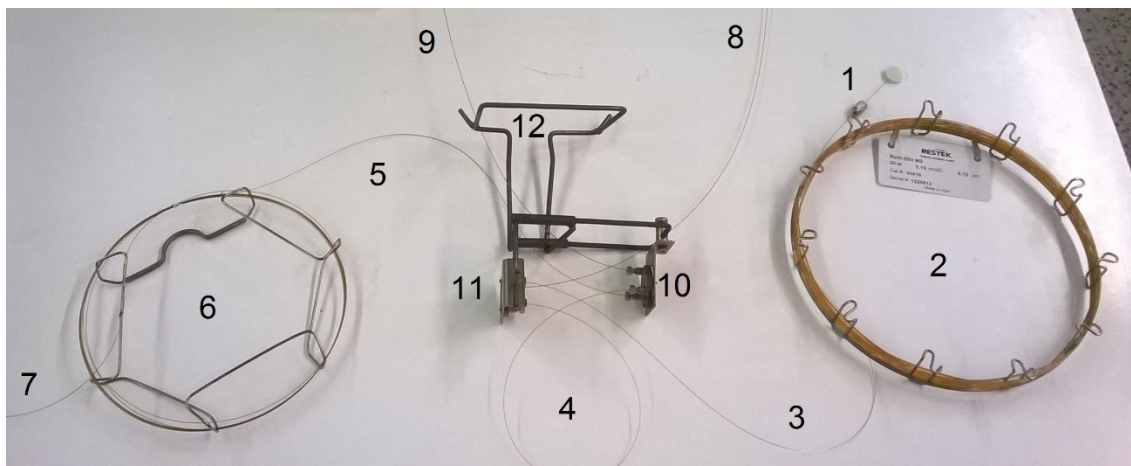
Obr. 4.1.12: Pohled na umístění řídicí jednotky (dočasná, viz kapitola 4.1.5) na plynovém chromatografu. V levém dolním rohu fotografie lze vidět dva dvoucestné ventily (1), kde je přívod mobilní fáze z řídicí jednotky ještě původně veden pomocí teflonových hadiček (2). Ze spodní části ventilů vystupují křemenné kapiláry vedoucí do pece kolon skrze její stěnu (3).



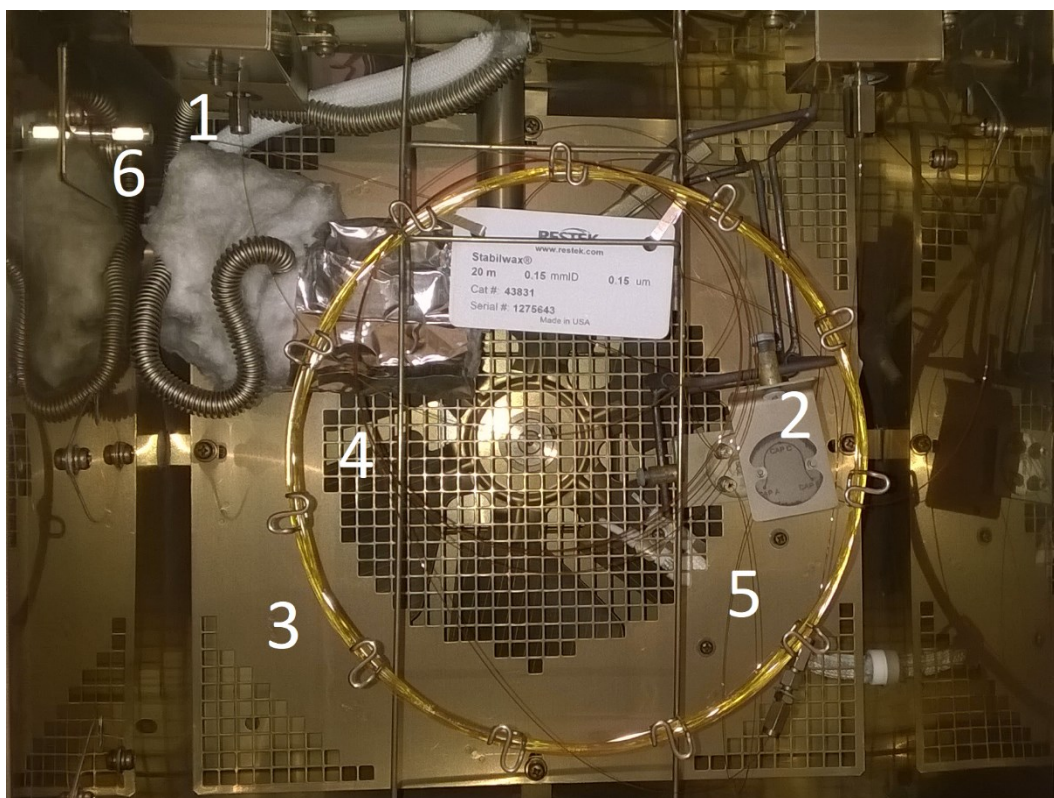
Obr. 4.1.13: Pohled na umístění ventilů (1) na horní části plynového chromatografu (GC-FID) (termostatovaná část pro kolony (2)), kde jsou skrz jehly (3) vedeny pomocné kapiláry do spojovacích prvků modulátoru (4). Dále je patrná první kolona (5).

První spojovací prvek spojoval I. kolonu, skladovací kapiláru a pomocnou kapiláru 1. Druhý spojovací prvek spojoval II. kolonu, skladovací kapiláru a pomocnou kapiláru 2. V prostoru kolonového termostatu plynového chromatografu byly spojovací prvky přichyceny na visící drátěnou konstrukci, která byla vyrobena pro tento účel v dílně Chemického ústavu. Všechny části (obě kolony, spojovací prvky, skladovací

kapilára) tvoří celek, který lze v případě jakékoliv manipulace s modulátorem vyjmout, což velmi usnadnilo časté vyměňování kolon při optimalizaci. (Obr. 4.1.14 a 4.1.15).



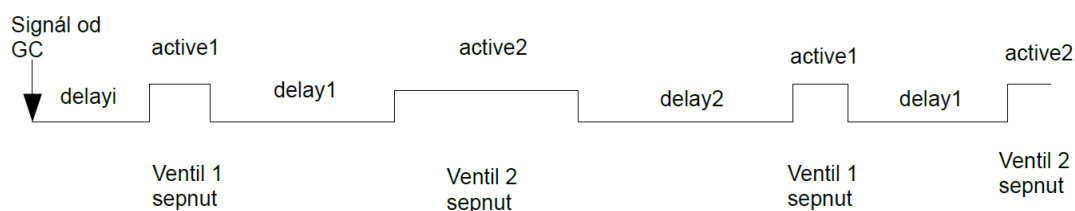
Obr. 4.1.14: Části modulátoru určené k umístění v kolonovém termostatu: (1) začátek/vstup I. kolony, (2) I. kolona, (3) konec/výstup I. kolony, (4) skladovací kapilára, (5) začátek/vstup II. kolony, (6) II. kolona, (7) konec/výstup II. kolony, (8) pomocná kapilára 1, (9) pomocná kapilára 2, (10 a 11) spojovací prvky, (12) drátěná konstrukce držáku.



Obr. 4.1.15: Celkový pohled do kolonového termostatu plynového chromatografu (GC-MS): (1) výstup z nástřiku a začátek první kolony, (2) dva spojovací prvky zde za sebou v zákrytu, (3) první kolona, (4) druhá kolona, (5) skladovací kapilára a (6) výstup druhé kolony a vstup do MS.

4.1.3 Úpravy modulátoru

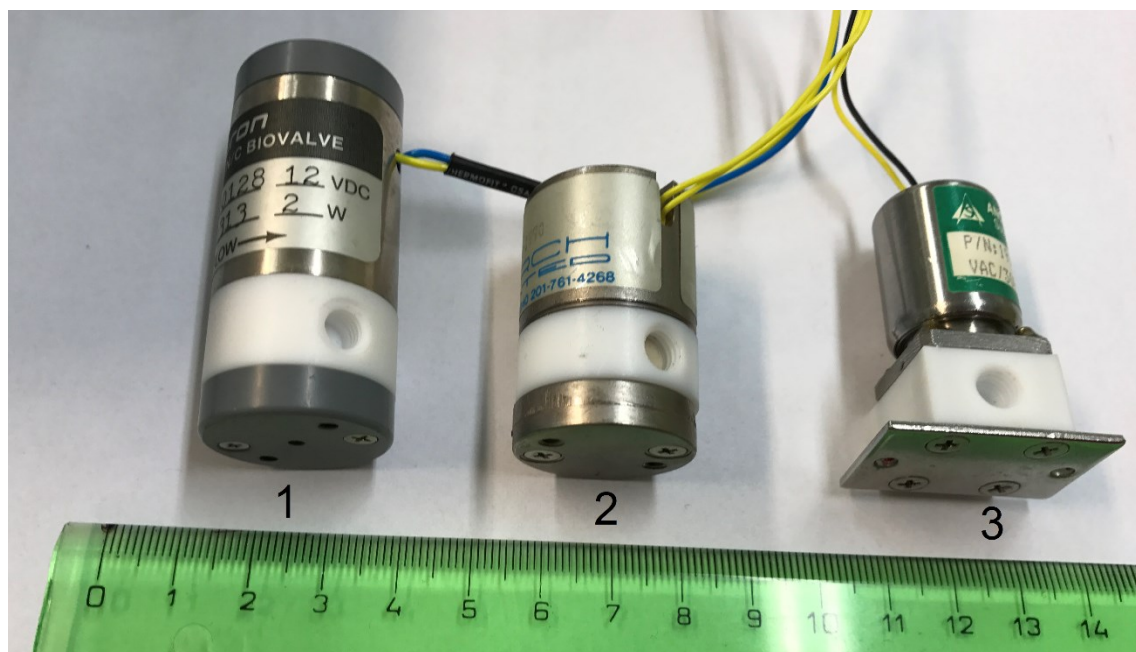
Časem přibýly různé úpravy a vylepšení řídicí jednotky pro pohodlnější a rychlejší práci. Byl aktualizován firmware řídicí elektroniky tak, aby byl schopen nastavit mrtvé časy mezi spínáním jednotlivých ventilů a mrtvý čas před začátkem modulace (tedy čas mezi synchronizací nástřiku plynového chromatografu a začátkem modulace) (Obr. 4.1.16).



Obr. 4.1.16: Diagram časování. Delayi (iniciální) jako mrtvý čas neaktivity ventilu po příchodu signálu z GC pro začátek modulace, poté se střídá active1 (sepnutí ventilu 1) a delay1 (nečinnost ventilu 1) s active2 a delay2 (sepnutí a nečinnost ventilu 2) a celé se cyklicky opakuje až do zastavení modulace signálem z GC.

Řídicí jednotka byla propojena s PC pomocí USB kabelu (řídicí elektronika komunikuje přes COM port, proto byla nutná přechodka) a byl vytvořen jednoduchý software, ve kterém se daly všechny parametry nastavit a odeslat do mikročipu. Bylo tedy možné zadat požadovanou dobu jak mechanicky pomocí tlačítek na řídicí jednotce, tak přes software. Pro komerční potřeby a testování firmou Data Apex byla doplněna i možnost kontinuálního výpisu obou tlaků z tlakových senzorů v softwaru. Tato firma modulátor testovala a později i přidala do svého ovládacího softwaru Clarity možnost modulátor zařadit do ovládaných zařízení a tím řídit časování ventilů [Příloha VI].

Byly také testovány tři různé velikosti ventilů. Vedle původních velkých, použitých u staré řídicí jednotky, byly dále používány střední. Malé ventily sice působily na plynovém chromatografu esteticky velmi hezky, ale bohužel neumožnily požadovaný průtok plynu pro potřebu modulace a staly se tak nepoužitelnými (Obr. 4.1.17).



Obr. 4.1.17: Velikostní srovnání všech tří testovaných ventilů: (1) model: 1100128 0277, Furon SAINT-GOBAIN, USA, (2) model: 225T011 2wNC, NResearch, USA, (3) model: N 190 1 12 S 3326G, ASCO GMBH Ratingen, Germany. Nakonec byl vybrán model č. 2.

4.1.4 Reprezentativní řídicí jednotka na výstavě

Na samotném závěru práce na stavbě a zlepšování řídicí jednotky byly postaveny ještě dva kusy.

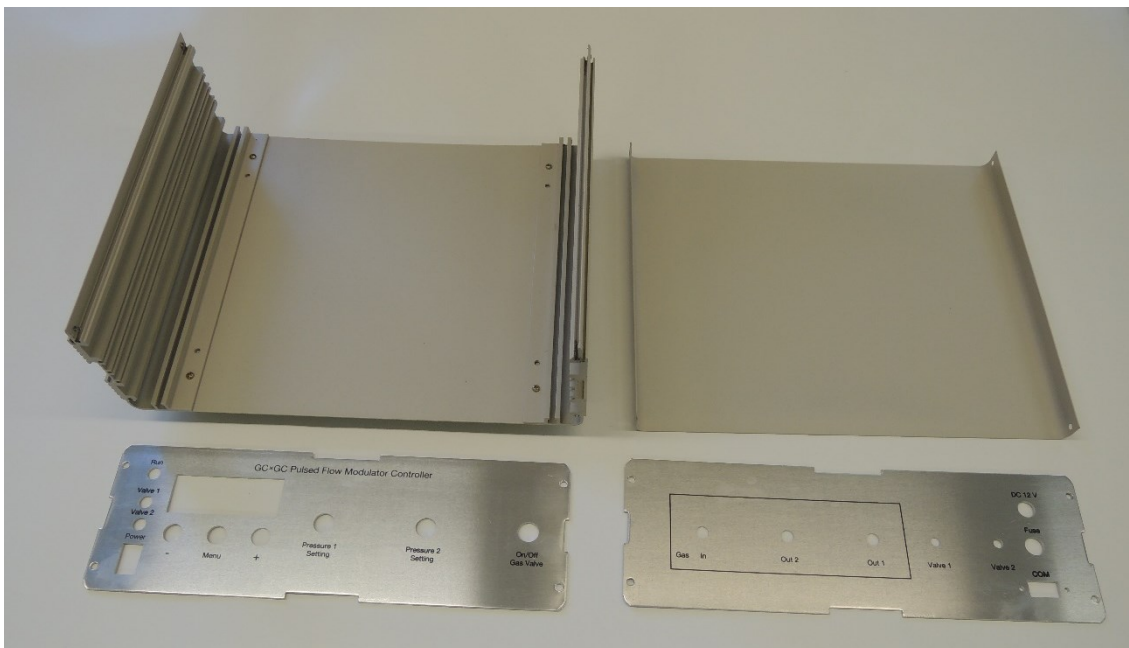
Jeden byl zapojen a testován v laboratoři plynové chromatografie na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice. Designem se příliš nelišil od pracovního (stávajícího) a pro stejnou funkčnost plně vyhovoval požadavkům na měření. Instalace přímo v laboratoři byla mírně složitější v tom, že přístroj, do kterého byl modulátor namontován, byl složen ze dvou identických plynových chromatografů Shimadzu GC-2010 Plus (jde o komerční systém MD-GC-GC-MS Shimadzu typu hard-cut). Bylo tedy potřeba propojit obě pece plynových chromatografů pomocnou vyhřívanou kapilárou, kterou byla protažena skladovací kapilára modulátoru. V každé peci plynového chromatografu byla jedna kolona, spojovací prvek SilFlow a pomocné kapiláry vedoucí skrz horní stěnu přístroje do dvoucestného ventilu. Řídicí jednotka byla umístěna mezi oba přístroje (Obr. 4.1.18).



Obr. 4.1.18: Umístění řídicí jednotky při použití dvou plynových chromatografů na KACH Pardubice.

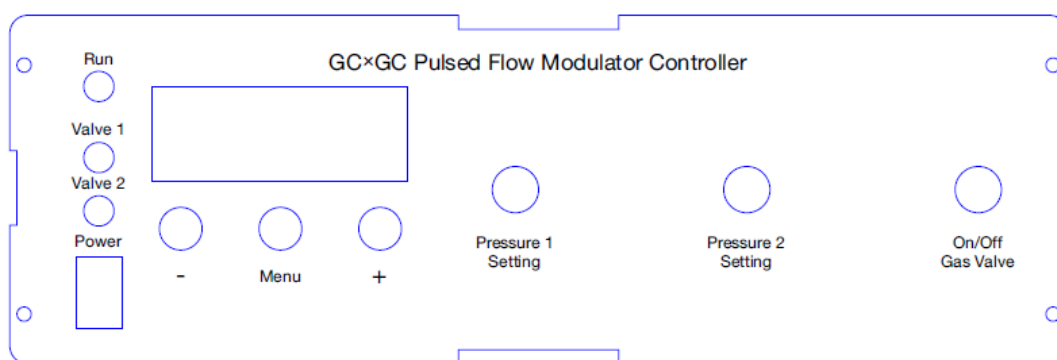
Výhoda tohoto uspořádání je v tom, že druhou kolonu lze udržovat na teplotě o něco vyšší (klasicky o 10 °C vyšší teplota) než první kolonu. Tím lze dosáhnout rychlejší separace (kratší retence) na druhé koloně a zkrácení modulační periody. Píky mají poté v druhé dimenzi konturového grafu při vyhodnocení lepší tvar (u klasického chromatografu občas nemožné), což vede ke zvýšení separační účinnosti systému.

Druhá řídicí jednotka byla kompletně přepracována a smontována jako reprezentativní kus na výstavy v zastoupení firmou Chromservis s.r.o. Pro tento účel byla zakoupena nová, designová elektro krabice, kdy její přední a zadní panel byl pro tyto účely upraven firmou Kavalír CZ s.r.o (Obr. 4.1.19-4.1.22).

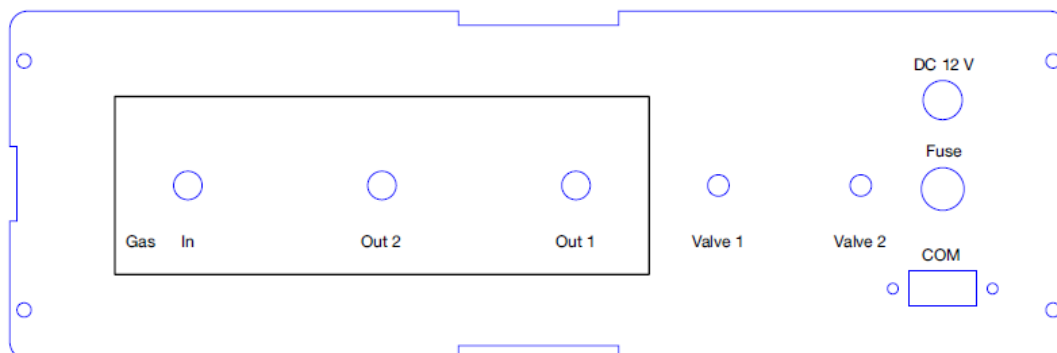


Obr. 4.1.19: Nová elektro krabice s vyřezaným a popsaným předním a zadním panelem.

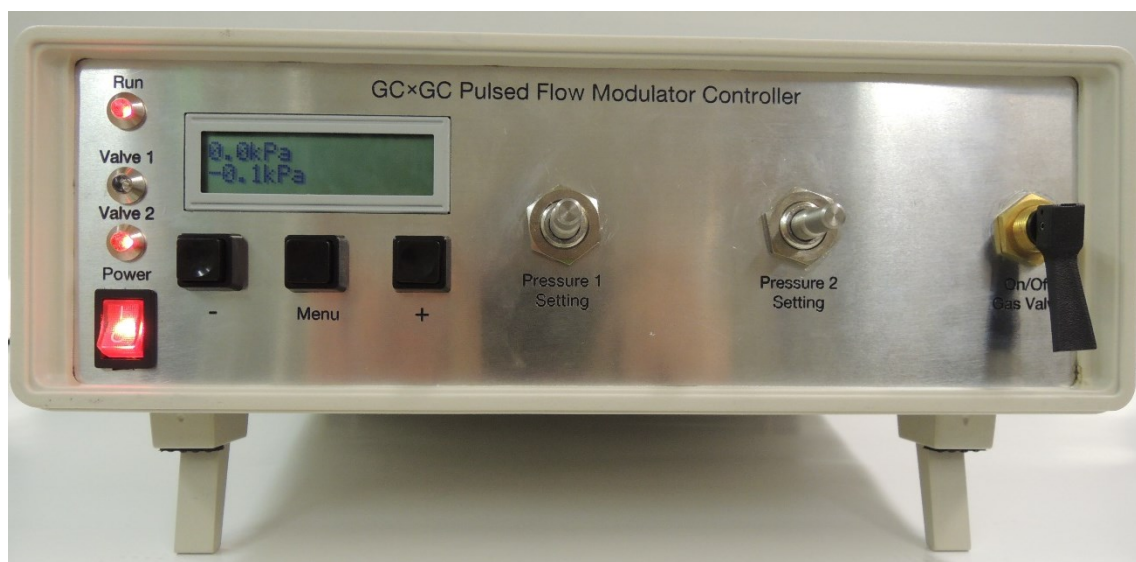
Přední panel



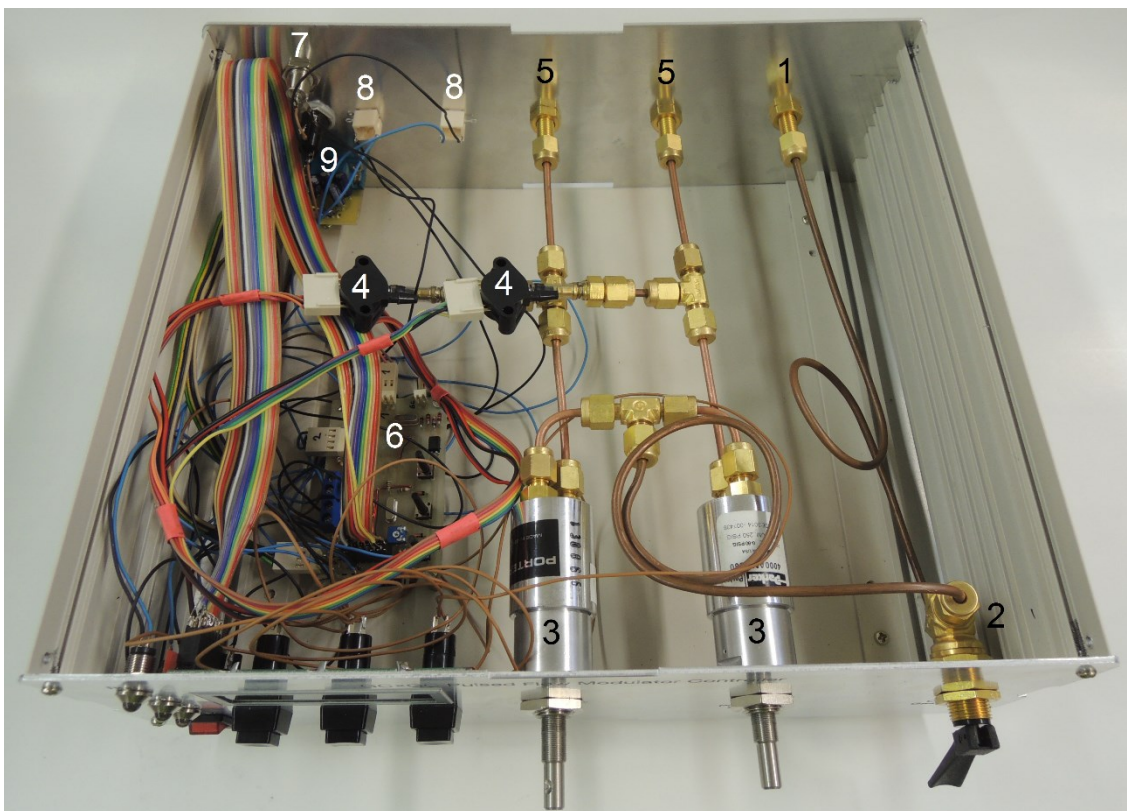
Zadní panel



Obr. 4.1.20: Předloha pro vyřezání a popsání předního a zadního panelu pro novou elektro krabici.



Obr. 4.1.21: Přední a zadní strana reprezentativní řídicí jednotky.



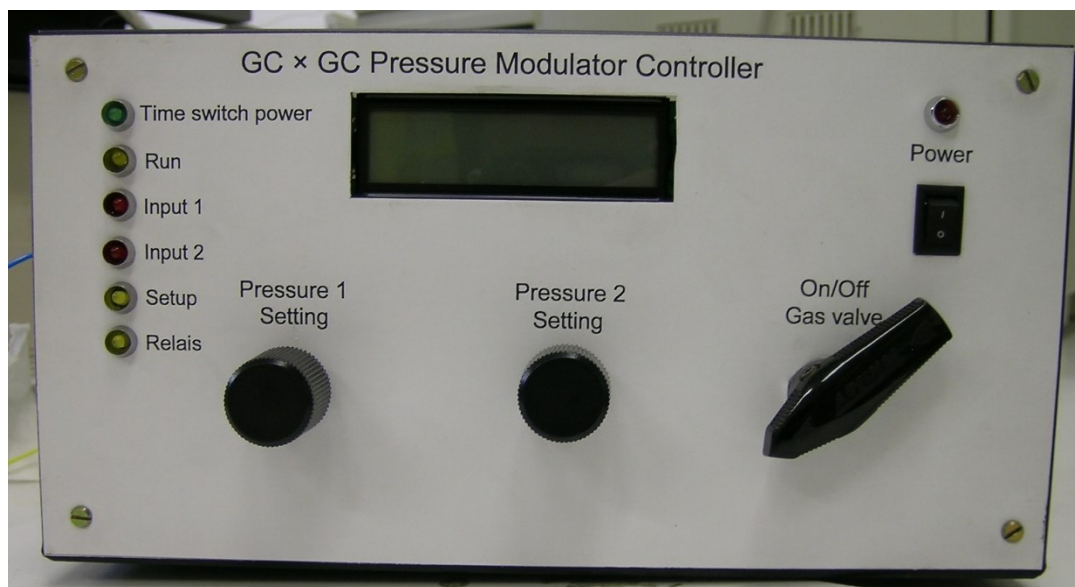
Obr. 4.1.22: Vnitřní uspořádání reprezentativní řídicí jednotky: (1) vstup plynu, (2) uzávěr plynu, (3) tlakový regulátor, (4) senzor tlaku, (5) výstup plynu, (6) řídicí elektronika, (7) vstup 12 V, (8) el. připojení ventilů, (9) COM port.

Tento kus byl vystaven na výstavě LaboExpo 2015 v Praze ve stánku firmy Chromaservis a na veletrhu Analytica 2016 v Mnichově ve stánku firmy DANI (DANI Instruments SpA, Viale Brianza, 87 – 20093 Cologno Monzese (MI) – Italy) [Přílohy VI a VII].

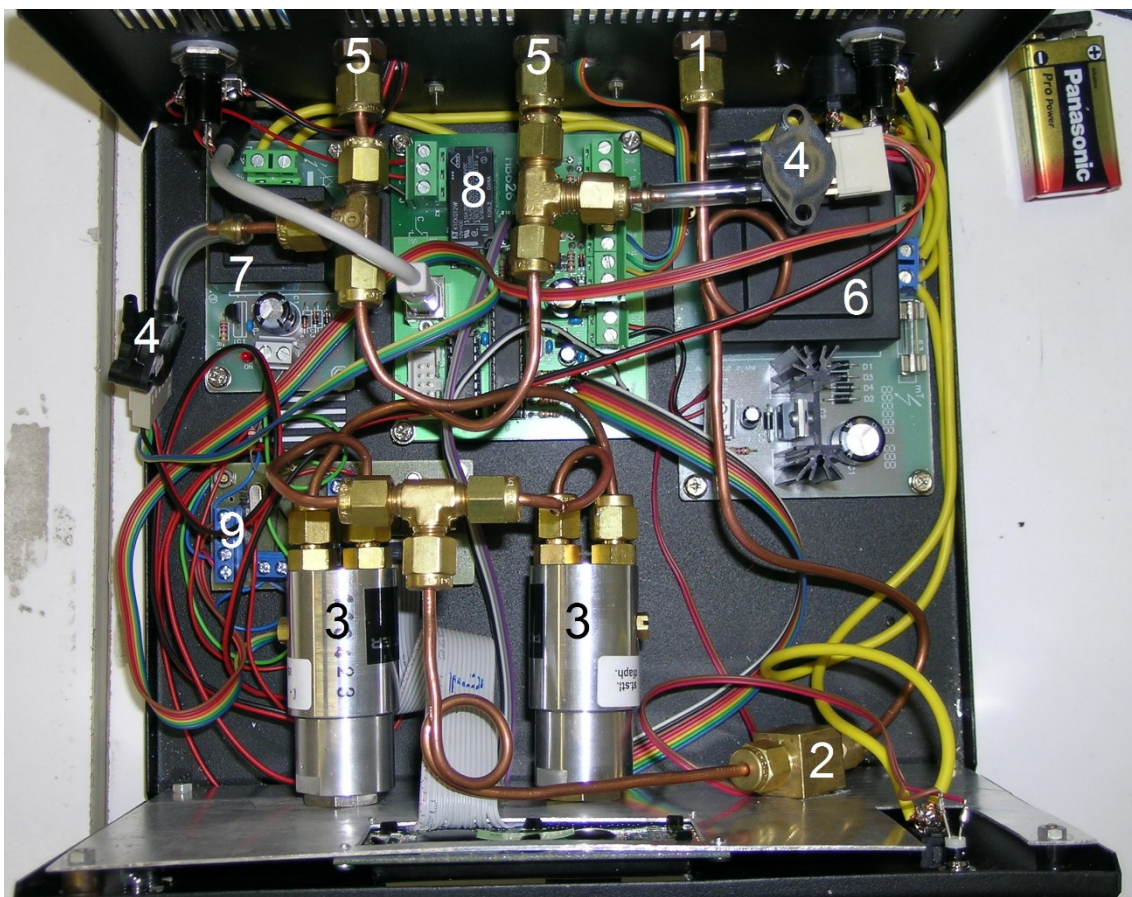
4.1.5 Dočasná řídicí jednotka

Mezi původní a novou řídicí jednotkou byla postavena tzv. dočasná řídicí jednotka, která již sice disponovala jemnými regulátory tlaku a tlakovými senzory pro každý ventil zvlášť, ale řídicí elektronika neumožňovala řízení časování ventilů. Umožňovala pouze zobrazení tlaku ze senzorů, časování ventilů zajišťovalo stále elektronické relé propojené se softwarem na PC. Záměr tedy poté byl vytvořit novou řídicí jednotku nezávislou na dalším zařízení (PC). Další nevýhodou byla potřeba dvou transformátorů

(na 6 V a 12 V), kdy 6V sloužilo k napájení elektroniky zobrazující tlak ze senzorů a 12V pro napájení časovacího relé a ventilů. Z tohoto důvodu je dočasná řídicí jednotka formou evoluce ve vývoji řídicí jednotky (Obr. 4.1.23 a 4.1.24).



Obr. 4.1.23: Přední panel dočasné řídicí jednotky (srovnej s Obr. 4.1.10).



Obr. 4.1.24: Vnitřní uspořádání dočasné řídicí jednotky: (1) vstup plynu, (2) uzavěr plynu, (3) tlakový regulátor, (4) senzor tlaku, (5) výstup plynu, (6) trafo 12 V, (7) trafo 6 V, (8) časovací relé, (9) elektronika pro zobrazení tlaků ze senzorů (srovnej s Obr. 4.1.11).

4.2 Optimalizace

4.2.1 Pulzní tlakový modulátor

Princip funkce pulzního tlakového modulátoru je podrobně popsán v teoretické části (2.4). Pro úspěšnou optimalizaci modulační bylo zapotřebí podrobně pochopit vzájemné tlakové a průtokové závislosti v systému. Dále jsou uvedeny vztahy z teoretických rovnic proudění plynu v kapilárách [100].

Pro výpočet vstupního tlaku plynu pro dosažení určité průtokové rychlosti zvoleného plynu kapilárou definovaných rozměrů za konstantní teploty lze použít Hagen-Poiseillův vztah platný pro nenulový výstupní tlak a stlačitelné médium (plyn):

$$p_i = \sqrt{\frac{16 F_0 \eta L p_0}{\pi r^4} + p_0^2} \quad (1)$$

kde p_i [Pa] je vstupní tlak plynu o dynamické viskozitě η [Pa·s] potřebný pro objemovou průtokovou rychlost F_0 [m³·s] na koloně délky L [m] a jejím poloměru r [m], p_0 [Pa] je zde výstupní tlak plynu. Pro výpočet je potřeba znát dynamickou viskozitu plynu, kterou lze pro helium a konkrétní teplotu vypočítat následovně:

$$\eta_{He} = 3,6744 \cdot 10^{-7} \cdot T^{0,7} \quad (2)$$

kde T [K] je termodynamická teplota plynu.

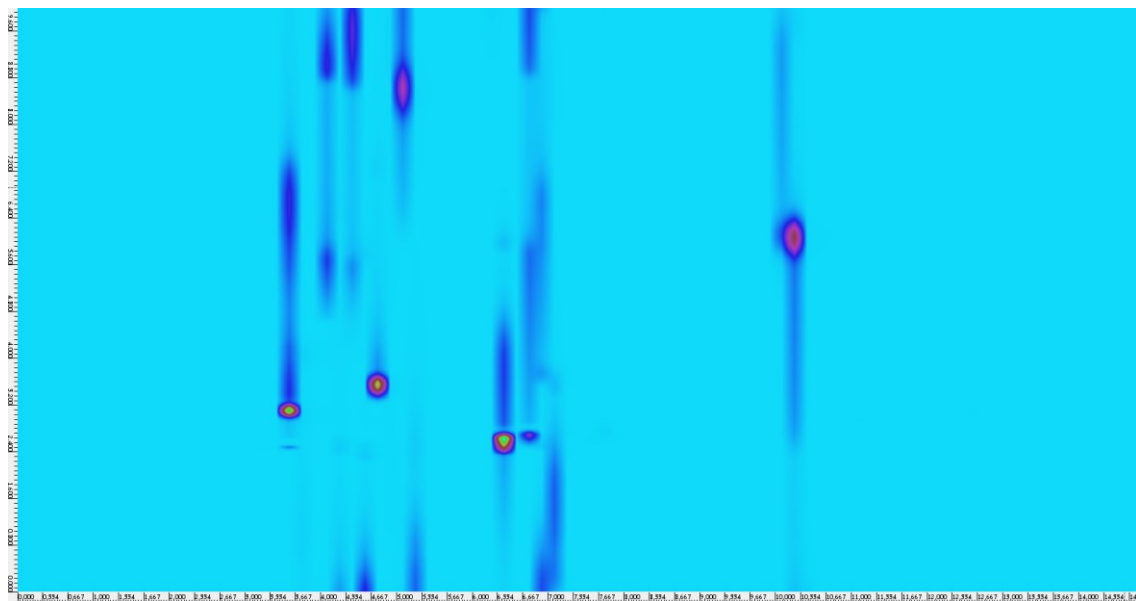
Tento vztah však v takto jednoduché podobě nebylo bohužel možno použít, protože výpočet tlaků a průtoků v systému vzájemně propojených kapilár různých průměrů a délek v modulátoru byl natolik složitý, že překročil rámec této dizertační práce. Doposud nebyl publikován postup ani metodika, jak chování takového systému matematicky charakterizovat a popsat. Jako proveditelnější se ukázal postup experimentálního hledání optima pomocí metody one-factor-at-a-time (OFAT), kdy se při zachování původních parametrů z předchozího experimentu změnil v následujícím pouze jeden (step-by-step).

4.2.2 Optimalizace modulace

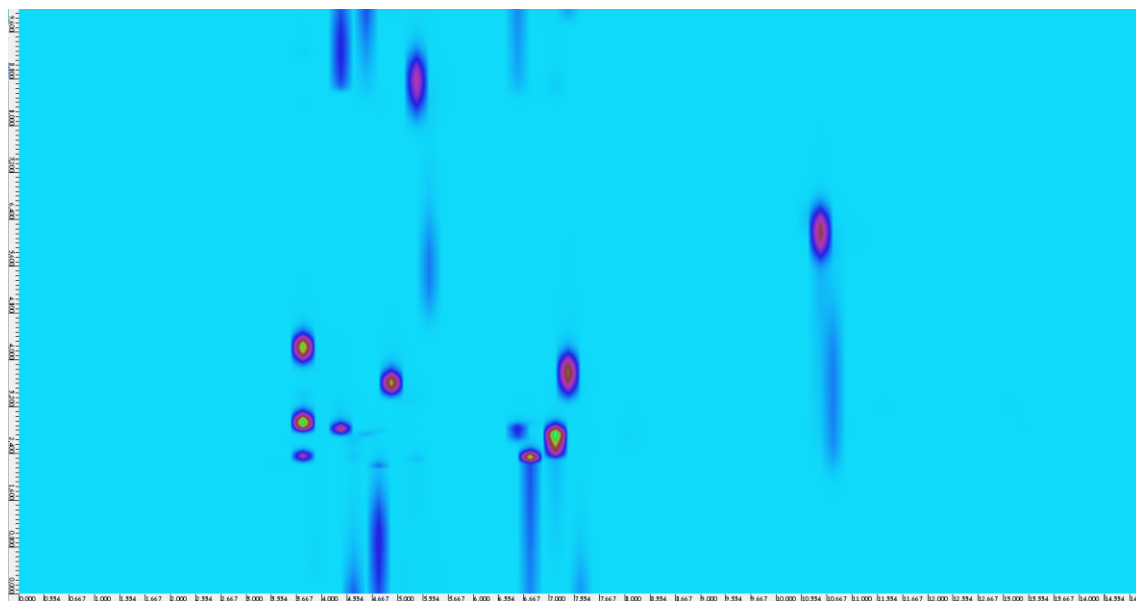
Optimalizace modulace probíhala postupně v jednotlivých krocích. Nejdříve byl systém zkoušen bez modulace, jestli vše těsní a vzorek může projít systémem od nástřiku po detektor. Poté bylo potřeba nalézt takové tlakové podmínky, aby vzorek systémem prošel od nástřiku až po detektor při zapnuté modulaci. Příliš velký tlak v pomocné kapiláře 2 totiž zastaví tok mobilní fáze, v extrémním případě může dojít k obrácení toku mobilní fáze do nástřiku. V případě příliš malého tlaku není efluent ze skladovací kapiláry celý dávkován do druhé kolony a může postupovat do pomocné kapiláry 2 a zároveň není dostatečně zásobena druhá kolona mobilní fází. To vede k příliš velké difuzi efluentu z první kolony a jeho dlouhé retenci na druhé koloně a projeví se jako „wrap-around“. Takto se označuje jev, při kterém separace na druhé

koloně neproběhne v rámci jedné modulační periody a u blobů (obdoba píku v konturovém grafu) poté neodpovídají jejich retenční časy v druhé dimenzi jejich skutečné retenci na druhé koloně, takže se objeví až v následující modulační periodě. V extrémním případě může docházet k dvoj- i vícenásobnému wrap-around efektu.

Z rozměrů první kolony a izotermální teploty kolonové pece chromatografu byl pomocí softwaru (EZGC Flow Calculator od Resteku, dostupný na webových stránkách firmy Restek, www.restek.com) určen vstupní tlak na první kolonu (nastavení konstantního tlaku mobilní fáze na plynovém chromatografu) a k němu se v závislosti na rozměrech druhé kolony nastavil druhý tlak na řídicí jednotce pro pomocnou kapiláru 2. Protože je průměr druhé kolony vždy větší, tvoří příspěvek z pomocné kapiláry 2 větší část mobilní fáze (ta menší část je spolu se vzorkem z první kolony). Poté probíhala optimalizace tlaku pro pomocnou kapiláru 1 tak, aby byl za dobu pulzu kompletně nadávkován celý obsah skladovací kapiláry do druhé kolony. Nastavením příliš vysokého tlaku v pomocné kapiláře 1 dochází sice k nadávkování, ale obsah skladovací kapiláry je dále unášen zvýšeným průtokem mobilní fáze druhou kolonou. Tímto zvýšeným průtokem v druhé koloně dochází ke zhoršení separace, které se projevuje rozdělením píků v konturovém grafu. Příliš nízký tlak zase není schopen nadávkovat celý obsah skladovací kapiláry do druhé kolony a dochází k nedostatečnému rozdělení píků až na základní linii. Toto se v konturovém grafu zobrazuje jako rozmyté (protažené) bloby ve vertikálním směru. Rozlišit mezi nastavením příliš vysokého a příliš nízkého tlaku v pomocné kapiláře 1 vyžaduje už jistou zkušenost, pro laika vypadají oba extrémy takřka stejně (Obr. 4.2.1 a 4.2.2).



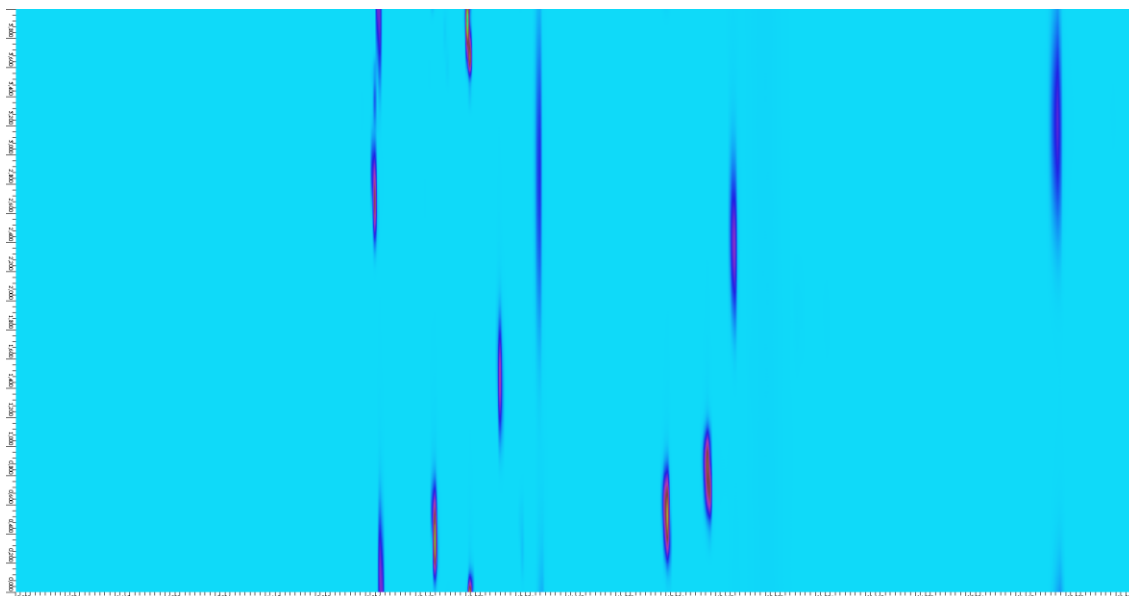
Obr. 4.2.1: Konturový graf (GC×GC-FID) směsi 11 pro příklad nastavení příliš vysokého tlaku v pomocné kapiláře 1. Bloby jsou poněkud sražené v ose y a dochází k rozmytí (protažení) spíše s rostoucí retencí na ose y .



Obr. 4.2.2: Konturový graf (GC×GC-FID) směsi 11 pro příklad nastavení příliš nízkého tlaku v pomocné kapiláře 1. Bloby mají oproti vyššímu tlaku protáhlejší tvar v ose y a dochází k rozmytí spíše proti rostoucí retenci na ose y .

Dalšími důležitými parametry k optimalizaci byly časy otevření ventilů. Mrtvé časy (doby mezi otevřením jednoho a zavřením druhého ventilu) byly nakonec úplně vypuštěny z důvodu absence rozdílu při jejich použití. Doba otevření prvního ventilu (pulz, nejčastěji 100-500 ms) byla volena tak, aby došlo k nadávkování celého obsahu skladovací kapiláry do druhé kolony. Musel být brán v potaz rozměr kapiláry i nastavený tlak u prvního ventilu. Doba otevření druhého ventilu (součet s pulzem tvořil modulační periodu, nejčastěji 2-12 s) byla volena tak, aby proběhla celá separace na druhé koloně. Zřetel musel být kladen na rozměr druhé kolony a retence analytů na ní. Při chybně nastavené době otevření prvního ventilu docházelo k podobným poruchám modulace jako u špatně nastaveného tlaku na prvním ventilu. Tyto dva parametry tedy byly na sobě silně závislé. Při příliš dlouhé době nastavené pro otevření druhého ventilu v kombinaci s vyšším tlakem v druhé pomocné kapiláře (opět jsou oba parametry vzájemně silně závislé, při nedodržení jednoho správně nastaveného parametru systém přestal modulovat úplně) docházelo sice k optimální modulaci, ale doba jedné analýzy se díky zbytečně dlouhé modulaci neúměrně prodloužila. Při příliš krátké době nastavené pro otevření druhého ventilu docházelo k wrap-aroundu (Obr. 4.2.3).

Tohoto jevu se dá i využít. V případě použití teplotního programu (u většiny případů reálných vzorků nutnost) se efektivní prostor pro separaci na druhé koloně v konturovém grafu začíná zmenšovat v závislosti na rychlosti a rozsahu teplotního programu. Obecně lze říci, že při izotermální analýze je separační prostor u GC×GC, vyjádřený konturovým grafem, dán celou jeho plochou. Při gradientovém teplotním programu se separační prostor v druhé dimenzi začíná zesponu zmenšovat tím více, čím je teplotní program rychlejší. Tento prostor pro separaci však může být využit při wrap-aroundu, kdy víme o retenci analytů na druhé koloně a s tímto jevem dopředu počítáme.



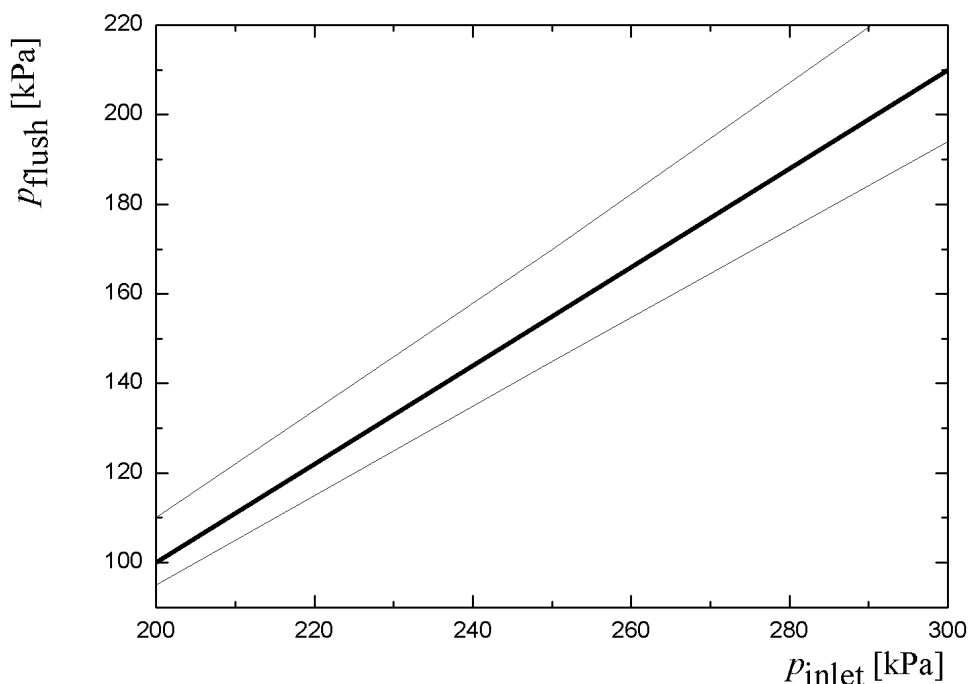
Obr. 4.2.3: Na konturovém grafu (GC×GC-FID) příklad wrap-aroundu, kdy separace na druhé koloně neproběhne v rámci jedné modulační periody a retenční časy blobů neodpovídají jejich skutečným retencím na druhé koloně. Retence na první koloně zůstává zachována.

Na začátku práce byla pro optimalizaci systému nejdříve zamýšlena volba multifaktorové predikční analýzy používané v naší laboratoři k minimalizaci počtu pokusů nutných k nalezení optima a tím snížení časové náročnosti optimalizace. V úvahu připadalo zvolení kvantitativních faktorů (parametrů) a na základě Plackett-Burmanova screeningového designu (neúplné dvouúrovňové faktorové pokusy) by byl proveden výběr takových faktorů, které mají na účinnost separace a funkčnost systému statisticky významný vliv. Takto vybrané experimentální parametry by byly optimalizovány podle Box-Behnkenova designu (neúplné víceúrovňové faktorové pokusy) za použití ANOVA testů, aby bylo dosaženo maximální separace a odezvy celého systému.

Bohužel se ukázalo, že tato multifaktorová analýza nemůže být použita z důvodu silné vzájemné závislosti (korelaci) jednotlivých parametrů. Pokud bychom vybrali jiné testy (zohledňující závislosti parametrů), je zde problém s číselným vyjádřením podoby konturového grafu. Matematicky lze počítat s celkovým produktem rozlišení, to ale bohužel nekoresponduje s tvarem blobů (případ malého rozlišení ideálního tvaru blobu proti velkému rozlišení rozmytých blobů). Byla proto zvolena metoda optimalizace OFAT (one-factor-at-a-time). Tímto způsobem se lze dopracovat k optimu poněkud

zdlouhavějším způsobem (ve srovnání s multifaktorovou analýzou až několikanásobně větší časová náročnost) a nikdy není zaručeno nalezení globálního, ale pouze lokálního optima.

Do této doby bylo pracováno pouze s konstantní teplotou kolony a tím pádem konstantními tlaky. V případě optimalizace systému na připravených směsích běžných těkavých rozpouštědel (záměrně vybraných pro jejich nižší bod varu) nebylo měření při izotermálním teplotním programu časově náročné. U měření reálných vzorků, při kterých se už musel použít teplotní program z důvodu přítomnosti výše vroucích analytů, nastával problém s rostoucí viskozitou mobilní fáze při její rostoucí teplotě. Při zachování počátečních tlakových podmínek se tedy systém s rostoucí teplotou brzy dostal mimo tlakové optimum a modulace přestala fungovat. Tlakové optimum se nachází v určitém intervalu hodnot, ve kterém ještě modulace s jistým úspěchem funguje (Obr. 4.2.4). V grafu je na ose x nastavení tlaku na chromatografu a na ose y nastavení tlaku pro ventil číslo dvě (pomocná kapilára 2). Optimum modulace je označeno silnou úsečkou, dvěma tenkými úsečkami je ohraničena oblast funkčnosti modulace.

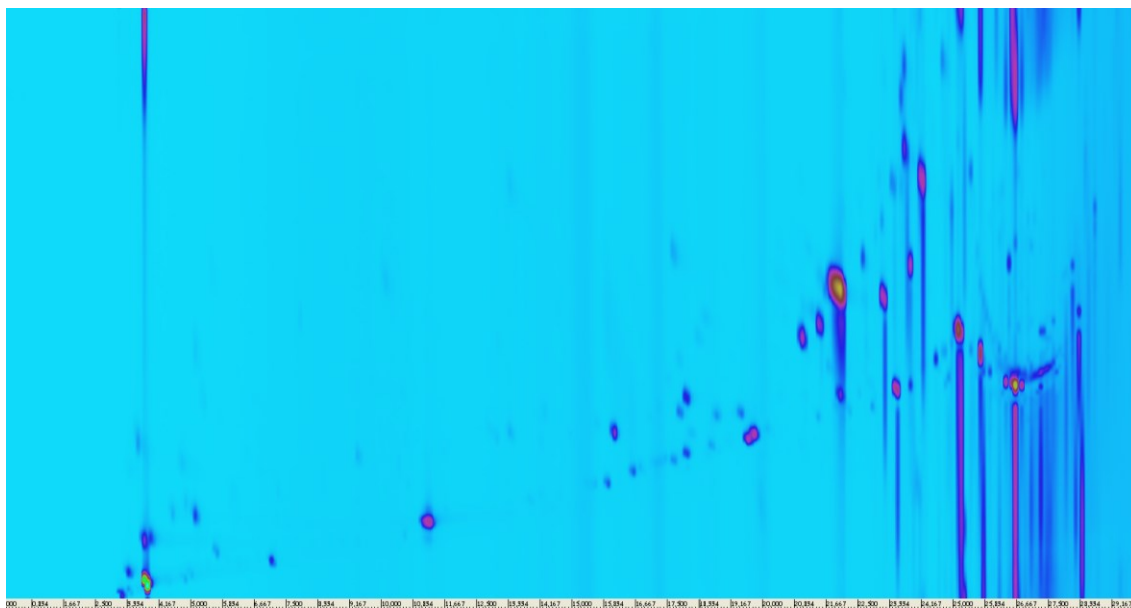


Obr. 4.2.4: Korelace hodnot tlaků systému GC×GC-FID nezbytných pro funkčnost modulace. Na ose x (p_{inlet}) je nastavení tlaku na plynovém chromatografu, na ose y (p_{flush}) je nastavení tlaku na modulátoru pro pomocnou kapiláru 2. Silná úsečka označuje optimum modulace a dvě tenké vyznačují oblast funkce modulace [99].

Jistým řešením je tedy měnit teploty pouze tak, aby tlaky nutné pro zachování konstantního průtoku zůstaly v této oblasti. Při zachování konstantního tlaku se zvyšováním teploty dochází ke zpomalení průtoku mobilní fáze a tím i k nárůstu míry difuze. To poté způsobí rozšíření píků a tím pádem blobů v obou dimenzích, což vede ke ztrátě účinnosti a píkové kapacity.

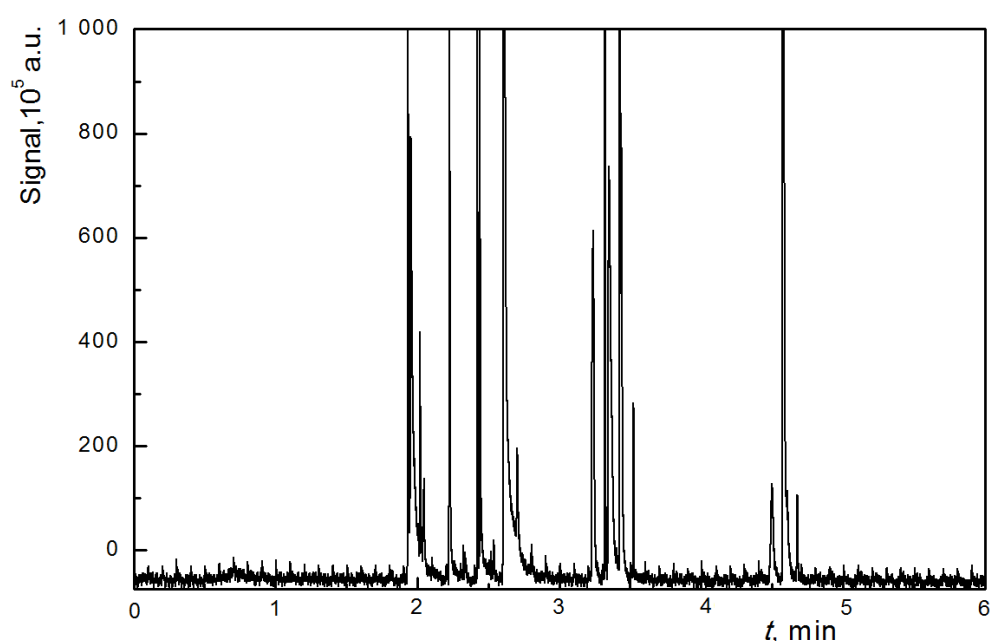
Další možné řešení je s rostoucí teplotou manuálně korigovat oba tlaky v modulátoru. Při hodinové analýze to pak znamená nastavovat tlak pomocí regulátoru každé 2 minuty po celou hodinu. Toto by bylo možné řešit elegantně pomocí elektronicky řízených tlakových regulátorů, které ale svojí cenou nezapadají do konceptu levného tlakového modulátoru (pořizovací cena začíná přibližně na 30 000 Kč za kus).

Na následujícím obrázku (Obr. 4.2.5) je zobrazen výstup analýzy extraktu z levandule, kdy je systém na počátku analýzy v tlakovém optimu. S rostoucí teplotou a tím pádem rostoucím tlakem dochází k čím dál větším poruchám modulace a rozmývání blobů.



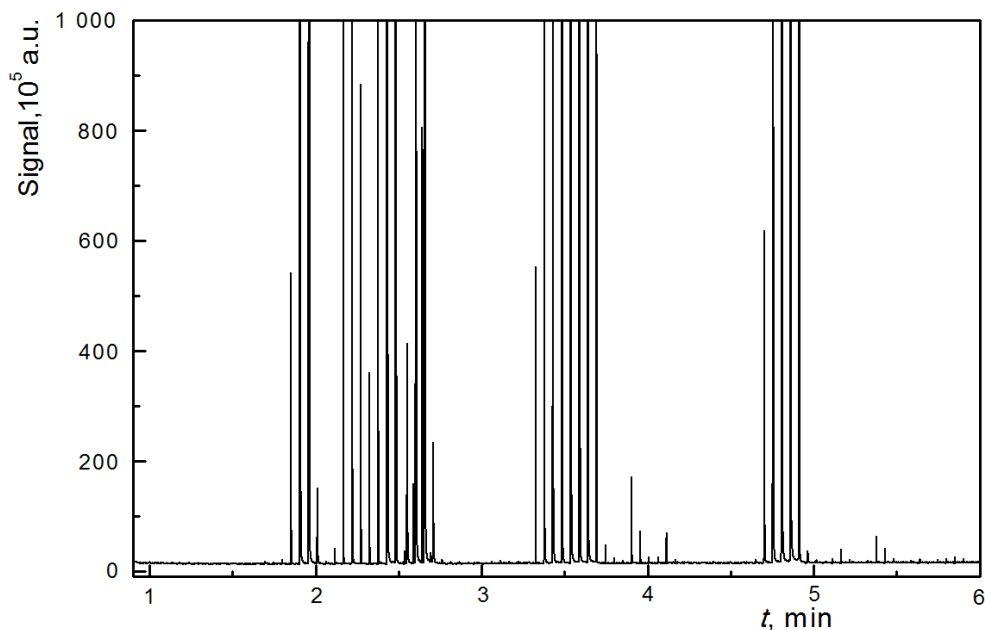
Obr. 4.2.5: Příklad použití teplotního programu s velkým teplotním rozsahem bez korekce tlaků. S rostoucí teplotou se zvětšuje nutnost úpravy tlaku s časem (osa x) a dochází k rozmývání blobů. Záznam z GC×GC-FID.

Pokud bychom mezi sebou srovnávali klasické chromatogramy z hlediska úspěšnosti modulace, lze odhalit již mnohé nedostatky přímo z nich a není potřeba každou analýzu převádět na konturové grafy. Například při pohledu na chromatogram Obr. 4.2.6 je patrné, že šířka jednotlivých píků není jednotná a separace píků neprobíhá až na základní linii. Dále lze pozorovat větší šum základní linie, který s nižšími píky, vzniklými v důsledku jejich rozšíření při špatné modulaci, vede ke ztrátě požadované citlivosti (ve srovnání s optimalizovaným systémem). V tomto případě již tedy nelze považovat píky za modulované a v konturovém grafu se projeví jako rozmyté bloby přes celou šířku modulační periody.



Obr. 4.2.6: Klasický chromatogram (GC×GC-FID) při modulaci mimo tlakové optimum, kde dochází k poruchám modulace. Jedná se o vzorek testovací Směsi 11.

Na další obrázku (Obr. 4.2.7) je klasický chromatogram, který získáme při optimalizované modulaci. Všechny píky jsou přibližně stejně široké a jsou separovány až na základní linii.



Obr. 4.2.7: Klasický chromatogram Směsi 11 (GC×GC-FID) při optimalizované modulaci.

Pro úspěšnou modulaci je tedy samotné nastavení tlaků klíčové. Naštěstí už poté není závislé na době modulační periody a tím pádem je pro zvolenou sestavu kolon a kapilár univerzální.

4.2.3 Optimalizace kolon, kapilár a jejich spojů

V průběhu optimalizace rozměrů kolon a kapilár bylo postupně porovnáváno několik rozdílných délek první kolony (10, 15, 30 a 60 m), druhé kolony (1, 5 a 10 m) a skladovací kapiláry (35, 70 a 100 cm). Stejně tak byly porovnávány jednotlivé vnitřní průměry první kolony (0,15 a 0,25 mm), druhé kolony (0,25 a 0,32 mm) a skladovací kapiláry (0,25 a 0,32 mm).

U pomocných kapilár byla zachována minimální možná konstrukční délka 40 cm, použití delších kapilár by nemělo význam z důvodu narůstající tlakové náročnosti a jiných průtoků v případě použití teplotních programů. Byly zkoušeny dva různé vnitřní průměry pomocných kapilár: 0,25 a 0,32 mm. Při použití 0,25 mm byly pozorovány poruchy modulace z důvodu nedostatečného průtoku mobilní fáze i při nastavení vyššího tlaku na vstupu. K tomu mohlo dojít i nedostatečně rychlými otevíracími a

zavíracími časy u ventilů. Proto byly vybrány pomocné kapiláry s průměry 0,32 mm pro všechny možné funkční kombinace.

Dále byly v systému vyměněny spojovací prvky. Systém SilFlow byl vyměněn za křemenné kusy ve tvaru ypsilon. Toto bylo zamýšleno především z ekonomického hlediska ke snížení pořizovací ceny modulátoru. Největší položkou byly právě spojovací prvky SilFlow (cena okolo 20 000 Kč za jeden kus proti ceně 1 000 Kč za jeden křemenný ypsilon kus). Dalším důvodem byly problémy s těsností spojů u spojovacích prvků SilFlow, které se při pozdějším připojení MS detektoru projevovaly zvýšeným šumem (přítomnost okolního vzduchu v detektoru). Takto upravený systém byl však bohužel již nepoužitelný pro kombinaci s hmotnostním detektorem z důvodu naprosté změny odporů spojovacích prvků a nemožnosti nalezení optima tlaků. Systém částečně zvládal modulovat, ale nedá se hovořit ani o uspokojivém výsledku. Jakákoliv snaha o optimalizaci zde byla tedy naprosto zbytečná. Systém lépe fungoval při použití pouze plamenově ionizačního detektoru, proto byl nadále u MS používán systém SilFlow při zvýšené kontrole těsnosti spojů.

Důležitý je tedy pro úspěšnou modulaci nejen výběr vhodných kolon a kapilár, nastavení tlaku a správné časování ventilů, ale vše musí být přizpůsobeno konkrétnímu vzorku. Obecně lze říci, že čím komplexnější je vzorek, tím delší musí být modulační perioda.

4.2.4 Testovací směsi

Pro ověřování funkčnosti a optimalizování systému byly připraveny směsi rozpouštědel označované jako Směs 11 a Směs 17. Směs 11 obsahovala tyto látky: hexan, heptan, butyl-methyl ether, ethylacetát, *tert*-butylacetát, 2,2,4-trimethylpentan, 1-oktanol, 2-propanol, 2-methylpropanol, aceton a toluen. Směs 17 obsahovala tyto látky: pentan, hexan, heptan, toluen, aceton, acetonitril, 2,2,4-trimethylpentan, 2-methoxy-2-methylpropan, dichlormethan, trichlormethan, ethanol, 2-propanol, 2-methylpropanol, 1-butanol, methylacetát, ethylacetát, *tert*-butylacetát.

Byly postupně zkoušeny různé varianty sestav, kdy byly zachovány nutné podmínky pro správnou funkci GC×GC-FID s pulzním tlakovým modulátorem, za účelem prověření robustnosti modulátoru. Důraz byl kladen na budoucí použití sestav

k analýzám určených reálných vzorků, ale také na provozní podmínky analýz (omezení průtoku mobilní fáze do detektoru, vysokých tlaků na ventilech či celkové doby analýzy).

Jako nejjednodušší a i nejrychlejší byla vybrána sestava:

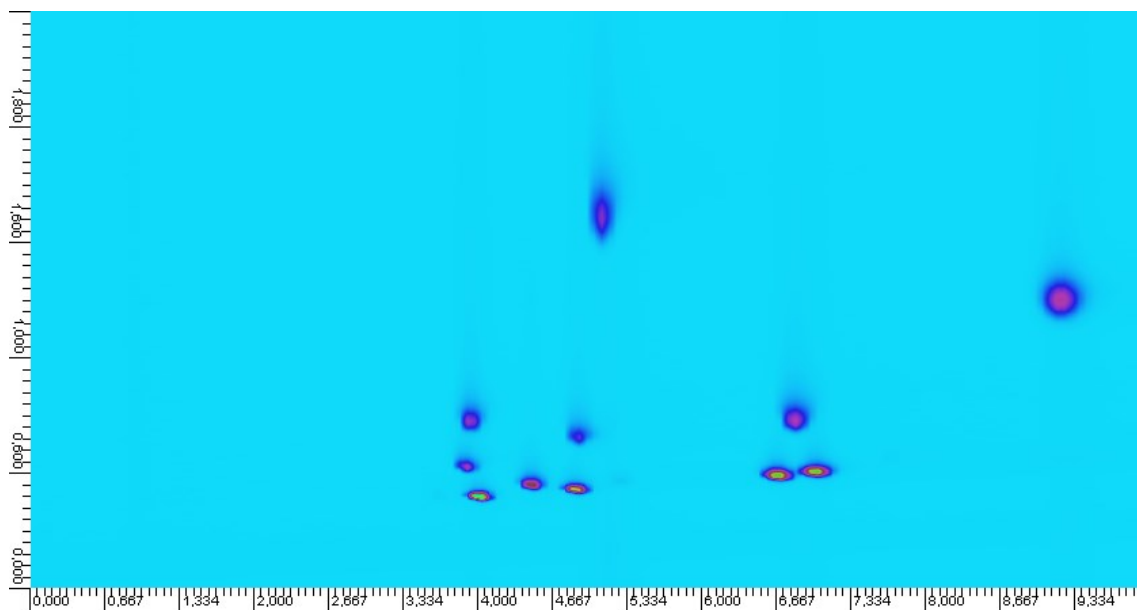
I. kolona:	CP-Sil 5CB 10 m × 0,15 mm × 0,15 μm
II. kolona:	Supelcowax 10 1 m × 0,25 mm × 0,25 μm
Skladovací kapilára:	35 cm × 0,25 mm
Tlaky:	Plynový chromatograf: 130 kPa
	Modulátor 1: 120 kPa
	Modulátor 2: 85 kPa

Průtoková rychlost na konci II. kolony byla přibližně 25 ml/min (změřeno bublinkovým průtokoměrem).

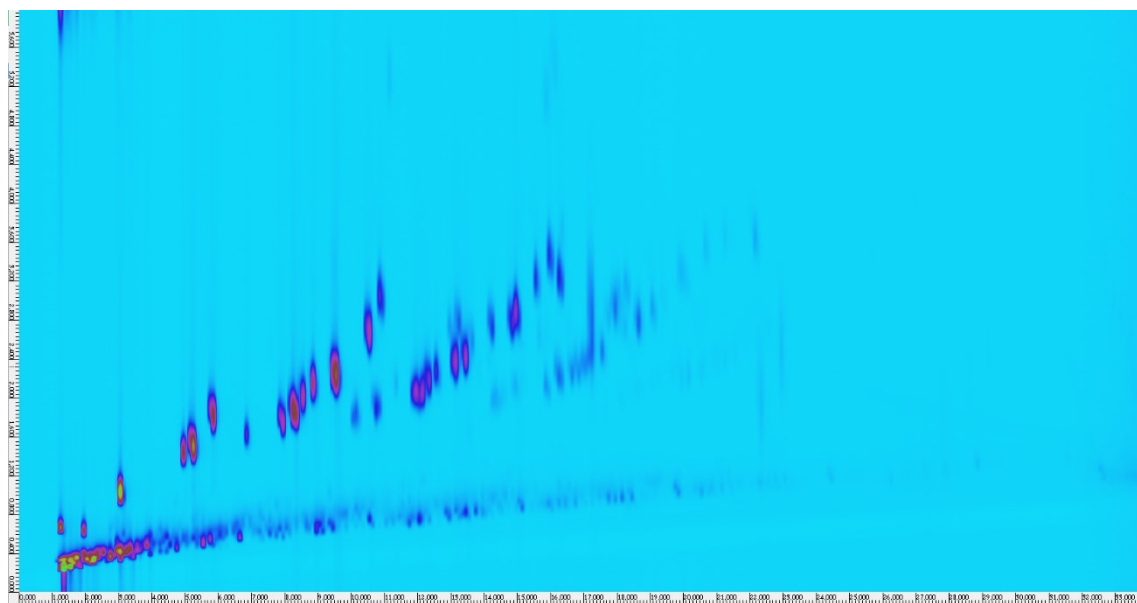
Pulz:	100 ms
Modulační perioda:	Směs 11 2 s
	benzin 6 s
	petrolej 8 s
	Sheron 9 s
	nafta 12 s

Na této sestavě byly postupně změřeny Směs 11 (Obr. 4.2.8), vzorek benzínu Natural 95 (Obr. 4.2.9), petroleje do stolních lamp (Obr. 4.2.10), motorové nafty (Obr.4.2.11) a nemrznoucí příměsi do motorové nafty značky Sheron (Obr. 4.2.12).

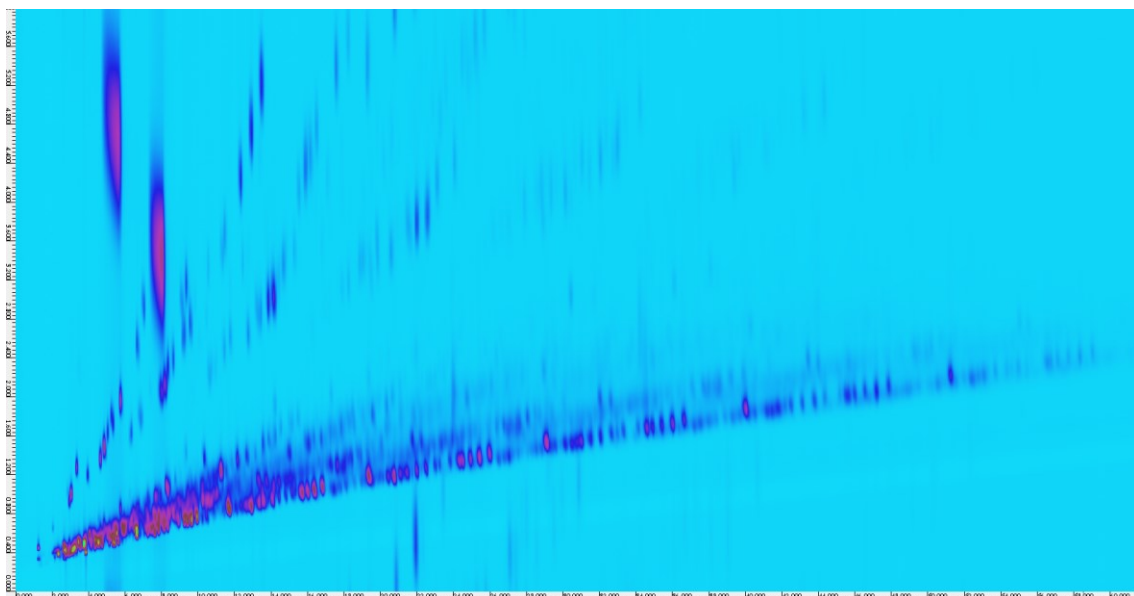
Prodlužující se doba modulační periody je přímo úměrná rostoucí komplexnosti vzorku. To je způsobeno delší analýzou na druhé koloně, kdy je potřeba více snížit průtokovou rychlost na druhé koloně a zvýšit tím účinnost separace. S prodlužující se dobou modulační periody se zkracuje celková doba analýzy, kterou prodlužuje pouze součet dob pulzů během analýzy. Bude-li klasická GC analýza trvat 10 min, v případě GC×GC při modulační periodě 2 s a pulzu 100 ms (0,00167 min) bude zapotřebí 300 modulačních period a analýza bude trvat $10 + (300 \cdot 0,00167) \approx 10,501$ min.



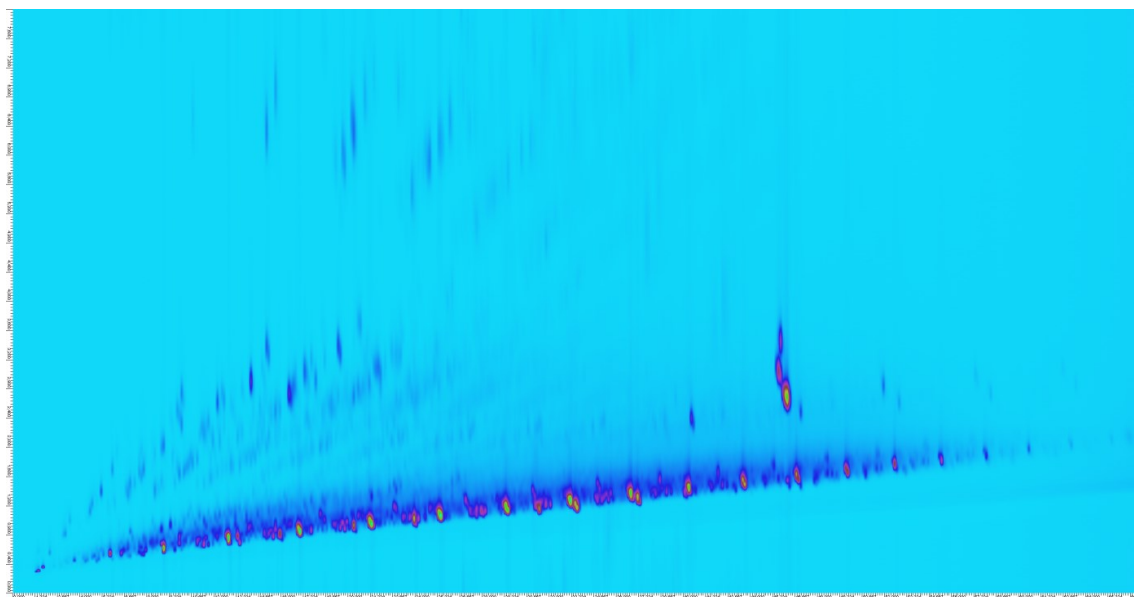
Obr. 4.2.8: Konturový graf z analýzy GC×GC-FID Směsi 11. Teplotní program: izotermální teplota 40 °C, split 1:100. Modulační perioda 2 s, pulz 100 ms.



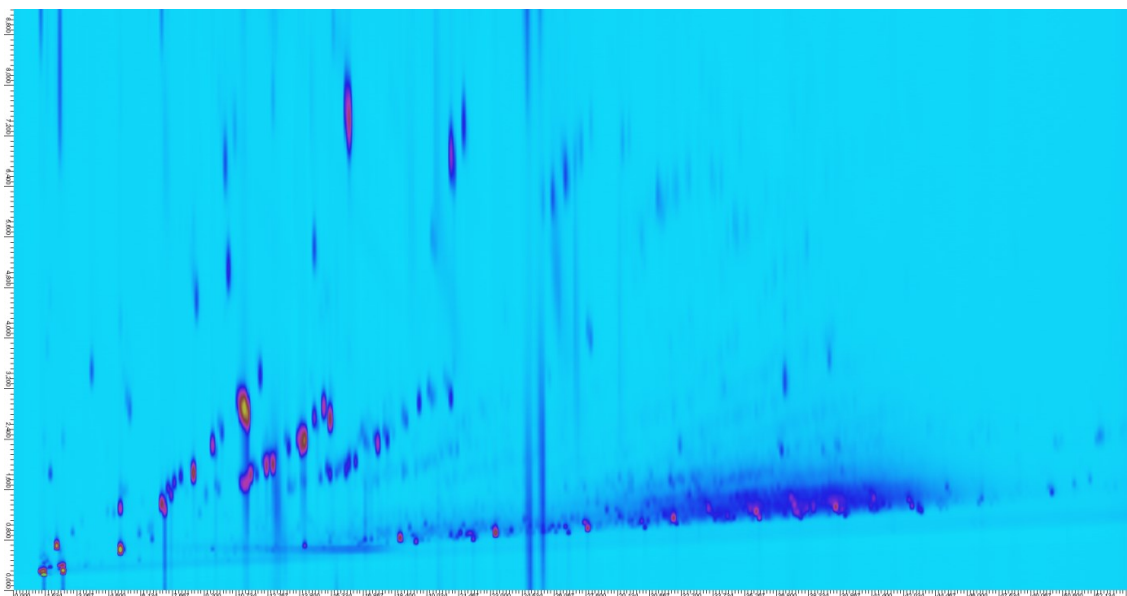
Obr. 4.2.9: Konturový graf z analýzy GC×GC-FID benzínu Natural 95. Teplotní program: od 35 °C do 130 °C rychlostí 3 °C/min a poté do 200 °C rychlostí 30 °C/min, split 1:100. Modulační perioda 6 s, pulz 100 ms.



Obr. 4.2.10: Konturový graf z analýzy GC×GC-FID petroleje do stolních lamp. Teplotní program: od 60 °C do 200 °C rychlostí 1 °C/min, split 1:100. Modulační perioda 8 s, pulz 100 ms.



Obr. 4.2.11: Konturový graf z analýzy GC×GC-FID motorové nafty. Teplotní program: od 60 °C do 260 °C rychlostí 3 °C/min, split 1:100. Modulační perioda 12 s, pulz 100 ms.



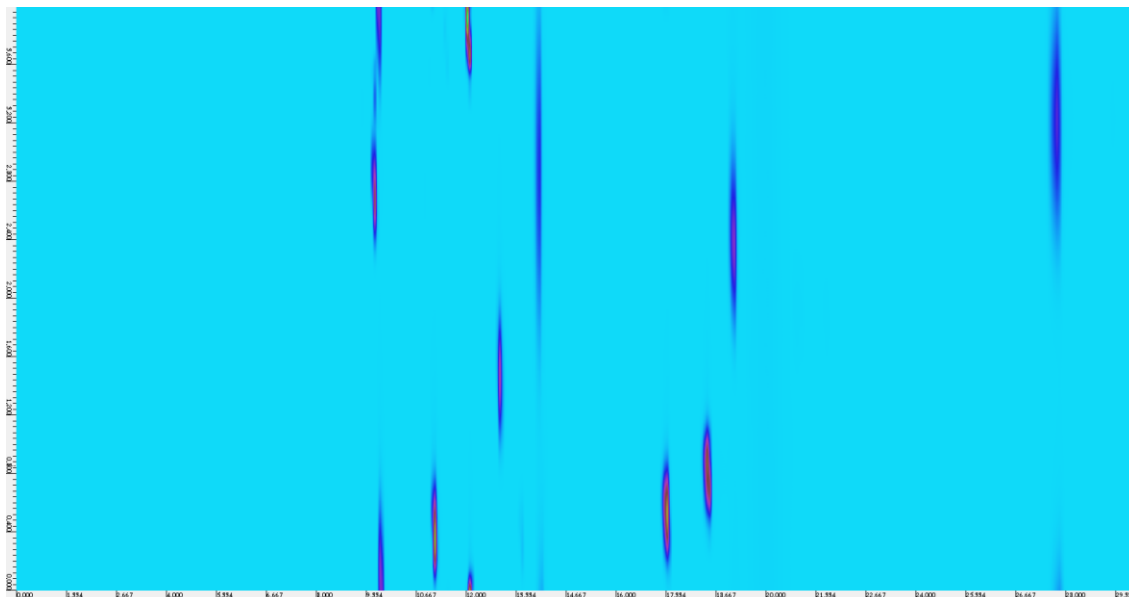
Obr. 4.2.12: Konturový graf z analýzy GC×GC-FID nemrznoucí příměsí do motorové nafty značky Sheron. Teplotní program: od 40 °C do 200 °C rychlostí 3 °C/min, split 1:100. Modulační perioda 9 s, pulz 100 ms.

Jako protiklad ověření délky a účinnosti separace celého systému byla následující sestava s úspěchem použita pouze pro ověření rozsahu použití řídicí jednotky, nikoliv pro ověřování separační účinnosti:

I. kolona:	HP-5MS 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm
II. kolona:	Supelcowax 10 10 m × 0,25 mm × 0,25 μm
Skladovací kapilára:	100 cm × 0,25 mm
Tlaky:	Plynový chromatograf: 400 kPa
	Modulátor 1: 220 kPa
	Modulátor 2: 200 kPa
Průtoková rychlost na konci II. kolony byla přibližně 10,5 ml/min.	
Pulz:	700 ms
Modulační perioda:	Směs 11 10 s

Při srovnání s předchozí sestavou na Směsi 11 se pulz prodloužil ze 100 ms na 700 ms a modulační perioda z 2 s na 10 s, lze spíše hovořit o nárůstu doby analýzy než o ohromném nárůstu píkové kapacity. Nehledě na problémy s vysokými tlaky, které se

pohybovaly na hranici možnosti řídicí jednotky. Píková kapacita může být v tomto případě ve srovnání s předchozím systémem větší, ale velká šířka blobů v druhé dimenzi ji opět snižuje. Ukázka separace Směsi 11 na Obr. 4.2.13.

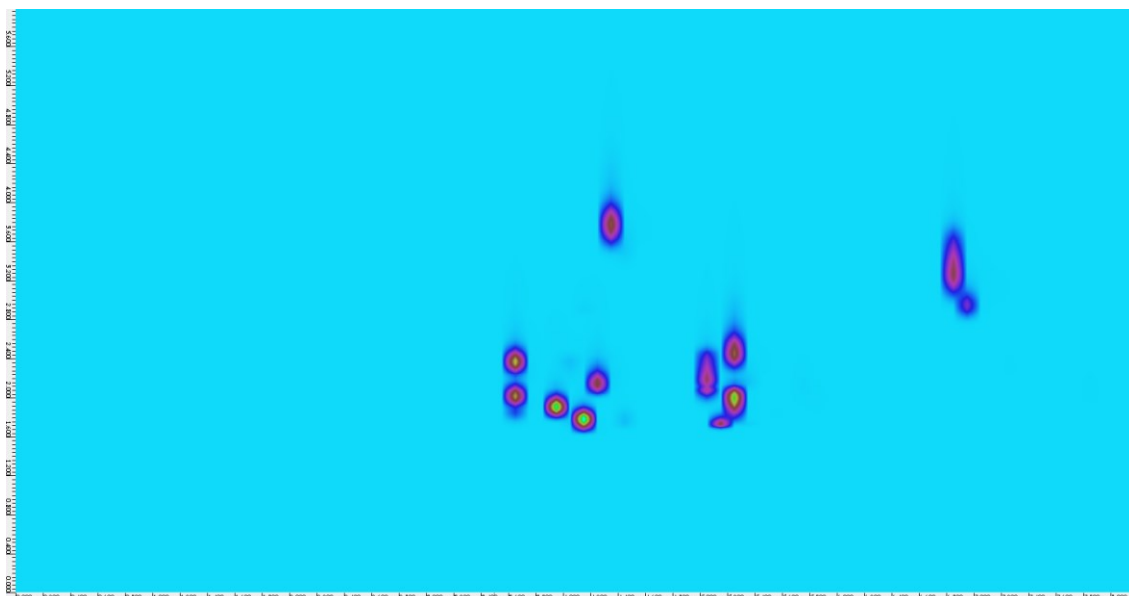


Obr. 4.2.13: Konturový graf z GC×GC-FID analýzy Směsi 11. Teplotní program: izotermální teplota 40 °C, split 1:100. Modulační perioda 10 s, pulz 700 ms.

Jako kompromis mezi těmito sestavami z hlediska délky kolon je následující uspořádání:

I. kolona:	DB-5MS 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm
II. kolona:	Supelcowax 10 5 m × 0,25 mm × 0,25 μm
Skladovací kapilára:	40 cm × 0,32 mm
Tlaky:	Plynový chromatograf: 200 kPa
	Modulátor 1: 175 kPa
	Modulátor 2: 150 kPa
Pulz:	500 ms
Modulační perioda:	Směs 11 2 s

Ukázka separace Směsi 11 na Obr. 4.2.14.



Obr. 4.2.14: Konturový graf z analýzy Směsi 11 (GC×GC-FID). Teplotní program: izotermální teplota 40 °C, split 1:100. Modulační perioda 2 s, pulz 500 ms.

Pro velmi jednoduché směsi analytů, jako je v tomto případě směs těkavých rozpouštědel (Směs 11 a Směs 17), lze s úspěchem použít velmi krátkých kolon (10 m a 1 m). Na analýzu reálných vzorků se však použít nedají z důvodu jejich nízké píkové kapacity. Pro analýzy většiny reálných vzorků byla proto dále používána první kolona délky 30 m a druhá kolona délek 2-5 m.

4.3 Přechod z GC×GC-FID na GC×GC-MS

Již optimalizovaný modulátor pro GC-FID byl přenesen a nainstalován do jiného plynového chromatografu vybaveného dvojicí detektorů: plamenově ionizačním (FID) a hmotnostním (MS). Zde se vyskytl problém s poměrně vysokým průtokem mobilní fáze na MS detektor, což se projevilo velmi výrazným zvýšením šumu, díky kterému se detektor stal prakticky nepoužitelným. Proto byly pro snížení průtoku do detektoru testovány dvě varianty: použití děliče toku nebo snížení vnitřního průměru kolon.

1) Dělič toku

Výstup z druhé kolony byl rozdělen pomocí děliče toku tak, aby bylo do MS detektoru vedeno pouze takové množství mobilní fáze, které nepřekračuje maximální

čerpací výkon vakuového systému MS detektoru, aby nedošlo k nárůstu tlaku ve vakuové části detektoru nad povolenou mez. Druhý výstup z děliče toku byl zaveden do FIDu. Rozdělení průtoků mezi detektory bylo provedeno pomocí kombinace kapilár různých délek a průměrů. Nakonec byla vybrána kombinace kapilár 50 cm × 0,1 mm do MS a 30 cm × 0,25 mm do FIDu (dělicí poměr 9/1 ve prospěch FIDu).

2) Snížení vnitřního průměru kolon

První kolona (Rxi-5Sil MS 20 m × 0,15 mm × 0,15 μm), druhá kolona (Supelcowax 10 5 m × 0,25 mm × 0,25 μm), skladovací kapilára (35 cm × 0,25 mm) a dvě pomocné kapiláry (40 cm × 0,32 mm) byly spojeny křemennými „Y“ spojkami z důvodu netěsnosti spojovacích prvků SilFlow na MS detektoru. Pro tuto sestavu byly nalezeny tyto optimální tlakové podmínky:

GC: 250 kPa, tlak ve větvi č. 1: 155 kPa, tlak ve větvi č. 2: 175 kPa. Pulz 300 ms a modulační perioda 4 s.

Nakonec bylo využíváno snížení průtoku na MS detektor pomocí děliče toku z důvodu nalezení ne příliš uspokojivého výsledku modulace při snížení vnitřního průměru kolon.

4.4 Porovnání účinnosti s kryofokusačním modulátorem ZOEX

Pulzní tlakový modulátor byl porovnán z hlediska účinnosti modulace s komerčním kryofokusačním modulátorem firmy ZOEX, kterým je vybaven stejný plynový chromatograf. Kolony byly zvoleny srovnatelné tak, aby bylo možné porovnání obou modulátorů.

Na Obr. 4.4.1 jsou dva konturové grafy při analýze Směsi 17 při použití dvou modulátorů (A kryofokusační modulátor, B pulzní tlakový modulátor). V obou případech byla použita první kolona SLB-5MS 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Druhá kolona byla v případě kryofokusačního modulátoru SOLGEL-WAX 2 m × 0,1 mm × 0,1 μm, u pulzního tlakového modulátoru Supelcowax 10 2 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Obě dvě mají stejnou stacionární fázi (polyethylenglykol), jejich vnitřní průměry a tloušťky filmu byly přizpůsobeny typu modulátoru. Skladovací kapilára byla v případě kryofokusačního modulátoru 2 m × 0,1 mm × 0,1 μm kolona SOLGEL-WAX za účelem snížení počtu spojů v systému (prodloužení druhé kolony),

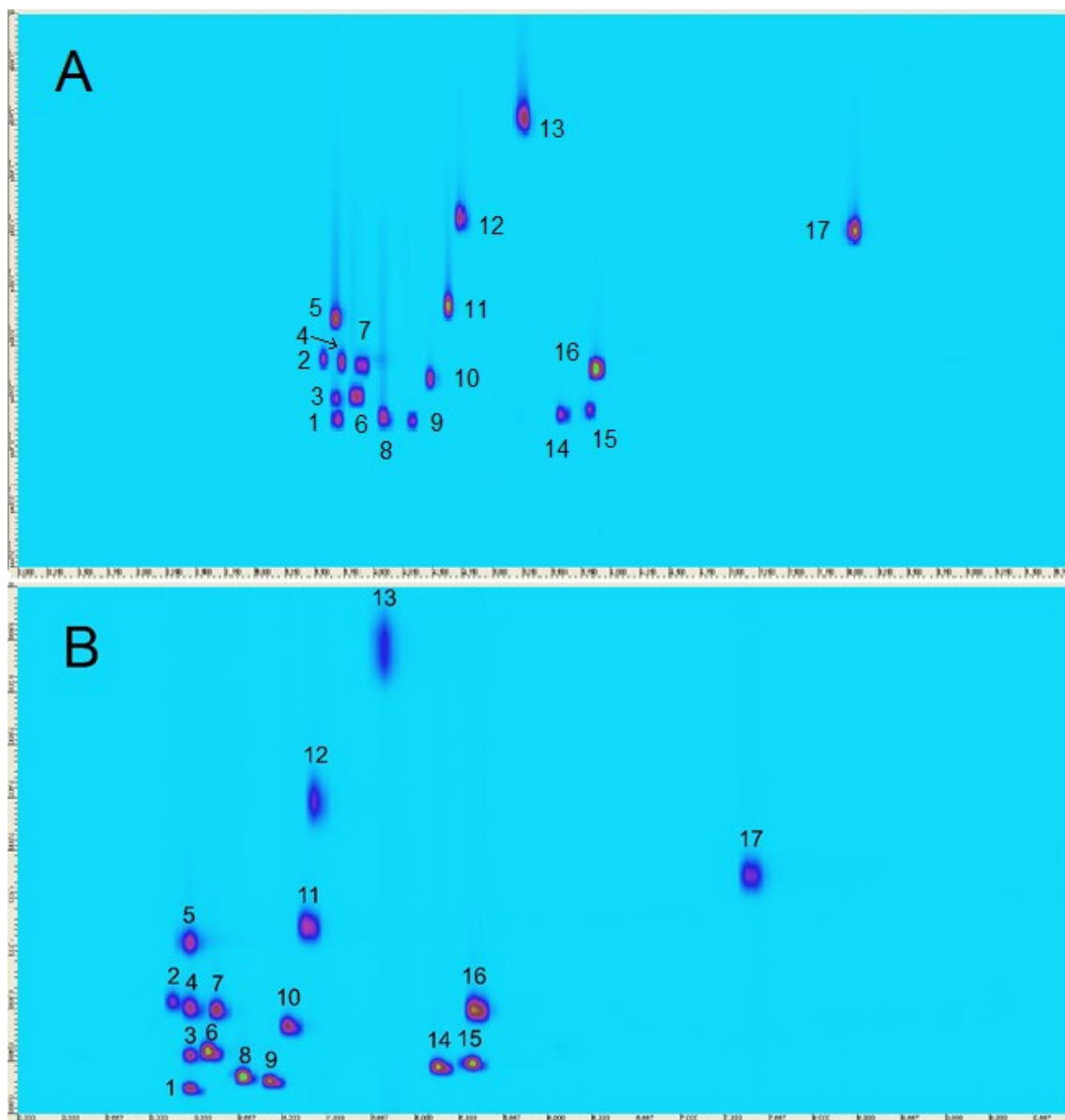
u pulzního tlakového modulátoru to byla nepokrytá kapilára rozměrů 35 cm × 0,25 mm. Doby analýz byly v obou případech stejné, retenční časy analytů byly velmi podobné. Při pohledu na Obr. 4.4.1 lze pozorovat vzájemné relativní polohy blobů. Způsob modulace tedy nemá zásadní vliv na retenci analytů na každé koloně, ta je ovlivněna pouze separačními mechanismy na každé koloně.

Pro kvantitativní srovnání byl vybrán parametr relativního produktu rozlišení r podle následujícího vztahu [101]:

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} {}^{2D}R_{j,k} / \left[\sum_{i=1}^{n-1} {}^{2D}R_{j,k} / (n-1) \right]^{(n-1)} \quad (3)$$

kde ${}^{2D}R_{j,k}$ je rozlišení pro jednotlivé dvojice látek se sousedními bloby a n celkový počet blobů v konturovém diagramu. Relativní produkt rozlišení může nabývat hodnot od nuly, pro kompletně překrývající se dva bloby, až po maximální hodnotu, kdy jsou všechny hodnoty rozlišení stejné. Hodnota r byla pro kryofokusační modulátor $r_K = 2 \cdot 10^8$, pro pulzní tlakový modulátor $r_{PFM} = 1,08 \cdot 10^6$. Tento podstatný rozdíl může být způsoben především produkcí širších modulovaných píků u pulzního tlakového modulátoru. Jako příklad rozdílné šířky blobů u obou typů modulátoru se můžeme podívat blíže na Obr. 4.4.1. Například blob č. 11 má v případě pulzního tlakového modulátoru rozměry 0,2 s × 0,166 min a v případě kryofokusačního modulátoru 0,1 s × 0,125 min.

Zajímavé také bylo srovnání identifikace jednotlivých analytů při použití tlakového modulátoru. Byly porovnány shody hmotnostních spekter ve dvou programech: GC Image pro konturové grafy a GCMS Solution pro klasické chromatogramy. V obou případech byla použita stejná knihovna hmotnostních spekter NIST 08 (Tabulka č. 4).



Obr. 4.4.1: Konturové grafy analýzy GC×GC Směsi 17 při použití dvou modulátorů: (A) kryofokusační modulátor pouze s MS, (B) pulzní tlakový modulátor s FID a MS. Číslování jednotlivých analytů je v obou případech identické: ethanol (1), acetonitril (2), 2-propanol (3), aceton (4), pentan (5), dichlormethan (6), methyl acetát (7), 2-methoxy-2-methylpropan (8), hexan (9), ethyl acetát (10), trichlormethane (11), 2-methyl-1-propanol (12), 1-butanol (13), 2,2,4-trimethylpentan (14), heptane (15), tert-butyl acetát (16), toluen (17).

Tabulka č. 4: Identifikace analytů ve Směsi 17 pomocí dvou programů a knihovny spekter NIST 08 při použití tlakového modulátoru.

Číslo blobu	Ret. čas I (min)	Ret. čas II (sec)	Název analytu	Shoda spekter GC Image (%)	Shoda spekter GCMS Solution (%)
1	3.27	0.18	pentan	86	97
2	3.13	0.84	ethanol	84	98
3	3.27	0.44	aceton	87	97
4	3.27	0.80	2-propanol	75	97
5	3.27	1.28	acetonitril	53	98
6	3.40	0.46	methyl acetát	76	97
7	3.47	0.78	dichlormethan	99	99
8	3.67	0.26	2-methoxy-2-methylpropan	67	93
9	3.87	0.24	hexan	82	97
10	4.00	0.66	ethyl acetát	95	98
11	4.13	1.40	trichlormethan	55	96
12	4.20	2.36	2-methyl-1-propanol	95	97
13	4.73	3.52	1-butanol	53	98
14	5.13	0.34	2,2,4-trimethylpentan	58	97
15	5.40	0.38	heptan	69	98
16	5.40	0.78	<i>tert</i> -butyl acetát	89	98
17	7.47	1.80	toluen	52	97

Zatímco shoda s knihovnou spekter u nejvyššího modulovaného píku v programu GCMS Solution byla v rozmezí 93 % pro 2-methoxy-2-methylpropan a 99 % pro dichlormethan, u programu GC Image byla shoda v rozsahu 52 % pro toluen a 99 % pro dichlormethan. Jelikož není přesně znám postup transformace dat u programu GC Image, je tato skutečnost bohužel nevysvětlena.

Při porovnání obou konturových grafů lze pozorovat, že u pulzního tlakového modulátoru s rostoucím retenčním časem na druhé koloně (osa *y*) dochází ke zmenšování signálu analytů. To je způsobeno tvorbou širších piků při modulaci, které jsou pravděpodobně způsobeny větší difuzí analytu na druhé koloně. K tomuto jevu u kryofokusačního modulátoru nedochází. Jedním z možných řešení by mohlo být ztenčení filmu stacionární fáze druhé kolony, které však nebylo vyzkoušeno. Jedná se však pouze o domněnku, tento jev nenastával pravidelně, a proto nebyl dále studován.

Průměrná opakovatelnost retenčních časů (relativní směrodatná odchylka) byla u pulzního tlakového modulátoru přibližně 2 % (kryofokusační přibližně 0,5 %) a ploch piků přibližně 3,5 % (kryofokusační přibližně 1 %). Závěrem lze říci, že pulzní tlakový

modulátor je při správném nastavení všech parametrů srovnatelným a použitelným nástrojem modulace. Bohužel, komerční kryofokusační modulátor je stále účinnějším nástrojem modulace. Výhodou pulzního tlakového modulátoru je však velmi nízká pořizovací cena a téměř nulové provozní náklady, na rozdíl od komerčního modulátoru ZOEX.

4.5 Analýza levandulového extraktu

Vzorek levandulového extraktu po extrakci vodní parou byl získán jako dar od školy JERGYM v Liberci po skončení SOČ jejich studenta u nás v laboratoři. Tento extrakt byl postupně analyzován na dvou různých sestavách kolon při současném připojení obou detektorů (FID i MS).

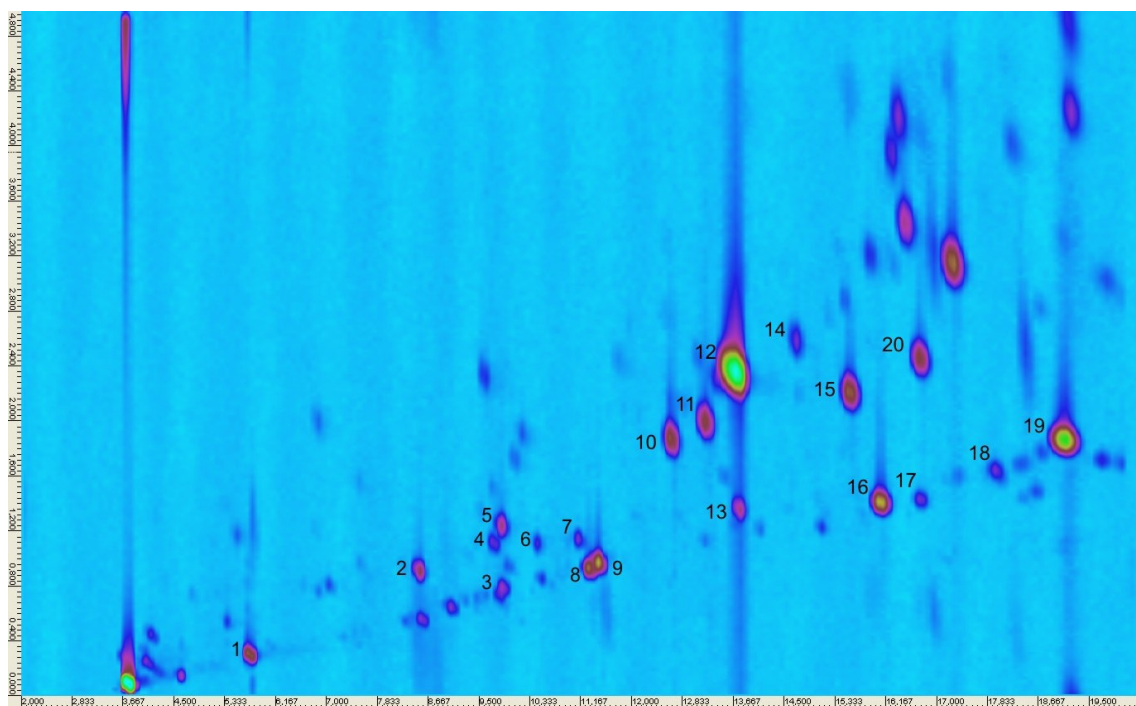
První, konvenční, sestava obsahovala:

- I. kolona: Rxi-5Sil MS (20 m × 0,15 mm × 0,15 μm)
- II. kolona: Supelcowax 10 (2 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

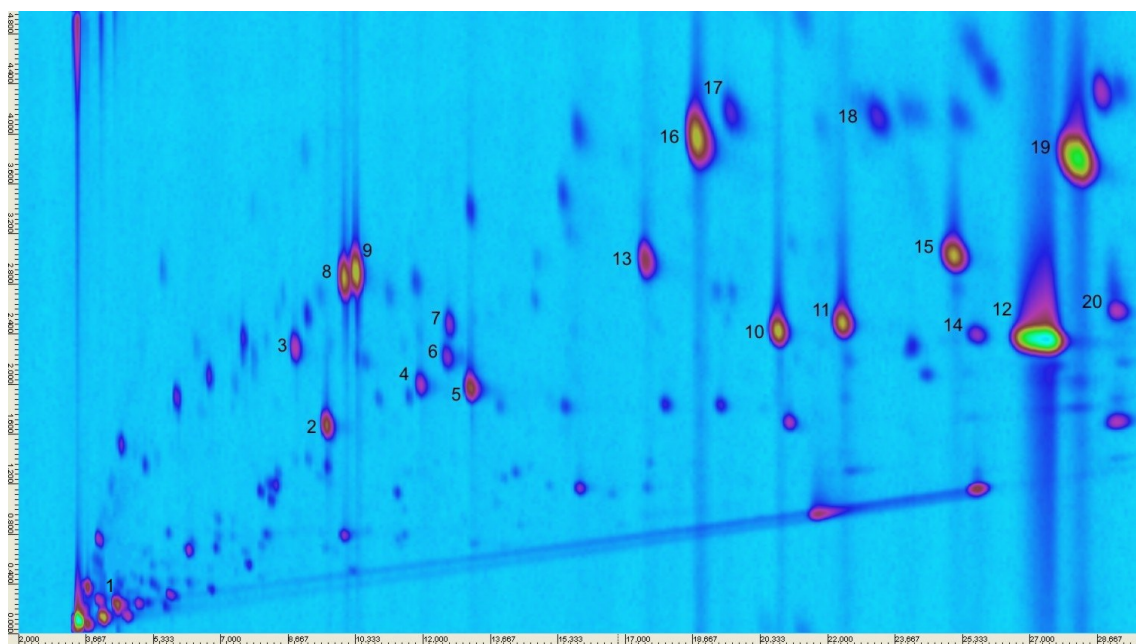
Druhá, reverzní, sestava obsahovala:

- I. kolona: Stabilwax (20 m × 0,15 mm × 0,15 μm)
- II. kolona: Rxi-5Sil MS (2 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Záměrně byly zvoleny sestavy tak, aby v nich pořadí polarity stacionární fáze první a druhé kolony bylo prohozeno. U konvenční sestavy by se měly analyty separovat v první dimenzi podle jejich bodu varu, jelikož první kolona je nepolární. U reverzní sestavy by naopak měly být analyty separovány v první dimenzi podle polarity. Pokud by tedy vzorek obsahoval více látek různé polarity, bylo by vhodnější použití reverzní sestavy. Konturový graf analýzy při použití konvenční sestavy je na Obr. 4.5.1, při použití reverzní sestavy na Obr. 4.5.2. Byly také zakoupeny dva vzorky etherických olejů do aroma lampy s vůní levandule za účelem jejich vzájemném porovnání. Jeden vzorek byl od značky Pajoma a druhý od privátní značky drogerie DM.



Obr. 4.5.1: Konturový graf analýzy (GC×GC-FID/MS) levandulového extraktu při použití konvenční sestavy. Číslo blobů odpovídají Obr. 4.5.2 a jsou vysvětlena v Tabulce č. 5. Experimentální podmínky: teplotní program 70 °C do 150 °C při 4 °C/min a poté 150 °C po 10 min. Tlak na plynovém chromatografu, prvním a druhém ventilu: 250, 155 and 175 kPa. Modulační perioda 5,0 s, pulz 300 ms.



Obr. 4.5.2: Konturový graf analýzy (GC×GC-FID/MS) levandulového extraktu při použití reverzní sestavy. Číslo blobů odpovídají i Obr. 4.5.1 a jsou vysvětlena v Tabulce č. 5. Experimentální podmínky: stejné jako u Obr. 4.5.1.

Pomocí MS byly identifikovány analyty v obou dvourozměrných chromatogramech. V Tabulce č. 5 jsou tyto analyty opět porovnány při identifikaci s knihovnou spekter NIST 08 ve dvou programech (GC Image a GCMS Solution) při obou sestavách při použití tlakového modulátoru.

Tabulka č. 5: Identifikace analytů v levandulovém extraktu při použití konvenční a reverzní sestavy pomocí dvou programů a knihovny spekter NIST 08.

Blob č.	Analyt	Retenční čas				Shoda s knihovnou NIST 08 (%)			
		Konvenční uspořádání		Reverzní uspořádání		Konvenční uspořádání		Reverzní uspořádání	
		I. (min)	II. (s)	I. (min)	II. (s)	GC Image	GCMS Solution	GC Image	GCMS Solution
1	ethyl acetát	5.67	0.30	4.42	0.22	97	84	51	97
2	sabinen	8.50	0.90	9.58	1.66	65	95	65	97
3	β-myrcen	9.83	0.78	8.83	2.28	34	95	42	95
4	3-oktanon	9.67	1.12	11.92	1.98	19	96	27	94
5	2-oktanon	9.83	1.22	13.17	1.96	79	96	59	98
6	hexyl acetát	10.42	1.10	12.58	2.20	20	96	37	98
7	σ-cynen	11.08	1.14	12.58	2.48	30	95	30	94
8	limonen	11.25	0.92	10.00	2.84	22	94	21	95
9	eucalyptol	11.42	0.96	10.33	2.88	87	94	83	91
10	cis-linalool oxide	12.58	1.86	20.75	2.42	32	95	45	96
11	trans-linalool oxide	13.17	1.98	22.33	2.48	46	96	66	96
12	linalool	13.67	2.34	27.33	2.34	92	97	89	97
13	okten-1-ol, 1-acetát	13.75	1.34	17.42	2.98	56	91	72	96
14	plinol	14.67	2.58	25.67	2.38	30	94	43	94
15	kafr	15.50	2.20	25.08	3.02	46	97	46	96
16	3,5,5-trimethylhexyl acetát	16.00	1.40	18.75	3.94	92	94	86	95
17	hexyl butyrát	16.67	1.42	19.58	4.16	57	94	56	97
18	terpinolen	17.92	1.64	23.17	4.14	19	90	12	96
19	linalool acetát	19.08	1.86	28.17	3.80	73	98	62	98
20	terpinen-4-ol	16.67	2.46	29.08	2.58	48	94	48	95

Při pohledu do Tabulky č. 5 je patrné, že některé analyty mají v obou typech sestavy stejnou shodu s databází spekter v obou programech: sabinen, σ-cynen, limonen a další. Naopak některé analyty se ve shodách velmi liší: ethyl acetát, 2-oktanon či trans linalool oxide. To může být způsobeno nepatrným růstem šumu s rostoucí teplotou a tím dosažení méně čistých hmotnostních spekter jednotlivých analytů.

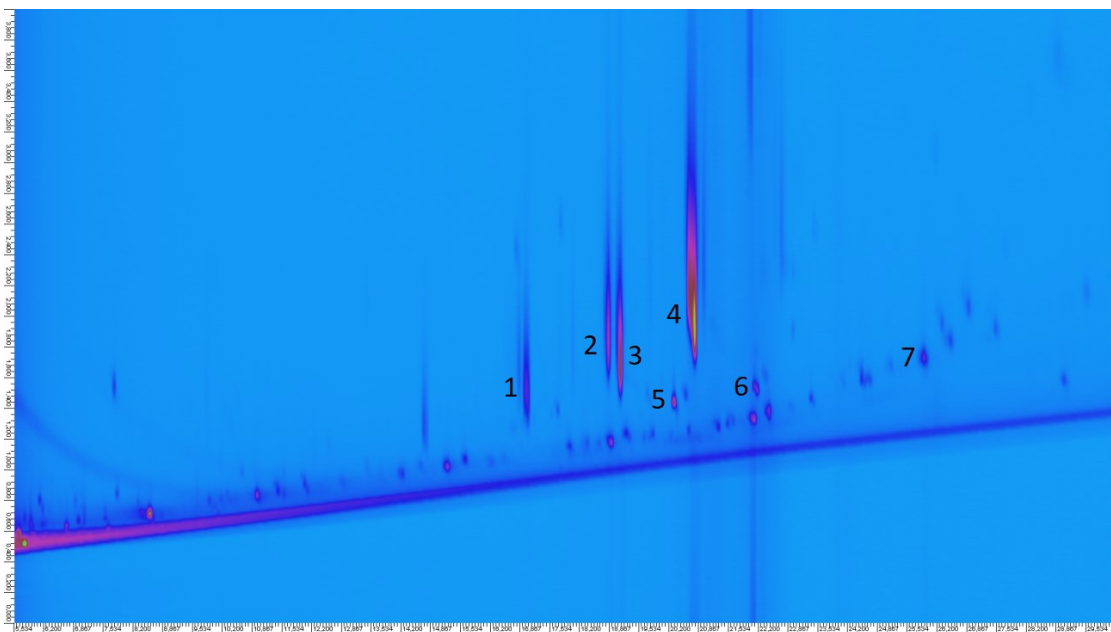
Porovnáním extraktu z levandule s etherickými oleji bylo pozorováno zastoupení stejných analytů ve všech případech. Lišily se pouze množstvím obsaženým v jednotlivých vzorcích, což může být důsledek extrahování různých použitých rostlin

levandule (druh, doba sklizně, místo růstu). Původně zamýšlený důkaz přítomnosti jiných látek oproti přírodní levanduli byl negativní.

Který typ sestavy (konvenční nebo reverzní) zvolit s větším úspěchem separace analytů pro analýzu extraktu z levandule nelze jednoznačně říci. Relativní produkt rozlišení je v obou případech velmi podobný, avšak při srovnání jednotlivých konturových grafů si můžeme všimnout, jak některé kritické páry analytů jsou více či méně rozseparované. Jako kritický pár je zde Limonen a Eukalyptol (8 a 9), který se nepodařilo plně rozdělit ani na jedné sestavě. To může být způsobeno jejich podobnými fyzikálními (bod varu) i chemickými (polarita) vlastnostmi. Zajímavé jsou také páry, které by při použití pouze první kolony (ať už polární či nepolární) nebyly rozseparovány vůbec a tvořily by pouze jeden pík. Např: páry 3-5, 12-13 v konvenční sestavě nebo pár 6-7 v reverzní sestavě.

4.6 Analýza toxikologických vzorků

Při testování funkčnosti modulátoru pouze na FIDu byly k dispozici anonymizované vzorky z Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie VFN v Praze. Jednalo se o extrakty v ethylacetátu z krve, orgánového moku, žaludečního obsahu a moči tří jedinců. Jako příklad je zde uveden trimethylsilylovaný kyselý extrakt ze séra, které obsahuje účinné látky z léčiv (na obrázku velké bloby uprostřed), které pravděpodobně způsobily otravu jedince (Obr. 4.6.1).

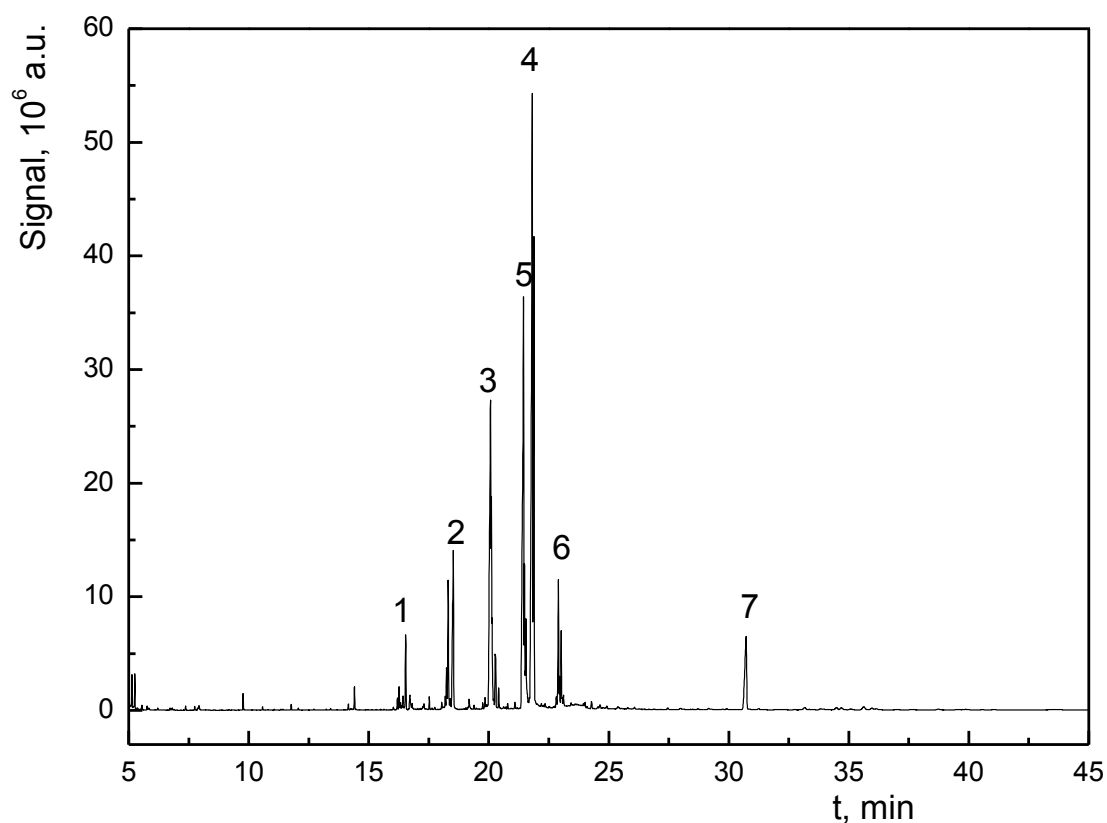


Obr. 4.6.1: Konturový graf GC×GC-FID analýzy kyselého extraktu z krve ze vzorku Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie VFN v Praze. Podmínky analýzy: teplotní program od 80 °C do 260 °C při 10 °C/min, poté 10 min izotermálně, split 1:0,1, tlak na GC: 130 kPa, tlak v pomocné kapiláře 1: 120 kPa, tlak v pomocné kapiláře 2: 85 kPa, pulz: 100 ms, modulační perioda: 4 s.

I. kolona: CP-Sil 5CB 10 m × 0,15 mm × 0,15 μm, II. kolona: Supelcowax 10 1 m × 0,25 mm × 0,25 μm, skladovací kapilára: 35 cm × 0,25 mm. Kyselina myristová (1), kyselina linolová (2), kyselina palmitová (3), kyselina stearová (4), venlafaxin (5), trazodon (6), cholesterol (7).

Při pohledu na konturový graf nelze přehlédnout linii ve spodní třetině grafu táhnoucí se přes celý retenční čas osy *x*. Jedná se o zvýšený šum základní linie, který vznikl při mírném odklonu od tlakového optima. Ten musel být zvolen kvůli urychlení retence analytů na druhé koloně vzhledem k jejich retenčním vlastnostem. Tato linie však i velmi dobře zobrazuje mrtvý čas na druhé koloně. Jinými slovy: bloby, které by se nacházely pod touto linií, jsou důsledkem wrap-around efektu, a tím pádem by bylo potřeba prodloužit modulační periodu.

Pro porovnání je na Obr. 4.6.2 chromatogram z klasické GC-MS získaný z Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie VFN v Praze. Lze si všimnout, že polohy majoritních píků jsou si navzájem podobné. Byla zde zjištěna přítomnost venlafaxinu a trazodonu.



Obr. 4.6.2: Chromatogram z klasické GC-MS analýzy téhož vzorku jako na Obr. 4.6.1. Ilustruje shodu majoritních píků s Obr 4.6.1. Číslování stejné jako u Obr 4.6.1.

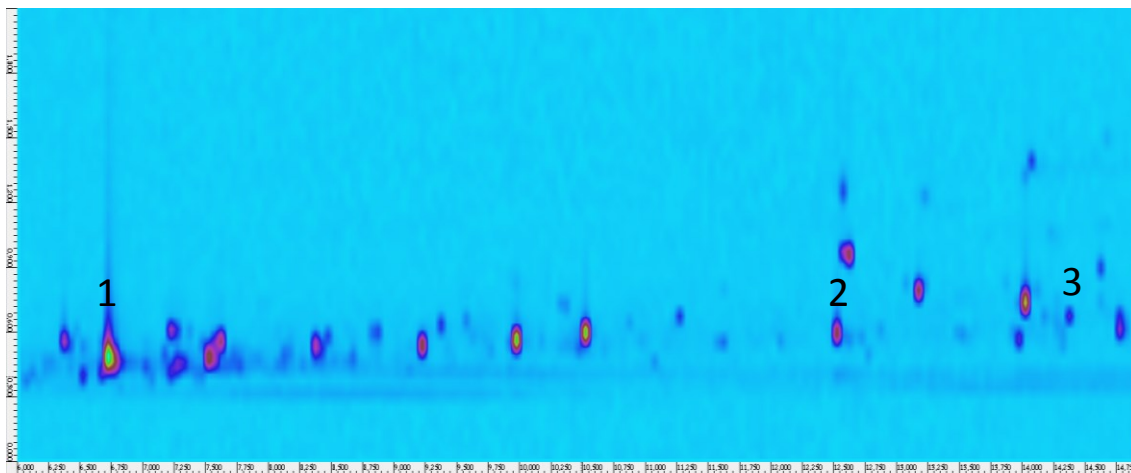
4.7 Analýza fosfolipidů

Fosfolipidy jsou v naší laboratoři dlouhodobě měřeny díky spolupráci s Katedrou genetiky a mikrobiologie Univerzity Karlovy. Jedná se o fosfolipidy získané z cytoplazmatické membrány u gram-pozitivní tyčinkovité půdní bakterie *Bacillus subtilis*. Hlavním předpokladem použití vzorků pro analýzy na GC×GC s tlakovým pulzním modulátorem byla bipolarita struktury molekul fosfolipidů.

Vzorek byl připraven dle kapitoly 3.10 [89-91] a rozdělen na dva, jeden obsahující polární části a druhý mastné kyseliny. V případě analýzy polárních částí bylo očekáváno větší množství analytů, proto byla metoda GC×GC vhodná. U analýzy mastných kyselin se jedná spíše o separaci v první dimenzi a dá se s úspěchem použít klasická GC.

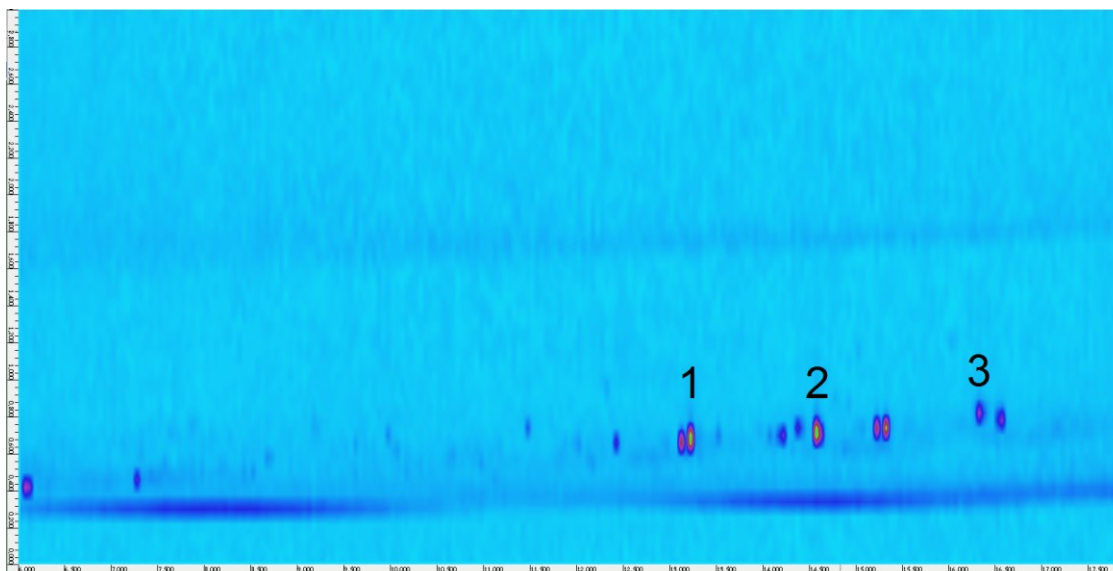
Na Obr. 4.7.1 je ukázka analýzy silanizovaných polárních částí z fosfolipidů získaných z bakterie *Bacillus subtilis*, kde byly určeny tris(trimethylsilyl) fosfát (1),

tetra(trimethylsilyl) fosfoglycerol (2) a tetra(trimethylsilyl) fosfoserin (3). Tyto analyty byly dále kvantifikovány pro potřeby Katedry genetiky a mikrobiologie, na jejichž základě mohou kolegové dále studovat odezvu bakterie na prostředí, ve kterém se nachází.



Obr. 4.7.1: GC×GC-FID/MS analýza polárních částí z fosfolipidů získaných z *Bacillus subtilis*: (1) tris(trimethylsilyl) fosfát, (2) tetra(trimethylsilyl) fosfoglycerol, (3) tetra(trimethylsilyl) fosfoserin. Podmínky analýzy: teplotní program od 100 °C do 250 °C při 10 °C/min, split 1:10, tlak na GC: 130 kPa, tlak v pomocné kapiláře 1: 120 kPa, tlak v pomocné kapiláře 2: 85 kPa, pulz: 100 ms, modulační perioda: 3 s. I. kolona: CP-Sil 5CB 10 m × 0,15 mm × 0,15 μm, II. kolona: Supelcowax 10 1 m × 0,25 mm × 0,25 μm, skladovací kapilára: 35 cm × 0,25 mm.

Na Obr. 4.7.2 je analýza mastných kyselin pocházejících z fosfolipidů získaných z bakterie *Bacillus subtilis*, kde byly dále kvantifikovány tyto kyseliny: (1) 12-methyldekanová, (2) palmitová a (3) olejová. Na výsledném konturovém grafu se kyseliny nachází v jedné přímce, což ukazuje na takřka nevyužitou druhou dimenzi (žádná separace ve směru osy *y*).



Obr. 4.7.2: GC×GC-FID/MS analýza mastných kyselin fosfolipidů získaných z *Bacillus subtilis*: (1) kyselina 12-methyl tetradekanová, (2) kyselina palmitová, (3) kyselina olejová. Podmínky analýzy: stejné jako v případě Obr. 4.7.1.

4.8 Analýza obranných látek ploštic

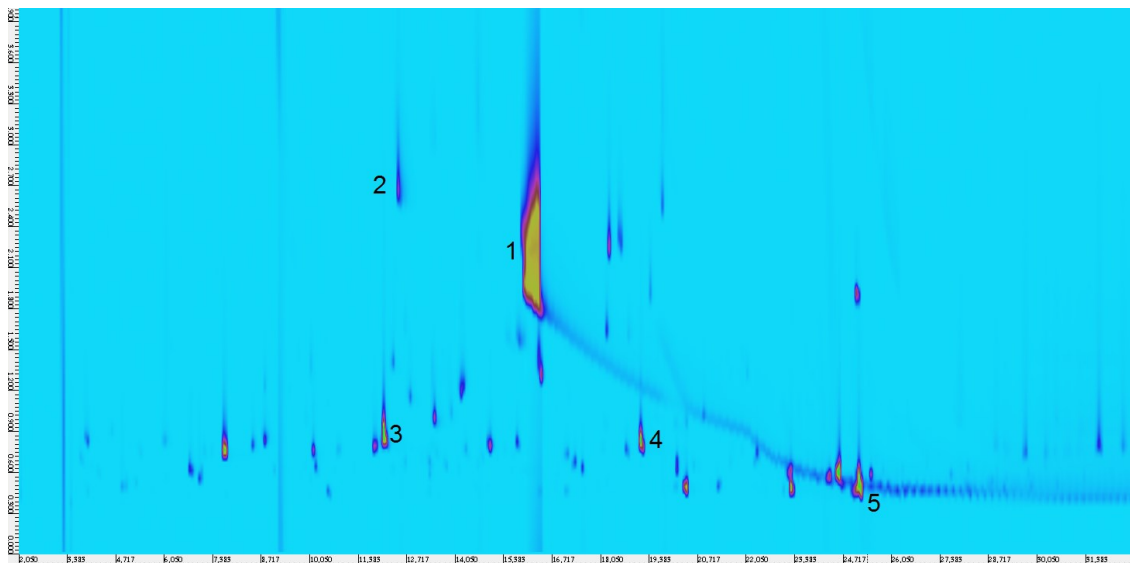
Již v průběhu klasické GC analýzy obranných látek u rodu *Pyrrhocoris apterus* bylo zjištěno velké množství analytů různé polaritě [92]. Proto se tento vzorek zdál ideální pro GC×GC analýzu a pro otestování tlakového pulzního modulátoru. Způsob odběru vzorku na SPME vlákno vycházel z článku [92].

Sestava pro modulátor byla následující:

- I. kolona: Rxi-5Sil MS (20 m × 0,15 mm × 0,15 μm)
- II. kolona: Supelcowax 10 (2 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Výstup z druhé kolony byl veden do děliče, ze kterého byl zapojen přes kapiláry různých rozměrů do MS a FID (viz kapitola 3.7).

Bohužel sestava nevykazovala dostatečnou citlivost detekce analytů a tento způsob dávkování vzorku nemohl být použit. Samotný FID není z principu dostatečně citlivý detektor a u MS se signál ztrácel ve vyšším šumu. Pro ilustraci, jak by tato analýza měla vypadat, je na Obr. 4.8.1 uveden záznam při použití kryofokusačního modulátoru na stejných kolonách (II. kolona byla pouze rozměrů 2 m × 0,1 mm × 0,1 μm) pouze s MS.

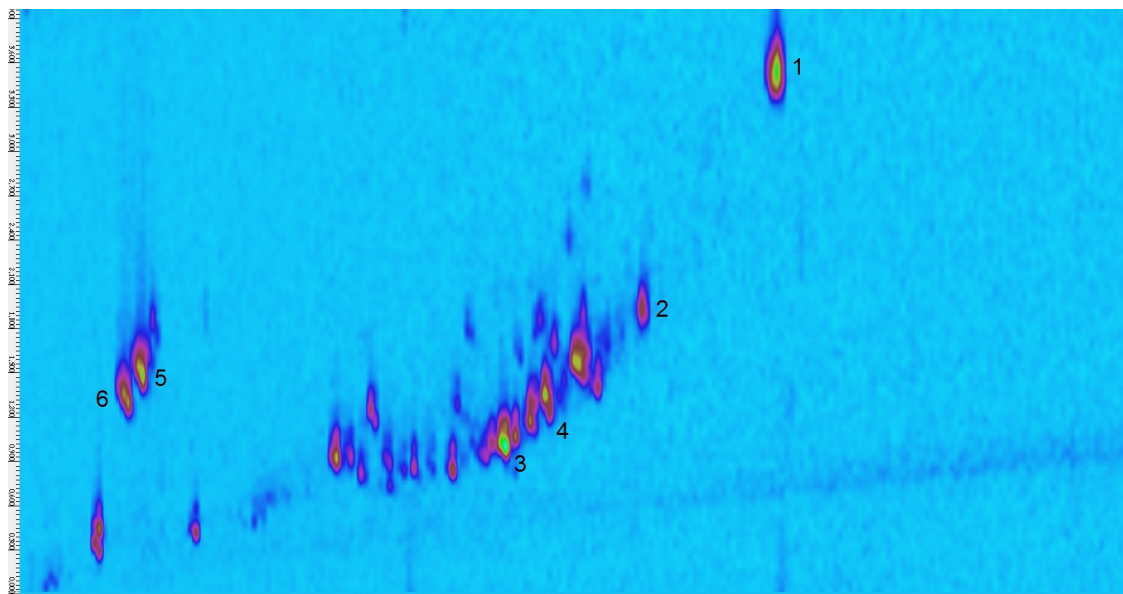


Obr. 4.8.1: Konturový graf GC×GC-MS analýzy obraných látek plošnice *Pyrrhocoris apterus* při použití kryofokusačního modulátoru: (1) 5-ethyl furanon, (2) 5-methyl furanon, (3) 2-hexenal, (4) 2-oktenal, (5) 2-decenal. Podmínky analýzy: teplotní program od 40 °C do 260 °C při 5 °C/min, poté 10 min izotermálně, splitless 1 min, konstantní průtok 35 cm/s, pulz: 375 ms, modulační perioda: 4 s.

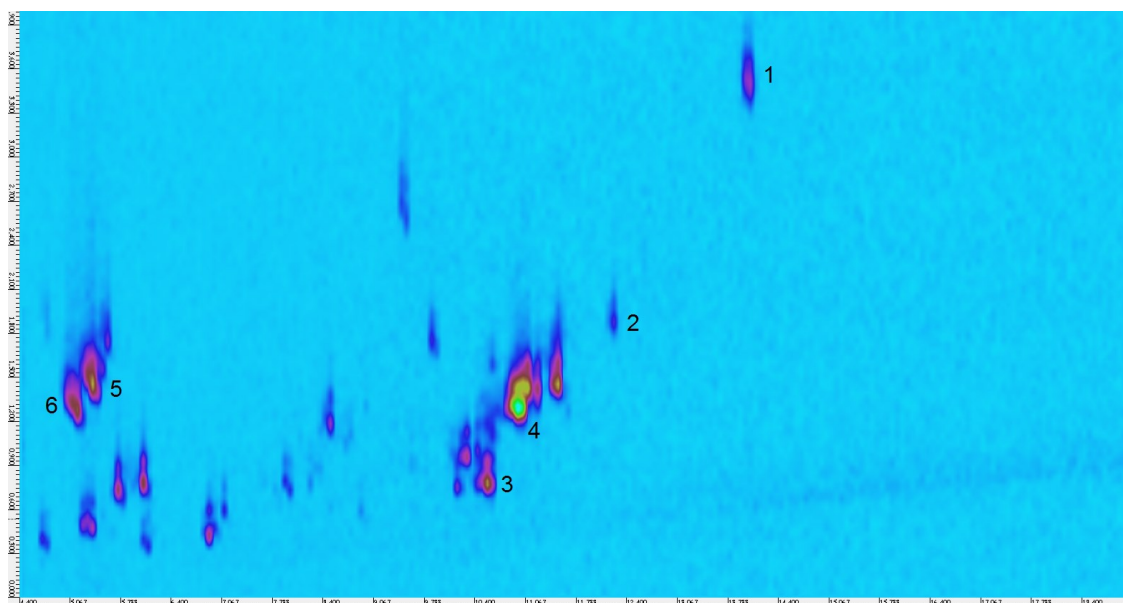
4.9 Analýza vybraných parfémů

Parfémy jsou díky svému složení, stejně jako petrochemické produkty, ideální vzorky pro GC×GC a v tomto případě i pro testování modulátoru. Na stejné sestavě na GC×GC-FID/MS, jako byla zvolena konvenční u analýzy levandule, byly změřeny postupně tři vzorky parfémů. Jednalo se o obchodní názvy Boss (Obr. 4.9.1), Felicity (Obr. 4.9.2) a Volare (Obr. 4.9.3) jednoho výrobce parfémů.

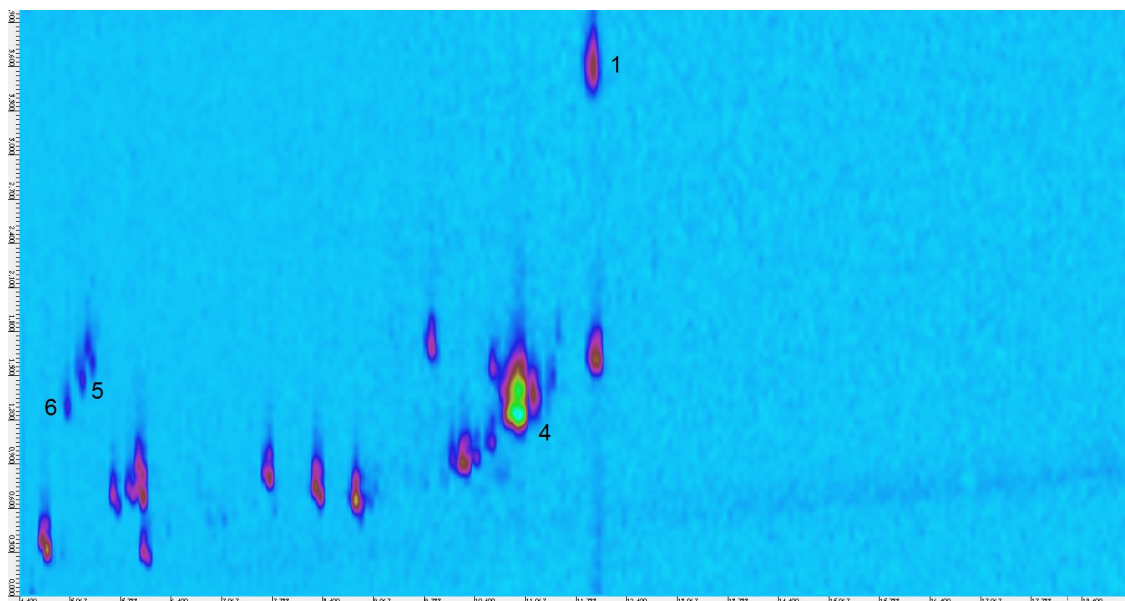
Ve všech případech byl použit stejný teplotní program: od 70 °C rychlostí 2 °C/min do 150 °C a poté ještě 10 min izotermálně. Split byl 1:1 a dávkování 1 µl. Vzorek byl čistý parfém bez ředění.



Obr. 4.9.1: Konturový graf GC×GC-FID/MS analýzy parfému Boss: (1) ethylen brassylát, (2) benzylacetát, (3) linalol, (4) ethyl linalol, (5) 1-propanol 2,2-oxybis, (6) 2-propanol 2,2-oxybis. Podmínky analýzy: teplotní program od 70 °C do 150 °C při 2 °C/min, poté 10 min izotermálně, split 1:1, pulz: 300 ms, modulační perioda: 4 s.



Obr. 4.9.2: Konturový graf GC×GC-FID/MS analýzy parfému Felicity: čísla stejná jako Obr. 4.9.1. Podmínky analýzy stejné jako Obr. 4.9.1.



Obr. 4.9.3: Konturový graf GC×GC-FID/MS analýzy parfému Volare: čísla stejná jako Obr. 4.9.1. Podmínky analýzy stejné jako Obr. 4.9.1.

Při porovnání těchto tří vzorků mezi sebou lze pozorovat výskyt stejných majoritních analytů: linalolu, ethyl-linalolu, benzylacetátu či ethylen brassylátu. Zajímavým zjištěním je, že zatímco analýza obranných látek ploštic nebyla při použití pulzního tlakového modulátoru s MS uskutečnitelná, analýza parfémů a extraktu levandule byla provedena bez problémů. Toto porovnání odráží skutečnost, že použití MS detekce s pulzním tlakovým modulátorem je úspěšné pouze při dostatečně koncentrovaném vzorku. Naprosto nevhodnou by tedy byla jakákoliv stopová analýza, kde se GC×GC občas užívá.

5 Shrnutí

1. Postupně byly sestrojeny tři řídicí jednotky tlakového pulzního modulátoru lišící se konstrukcí. Poslední verze je již kompletně připravena ke komerčnímu využití, zastoupení firmou Chromservis s.r.o (Příloha VI).
2. Byl sestaven upravený modulátor pro možnost rychlé výměny kolon a ke každé sestavě kolon nalezena tlaková optima a doby modulačních period a pulzů v závislosti na typu vzorku.
3. Podrobně byly popsány a vysvětleny vztahy v systému, zvláště pak při optimalizaci tlaků a časování jednotlivých ventilů.
4. Na různých sestavách kolon byly optimalizovány podmínky tak, aby v budoucnu bylo možné použít optimální kombinaci kolon a pracovních podmínek pro určitý typ vzorku a získat tak úspěšnou separaci.
5. Pulzní tlakový modulátor byl úspěšně použit v kombinaci s hmotnostním detektorem s kvadrupólem jako analyzátozem, kdy bylo vybráno řešení s dělením toku mezi hmotnostní a plamenově ionizační detektor. Na tomto systému byl porovnán pulzní tlakový modulátor s modulátorem kryofokusačním firmy ZOEX.

Aby se pulzní tlakový modulátor v kombinaci s hmotnostním detektorem vyrovnal použití kryofokusačního modulátoru, musí být splněny dvě podmínky: krátká retence na druhé koloně a patřičně koncentrovaný vzorek.
6. Na příkladu analýzy levandulového extraktu byla demonstrována výhoda a možnost reverzního zapojení kolon a ukázána rozdílná shoda hmotnostních spekter s knihovnou v případě dvou různých vyhodnocovacích programů.
7. Pro ilustraci univerzálnosti použití modulátoru byl zanalyzován kyselý extrakt z krve ze vzorku z Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie VFN v Praze.

8. V rámci spolupráce našeho vědeckého týmu s Katedrou genetiky a mikrobiologie byly analyzovány fosfolipidy získané z cytoplazmatické membrány u gram-pozitivní tyčinkovité bakterie *Bacillus subtilis*.

9. Při pokusu o neletální dávkování vzorku obranných látek ploštíc pomocí SPME se ukázal pulzní tlakový modulátor v kombinaci s hmotnostním detektorem jako nevhodný nástroj pro GC×GC analýzy z důvodu velmi nízké citlivosti metody. Ta je způsobena tím, že velká část průtoku z druhé kolony musí být pro správnou funkčnost detektoru odvedena pryč mimo MS detektor. Z toho důvodu byl pro vzorek na GC×GC pomocí SPME dávkování použit kryofokusační modulátor.

10. Na stejném systému s konvenčním zapojením kolon, jako byly analyzovány extrakty z levandule, byly analyzovány tři parfémy jednoho výrobce.

6 Závěr

Cílem dizertační práce bylo sestavit, vyzkoušet a optimalizovat podmínky použití pulzního tlakového modulátoru (PFM) pro komprehenzivní plynovou chromatografii na plynovém chromatografu s FID a MS detektorem a porovnat jeho účinnost modulace s kryofokusačním komerčním modulátorem značky ZOEX.

Během práce byly sestaveny tři typy řídicích jednotek a byl vyvinut robustní PFM. Parametry PFM byly vždy optimalizovány tak, aby byl použitelný s různými rozměry kolon. Příklad sestavy pro použití s hmotnostním detektorem: první kolona (Rxi-5Sil MS $20\text{ m} \times 0,15\text{ mm} \times 0,15\text{ }\mu\text{m}$), druhá kolona (Supelcowax 10 $2\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$), skladovací kapilára ($35\text{ cm} \times 0,25\text{ mm}$) a dvě pomocné kapiláry ($40\text{ cm} \times 0,32\text{ mm}$), z děliče toku za druhou kolonou byla $50\text{ cm} \times 0,1\text{ mm}$ kapilára do MS detektoru a $30\text{ cm} \times 0,25\text{ mm}$ do FIDu. Pro tuto sestavu byly nalezeny optimální tlakové podmínky tyto: GC: 250 kPa, tlak v pomocné kapiláře č. 1: 155 kPa, tlak v pomocné kapiláře č. 2: 175 kPa. Doba pulzu byla poté 300 ms a modulační perioda 4 s.

Na sestavách s PFM byly pro demonstraci jeho funkčnosti provedeny analýzy komplexních reálných vzorků, jako jsou vzorky esenciálních olejů, ropných derivátů, parfémů a biologických vzorků. PFM byl porovnán s komerčním kryofokusačním modulátorem Zoex, kterým byl vybaven stejný plynový chromatograf. Byly použity shodné kolony a vzorek (směs těkavých rozpouštědel). Průměrná opakovatelnost retenčních časů (relativní směrodatná odchylka) byla u pulzního tlakového modulátoru přibližně 2,0 % (kryofokusační přibližně 0,5 %) a ploch píků přibližně 3,5 % (kryofokusační přibližně 1,0 %). PFM je při správném nastavení všech parametrů použitelným nástrojem modulace. Komerční kryofokusační modulátor je však stále robustnější a účinnější, avšak výhodou PFM je jeho velmi nízká pořizovací cena a téměř nulové provozní náklady.

Závěrem lze tedy říci, že všechny cíle této dizertační práce byly splněny.

7 Seznam zkratek a symbolů

$^{2D}R_{j,k}$ - rozlišení pro jednotlivé dvojice látek se sousedními bloby

% - procento

°C - stupeň Celsia

°C/min - stupeň Celsia za minutu

2D - dvourozměrný (prostor)

3D - třírozměrný (prostor)

ANOVA- analysis of variance, analýza rozptylu

COM - sériový port pro připojení přídavného hardwaru

DFM - modulátor s diferenciálním tokem

FID - plamenově ionizační detektor

FSM - modulátor s přepínaným tokem

GC - jednorozměrná plynová chromatografie

GC×GC - komprehenzivní plynová chromatografie

GC×GC-FID - komprehenzivní plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

GC×GC-FID+MS - komprehenzivní plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem a hmotnostním detektorem

GC×GC-MS - komprehenzivní plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

GC×GC-TOF-MS - komprehenzivní plynová chromatografie s time-of-flight analyzátozem a hmotnostním detektorem

GC-FID - plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Kč - Koruna česká

l - délka [m, cm, mm, μm]

LCD - Liquid Crystal Display - displej z tekutých krystalů,

MS - hmotnostní detektor

n - celkový počet blobů v konturovém diagramu

OFAT- one-factor-at-a-time, v čase změna pouze jednoho faktoru

osa x , y , z - označení libovolného trojrozměrného prostoru pomocí tří os

PC - personal computer, osobní počítač

PFM - tlakový pulzní (fluidní) modulátor

r - relativní produkt rozlišení

r_K - r pro kryofokusační modulátor

r_{PFM} - r pro pulzní tlakový modulátor

R_x - rozlišení v ose x

R_y - rozlišení v ose y

R_s - rozlišení v prostoru k nejbližšímu sedlu píku

SIM - single-ion-monitoring, sledování jednoho iontu

SPME - Solid phase micro-extraction, mikroextrakce tuhou fází

SPME GC-MS- kombinace mikroextrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem

t - čas [min, s, ms,]

TOF - time-of-flight, průletový analyzátor

USB - Universal Serial Bus, rozhraní pro připojení přídatného hardwaru

V - Volt, značka pro jednotku napětí U

VFN - Všeobecná fakultní nemocnice

8 Seznam publikací a konferenčních příspěvků

Publikace:

- [1] **Ston, M.**; Cabala, R.; Bierhanzl, V. M.; Krajicek, J.; Bosakova, Z.: Improved flow modulator construction for GC × GC with quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **2016**, 54, 1481–1488. [IF: 1,32]
- [2] Bierhanzl, V. M.; Bursová, M.; **Ston, M.**; Čabala, R.; Seydlová, G.: Simultaneous analysis of polar and non-polar components of cell membrane phospholipids by GC-MS. *Chemical Papers* **2016**, 70, 1309–1315. [IF: 1,33]
- [3] Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; **Ston, M.**; Katora, P.; Ferenczy, V.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Seydlová, G.: Direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography, and gas chromatography of *Bacillus subtilis* phospholipids. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **2016**, 147, 1385–1391. [IF: 1,13]
- [4] Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; **Ston, M.**; Kubinec, R.; Szabó, A. H.; Podolec, P.: Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol and phosphate. *Journal of Separation Science* **2015**, 38, 67–72. [IF: 2,74]
- [5] Krajicek, J.; Havlikova, M.; Bursova, M.; **Ston, M.**; Cabala, R.; Exnerova, A.; Stys, P.; Bosakova, Z.: Comparative Analysis of Volatile Defensive Secretions of Three Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method. *Plos One* **2016**, 11, 1–19. [IF: 3,06]

Konferenční příspěvky:

- [1] Ston, M.; Cabala, R.: Improved flow modulator construction for GC x GC with simultaneous flame ionization and quadrupole mass spectrometry detection. 6th EuCheMS Chemistry Congress, Seville, Spain. 11. – 15. 9. 2016

- [2] Ston, M.: Tlakový pulsní modulátor pro GC×GC jako alternativa kryogenních modulátorů. Přednáška na ACD 2016 – Albertov Comprehensive Days, Praha, Česká republika. 9. 2. 2016
- [3] Ston, M.; Cabala, R.: Economic flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography with simultaneous flame ionization and quadrupole mass spectrometry detection. 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Beijing, China. 21. – 25. 9. 2015
- [4] Ston, M.; Čabala, R.: Pressure modulator development and its optimization for applications in comprehensive gas chromatography. 10th ISC Modern Analytical Chemistry, Praha, Česká republika. 22. 9. 2014
- [5] Ston, M.; Cabala, R.: Pressure modulator development and its optimization for applications in comprehensive gas chromatography. ISC 2014 - International Symposium on Chromatography, Salzburg, Austria. 14. – 18. 9. 2014
- [6] Ston, M.; Cabala, R.: Pressure modulator optimization for comprehensive gas chromatography. 20th International Symposium on Electro- and Liquid-Phase Separation Techniques, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Islands, Spain. 6. – 9. 10. 2013
- [7] Ston, M.; Čabala, R.: Pressure modulator development and optimization for applications in comprehensive gas chromatography. 9th ISC Modern Analytical Chemistry, Praha, Česká republika. 23. 9. 2013

9 Použitá literatura

1. Kulsing, Ch.; Nolvachai, Y.; Rawson, P.; Evans, D.J.; Marriott, P.J.,
Continuum in MDGC Technology: From Classical Multidimensional to
Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography.
Analytical Chemistry **2016**, 88, 3529-3538.
2. Ong, R.C.Y.; Marriott, P.J.,
A review of basic concepts in comprehensive two-dimensional gas
chromatography.
Journal of Chromatographic Science **2002**, 40, 276-291.
3. Dunn, M.; Shellie, R.; Morrison, P.; Marriott, P.,
Rapid sequential heart-cut multidimensional gas chromatographic analysis.
Journal of Chromatography A **2004**, 1056, 163-169.
4. Cortes, H. J.; Winniford, B.; Luong, J.; Pursch, M.,
Comprehensive two dimensional gas chromatography review.
Journal of Separation Science **2009**, 32, 883-904.
5. Harvey, P. M.; Shellie, R. A.,
Factors affecting peak shape in comprehensive two-dimensional gas
chromatography with non-focusing modulation.
Journal of Chromatography A **2011**, 1218, 3153-3158.
6. Cortes, H. J.; Winniford, B.; Luong, J.; Pursch, M.,
Comprehensive two dimensional gas chromatography review.
Journal of Separation Science **2009**, 32, 883-904.

7. Klee, M. S.; Blumberg, L. M.,
Measurement of retention in comprehensive two-dimensional gas chromatography using flow modulation with methane dopant.
Journal of Chromatography A **2010**, 1217, 1830-1837.
8. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool.
Journal of Chromatography A **2003**, 1000, 69-108.
9. Górecki, T.; Harynuk, J.; Panić, O.,
The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC).
Journal of Separation Science **2004**, 27, 359-379.
10. Blumberg, L. M.; David, F.; Klee, M. S.; Sandra, P.,
Comparison of one-dimensional and comprehensive two-dimensional separations by gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2008**, 1188, 2-16.
11. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T.,
Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC).
Trends in Analytical Chemistry **2006**, 25, 540-553.
12. Cordero, Ch.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Galli, M.; Bicchi, C.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the analysis of volatile samples of natural origin: A multidisciplinary approach to evaluate the influence of second dimension column coated with mixed stationary phases on system orthogonality.
Journal of Chromatography A **2006**, 1132, 268-279.

13. Weber, B. M.; Harynuk, J. J.,
Application of thermodynamic-based retention time prediction
to ionic liquid stationary phases
Journal of Separation Science **2014**, 37, 1460-1466.
14. Klee, M. S.; Cochran, J.; Merrick, M.; Blumberg, L. M.,
Evaluation of conditions of comprehensive two-dimensional gas
chromatography that yield a near-theoretical maximum in peak capacity gain
Journal of Chromatography A **2015**, 1383, 151-159.
15. Pinkerton, D. K.; Parsons, B. A.; Synovec, R. E.,
Method to determine the true modulation ratio for comprehensive two-
dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2016**, 1476, 114-123.
16. Blumberg, L. M.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography: metrics, potentials,
limits.
Journal of Chromatography A **2003**, 985, 29-38.
17. Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P.,
Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid
chromatography.
Analytical Chemistry **1998**, 70, 1585-1594.
18. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T.,
Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography
(GC×GC).
Trends in Analytical Chemistry **2006**, 25, 438-454.

19. Kinghorn, R. M.; Marriott, P. J.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a modulating cryogenic trap.
Journal of High Resolution Chromatography **1998**, 21, 620-622.
20. Phillips, J. B.; Liu, Z.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface.
Journal of Chromatographic Science **1991**, 29, 227-231.
21. Marriott, P.J; Kinghorn, R.M.,
New operational modes for multidimensional and comprehensive gas chromatography by using cryogenic modulation.
Journal of Chromatography A **2000**, 866, 203-212.
22. Marriott, P.J.; Ong, R.C.Y.; Kinghorn, R.M.; Morrison, P.D.,
Time-resolved cryogenic modulation for targeted multidimensional capillary gas chromatography analysis.
Journal of Chromatography A **2000**, 892, 15-28.
23. Gaines, R. B., Frysinger, G. S.,
Temperature requirements for thermal modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Separation Science **2004**, 27, 380-388.
24. Begnaud, F.; Debonneville, C.; Probst, J.-P.; Chaintreau, A.; Morrison, P. D.; Adcock, J. L.,
Effects of variation in modulator temperature during cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Separation Science **2009**, 32, 3144-3151.

25. Panić, O.; Górecki, T.; McNeish, C.; Goldstein, A. H.; Williams, B. J.; Worton, D. R., Development of a new consumable-free thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2011**, 1218, 3070-3079.
26. Pursch, M.; Sun, K.; Winniford, B.; Cortes, H.; Weber, A.; McCabe, T.; Luong, J., Modulation techniques and applications in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC).
Analytical and Bioanalytical Chemistry **2002**, 373, 356-367.
27. Adahchour, M.; Jover, E.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T., Twin comprehensive two-dimensional gas chromatographic system: concept and applications.
Journal of Chromatography A **2005**, 1086, 128-134.
28. Wang, F. C.-Y., New valve switching modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2008**, 1188, 274-280.
29. Seeley, J. V.; Kramp, F.; Nicka, C. J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography via differential flow modulation.
Analytical Chemistry **2000**, 72, 4346-4352.
30. Oldridge, N.; Panic, O.; Górecki, T., Stop-flow comprehensive two-dimensional gas chromatography with pneumatic switching.
Journal of Separation Science **2008**, 31, 3375-3384.

31. Bueno, P. A.; Seeley, J. V.,
Flow-switching device for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2004**, 1027, 3-10.
32. LaClair, R. W.; Bueno, P. A.; Seeley, J. V.,
A systematic analysis of a flow-switching modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Separation Science **2004**, 27, 389-396.
33. Cai, H.; Stearns, S. D.,
Partial modulation method via pulsed flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Analytical Chemistry **2004**, 76, 6064-6076.
34. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; Bandurski, S. V.,
Microfluidic deans switch for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Analytical chemistry **2007**, 79, 1840-1847.
35. Poliak, M.; Kochman, M.; Amirav, A.,
Pulsed flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2008**, 1186, 189-195.
36. Seeley, J.V.; Micyus, N.J.; McCurry, J.D.; Seeley, S.K.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography with a simple fluidic modulator.
American laboratory **2006**, 38, 24-26.
37. Seeley, J.V.,
Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2012**, 1255, 24-37.

38. Harvey, P. Mc A.; Poynter, S. D. H.; Shelle, R. A.,
GC×GC with Fluidic Modulation for Enantioselective Essential Oil Analysis
LC-GC Europe **2011**, 24, 548-555.

39. Semard, G.; Gouin, C.; Bourdet, J.; Bord, N.; Livadaris, V.,
Comparative study of differential flow and cryogenic modulators comprehensive
two-dimensional gas chromatography systems for the detailed analysis of light
cycle oil.
Journal of Chromatography A **2011**, 1218, 3146-3152.

40. Gorovenko, R.; Krupčík, J.; Špánik, I.; Bočková, I.; Sandra, P.; Armstrong, D.W.,
On the use of quadrupole mass spectrometric detection for flow modulated
comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2014**, 1330, 51-60.

41. Tranchida, P.Q.; Salivo, S.; Franchina, F.A.; Mondello, L.,
Flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography combined
with a high-resolution time-of-flight mass spectrometer: a proof-of-principle
study.
Analytical Chemistry **2015**, 87, 2925-2930.

42. Griffith, J.F.; Winniford, W.L.; Sun, K.; Edam, R.; Luong, J.C.,
A reversed-flow differential flow modulator for comprehensive two-dimensional
gas chromatography
Journal of Chromatography A **2012**, 1226, 116-123.

43. Tranchida, P.Q.; Purcaro, G.; Visco, A.; Conte, L.; Dugo, P.; Dawes, P.;
Mondello, L.,
A flexible loop-type flow modulator for comprehensive two-dimensional gas
chromatography
Journal of Chromatography A **2011**, 1218, 3140-3145.

44. Toussaint, G.; Lorentz, C.; Vrinat, M.; Geantet, C.,
Comprehensive 2D chromatography with mass spectrometry: a powerful tool for following the hydrotreatment of a Straight Run Gas Oil.
Analytical Methods **2011**, 3, 2743-2748.
45. Shellie R.; Marriott P.; Morrison P.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization and time-of-flight mass spectrometry detection: qualitative and quantitative analysis of west australian sandalwood oil.
Journal of Chromatographic Science **2004**, 42, 417-422.
46. Gorovenko, R.; Krupčík, J.; Špánik, I.; Bočková, I.; Sandra, P.; Armstrong, D.W.,
On the use of quadrupole mass spectrometric detection for flowmodulated comprehensive two-dimensional gas chromatography
Journal of Chromatography A **2014**, 1330, 51-60.
47. Tessarolo, N.S.; Silva, R.C.; Vanini, G.; Pinho, A.; Romão, W.; de Castro, E.V.R.; Azevedo, D.A.,
Assessing the chemical composition of bio-oils using FT-ICR mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry.
Microchemical Journal **2014**, 117, 68-76.
48. Kochman, M.; Gordin, A.; Alon, T.; Amirav, A.,
Flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry with a supersonic molecular beam.
Journal of Chromatography A **2006**, 1129, 95-104.
49. Krupčík, J.; Gorovenko, R.; Špánik, I.; Sandra, P.; Armstrong, D.W.,
Flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography with simultaneous flame ionization and quadrupole mass spectrometric detection.
Journal of Chromatography A **2013**, 1280, 104-111.

50. Tranchida, P.Q.; Franchina, F.A.; Dugo, P.; Mondello, L.,
A flow-modulated comprehensive gas chromatography–mass spectrometry
method for the analysis of fatty acid profiles in marine and biological samples.
Journal of Chromatography A **2012**, 1255, 171-176.
51. Tranchida, P. Q.; Purcaro, G.; Sciarrone, D.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.,
Accurate quadrupole MS peak reconstruction in optimized gas-flow
comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Separation Science **2010**, 33, 2791-2795.
52. Kalinová, B.; Jiroš, P.; Žd'árek, J.; Wen, X.; Hoskovec, M.,
GC×GC/TOF MS technique-A new tool in identification of insect pheromones:
Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland.
Talanta **2006**, 69, 542-547.
53. von Muhlen, C.; Zini, C.A.; Caramao, E.B.; Marriott, P.J.,
Applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography to the
characterization of petrochemical and related samples.
Journal of Chromatography A **2006**, 1105, 39-50.
54. Blomberg, J.; Schoenmakers, P. J.; Beens, J.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and its
applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures.
Journal of High Resolution Chromatography **1997**, 20, 539-544.
55. Vendevre, C.; Ruiz-Guerrero, R.; Bertoncini, F.; Duval, L.; Thiébaud, D.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography for detailed
characterisation of petroleum products.
Oil & Gas Science and Technology - Revue de l'IFP **2007**, 62, 43-55.

56. Pedroso, M. P.; de Godoy, L. A. F.; Ferreira, E. C.; Poppi, R. J.; Augusto, F.,
Identification of gasoline adulteration using comprehensive two-dimensional gas
chromatography combined to multivariate data processing.
Journal of Chromatography A **2008**, 1201, 176-182.
57. Micyus, N. J.; McCurry, J. D.; Seeley, J. V.,
Analysis of aromatic compounds in gasoline with flow-switching comprehensive
two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2005**, 1086, 115-121.
58. Frysinger, G. S.; Gaines, R. B.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric
detection (GCxGC/MS) applied to the analysis of petroleum.
Journal of High Resolution Chromatography **1999**, 22, 251-255.
59. Wang, H.; Weng, N.; Zhang, S.; Zhu, G.; Chen, J.; Wei, C.,
Identification of petroleum aromatic fraction by comprehensive two-dimensional
gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry.
Chinese Science Bulletin **2010**, 55, 2039-2045.
60. Nicole, J. M.; McCurry, J. D.; Seeley, J. V.,
Analysis of aromatic compounds in gasoline with flow-switching comprehensive
two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2005**, 1086, 115-121.
61. Wang, G.; Karnes, J.; Bunker, C. E.; Lei Geng, M.,
Two-dimensional correlation coefficient mapping in gas chromatography: Jet
fuel classification for environmental analysis.
Journal of Molecular Structure **2006**, 799, 247-252.

62. Tiyaongpattana, W.; Wilairat, P.; Marriott, P. J.,
Characterization of biodiesel and biodiesel blends using comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Separation Science **2008**, 31, 2640-2649.
63. Wang, F. Ch-Y.; Qian, K.; Green, L. A.,
GC×MS of diesel: A two-dimensional separation approach.
Analytical Chemistry **2005**, 77, 2777-2785.
64. Seeley, J. V.; Bates, C. T.; McCurry, J. D.; Seeley, S. K.,
Stationary phase selection and comprehensive two-dimensional gas chromatographic analysis of trace biodiesel in petroleum-based fuel.
Journal of Chromatography A **2012**, 1226, 103-109.
65. Seeley, J.V.; Seeley, S.K.; Libby, E.K; McCurry, J.D.,
Analysis of biodiesel/petroleum diesel blends with comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatographic Science **2007**, 45, 650-656.
66. Mogollon, N.G.; Ribeiro, F.A.; Lopez, M.M.; Hantao, L.W.; Poppi, R.J.; Augusto, F.,
Quantitative analysis of biodiesel in blends of biodiesel and conventional diesel by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate curve resolution;
Analytica Chimica Acta **2013**, 796, 130-136.
67. Seeley, J. V.; Libby, E. M.; Seeley, S. K.; McCurry, J. D.,
Comprehensive two-dimensional gas chromatography analysis of high-ethanol containing motor fuels.
Journal of Separation Science **2008**, 31, 3337-3346.

68. Adam, F.; Vendeuvre, C.; Bertoncini, F.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M.-C., Comprehensive two-dimensional gas chromatography for enhanced analysis of naphthas: New column combination involving permethylated cyclodextrin in the second dimension.
Journal of Chromatography A **2008**, 1178, 171-177.
69. Parastar, H.; Radović, J. R.; Jalali-Heravi, M.; Diez, S.; Bayona, J. M.; Tauler, R., Resolution and quantification of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy fuel oil sample by means of GC $\times$ GC-TOFMS combined to multivariate curve resolution.
Analytical Chemistry **2011**, 83, 9289-9297.
70. Cappelli F.F.; Souza-Silva, É.A.; Macedo da Silva, J.; Bastos Caramão, E.; Alcaraz Zini, C., Characterization of sulfur and nitrogen compounds in Brazilian petroleum derivatives using ionic liquid capillary columns in comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection.
Journal of Chromatography A **2016**, 1461, 131-143.
71. Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis.
Journal of Chromatography A, **2004**, 1054, 3-16.
72. Ryan, D.; Shellie, R.; Tranchida, P.; Casilli, A.; Mondello, L.; Marriott, P., Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry.
Journal of Chromatography A **2004**, 1054, 57-65.

73. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.,
Detailed analysis and group-type separation of natural fats and oils using
comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A **2003**, 1019, 187-196.
74. Tranchida, P. Q.; Donato, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; Dugo, P.,
Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids
Trends in Analytical Chemistry **2007**, 26, 191-205.
75. Tuzimski, T.,
Multidimensional chromatography in pesticides analysis.
Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis **2011**, 155-196.
76. Dimandja, J-M. D.; Stanfill, A. B.; Grainger, J.; Patterson, D. G.,
Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC)
to the qualitative analysis of essential oils.
Journal of High Resolution Chromatography **2000**, 23, 208-214.
77. Omar, J.; Alonso, I.; Olivares, M.; Vallejo, A.; Etxebarria, N.,
Optimization of comprehensive two-dimensional gas-chromatography (GC×GC)
mass spectrometry for the determination of essential oils.
Talanta **2012**, 88, 145-151.
78. Shellie, R.; Marriott, P.,
Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using
comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review.
Flavour and Fragrance Journal **2003**, 18, 179-191.
79. Shellie, R.; Marriott, P.; Chaintreau, A.,
Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of
comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control.
Flavour and Fragrance Journal **2004**, 19, 91-98.

80. Hoh, E.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.,
Optimization of separation and detection conditions for comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans.
Journal of Chromatography A **2007**, 1145, 210-221.
81. Blase, R.C., Patrick, E.L., Mitchell, J.N., Libardoni, M.,
Analysis of cave atmospheres by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) with flame ionization detection (FID).
Analytical Chemistry Research **2015**, 3, 54-62.
82. Guiochon, G. A.; Beaver, L. A.,
Progress and future of instrumental analytical chemistry applied to the environment.
Analytica Chimica Acta **2004**, 524, 1-14.
83. Shi, X.; Wang, S.; Yang, Q.; Lu, X.; Xu, G.,
Comprehensive two-dimensional chromatography for analyzing complex samples: recent new advances.
Analytical Methods **2014**, 6, 7112-7123.
84. Guttman, A.; Mustafa Varoglu, M.; Khandurina, J.,
Multidimensional separations in the pharmaceutical arena.
Drug Discovery Today **2004**, 9, 136-144.
85. Ma, H.; Li, X.; Chen, J.; Wang H.; Cheng, T.; Chen, K.; Xu, S.,
Analysis of human breath samples of lung cancer patients and healthy controls with solid-phase microextraction (SPME) and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC).
Analytical Methods **2014**, 6, 6841-6849.

86. Bierhanzl, V.M.; Bursová, M.; Ston, M.; Čabala, R.; Seydlová, G.,
Simultaneous analysis of polar and non-polar components of cell membrane
phospholipids by GC-MS.
Chemical Papers **2016**, 70, 1309–1315.
87. Bierhanzl, V.M.; Čabala, R.; Ston, M.; Kotorá, P.; Ferenczy, V.; Blaško, J.;
Kubinec, R.; Seydlová, G.,
Direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography, and gas
chromatography of *Bacillus subtilis* phospholipids.
Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly **2016**, 147, 1385–1391.
88. Bierhanzl, V.M.; Čabala, R.; Ston, M.; Kubinec, R.; Szabó, A. H.; Podolec, P.,
Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine,
phosphoethanolamine, phosphoglycerol and phosphate.
Journal of Separation Science **2015**, 38, 67–72.
89. Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala, R.; Kozlík, P.; Svobodová, J.; Pátek, M.,
Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane
of *Bacillus subtilis*.
Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes **2013**, 1828, 2370-2378.
90. Dowhan, W.; Bogdanov, M.,
Functional Roles of Lipids in Membranes.
Elsevier 2002.
91. Bishop, D. G.; Rutberg, L.; Samuelsson, B.,
The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*.
European Journal of Biochemistry **1967**, 2, 448-453.

92. Krajicek, J.; Havlikova, M.; Bursova, M.; Ston, M.; Cabala, R.; Exnerova, A.; Stys, P.; Bosakova, Z.,
Comparative Analysis of Volatile Defensive Secretions of Three Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method.
Plos One **2016**, 11, 1–19.

93. Millar, J.G.,
Pheromones of true bugs.
Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals Ii, Springer-Verlag Berlin **2005**, 37-84.

94. Ho, H.Y.; Millar, J.G.,
Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae).
Zool Stud **2001**, 40, 193-198.

95. Krall, B.S.; Bartelt, R.J.; Lewis, C.J.; Whitman, D.W.,
Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*.
Journal of Chemical Ecology **1999**, 25, 2477-2494.

96. Moraes, M.C.B.; Pareja, M.; Laumann, R.A.; Borges, M.,
The Chemical Volatiles (Semiochemicals) Produced by Neotropical Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae).
Neotropical Entomology **2008**, 37, 489-505.

97. Hamilton, J.G.C.; Gough, A.J.E.; Staddon, B.W.; Games, D.E.,
Multichemicaldefense of plant bug *Hotea gambiae* (Westwood) (Heteroptera: Scutelleridae): (E)-2-hexenol from abdominal gland in adults.
Journal of Chemical Ecology **1985**, 11, 1399-1409.

98. Aldrich, J.R.; Blum, M.S.; Fales, H.M.,
Species-specific natural products of adult male leaf-footed bugs (Hemiptera:
Heteroptera).
Journal of Chemical Ecology **1979**, 5, 53-62.
99. Ston, M.,
Testování a optimalizace podmínek tlakového modulátoru pro GC×GC analýzy.
Diplomová práce.
Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
2012, Praha.
100. Grob, R.L.; Barry, E.F.,
Modern Practice of Gas Chromatography, **2004**, John Wiley & Sons, Inc
101. Drouen, A. C. J. H.; Billiet, H. A. H.; Schoenmakers, P. J.; de Galan, L.,
An improved optimization procedure for the selection of mixed mobile phases in
reversed phase liquid chromatography.
Chromatographia **1982**, 16, 48-52.



Article

Improved Flow Modulator Construction for GC × GC with Quadrupole Mass Spectrometry

Martin Ston^{1,*}, Radomir Cabala^{1,2}, Václav Matej Bierhanzl¹, Jan Krajčický¹, and Zuzana Bosáková¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic and ²Toxicology Department, Institute of Forensic Medicine and Toxicology, General University Hospital in Prague and 1st Faculty of Medicine of Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: ston@natur.cuni.cz

Received 24 November 2015; Revised 25 May 2016

Abstract

Improvement and testing of a flow modulator for the application in comprehensive two-dimensional gas chromatography separations is the subject of the presented paper. This improved setup constructed from two independent capillary branches each consisting of a pressure regulator, a pressure sensor, a two-way solenoid valve and a microfluidic T-connector, allows an independent and easy settings of the pressures and flow velocities in the modulator and provides system flexibility in an operation without need of any component exchange. The estimated flow rates were 0.4 mL/min in the first column and 3.2 mL/min in the second column. This setup was compared with the commercial Zoex cryogenic modulator for the separation of 17 selected solvents at isothermal conditions. Modulator working conditions were optimized and its separation power was demonstrated on the analysis of a lavender extract under an application of two orthogonal capillary column sets (nonpolar–polar vs. polar–nonpolar) and temperature program. The results were evaluated by two commercial software packages and discussed with respect to the identification compliance.

Introduction

The determination of all single components using a common gas chromatography is difficult and often impossible in real samples, such as essential oils, petroleum products or biological samples, which can contain up to thousands of substances (1). Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) has been developed especially to improve the separation efficiency (peak capacity) and its combination with mass spectrometry (MS) is an extremely powerful analytical tool for the study of very complex mixtures of volatile and semi-volatile organic compounds (2).

The GC × GC system has to fulfill two main requirements: a comprehensiveness (i) and an orthogonality (ii). The system can be designated as (i) comprehensive if the whole sample is being separated on two capillary columns where (ii) different separation mechanisms are given by a combination of a conventional length non-polar column in the first dimension and a short (more) polar

column in the second dimension. The columns are coupled in series via a modulator, which is responsible for a sampling of the small fractions eluting from the first column and then re-injecting them rapidly into the short second column. The second important feature of GC × GC is that the separation reached on the first column is not canceled out by the modulator or the second column (3). A theoretical overall peak capacity in this system equals to the multiplication of peak capacities of both columns, which gives an increase in the total peak capacity (efficiency) by a factor of 10 to 100. The total peak capacity of the same system without the modulator equals to the sum of the peak capacities of both columns only (4).

Most of GC × GC systems available today are equipped with a thermal modulation technique where a capturing of a fraction from the first column is provided by a repetition of a cooling of two points at a capillary column by the cryogenic gas jet and followed by a heating of these points by a hot-gas jet. In these systems, the

cryogenic jet is always switched on and the repetitive shots of the hot jet sample narrow bands of analytes to the second column for the separation and detection (5). Their main advantage is the ability to produce very narrow peaks in the chromatogram (up to 60 ms peak width at half height) which is necessary to achieve a high overall efficiency of the GC×GC system (6). The highlights of this modulation technique are a high reproducibility and robustness. Its disadvantages are a high purchase price and operating costs. Therefore, there is an effort for a development of cost-effective alternatives, which could be represented by the group of valve-based modulators, e.g., flow modulators (FM, 7–9).

A flow modulation was first described by Bruckner *et al.*, who applied a six-port diaphragm valve to perform a single stage GC×GC modulation (10). The only commercial FM is based on the model proposed by Seeley *et al.* (11). The hyphenation of GC×GC with MS detector represents actually addition of a third separation dimension (12). GC×GC has been successfully applied in many research areas. In particular, the enhanced sensitivity and the formation of structured chromatograms have brought useful benefits for the analysis of petrochemical products (13, 14), gasoline (15), kerosene (16), diesel (17) and biodiesel (18), sandalwood oil (19) and a study of the atmosphere (20).

The present research is focused on the use of FM in GC×GC combined with quadrupole MS for a lavender analysis. The first part of this study is dedicated to the construction and parameter optimizing of the pulsed FM. Then, the application of the cryogenic dual-jet modulator and of the pulsed FM for the analysis of several volatile solvents are compared. Finally, the performance of the pulsed FM is discussed.

Experimental

Materials

In this study two sets of columns were used. A nonpolar–polar (N–P) set consists of first dimension column Rxi-5Sil MS (20 m × 0.15 mm i.d. × 0.15 µm film thickness, Restek, Bellefonte, PA, USA) and second dimension column Supelcowax 10 (2 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Polar–nonpolar (P–N) set is represented by a Stabilwax (20 m × 0.15 mm i.d. × 0.15 µm film thickness) in first dimension and Rxi-5Sil MS (2 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness, both Restek, Bellefonte, PA, USA) in second dimension. Rxi-5Sil MS (20 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness, Restek) and Supelcowax 10 (2 m × 0.1 mm i.d. × 0.1 µm film thickness, Supelco) were used for the cryogenic modulation. The FM operational conditions for both sets of columns were the same. The first and the second dimension columns were interconnected with the modulator via two three-port planar microfluidic devices (SilFlow, SGE Analytical Science, Ringwood, Australia). An uncoated deactivated silica capillary (0.35 m × 0.25 mm i.d.) was employed as the storage transfer line and two uncoated deactivated silica capillaries (0.4 m × 0.32 mm i.d., Supeko Bellefonte, PA, USA) were used as the transfer lines between microfluidic devices and two-way solenoid valves. Two two-way solenoid valves (225T011, NREsearch Inc., NJ, USA), two miniature pressure regulators (Model 4000, Parker Hannifin, PA, USA), two pressure sensors (MPX4250DP, Freescale Semiconductor, Inc., Texas, USA) and a laboratory constructed electronic controller for the valve timing and switching and the pressure control were used (for setup diagram see Figure 1A).

Samples preparation

All volatile solvents used were of GC grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). The testing mixture was prepared of 17 volatile solvents (Pentane, Hexane, Heptane, Toluene, Acetone, Acetonitrile, 2,2,4-Trimethylpentane, 2-Methoxy-2-methylpropane, Dichloromethane, Trichloromethane, Ethanol, 2-Propanol, 2-Methyl-1-Propanol, 1-Butanol, Methyl acetate, Ethyl acetate, *tert*-Butyl acetate) 10 µL of each in 1 mL decane.

A lavender extract was provided by JERGM (Liberec, Czech Republic).

GC×GC analysis

A Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) with quadrupole mass spectrometer (QP2010 Plus) was used for the testing and application development. In order to compare both modulators, the sample was analyzed on the same gas chromatograph equipped by a cryogenic modulator Zoex (Zoex Corporation, Houston, USA) with a two-stage loop liquid nitrogen modulator. Helium (99.999%, Linde, Czech Republic) was used as the carrier gas and the make-up gas in the modulator system. Samples (0.1 µL) were injected by an auto-sampler (AOC-20i, Shimadzu) in the split mode (split ratio, 1:100) at 250°C. The temperature of a transfer line and MS ion source was maintained at 250 and 200°C, respectively. MS was operated in the full scan mode (m/z 33–275 mass range) with an acquisition rate of 50 spectra s⁻¹. Raw GC×GC data were collected by GCMSsolution software version 2.7 (Shimadzu, Kyoto, Japan) and their transformation and visualization were carried out by GC Image software (version 2.0b2_2, Zoex Corporation, Houston, USA).

The separation of volatile solvents mixture was performed isothermally at 50°C for 10 min. The cryogenic modulation conditions were: 400 kPa inlet column pressure, modulation period 4 s, duration of pulse 375 ms and temperature 350°C of hot jet were used (Figure 2A). The pulsed flow modulation conditions were: column inlet pressure 250 kPa, the first and the second valve pressures were set at 155 and 175 kPa (Figure 2B), and 145 and 165 kPa (Figure 2C), respectively. The modulation time was 4.0 s (3.7 s sampling time and 0.3 s injection/pulse time).

For the separation of the lavender extract the oven was programmed from 70 to 150°C at a rate of 4°C min⁻¹, and maintained at 150°C for 10 min. The column inlet pressure was 250 kPa, the first and the second valve pressures were set at 155 and 175 kPa, respectively. The modulation time was 5.0 s (4.7 s sampling time and 0.3 s injection/pulse time).

Results

Modulator construction

The original construction of the FM presented by Seeley *et al.* (11) and modified by Amirav *et al.* (21), which consisted of one pressure regulator followed by one three-way solenoid valve switching the flow between two transfer lines, has been modified and optimized. Each transfer line was fed with carrier gas via the separate pressure regulator and one two-way solenoid valve (Figure 1A and B). This setup is advantageous over the original one in the possibility of an independent setting of flows through both transfer lines allowing a flexible regulation of the modulation period almost independently on the column and transfer line capillary dimensions applied. Any

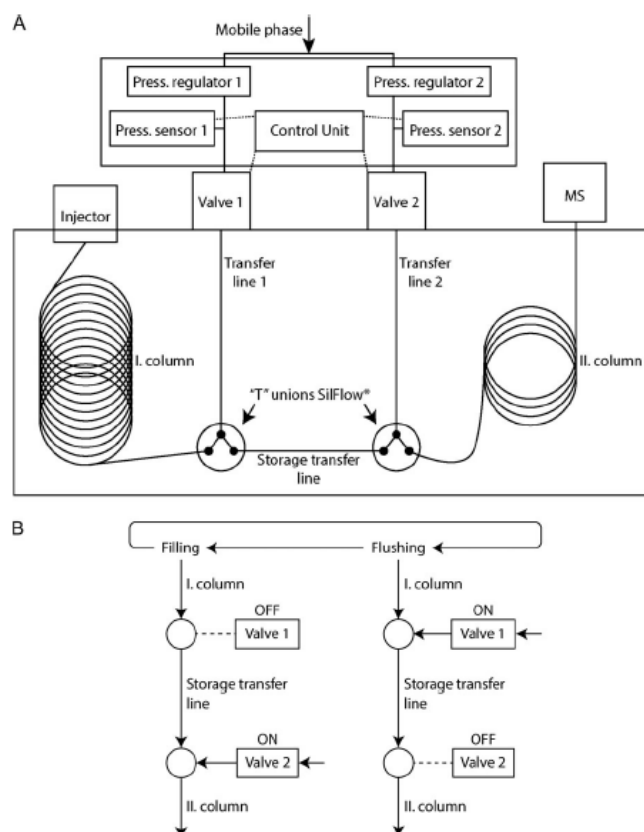


Figure 1. (A) Schematic diagram of the GC × GC system setup equipped with pulsed FM. (B) Cyclical operation principle of the pulsed FM.

change of the flows in the transfer lines of the original construction was possible only by change of the transfer capillary lengths and/or diameters, which required a laborious modulator disassembling. Next benefit of this design with two independent valves/pressure controllers is in the possibility of the changing separation columns but leaving the rest unchanged. Further modification is in the replacement of the standard brass T-pieces by SilFlow for connecting of the columns with a storage transfer line and transfer lines to minimize the extra-column volume contributions (22).

Two miniature pressure regulators and analog pressure sensors, a control unit for precise and reproducible pressure setting, pressure monitoring, the solenoid valve switching and the modulation period timing are placed in the small external box located on the top of the gas chromatograph. Valves, sensors and the control unit are powered by 12 V DC supplied by an external source for safety reasons. The control unit is connected to GC to synchronize the sample injection and modulation start. The two-way solenoids are placed separately on the top of the GC oven

and thermally isolated from the oven box. The control unit switches the solenoids periodically in such a way that the only one of them is on all the time (Figure 1B). The helium make-up gas for the modulator is supplied from the same gas lines as the GC-MS instrument.

Rxi-5Si⁵ MS column (20 m × 0.15 mm i.d. × 0.15 μm film thickness) was selected for the first dimension and Supelcowax 10 (2 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness) for the second dimension owing the appropriate flow conditions. In this configuration, the storage transfer line should be of 0.25 mm i.d. because of the dimensions of the second column and a minimization of an axial diffusion. A storage transfer line length has to be selected in dependence on analyte retentions on the second column because during a separation period on second column (the modulation period) the whole eluent volume from the first column must fit the storage transfer line volume. On the basis of preliminary experiments, the storage transfer line was 35 cm long and of 0.25 mm i.d. in this configuration throughout this work.

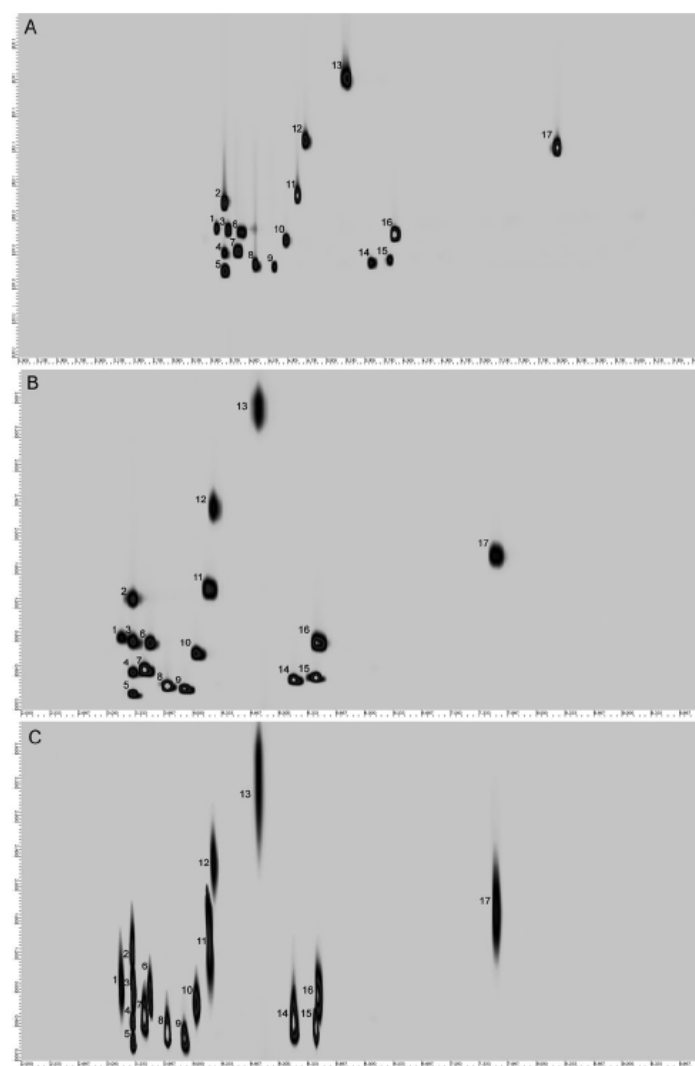


Figure 2. GC $\times$ GC contour plots of testing sample using cryogenic modulation (A) and pulsed flow modulation (B and C): Ethanol (1); Acetonitrile (2); 2-Propanol (3); Acetone (4); Pentane (5); Dichloromethane (6); Methyl acetate (7); 2-Methoxy-2-methylpropane (8); Hexane (9); Ethyl acetate (10); Trichloromethane (11); 2-Methyl-1-Propanol (12); 1-Butanol (13); 2,2,4-Trimethylpentane (14); Heptane (15); ~~tert~~Butyl acetate (16); Toluene (17). For experimental conditions see "GC $\times$ GC analysis" section.

Lengths of transfer line 1 and 2 (40 cm both) were selected due to the distance between SiFlow in GC oven and the valves on the top of the gas chromatograph. Internal diameters of the transfer lines (0.32 mm both) were selected with respect to sufficiently high flows

(minimal flow restriction) which allow an efficient flushing of the storage transfer line and an optimal separation in second column.

The transient effects during the equilibration of pressures between the microfluidic devices, when the modulator is switching

between filling and flushing states, do not have any noticeable effects on the results within the selected experimental conditions.

Volatile solvents

Adjustment of three pressure settings, which are dependent on each other, was necessary to get the sufficient and reliable separation on GC × GC system. Therefore, these interdependent parameters were optimized empirically by one-factor-at-time method, which is traditionally used for the process optimization, where one parameter is systemically changed whereas the others are held constant and the corresponding system response is monitored. The flow rate was selected for the complete flushing of the storage transfer line into the second column, and to avoid backflush into the first column. The optimum values of the inlet column pressure, the transfer line 1 and 2 pressures were 250, 155 and 175 kPa, respectively. The estimated flow rates were 0.4 mL/min in the first

column and 3.2 mL/min in the second column. Example of a correlation between the flushing pressure (transfer line 1) and the column inlet pressure is shown on Figure 3. Pressure in the transfer line 2 has to be ~20 kPa higher than in the transfer line 1. This straightforward relation allows an easy way of the pressure settings for the effective flow modulation and represents comparatively high flexibility of the system (see later). The sample (see "Samples preparation" section) containing analytes of different polarities was selected for testing of a system separation efficiency. The modulation period of 4 s was selected according to the retention of analytes on the second column and to the dimension of the storage transfer line. Similarly, the pulse (sampling) time of 300 ms was chosen relative to the dimensions of the storage transfer line and the flow rate in transfer line 1.

Average retention times run-to-run reproducibility of 17 components for five replicate injections was found to be below 0.75% RSD in the first dimension, and below 2.15% RSD in the second dimension. The total peak areas (volumes) of sample components were also calculated by GC Image software and their RSD values were below 3.5%.

Lavender

The modulator has been tested for two sets of separation columns (nonpolar-polar as a conventional orthogonal order, and polar-nonpolar as inverted to the previous one) to evaluate its ability to work at different column configurations. The lavender extract was used as a complex testing sample. The utilization of the separation space of GC × GC chromatogram is better for the inverted orthogonal set (Figure 4), which provides higher resolution between the peaks in the second dimension compared with the conventional orthogonal set (Figure 5).

Discussion

Volatile solvents

Example of the raw MS chromatogram measured under optimized conditions is shown on Figure 6. GC × GC chromatogram generated

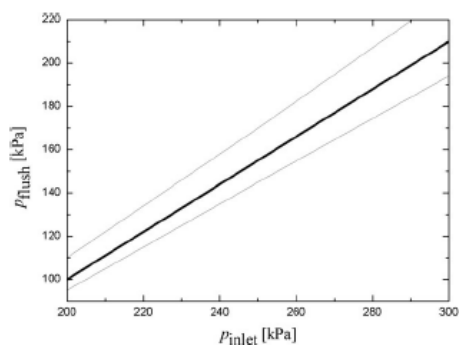


Figure 3. Correlation between flushing pressure P_{flush} (transfer line 1) and column inlet pressure P_{inlet} . Thick line represents optimal modulation and thin lines define borders of the area where effective modulation is possible.

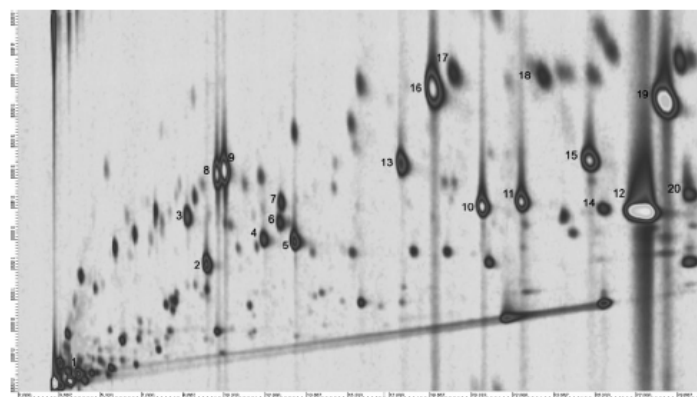


Figure 4. Analysis of lavender extract on the inverted orthogonal set of columns: first dimension – Stabilwax column (20 m × 0.15 mm i.d. × 0.15 μm film thickness) and second dimension – Rxi-5Sil MS column (2 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness). The experimental conditions and blob numbering are the same as in Figure 5.

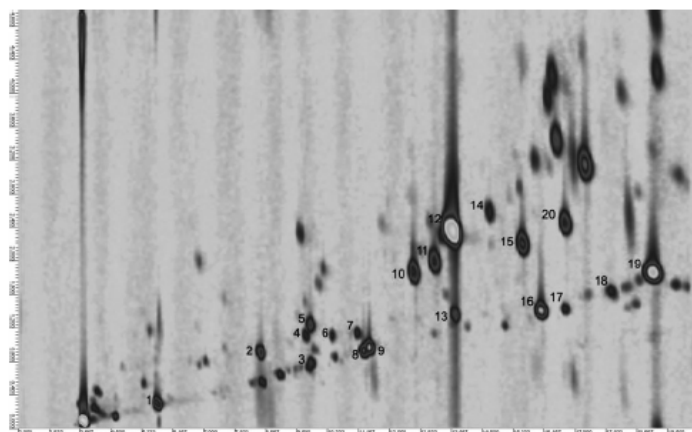


Figure 5. Analysis of lavender extract on the conventional orthogonal set of columns: first dimension – Rxi-5Sil MS column (20 m $\times$ 0.15 mm i.d. $\times$ 0.15 μ m film thickness) and second dimension – Supelcowax 10 column (2 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m film thickness). Blobs: Ethyl acetate (1); Sabinene (2); β -Myrcene (3); 3-Octanone (4); 2-Octanone (5); Hexyl acetate (6); α -Cynene (7); Limonene (8); Eucalyptol (9); *cis*-Linalool oxide (10); *trans*-Linalool oxide (11); Linalool (12); Octen-1-ol, 1-acetate (13); Pinolol (14); Camphor (15); 3,5,5-Trimethylhexyl acetate (16); Hexyl butyrate (17); Terpinolol (18); Linalool acetate (19); Terpinene-4-ol (20). For experimental conditions see “GC $\times$ GC analysis” section.

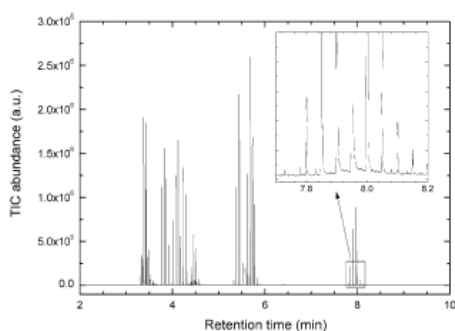


Figure 6. Raw MS chromatogram of 17 solvents collected and presented by GCMSsolution software. For experimental conditions see “GC $\times$ GC analysis” section.

by a transformation from the raw data (GCMSsolution) by the GC Image software is shown in Figure 2B. In Figure 2, there is a comparison of the pulsed FM and the cryogenic modulator (A) using the same column configuration. Figure 2B and C represent different pressure settings yielding modulated peaks and blobs where their widths can be controlled in both dimensions. This feature is unique for the presented system, could help by the resolution tuning of critical peak (blobs) pairs and is unavailable in the cryogenic system. The peak widths in their half height could be tuned in the range between 0.2 and 2.0 s in first dimension (x axis in contour plot) yielding peak widths in the range between 0.05 and 1.0 s in the second dimension (y axis in contour plot) correspondingly. The experimental conditions of the FM are intentionally set to produce

broader peaks to allow quadrupole mass spectrometer to measure sufficient number of scans over the peaks.

Because the identification by GC Image software from the GC $\times$ GC-MS chromatogram was insufficient for some analytes, even though relatively high peak intensities and clean MS spectra, we performed identification from the corresponding highest peak in the raw GC data (GCMSsolution, see Figure 6). In doing so, both programs used the same MS library NIST 08. The results are compared in Table I.

However, this fact is not related to the modulator used because the same effect has been observed under the application of the cryogenic Zoex modulator (data not shown). The conclusion of this result is that if the identification reliability in GC $\times$ GC is low it could be improved by the evaluation of the raw data (rule, which is well known among the GC $\times$ GC chromatographers).

Lavender

Twenty analytes of higher abundances (mainly terpenes) were selected for the comparison of two sets and their MS match factors gained by the two software packages from the NIST 08 database are presented in Table II. This is evidence that the raw MS data quality is independent on the column polarity order and that the modulator works well with both sets of columns. Inasmuch as the modulator is working well the source of this discrepancy have to be localized within the GC Image algorithm or improper software settings. Through it all, GC Image software is very helpful in visualization and evaluation of the complex GC $\times$ GC data, and the raw MS data can be analyzed anytime if there are any doubts.

Conclusions

In this paper the development, optimization and application of the improved FM setup was described. The isothermal GC $\times$ GC

Table I. Identification of Standards in Figure 2 by Two Software Packages Utilizing the Same Mass Spectra Library NIST 08

Blob number	Ret. time I (min)	Ret. time II (sec)	Compound name	Library match GC Image (%)	Library match GCMSsolution (%)
1	3.27	0.18	Pentane	86	97
2	3.13	0.84	Ethanol	84	98
3	3.27	0.44	Acetone	87	97
4	3.27	0.80	2-Propanol	75	97
5	3.27	1.28	Acetonitrile	53	98
6	3.40	0.46	Methyl acetate	76	97
7	3.47	0.78	Dichloromethane	99	99
8	3.67	0.26	2-Methoxy-2-methylpropane	67	93
9	3.87	0.24	Hexane	82	97
10	4.00	0.66	Ethyl acetate	95	98
11	4.13	1.40	Trichloromethane	55	96
12	4.20	2.36	2-Methyl-1-Propanol	95	97
13	4.73	3.52	1-Butanol	53	98
14	5.13	0.34	2,2,4-Trimethylpentane	58	97
15	5.40	0.38	Heptane	69	98
16	5.40	0.78	<i>tert</i> -Butyl acetate	89	98
17	7.47	1.80	Toluene	52	97

Table II. Comparison of Identification of Compounds Present in Lavender Sample by Two GC×GC Column Sets and Two Software Packages Utilizing the Same Mass Spectra Library NIST 08

Blob number	Compound name	Retention time				Library match (%)			
		Dimension in N-P set		Dimension in P-N set		N-P set		P-N set	
		I (min)	II (s)	I (min)	II (s)	GC Image	GCMSsolution	GC Image	GCMSsolution
1	Ethyl acetate	5.67	0.30	4.42	0.22	97	84	51	97
2	Sabinene ^a	8.50	0.90	9.58	1.66	65	95	65	97
3	β-Myrcene ^a	9.83	0.78	8.83	2.28	34	95	42	95
4	3-Octanone	9.67	1.12	11.92	1.98	19	96	27	94
5	2-Octanone	9.83	1.22	13.17	1.96	79	96	59	98
6	Hexyl acetate	10.42	1.10	12.58	2.20	20	96	37	98
7	α-Cymene ^a	11.08	1.14	12.58	2.48	30	95	30	94
8	Limonene ^a	11.25	0.92	10.00	2.84	22	94	21	95
9	Eucalyptol ^a	11.42	0.96	10.33	2.88	87	94	83	91
10	<i>cis</i> -Linalool oxide	12.58	1.86	20.75	2.42	32	95	45	96
11	<i>trans</i> -Linalool oxide	13.17	1.98	22.33	2.48	46	96	66	96
12	Linalool ^a	13.67	2.34	27.33	2.34	92	97	89	97
13	Octen-1-ol, 1-acetate	13.75	1.34	17.42	2.98	56	91	72	96
14	Pinol	14.67	2.58	25.67	2.38	30	94	43	94
15	Camphor ^a	15.50	2.20	25.08	3.02	46	97	46	96
16	3,5,5-Trimethylhexyl acetate	16.00	1.40	18.75	3.94	92	94	86	95
17	Hexyl butyrate ^a	16.67	1.42	19.58	4.16	57	94	56	97
18	Terpinolene	17.92	1.64	23.17	4.14	19	90	12	96
19	Linalool acetate	19.08	1.86	28.17	3.80	73	98	62	98
20	Terpinene-4-ol ^a	16.67	2.46	29.08	2.58	48	94	48	95

^aStatistically identical library match in conventional (N-P) set and inverted (P-N) set of column.

separation of 17 solvents was presented for quadrupole mass detection (GC×GC-qMS). The temperature programmed separation of a lavender extract demonstrated the performance of the GC×GC-qMS setup utilizing the FM to analyze complex biological samples with a sufficient resolution, peak capacity and identification reliability. The FM could be characterized by the lower operation cost, the elimination of a cryogenic gas consumption, the ease of an utilization and a possibility of column variations. Additionally, the modulator performance was illustrated with two orthogonal sets of separation columns (conventional polarity order and inverted one) where slightly better separation space

utilization of GC×GC chromatogram was observed for inverted separation column set and lavender extract sample. Two commercial software packages, GCMSsolution (Shimadzu) and GC Image (Zoex) were used and compared for NIST 08 based data interpretation.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of Charles University in Prague [project GAUK 894513] and Charles University in Prague [project SVV260317].

Table I. Identification of Standards in Figure 2 by Two Software Packages Utilizing the Same Mass Spectra Library NIST 08

Blob number	Ret. time I (min)	Ret. time II (sec)	Compound name	Library match GC Image (%)	Library match GCMSolution (%)
1	3.27	0.18	Pentane	86	97
2	3.13	0.84	Ethanol	84	98
3	3.27	0.44	Acetone	87	97
4	3.27	0.80	2-Propanol	75	97
5	3.27	1.28	Acetonitrile	53	98
6	3.40	0.46	Methyl acetate	76	97
7	3.47	0.78	Dichloromethane	99	99
8	3.67	0.26	2-Methoxy-2-methylpropane	67	93
9	3.87	0.24	Hexane	82	97
10	4.00	0.66	Ethyl acetate	95	98
11	4.13	1.40	Trichloromethane	55	96
12	4.20	2.36	2-Methyl-1-Propanol	95	97
13	4.73	3.52	1-Butanol	53	98
14	5.13	0.34	2,2,4-Trimethylpentane	58	97
15	5.40	0.38	Heptane	69	98
16	5.40	0.78	<i>tert</i> -Butyl acetate	89	98
17	7.47	1.80	Toluene	52	97

Table II. Comparison of Identification of Compounds Present in Lavender Sample by Two GC×GC Column Sets and Two Software Packages Utilizing the Same Mass Spectra Library NIST 08

Blob number	Compound name	Retention time				Library match (%)			
		Dimension in N-P set		Dimension in P-N set		N-P set		P-N set	
		I (min)	II (s)	I (min)	II (s)	GC Image	GCMSolution	GC Image	GCMSolution
1	Ethyl acetate	5.67	0.30	4.42	0.22	97	84	51	97
2	Sabinene ^a	8.50	0.90	9.58	1.66	65	95	65	97
3	β-Myrcene ^a	9.83	0.78	8.83	2.28	34	95	42	95
4	3-Octanone	9.67	1.12	11.92	1.98	19	96	27	94
5	2-Octanone	9.83	1.22	13.17	1.96	79	96	59	98
6	Hexyl acetate	10.42	1.10	12.58	2.20	20	96	37	98
7	α-Cynene ^a	11.08	1.14	12.58	2.48	30	95	30	94
8	Limonene ^a	11.25	0.92	10.00	2.84	22	94	21	95
9	Eucalyptol ^b	11.42	0.96	10.33	2.88	87	94	83	91
10	<i>cis</i> -Linalool oxide	12.58	1.86	20.75	2.42	32	95	45	96
11	<i>trans</i> -Linalool oxide	13.17	1.98	22.33	2.48	46	96	66	96
12	Linalool ^b	13.67	2.34	27.33	2.34	92	97	89	97
13	Octen-1-ol, 1-acetate	13.75	1.34	17.42	2.98	56	91	72	96
14	Pinol	14.67	2.58	25.67	2.38	30	94	43	94
15	Camphor ^a	15.50	2.20	25.08	3.02	46	97	46	96
16	3,5,5-Trimethylhexyl acetate	16.00	1.40	18.75	3.94	92	94	86	95
17	Hexyl butyrate ^a	16.67	1.42	19.58	4.16	57	94	56	97
18	Terpinolen	17.92	1.64	23.17	4.14	19	90	12	96
19	Linalool acetate	19.08	1.86	28.17	3.80	73	98	62	98
20	Terpinene-4-ol ^a	16.67	2.46	29.08	2.58	48	94	48	95

^aStatistically identical library match in conventional (N-P) set and inverted (P-N) set of column.

separation of 17 solvents was presented for quadrupole mass detection (GC×GC-qMS). The temperature programmed separation of a lavender extract demonstrated the performance of the GC×GC-qMS setup utilizing the FM to analyze complex biological samples with a sufficient resolution, peak capacity and identification reliability. The FM could be characterized by the lower operation cost, the elimination of a cryogenic gas consumption, the ease of an utilization and a possibility of column variations. Additionally, the modulator performance was illustrated with two orthogonal sets of separation columns (conventional polarity order and inverted one) where slightly better separation space

utilization of GC×GC chromatogram was observed for inverted separation column set and lavender extract sample. Two commercial software packages, GCMSolution (Shimadzu) and GC Image (Zoex) were used and compared for NIST 08 based data interpretation.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of Charles University in Prague [project GAUK 894513] and Charles University in Prague [project SVV260317].

ORIGINAL PAPER

Simultaneous analysis of polar and non-polar components
of cell membrane phospholipids by GC-MS

^aVáclav M. Bierhanzl*, ^{a,b}Miroslava Bursová, ^aMartin Ston,
^{a,b}Radomír Čabala, ^cGabriela Seydlová

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague,
Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^bInstitute of Forensic Medicine and Toxicology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague
and General University Hospital, U Nemocnice 2, 121 08 Prague 2, Czech Republic

^cDepartment of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague,
Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

Received 17 September 2015; Revised 10 March 2016; Accepted 11 March 2016

A rapid and selective GC-MS method was optimised for the simultaneous analysis of fatty acids, phosphoethanolamine, phosphoglycerol and phosphoserine, which comprise the polar headgroups of phospholipids. Enzymatic hydrolysis was used for sample preparation to selectively release fatty acids and prevent cleavage of the phosphoester bonds of the polar headgroups. A two-step consecutive derivatisation of the fatty acids and polar headgroups was applied to enable the simultaneous analysis of the selected analytes. The method was tested on samples of cell membrane phospholipids of *Bacillus subtilis*, a microbe with a broad spectrum of fatty acids. This approach can accelerate and simplify biotechnological research and quality control. The experimental conditions were optimised using a chemometric approach denoted as experimental design.
© 2016 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

Keywords: bacterial membrane, branched-chain fatty acids, GC-MS, phospholipids, lipidomics, silylation

Introduction

Phospholipids (PL) are a class of lipids, a major component of all cell membranes, forming the cell lipid bilayer. The physico-chemical properties of cell membranes are jointly determined by the fatty acyl chains and polar component (headgroups) of the PLs' composition (Boumann et al., 2006). Knowledge of cell membrane composition is indispensable in many scientific and industrial applications, e.g. lipidomics (Caboni & Lercker, 1984), or foodomics (García-Cañas et al., 2012). An important aspect of cell membrane analysis is the study of microorganisms, especially with regard to their potential medical and industrial uses.

Most phospholipids are esters of glycerol, fatty

acids and phosphoric acid or phosphoric acid modified with other polar moieties (phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol). The phosphoester represents the polar headgroup of PL, which makes it partially soluble in water and enables all the interactions with the rest of the environment, which is important in cell communication and membrane transport.

Bacillus subtilis, which is a common soil microbe, is a typical Gram-positive bacterium; it has been thoroughly researched and frequently used as a model microbe and for fermentation. Some of its wild-type strains produce the promising detergent and antibiotic lipopeptide surfactin (Kawai et al., 2004). The membrane lipids of the surfactin producer strain contain five phospholipid classes:

*Corresponding author, e-mail: ing.bierhanzl@gmail.com

Table 1. Selected experimental parameters of derivatisation procedure and their levels

Parameter		Level		
		Low	Central	High
A	Volume ratio of reaction mixture of HMDS/ACN	1 : 2	5 : 4	2 : 1
B	Volume of reaction mixture of HMDS/ACN (μL)	200	400	600
C	Volume of trifluoroacetic acid (μL)	1	3	5
D	Temperature of derivatisation (1) ($^{\circ}\text{C}$)	40	70	100
E	Time of derivatisation (1) (min)	15	38	60
F	Volume of BSTFA (μL)	40	220	400
G	Temperature of derivatisation (2) ($^{\circ}\text{C}$)	40	70	100
H	Time of derivatisation (2) (min)	15	38	60

phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine and cardiolipin. The majority of fatty acids (FA) (about 90 %) are branched-chain FA and some common straight-chain FA (Seydlová et al., 2012).

Branched-chain fatty acids (BCFA) are classified into two different types according to the position of the terminal methyl groups of the aliphatic chain (*iso*- and *anteiso*-). In the *iso*-conformation, the penultimate carbon atom of the aliphatic chain (ω -2 carbon) is branched with a methyl group, while in the *anteiso*-conformation the third last carbon (ω -3) atom is branched. The production of BCFA is typical of Gram-positive bacteria, so their presence can contribute to bacteria identification (Li et al., 2010).

The identification and determination of intact phospholipids is carried out using thin-layer chromatography (TLC) or liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) but these methods have their disadvantages. TLC affords only a limited sensitivity and quantification of certain PL groups, and is often not sufficiently selective (Fuchs et al., 2007). In addition, TLC is time- and solvent-demanding. On the other hand, LC-MS is an advanced but expensive instrumental technique (Butovich et al., 2007). Due to the variability of the fatty acid composition of PLs, it is impossible to designate unique m/z values corresponding to the respective PL classes. However, PL membranes are composed of broad spectra of FA and PL classes. They can be measured by LC-MS, but the spectra of the individual peaks are relatively complex and often difficult to evaluate because the PL classes are not chemical individuals (Ostrowska et al., 2000).

Fatty acids are commonly analysed by GC or GC-MS after PL hydrolysis (Seppänen-Laakso et al., 2002). Alkaline/acid-catalysed transesterification is commonly used, which cleaves bonds between glycerol and fatty acids and transforms FAs into methyl esters (Youseff et al., 2012). This method is not suitable for polar headgroups, because it cleaves the phosphate group from the polar headgroup. Stereoselective cleavage of the bond between the polar headgroup and glycerol backbone can be provided by phospholipase C (Rastogi et al., 2005).

The present study-group recently published a method for the GC-MS analysis of PL polar headgroups after a two-step derivatisation (Bierhanzl et al., 2015). The analysis of individual phosphoesters by GC is needed for the simultaneous analysis with fatty acids. Since hydrolysed PLs contain moieties with different silylation reactivities, they need to be derivatised in two steps. A weaker agent (hexamethyldisilazane, HMDS) is used in the first step to silylate the more reactive groups (hydroxyl, carboxyl), whereas the stronger one (*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA) is used for amines. The stronger agent cannot be used in a one-step procedure because it reacts too vigorously and produces varied reaction products (Podolec et al., 2014).

The optimal conditions for the derivatisation method have been found using a chemometric approach known as response surface methodology (RSM). This approach is taking the place of the common one-factor-at-a-time (OFAT) procedures because they are time-consuming and do not take into account the possible interactions among the individual parameters (Table 1). The RSM procedure consists of four principal steps: (i) selection of parameters and responses; (ii) screening of parameters (e.g. temperature, volume, rate) exerting a statistically significant influence on the response studied (e.g. extraction efficiency, peak area, etc.); (iii) modelling, to find a mathematical description of the system response as a function (usually a polynomial) of the selected parameters; and (iv) optimisation, to specify the combination of parameters yielding the optimum response (Hibbert, 2012).

In terms of statistical methods, fractional factorial design was employed for screening, face-centred central composite design for modelling and the desirability function for optimisation.

The present work sought to develop and optimise a rapid, sensitive and robust GC-MS method suitable for the simultaneous analysis of both polar PL headgroups and non-polar fatty acids in one single measurement, hence saving on the time and material required for two sets of analyses, using advanced statis-

Table 2. Experimental parameters, their levels and experimental plan used in screening and modelling by fractional factorial design

Fractional factorial design								
Run	Volume ratio of reaction mixture HMDS/ACN	Volume of reaction mixture HMDS/ACN (μL)	Volume of trifluoroacetic acid (μL)	Temperature of derivatisation (1) (°C)	Time of derivatisation (1) (min)	Volume of BSTFA (μL)	Temperature of derivatisation (2) (°C)	Time of derivatisation (2) (min)
1	1 : 2	600	5	100	15	40	100	15
2	2 : 1	600	1	100	15	40	40	15
3	2 : 1	600	5	100	60	400	100	60
4	1 : 2	600	1	40	15	400	40	60
5	2 : 1	200	1	100	15	400	100	15
6	1 : 2	200	1	100	60	40	100	60
7	2 : 1	200	1	40	60	400	100	15
8	1 : 2	200	5	40	60	400	40	15
9	1 : 2	200	5	100	15	400	40	15
10	1 : 2	200	1	40	15	40	100	60
11	2 : 1	200	5	40	15	40	40	60
12	2 : 1	200	5	100	60	40	40	60
13	2 : 1	600	1	40	60	40	40	15
14	1 : 2	600	5	40	60	40	100	15
15	2 : 1	600	5	40	15	400	100	60
16	1 : 2	600	1	100	60	400	40	60

tical methods. The method here presented was tested on real samples of the cell membrane of *Bacillus subtilis*.

Theoretical

Optimisation of derivatisation conditions

The eight silylation parameters were selected based on the prior experience of the authors (Bierhanzl et al., 2015) and the results of the preliminary experiments. They are listed in Table 1 together with their levels. The maximum response was sought, defined as the sum of the absolute peak areas of fatty acids and polar headgroups (phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol).

To screen the significance of the parameters, fractional factorial design was used, based on a determination of the potential main effects and interactions between the parameters (Ryan, 2007). Three values were attributed to each parameter (Table 1), where only the low and the high values were used for screening. A table was created using the program Minitab 16, and a set of 16 random measurements was performed accordingly (Table 2).

The results were evaluated using the ANOVA test, determining the main effects at a significance level of 95 % (Armstrong et al., 2002). The result for the sum of the absolute peak areas can be seen in the Pareto graph (Fig. 1).

This test of parameter significance indicated all the selected parameters, apart from the volume of the reaction mixture of HMDS/ACN, to have statis-

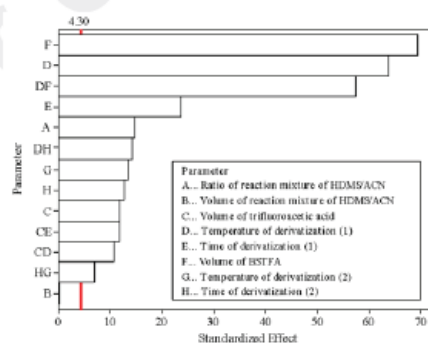


Fig. 1. Standardised main effect Pareto chart for t fractional factorial design. Vertical line in the chart defines 95 % confidence level; A–H – parameters of derivatisation (as for Table 1).

tical significance. In addition, the following interactions between parameters could not be omitted from the statistical influence on the selected response: (i) derivatisation temperature (1) – volume of BSTFA; (ii) derivatisation temperature (1) – derivatisation time (2); (iii) volume of trifluoroacetic acid – derivatisation time (1); (iv) volume of trifluoroacetic acid – time of derivatisation (1); and (v) time of derivatisation (2) – derivatisation temperature (2).

To optimise the operational parameters referred to above, face-centred central composite design (Myers et al., 2009) was employed. Table 3 summarises the 14

Table 3. Experimental parameters, their levels and experimental plan used in screening and modelling by face-centred central composite design

Face-centred central composite design								
Run	Volume ratio of reaction mixture HMDS/ACN	Volume of reaction mixture HMDS/ACN (μL)	Volume of trifluoroacetic acid (μL)	Temperature of derivatisation (1) (°C)	Time of derivatisation (1) (min)	Volume of BSTFA (μL)	Temperature of derivatisation (2) (°C)	Time of derivatisation (2) (min)
17	5 : 4	400	3	70	38	220	70	38
18	5 : 4	400	3	70	38	220	70	38
19	5 : 4	400	3	70	38	220	70	38
20	5 : 4	400	3	70	38	220	70	38
21	1 : 2	400	3	70	38	220	70	38
22	2 : 1	400	3	70	38	220	70	38
23	5 : 4	200	3	70	38	220	70	38
24	5 : 4	600	3	70	38	220	70	38
25	5 : 4	400	1	70	38	220	70	38
26	5 : 4	400	5	70	38	220	70	38
27	5 : 4	400	3	40	38	220	70	38
28	5 : 4	400	3	100	38	220	70	38
29	5 : 4	400	3	70	15	220	70	38
30	5 : 4	400	3	70	60	220	70	38

random combinations of the low, central and high parameter levels, created in accordance with the CCD plan by Minitab 16. Functional polynomial dependence was used to evaluate this system by the ANOVA method. After treating the results for the sum of the analyte peak absolute areas using Minitab 16 and excluding insignificant contributions to the response, the following quadratic equation was obtained (Table S1). The lack-of-fit test was insignificant at the 5 % level and the coefficient of determination ($R^2 = 0.8309$) indicates sufficient agreement between the experimental data and the model created. The response surface plot (Fig. S1, in Supplementary data) illustrates the inter-relationship of statistically significant parameters with the response data.

The system was optimised deploying Minitab 16, using a desirability function to find the combination of the selected parameters which yielded the maximum response value (Costa & Pereira, 2010). The following optimum parameters were obtained: volume of HMDS/ACN – 200 μL, volume ratio of reaction mixture of HMDS/ACN – 1 : 1, volume of trifluoroacetic acid – 2.5 μL, temperature and time of derivatisation (1) – 100°C for 60 min, volume of BSTFA – 40 μL and temperature and time of derivatisation (2) – 100°C for 15 min.

Experimental

HMDS, BSTFA, (99 %), acetonitrile, (HPLC grade), hexane (97 %, HPLC grade), chloroform (99 %), phosphoethanolamine, phosphoserine, phosphoglycerol (85 %), phosphatidylglycerol (99 %), phosphatidylethanolamine (97 %), phosphatidylserine

(70 %), palmitoleic (98.5 %) and oleic (99 %) acid, 12- and 13-methylmyristic (98 %) and 14- and 15-methylpalmitic (98 %) acids and phospholipase C, isolated from *Bacillus cereus*, were all purchased from Sigma-Aldrich (USA). Stearic, palmitic and myristic acids (p.a.) were supplied by Lachema (Czech Republic). Propan-2-ol (LC-MS grade) was provided by Fluka (Sigma-Aldrich). Trifluoroacetic acid (99.9 %; Romil, UK) was used as the catalyst for silylation. Phosphoric acid (85 %, p.a.) was supplied by Penta (Czech Republic). Lab-lemco powder, bacto-yeast extract, and bacto-peptone for broth preparation were purchased from Oxoid (Czech Republic); NaCl (p.a.) was purchased from LachNer (Czech Republic).

Standards (0.5 mg) or real samples (20 μL) were poured into a 2 mL vial and derivatised using 200 μL of HMDS/acetonitrile ($\varphi_r = 1 : 1$) reaction mixture and 2.5 μL of trifluoroacetic acid, and the mixture was maintained at 100°C for 60 min. Next, 40 μL of BSTFA was added to derivatise the amine groups (phosphoethanolamine and phosphoserine) and the reaction was maintained at 100°C for a further 15 min.

The culture of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (American Type Culture Collection) was grown aerobically (120 min^{-1}) in nutrient broth (1 g Lab-Lemco powder, 2 g Bacto yeast extract, 5 g Bacto-pepton (all Oxoid; Czech Republic), 5 g NaCl (LachNer; Czech Republic) per litre) at 30°C in the Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic. The culture growth was monitored turbidimetrically at 420 nm until it attained the exponential phase. The cells were harvested by rapid filtration through a Synpor no. 5 filter (Pragochema, Czech Republic). The membrane

Table 4. Method validation parameters

TMS derivative	Calibration Equation ^a		R^2	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repeatability (%)
	Intercept	Slope				
Phosphoglycerol	5263187	308253	0.9875	177	590	6
Phosphoethanolamine	496320	49490	0.9980	300	1000	2
Phosphoserine	8215161	966205	0.9932	353	1176	5
Myristic	215718	134156829	0.9933	5.0	16.8	3
13-Methylmyristic	92425	60019721	0.9934	4.7	15.5	4
12-Methylmyristic	85593	70852295	0.9948	3.6	12.1	3
Palmitoleic	173818	105973954	0.9940	4.9	16.5	4
Palmitic	113712	116858966	0.9952	2.9	9.8	4
15-Methylpalmitic	105510	68954573	0.9941	4.6	15.4	4
14-Methylpalmitic	101723	86426856	0.9951	3.6	11.9	4
Oleic	289524	122405098	0.9936	7.1	23.7	5
Stearic	133413	93853635	0.9948	4.3	14.3	5

a) Calibration equation in form: slope · concentration – intercept.

Table 5. Abundances, m/z values and retention times of TMS derivatives measured on *Bacillus subtilis* membrane lipid sample

TMS derivative	<i>m/z</i>	Retention time (min)	Derivative abundance (%)
Fatty acids			
Myristic	55, 73, 75, 117, 129	07.639	04.3
13-Methylmyristic (<i>iso</i> -)		08.128	12.3
12-Methylmyristic (<i>anteiso</i> -)		08.193	23.8
Palmitoleic		09.072	03.3
Palmitic		09.281	26.4
15-Methylpalmitic (<i>iso</i> -)		09.871	07.8
14-Methylpalmitic (<i>anteiso</i> -)		09.963	10.2
Oleic		11.095	03.9
Stearic		11.400	08.0
Polar headgroups			
Phosphoglycerol	73, 299, 357	06.814	–
Phosphoethanolamine	73, 299, 174, 188	07.072	–
Phosphoserine	73, 299, 356	07.191	–

phospholipids were extracted from the cell biomass using a hexane/propan-2-ol ($\varphi_r = 3 : 2$) mixture, which was a standard extraction procedure in accordance with Seydlová and Svobodová (2008). After evaporation of the solvent in a vacuum at 40 °C, the phospholipids were dissolved in chloroform, filtered through glass fibre filters (Whatman) and dried under a stream of nitrogen. Phospholipase C, 1 mg, was added to the dry sample, and 100 μL of water and 10 μL of methanol were added to cleave the ester bonds. The reaction mixture was maintained at 37 °C for 2 h in an ultrasonic bath, then allowed to stand for 10 min and the clear solution used for the analysis.

All GC-MS analyses were carried out on a GC-17A gas chromatograph with a QP 5050A single quadrupole MS (Shimadzu, Japan), using electron ionisation at 70 eV. A DB-5ms capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm ID, stationary phase thickness 0.25 μm , Agilent Technologies, USA) was used for chromatographic

separation. Helium (99.999 %, Linde Gas, Czech Republic) was used as the carrier gas. The linear velocity of the carrier gas was set to 35 cm s^{-1} , and 1 μL of the sample was injected using an AOC-20i autosampler (Shimadzu) at an injector temperature of 250 °C (splitless mode, 1 min). The transfer line temperature was maintained at 250 °C. The results were evaluated using the software GC Solution v.1.21 (Shimadzu) and the NIST (2011) mass spectra database.

The temperature programme was optimised separately using EZGC v.2.20 gas chromatography modelling software (Analytical Innovations, Inc.) to shorten the analysis time. The software calculated almost 16 million combinations of the parameters and recommended the following conditions: initial temperature 150 °C for 1 min, then 14 °C min^{-1} to 250 °C for 5 min. The solvent cut time was 2.5 min. Optimised analyses were performed in selected-ion monitoring (SIM) mode (for selected m/z values see Table 5).

Results and discussion

Enzymatic hydrolysis was first tested on an artificial mixture of PL standards (see Experimental) and the results revealed that the enzyme, whose level is determined purely by its activity, was able to provide a reliable cleavage of phosphoester bonds, which was necessary for polar headgroups analysis. Linearity, repeatability, reproducibility and limits of detection and quantification were estimated for trimethylsilylated fatty acids. Standard solutions of TMS-fatty acids in acetonitrile were diluted 10-, 20-, 50-, 100-, 200-, 500- and 1000- fold. Method linearity was tested over this concentration range and the correlation coefficients of all analytes were approximately 0.99, reflecting sufficient linearity. Repeatability was tested on the set of 7 parallel measurements of a single mixture sample, affording a relative standard deviation of 3–6 %. All the limits of detection and quantification of FA derivatives were below $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Table 4). However, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the polar headgroups were higher by two orders of magnitude.

After the selection of fatty acids and polar headgroups in accordance with the results from a previously published paper (Seydlová & Svobodová, 2008) on *Bacillus subtilis* membrane composition, the retention times of single TMS-fatty acid and TMS-polar headgroup derivative standards were measured. For both TMS-modified fatty acids and polar headgroups, characteristic m/z values were selected to determine their identity in SIM measurements together with the retention times (Table 5).

Next, a hydrolysate of membrane lipids from *Bacillus subtilis* was trimethylsilylated and measured under optimised conditions (Fig. 2).

The fatty acids used, which are listed in Table 5, were selected according to their abundance (higher than 1 %) in the previously analysed samples (Seydlová et al., 2013), and they were also detected in the real sample by the method presented here. The polar headgroups were also reliably detected in the real sample, despite their intensities being comparatively low. A positive feature is that all the TMS-derivatives of the polar headgroups eluate before the fatty acid TMS-derivatives of the *Bacillus subtilis* sample.

The major peaks corresponded to palmitic and 12-methylmyristic (*anteiso*-) TMS-derivatives. The abundance of palmitic acid was found to be much higher than in the previously published article (Seydlová et al., 2013) for *Bacillus subtilis* (ATCC 21332). Slight differences in the relative abundance of FA are dependent on the strain and living conditions and they can also vary between individuals of one subspecies. Therefore, within the biological variability of the FA composition of the *Bacillus subtilis* membrane at various periods of the growth curve, the order of the FA abundances are in full agreement with the previously

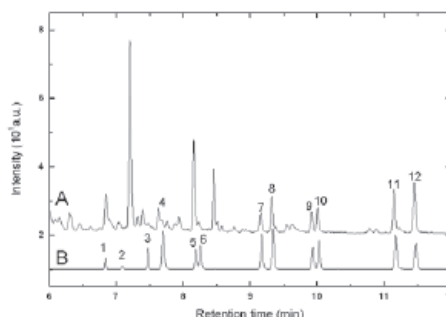


Fig. 2. Total ion current (TIC) chromatogram of *Bacillus subtilis* cell membrane PL hydrolysate (A) and standard mixture (B): 1 – TMS-phosphoglycerol, 2 – TMS-phosphoethanolamine, 3 – TMS-phosphoserine, 4 – myristic TMS, 5 – 13-methylmyristic TMS, 6 – 12-methylmyristic TMS, 7 – palmitoleic TMS, 8 – palmitic TMS, 9 – 15-methylpalmitic TMS, 10 – 14-methylpalmitic TMS, 11 – oleic TMS, 12 – stearic TMS; Column DB-5ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm), 1 μL sample, injection 250 $^{\circ}\text{C}$, splitless mode; temperature programme: initial 150 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 14 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, final 250 $^{\circ}\text{C}$ (5 min).

published results (Seydlová & Svobodová, 2008). The sole exception was palmitic acid, which was found to be more abundant.

Iso- and *anteiso*-isomers of the methylmyristic and methylpalmitic TMS-derivatives are relatively difficult to distinguish due to the similarity of their MS spectra (Ran-Ressler et al., 2012), because there is no significant marker (e.g. ratio between two fragment intensities, etc.). Therefore, the confirmation of peak identity was achieved by comparing both the retention times and the MS spectra of the standards. The relative ratio of *iso*- and *anteiso*- fatty acids was found to be 0.6 in the present case, and this value is in full agreement with that previously published (0.5–1.1) (Seydlová et al., 2013), so it is probably characteristic of this *Bacillus subtilis* strain.

Conclusions

A new, sensitive instrumental method was developed and optimised for the simultaneous analysis of PL polar headgroups and fatty acids in a single measurement. To the best of our knowledge, no such analysis has previously been reported. The optimal derivatisation conditions were evaluated statistically using the central composite design method, and the chromatographic parameters were selected by the software out of almost 16 million options. Emphasis was placed on the resolution of BCFA isomers, which are considered to be the most difficult to resolve using by MS, hence it affirmed the suitability of this method for lipid anal-

yses in general whilst also saving time. Enzymatic hydrolysis, which is necessary to avoid the destruction of polar headgroups, ensures the cleaving of specific ester bonds, whereas two-step silylation provides the derivatisation of hydroxyl, carboxyl and amine groups to facilitate their determination in a non-polar GC column. Analysis of the membrane PL of *Bacillus subtilis* confirmed the reliability of the method, and all the species' typical and major fatty acids were analysed together with its polar headgroups.

Acknowledgements. This work receive financial support from grant nos. SVV260317 and 13-18051P from the Czech Science Foundation.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version of this paper (DOI: 10.1515/chempap-2016-0073).

References

- Armstrong, R. A., Eperjesi, F., & Gilmartin, B. (2002). The application of analysis of variance (ANOVA) to different experimental designs in optometry. *Ophthalmic and physiological optics*, 22, 248–256. DOI: 10.1046/j.1475-1313.2002.00020.x.
- Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Ston, M., Kubinec, R., Hengerics Szabó, A., & Podolec, P. (2015). Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate. *Journal of Separation Science*, 38, 67–72. DOI: 10.1002/jssc.201400657.
- Boumann, H. A., Hopmans, E. C., van de Leemput, I., Op den Camp, H. J. M., van de Vossen, J., Strous, M., Jetten, M. S. M., Sinnighe Damsté, J. S., & Schouten, S. (2006). Ladderane phospholipids in anaerobic bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups. *FEBS Microbiological Letters*, 258, 297–304. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00233.x.
- Butovich, I. A., Uchiyama, E., Di Pascuale, M. A., & McCulley, J. P. (2007). Liquid chromatography–mass spectrometric analysis of lipids present in human meibomian gland secretions. *Lipids*, 42, 765–776. DOI: 10.1007/s11745-007-3080-2.
- Caboni, M. F., & Lerder, G. (1984). Analysis of phospholipids in cow's milk by high-temperature injection gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 315, 223–231. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90739-3.
- Costa, N. R., & Pereira, Z. L. (2010). Multiple response optimization: a global criterion-based method. *Journal of Chemometrics*, 24, 333–342. DOI: 10.1002/cem.1312.
- Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Schürenberg, M., & Suckau, D. (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 827–834. DOI: 10.1007/s00216-007-1488-4.
- García-Cañas, V., Simó, C., Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2012). Present and future challenges in food analysis, foodomics. *Analytical Chemistry*, 84, 10150–10159. DOI: 10.1021/ac301680q.
- Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2–13. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.01.020.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., & Matsumoto, K. (2004). Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes. *Journal of Bacteriology*, 186, 1475–1483. DOI: 10.1128/jb.186.5.1475-1483.2004.
- Li, Y., Wu, S., Wang, L., Li, Y., Shi, F., & Wang, X. (2010). Differentiation of bacteria using fatty acids profiles from gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 90, 1380–1383. DOI: 10.1002/jsfa.3931.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). *Response surface methodology, process and product optimization using designed experiment*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Ostrowska, J., Skrzydlewska, E., & Figaszewski, Z. A. (2000). Isolation and analysis of phospholipids. *Chemia Analytica*, 45, 613–629.
- Podolec, P., Hengerics Szabó, A., Blaško, J., Kubinec, R., Górová, R., Višňovský, J., Gnipová, A., Horváth, A., Bierhanzl, V., Hložek, T., & Čabala, R. (2014). Direct silylation of *Trypanosoma brucei* metabolites in aqueous samples and their GC–MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, 967, 134–138. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.023.
- Ran-Ressler, R. R., Lawrence, P., & Brenna, J. T. (2012). Structural characterization of saturated branched chain fatty acid methyl esters by collisional dissociation of molecular ions generated by electron ionization. *Journal of Lipid Research*, 53, 195–203. DOI: 10.1194/jlr.D020651.
- Rastogi, A., Hutchinson, T. E., & Pereira, B. M. J. (2005). Phospholipase C from two bacterial strains acts differently on pure phospholipids and membrane bound glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42(2), 92–99.
- Ryan, T. P. (2007). *Modern experimental design*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39–62. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00397-5.
- Seydlová, G., & Svobodová, J. (2008). Development of membrane lipids in the surfactin producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica*, 53, 303–307. DOI: 10.1007/s12223-008-0047-5.
- Seydlová, G., Halada, P., Fišer, R., Toman, O., Ulrych, A., & Svobodová, J. (2012). DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 765–774. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05238.x.
- Seydlová, G., Fišer, R., Čabala, R., Kozlík, P., Svobodová, J., & Pátek, M. (2013). Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *BBA Biomembranes*, 1828, 2370–2378. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.06.032.
- Youseff, M. F. M., Xu, X., & Guo, Z. (2012). Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock, a review on processing and production requirements. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 91, 525–531. DOI: 10.1007/s11746-014-2443-0.



Direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography, and gas chromatography of *Bacillus subtilis* phospholipids

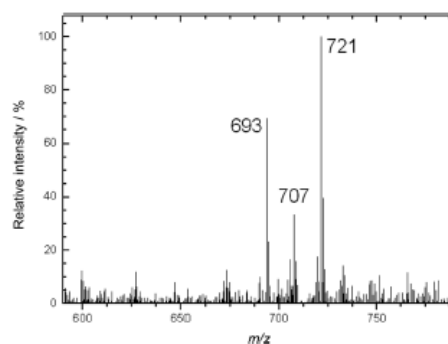
Václav Matěj Bierhanzl¹ · Radomír Čabala^{1,3} · Martin Ston¹ · Peter Kotora² · Viktória Ferenczy² · Jaroslav Blaško² · Róbert Kubínek² · Gabriela Seydlová⁴

Received: 3 December 2015 / Accepted: 9 March 2016 / Published online: 30 March 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract Direct injection mass spectrometry was amended with chromatographic methods in analysis of membrane phospholipids of *Bacillus subtilis* mutant strain, which contains four polar headgroups only (phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and phosphatidic acid). Phospholipid classes were determined by thin layer chromatography as the basic method. Analysis of fatty acids by gas chromatography determined relative abundances of saturated, unsaturated, linear, and branched C₁₄ to C₁₈ fatty acids in phospholipids. Experimental data measured by direct injection mass spectrometry in the *m/z* range of 590–790 were used to estimate theoretical phospholipid composition which was compared with the data of chromatographic methods. The phospholipid class relative abundances measured by mass spectrometry did not agree fully with those of thin layer chromatography and the probable explanation was proposed. The direct injection mass spectrometry approach seems to be fast and easy procedure suitable for analyses of proportional changes in phospholipid composition and can

be used as a complementary method for trend analyses and in process monitoring.

Graphical abstract



Keywords *Bacillus subtilis* · Lipids · Membranes · Direct injection mass spectrometry

Introduction

Phospholipids compose major part of cell membranes, which are responsible for amphiphilic properties of cells and allow life and existence of cells in aqueous environment. The nature of membrane lipids is a key prerequisite for proper membrane structure and function. Phospholipids are a heterogeneous group comprising several hundreds of chemical substances, which differ in two major moieties: fatty acyls (FA) and polar headgroups. Fatty acyls are routinely analyzed in the form of respective esters by gas

✉ Václav Matěj Bierhanzl
ing.bierhanzl@gmail.com

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

² Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovakia

³ Institute of Forensic Medicine and Toxicology, General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic

⁴ Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

chromatography (GC), whereas polar headgroups are analyzed by suitable instrumental methods including classical thin layer chromatography (TLC). On-line or off-line separated phospholipids are often identified and quantified by mass spectrometry utilizing its high specificity and sensitivity. Combination of GC and TLC gives the desired information about the composition of phospholipids but one single method to analyze both fatty acids and polar part in one-step is still not used for routine measurements. Despite disadvantages of TLC as a high time demand, low sensitivity, and limited quantification precision, it is still routinely used for robust classification of phospholipids according to their polar parts. Apart from TLC a number of modern chromatographic and other separation techniques have been developed, however, neither high-performance liquid chromatography (HPLC) or electro-migration method have acquired appropriate popularity to replace TLC. Since phospholipids do not absorb sufficiently at any wavelength of UV or visible spectrum the use of mass spectrometry (MS) seems inevitable for unquestionable identification [1, 2]. Majority of phospholipids differ in molecular weight so they can be analyzed according to their m/z values. Direct injection of phospholipids on mass spectrometer is an approach, which should allow not only phospholipid classification according to respective polar headgroups but, additionally, identification according to the individual composition. Several techniques using direct injection mass spectrometry (DI-MS) without separation have been already published. Fast atom bombardment has been replaced with more suitable ionization techniques [3]. Identification of phospholipid molecules requires weak ionization technique to avoid destruction of molecular ion so the most popular one, which was tested, is electrospray (ESI), which was successfully used for all phospholipid classes in both positive and negative polarities [4]. Some phospholipid classes (p.e. phosphatidylcholine, which is absent in *Bacillus subtilis*, demands positive mode) have different responses at negative resp. positive modes [5]. Nevertheless, convenience of ESI for phospholipid analysis has been showed in coupling with hydrophilic interaction chromatography (HILIC)-HPLC [6] where several species of phospholipid classes together with other polar lipids had been successfully separated. The other used soft techniques are atmospheric pressure photoionization (APPI), which can be used for several diluents only [7] and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) which can be an alternative to ESI, but this ionization technique produces not only deprotonation but several other molecule losses too [8]. The last soft technique is matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) [9, 10]. The main disadvantage of MALDI is off-line based setup, which rule out LC/MS analyses in real time [11]. However, MALDI-MS was used several times for identification of phospholipids

that had been separated by TLC [12, 13]. Analysis of TLC spot by MALDI-MS is troublesome, because the ionization at various spot locations could yield different results [14], the presence of phosphatidylcholine, which has high detection sensitivity [15], may influence identification of other phospholipids [16] and stationary phase of TLC has to absorb UV radiation to serve as an ionization matrix [17]. Beside usual matrices for proteins and macromolecules, strong basic matrix called proton sponge can be used as a matrix for low molecular weight phospholipids [18]. Analysis of phospholipid composition by direct injection mass spectrometry (without pre-separation) has been used for identification of alimentary products [10, 19], different animal cells [20, 21], and different plant pollen [22]. Likewise, human medicine could use changes in phospholipid composition [23, 24] in diagnostic procedures for bacterial identification [25]. Together with cell membrane proteins, phospholipid composition [26] could probably lead to microbe identification without classical microbial or biochemical techniques [27]. Last but not least, in case of bacterial pathogens, the cell membrane is the target of several newly launched antibiotics and antimicrobial peptides and the lipid composition of the membranes is crucial for the antibiotic-membrane interaction, its efficiency and selectivity for bacteria [28]. Therefore, determination of membrane lipid composition should help antibiotic research in targeting the microbes with a suitable drug [29].

Goal of this paper was to simplify analysis of FA and phospholipid classes with elemental laboratory equipment (single quad MS), to provide the suitability on isolated lipid fractions of *Bacillus subtilis* SDB206 by direct injection mass spectrometry method and to correlate its results with those of TLC and GC-MS. *B. subtilis* is an ideal experimental object as it is thoroughly studied model of gram-positive bacterium, its membrane is normally composed of five [30] phospholipid classes and contains branched-chain fatty acids with odd number carbon atoms. Therefore, its phospholipid composition avoids the overlaps of phospholipids with the same molecular weight.

Results and discussion

Fatty acids determination by GC-MS

Fatty acids, which are present in *Bacillus subtilis* membrane lipids are mostly branched-chain fatty acids (BCFA) with odd number of carbons. Generally, their acyls are not typical in phospholipids and this fact simplifies identification of phospholipid molecular fragments during direct injection mass spectrometry (DI-MS; see chapter Direct injection mass spectrometry). Abundance of respective FA

methylester was calculated as a ratio between its peak area and the sum of peak areas of all identified FA methylesters. Relative abundancies determined by GC-MS are presented in Table 1. It can be premised that majority of phospholipid molecules contain mostly C₁₅ (59.4 %) and C₁₇ (24.1 %) fatty acid isomers. The ratio of the branched to straight FA was found 87.7 %/12.3 % and the fraction of the unsaturated FA represents 3.1 %, which facts correspond with the published data [31]. It can be derived from the data that the fractions of the odd and even carbon number FA correspond to 83.5 and 16.5 %, respectively.

Phospholipids class ratio

Phospholipid class analysis by TLC (see Table 2) showed that the majority (almost 90 %) of membrane phospholipids are composed of only two phospholipid classes, namely phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylethanolamine (PE). High content of PG can be attributed to the absence of cardiolipin, which is reduced by cardiolipin synthesis from two PG molecules in other *Bacillus subtilis* strains. A small portion of phosphatidylserine (PS) was determined too. The last phospholipid class, which should be present in membrane of the mutant strain, phosphatidic acid (PA), could not be detected reliably because of the high detection limit (10 µg for a spot) of TLC method. Fifth class—cardiolipin which should not been present at all because of genetic mutation [32] was not detected.

Direct injection mass spectrometry of membrane lipids

According to mutant strain technical specification *Bacillus subtilis* SDB206 should contain only PA, PE, PG, and PS. FA analysis showed that only C₁₄ to C₁₈ isomers including

C_{16:1} and C_{18:1} FA are present. Theoretically, if all possible FA combinations (couples) occurred in all phospholipid classes, there would be hundreds of phospholipid individuals. Accordingly, the lightest phospholipid would have monoisotopic mass of 591 whereas the heaviest would have 790. In this range of $m/z = 200$ hundreds distinguishable masses should be detected. According to the monoisotopic masses of *Bacillus subtilis* phospholipid headgroups (lack of phosphatidylcholine), there would not be two different phospholipids of the same monoisotopic mass. Differences in monoisotopic masses of the headgroups are sufficiently large to distinguish between the corresponding phospholipid classes independently on their FA composition. Mass spectrum of direct injection of membrane lipids showed three major deprotonated molecules (721, 707, and 693), and almost 20 other fragments which overpassed the limit of 1 % of relative abundance (Fig. 1).

Although all phospholipid molecules probably do not yield identical detector response, the summed abundancies could serve as an important raw information. Sum of abundancies of respective phospholipid classes are as follows: PG 65.1 %, PE 12.2 %, PS 6.8 %, and PA 15.9 %. The amount of nitrogen containing phospholipids (PE and PS) is lower in results of DI-MS than in those from TLC analysis whereas the content of anionic phospholipids (PA and PG) is higher. This difference in abundance between major phospholipids is probably caused by the higher ionization efficiency of anionic phospholipids in negative polarity ionization mode of MS. The mixtures of different ratio of phospholipid standards have been measured and the results confirmed that phospholipids of one class could not give false positive signal of other class.

All of three major peaks in Fig. 1 correspond to phosphatidylglycerol class, which should be the most abundant one, with one C₁₅ fatty acid and either C₁₇ ($m/z = 721$), or C₁₅ ($m/z = 693$) and C₁₆ ($m/z = 707$). FA composition of

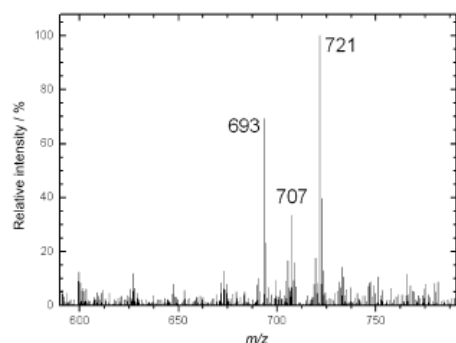
Table 1 Abundance of fatty acids in *B. subtilis* phospholipids determined by GC-MS

Methylester	Fatty acid group	Abundance/%	Monisotopic mass	Molecular formula
Isomyristate	C ₁₄	0.87	242.4	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Myristate	C ₁₄	0.51	242.4	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
13-Methylmyristate	C ₁₅	16.34	256.4	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
12-Methylmyristate	C ₁₅	43.07	256.4	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Isopalmitate	C ₁₆	3.31	270.5	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Palmitoleate	C ₁₆	0.72	268.4	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Palmitate	C ₁₆	5.39	270.5	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
15-Methylpalmitate	C ₁₇	8.86	284.5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
14-Methylpalmitate	C ₁₇	15.23	284.5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Oleate	C ₁₈	2.36	296.5	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
Stearate	C ₁₈	3.34	298.5	C ₁₉ H ₃₈ O ₂

FA fractions: C₁₄ 1.38 %, C₁₅ 59.41 %, C₁₆ 9.42 %, C₁₇ 24.09 %, C₁₈ 5.70 %

Table 2 Relative content of phospholipid classes in cell membranes of *Bacillus subtilis* determined by TLC

Phospholipid class	Content/%
Phosphatidylglycerol (PG)	54.2 ± 2.1
Phosphatidylethanolamine (PE)	34.0 ± 2.7
Phosphatidylserine (PS)	7.8 ± 0.7
Phosphatidic acid (PA)	1.2 ± 1.1

**Fig. 1** MS spectrum of cell membrane phospholipids of *B. subtilis* measured by direct injection in the range of $m/z = 590\text{--}790$

phospholipid classes could be different (Table 3). Some FA are typical only for some class, mostly abundant (C_{15} and C_{17}) fatty acids are present in the most abundant phospholipid (PG) and phosphatidylserine contains predominantly odd FA (see Table 4).

However, the ratios of saturated to unsaturated FA in phospholipid classes are as follows: 3.3 for PE, 2.25 for PS, 0.76 for PA, and 7.1 for PG (Tables 3, 4), thus the saturated FA predominate, which fact is consistent with the FA abundances determined by GC-MS.

The sum of abundances of PL containing unsaturated FA is evidently higher in Table 3 compared to real content of two unsaturated FA ($C_{16:1}$ and $C_{18:1}$), whose relative content is 0.7 and 2.4 % (Table 1). Moreover, these fragments match to phosphatidic acid, which is a precursor of phospholipid synthesis and should not be so abundant in membrane lipids according to TLC results. Furthermore, unsaturated FA are usually bonded only at sn-2 position of the glycerol backbone, so presence of two unsaturated fatty acids in one molecule is really uncommon when their relative content is so low, but this cannot be proved merely from MS spectrum. The assignment confusion between $C_{16} \times C_{16}$ and $C_{15} \times C_{17}$ (and analogically $C_{16} \times C_{18}$ and $C_{17} \times C_{17}$) or between two odd versus two even fatty acids is not probable because of low content of even fatty acids in the sample, which makes the GC analysis indispensable.

Owing the unknown exact weight of the sample (approximately 1 mg), the detection limit of the DI-MS was estimated to be approximately 45 ng of PL in 5 mm³ of injected sample volume.

Conclusion

Direct injection mass spectrometry of membrane phospholipids has identified all present phospholipid classes, whereas TLC could not identify PA owing to its low sensitivity. Phospholipid classes' ratio from DI-MS results is different from TLC results. One of the possible reasons could be different ionization efficiency of MS towards phospholipid classes. Mass spectrometry can distinguish reliably between phospholipids containing saturated and unsaturated FA and determine the sum of carbons in both phospholipid acyls, however, isomeric FA cannot be distinguished properly by DI-MS only. Combination of direct injection mass spectrometry and chromatographic analyses of phospholipids gives sufficient information to determine both fatty acids and polar headgroups ratio.

The fast and easy DI-MS approach could be recommended for routine analyses of samples where relative composition of FA and phospholipids is monitored. FA and phospholipids analyses should be done only once and then DI-MS is sufficient so the issue can be simplified and shortened. DI-MS method eliminates partially the application of commercially unavailable phospholipid standards also.

Experimental

Phosphatidic acid (98 %), phosphoethanolamine (97 %), phosphoserine (70 %), phosphoglycerol (99 %), acetonitrile (HPLC grade), hexane (97 %, HPLC grade), pentane (98 %), and chloroform (99 %, anhydrous) were supplied by Sigma Aldrich. He (99.999 %) which was used as the carrier gas was purchased from Linde Gas (Czech Republic). Propan-2-ol (LC-MS grade), heptane (99 %), and methanol (LC-MS grade) were delivered by Fluka. NaCl (for analysis) was delivered by LachNer (Czech Republic). Lab-lemco powder, bacto-yeast extract and bacto-pepton for broth preparation were supplied by Oxoid (Czech Republic).

Real sample: *Bacillus subtilis* cell membrane phospholipids

Bacillus subtilis SDB206 used in this study was a mutant strain with disruption in cardiolipin synthase genes, and was a kind gift of Kouji Matsumoto [32]; it is cultivated as

Table 3 Abundance of monoisotopic ions corresponding to phospholipids of *Bacillus subtilis* determined by DI-MS

<i>m/z</i>	Proposed composition				Abundance/%
	PA	PG	PS	PE	
591	C14 × C14				0.9
647	C15 × C17				2.6
671	C16:1 × C18:1				3.2
673	C16 × C18:1				4.0
690				C16 × C16:1	2.6
693		C15 × C15			16.1
699	C18:1 × C18:1				2.5
701	C18 × C18:1				2.6
707		C15 × C16			9.3
718				C16 × C18:1	1.3
719		C16 × C16:1			4.7
720				C17 × C17	6.6
721		C15 × C17			21.8
732			C15 × C16:1		3.3
733		C15 × C18:1			6.1
735		C15 × C18			1.8
746				C18 × C18:1	1.7
747		C16 × C18:1			2.2
748			C15 × C17		2.6
774			C16 × C18:1		0.9
775		C18 × C18:1			3.0

Table 4 Abundance of FA combinations in phospholipid classes of *B. subtilis* determined by DI-MS

FA combination	Abundance/%	Phospholipid class			
		PA	PG	PS	PE
C14 × C14	0.9	0.9	–	–	–
C15 × C15	16.1	–	16.1	–	–
C15 × C16	9.3	–	9.3	–	–
C15 × C16:1	3.3	–	–	3.3	–
C15 × C17	27.0	2.6	21.8	2.6	–
C15 × C18	1.8	–	1.8	–	–
C15 × C18:1	6.1	–	6.1	–	–
C16 × C16:1	7.3	–	4.7	–	2.6
C16 × C18:1	8.4	4.0	2.2	0.9	1.3
C16:1 × C18:1	3.2	3.2	–	–	–
C17 × C17	6.6	–	–	–	6.6
C18 × C18:1	7.3	2.6	3.0	–	1.7
C18:1 × C18:1	2.5	2.5	–	–	–

– Absent

a surfactin producer so its monitoring is demanded for production optimization [33]. Lipids were extracted with hexane-propan-2-ol mixture (3:2, v/v) from bacterial cell biomass (400 cm³ of culture in nutrient broth) harvested in the exponential phase of growth by rapid filtration (Synpor

no. 5 filter, Pragochema, Czech Republic). After vacuum evaporation of the solvent at 40 °C, phospholipids were dissolved in chloroform, filtered through GF/C glass fiber filters (Whatman) and concentrated under a stream of nitrogen. The lipid samples were stored at –80 °C. Dry

sample (about 1 mg) was dissolved in 1 cm³ of methanol/chloroform (1:1 v/v) and directly injected to mass spectrometer or analyzed by thin layer chromatography.

Gas chromatography of fatty acids

Membrane lipids were transesterified to FA methyl esters by incubation in sodium methoxide at room temperature according to previously published procedure [31]. After neutralization by the addition of methanolic HCl (2 mol dm⁻³), the fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted three times with 200 mm³ of pentane and dried under the nitrogen flow. Methyl esters were dissolved in 100 mm³ of heptane. Gas chromatograph with mass spectrometer detector GCMS-QP 5050A (Shimadzu, Japan) was used for fatty acid analysis. Separation capillary column DB-5MS (30 m × 0.25 mm ID, stationary phase thickness 0.25 µm) was purchased from Agilent Technologies (USA). Linear velocity of carrier gas was set at 39.2 cm s⁻¹. Automatic sampler AOC-20i (Shimadzu, Japan) was used for sample injection (1 mm³) in split mode (1:20). Injection temperature was held at 270 °C. The measurements were carried out with the following temperature program: initial temperature 60 °C, 2 min, then 7.5 °C min⁻¹ to 250 °C, 5 min. The transfer line was maintained at 255 °C. Detector was operated in scan mode and solvent cut time was 5 min. The chromatograms were evaluated with GC Solution v. 1.21 software (Shimadzu) and mass spectra were compared with NIST 2011 database.

Thin layer chromatography

Phospholipids were separated by thin layer chromatography (TLC, silica gel 60 G plates; Merck) in chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v) as the mobile phase. The spots were detected with iodine vapor and to localize the amino groups, the plates were treated with a 0.2 % ninhydrin solution (butanol-acetic acid 95:5, v/v). The spots were collected from the plates and then phospholipids quantified spectrophotometrically, as previously published [34]. The average results from three independent experiments including standard deviations are presented.

Mass spectrometer (direct injection)

Direct injection was performed at single quadrupole LC/MS 6110 (Agilent technologies) Agilent G1978B multimode (ESI+APCI) ion source (simultaneous ESI and APCI, for details see [35]). Multimode ion source was utilized to achieve a balanced response for analyzed compounds in a single analysis. All analyses were carried out with negative polarity, drying gas temperature was

300 °C, and drying gas flow was 5 dm³ min⁻¹. Degasser temperature was set at 200 °C, voltage on capillary was 2000 V, and corona current 2 µA. The direct injection of 5 mm³ was done by autosampler of the LC/MS system (no separation column installed).

Acknowledgments The work was performed at the Institute of Chemistry of the Faculty of Natural Science of Comenius University with support from SVV260317 and Mobility Fund of Charles University in Prague, further support was provided by project 13-18051P from the Czech Science Foundation and Grants APVV-0840-11, APVV-0416-10, APVV-0061-11 and APVV-0286-12 from Slovak Research and Development Agency.

References

1. Langecake P, Pryce RJ (1976) *Physiol Plant Pathol* 9:77
2. Dodibiha E, Xu C, Payagala T, Wanigasekara E, Moon MH, Armstrong DW (2011) *Analyst* 136:1586
3. Wang C, Xie S, Yang J, Yang Q, Xu G (2004) *Anal Chim Acta* 525:1
4. Pulfer M, Murphy RC (2003) *Mass Spectrom Rev* 22:332
5. Liu Z, Moate P, Cocks B, Rochfort S (2015) *J Chromatogr B* 978:95
6. Viidanoja J (2015) *J Chromatogr B* 1001:140
7. Cai S-S, Syage JA (2006) *J Chromatogr A* 1110:15
8. Byrdwell WC (2001) *Lipids* 36:327
9. Postle AD, Wilton DC, Hunt AN, Attard GS (2007) *Prog Lipid Res* 46:200
10. Fuchs B, Schiller J, Süß R, Schürenberg M, Suckau D (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:827
11. Calvano CD, De Ceglie C, Aresta A, Facchini LA, Zambonin CG (2013) *Anal Bioanal Chem* 405:1641
12. Li YL, Gross ML, Hsu F-F (2005) *J Am Soc Mass Spectrom* 16:679
13. Sommerer D, Süß R, Hammerschmidt S, Wirtz H, Arnold K, Schiller J (2004) *J Pharm Biomed Anal* 35:199
14. Wegener J, Zschömig K, Onischke K, Fuchs B, Schiller J, Müller K (2013) *Exp Gerontol* 48:213
15. Sparvero LJ, Amoscato AA, Dixon CE, Long JB, Kochanek PM, Pitt BR, Bayir H, Kagan VE (2012) *Chem Phys Lipids* 165:545
16. Schiller J, Süß R, Arnold J, Fuchs B, Lebig J, Müller M, Petković M, Spalteholz H, Zschömig O, Arnold K (2004) *Prog Lipid Res* 43:449
17. Petković M, Schiller J, Müller M, Benard S, Reichl S, Arnold K, Amhold J (2001) *Anal Biochem* 289:202
18. Fuchs B (2012) *J Chromatogr A* 1259:62
19. Dong W, Shen Q, Baibado JT, Liang Y, Wang P, Huang Y, Zhang Z, Wang Y, Cheung H-Y (2013) *Int J Mass Spectrom* 343:15
20. Calvano CD, De Ceglie C, D'Accolti L, Zambonin CG (2012) *Food Chem* 134:1192
21. Apparicio M, Ferreira CR, Tata A, Santos VG, Alves AE, Mostachio GQ, Pires-Butler EA, Motheo TF, Padilha LC, Pilau EJ, Gozzo FC, Eberlin MN, Lo Turco BG, Luvoni GC, Vicente WRR (2012) *Reprod Dom Anim* 47:113
22. Liang M, Zhang P, Shu X, Liu C, Shu J (2013) *Int J Mass Spectrom* 334:13
23. Stübiger G, Aldover-Macasaet E, Bicker W, Sobal G, Willfort-Ehringer A, Pock K, Bochkov V, Widhalm K, Belgacem O (2012) *Atherosclerosis* 224:177
24. Samhan-Arias AK, Ji J, Demidova OM, Sparvero LJ, Feng W, Tyurin V, Tyurina YY, Epperly MW, Shvedova AA, Greenberger

- JS, Bayir H, Kagan VE, Amoscato AA (2012) *Biochim Biophys Acta* 1818:2413
25. Shu X, Li Y, Liang M, Yang B, Liu C, Wang Y, Shu J (2012) *Int J Mass Spectrom* 321:71
26. Schiller J, Amhold J, Benard S, Müller M, Reichl S, Arnold K (1999) *Anal Biochem* 267:46
27. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, Raoult D (2009) *Clin Infect Dis* 49:543
28. Teixeira V, Feio MJ, Bastos M (2012) *Prog Lipid Res* 51:149
29. Shevchenko A, Simons K (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:593
30. Kaneda T (1977) *Bacteriol Rev* 41:391
31. Seydlová G, Fišer R, Čabala R, Kozlík P, Svobodová J, Pátek M (2013) *BBA Biomembranes* 1828:2370
32. Kawai F, Shoda M, Harashima R, Sadaie Y, Hara H, Matsumoto K (2004) *J Bacteriol* 186:1475
33. Glass RL (1971) *Lipids* 6:919
34. Rouser G, Fleische S, Yamato A (1970) *Lipids* 5:494
35. Fischer S, Duncan W (2007) Optimizing the Agilent Multimode Source. www.agilent.com/chem/multimode

Václav Matěj Bierhanzl¹
 Radomír Čabala^{1,2}
 Martin Šton¹
 Robert Kubinec^{3,4}
 Alexandra Hengerics Szabó³
 Peter Podolec³

¹Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Institute of Forensic Medicine and Toxicology, General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

³Faculty of Natural Sciences, Institute of Chemistry, Comenius University, Bratislava, Slovakia

⁴Distillchem, s.r.o., Makov, Slovakia

Received June 16, 2014
 Revised September 12, 2014
 Accepted October 19, 2014

Research Article

Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate

A new, rapid, sensitive, robust, and reliable method has been developed for the qualitative analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate using gas chromatography with mass spectrometry and two-step trimethylsilylation. The method employs hexamethyldisilazane for silylation of the phosphate and hydroxyl groups in the first phase and bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide for silylation of the less-reactive amino groups in the second phase. This order is of key importance for the method because of the different reactivities of the two reagents and the mechanism of derivatization of the active groups of the analytes. Trimethylsilylated derivatives of the analytes were identified on the basis of their retention times and mass spectra. The probable structures of the major fragments were identified in the spectra of the trimethylsilylated derivatives and characteristic *m/z* fragments were selected for each analyte. Fragments with *m/z* 73 and 299 occurred in the spectra of all the analytes. The characteristic retention data were employed to calculate the retention indices of the individual silylated phosphorylated substances in the hydrocarbon range C₁₂–C₁₉ for the DB-5ms column. The method was employed to measure the polar fraction of the hydrolysate of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. The detection limits vary between 5 µg/mL (trimethylsilylated phosphate) and 72 µg/mL (trimethylsilylated phosphoethanolamine).

Keywords: Gas chromatography with mass spectrometry / Phosphoethanolamine / Phospholipids / Phosphoserine / Trimethylsilylation
 DOI 10.1002/jssc.201400657



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

Phospholipids (PLs) form part of the nonpolar fraction of the biological samples and are mostly investigated from the viewpoint of the contents of fatty acids together with nonpolar lipids [1]. PLs are formed of a glycerol skeleton with two ester-bonded fatty acids (hydrophobic part), to which the phosphate functional group is bonded, which is frequently further modified by an additional low-molecular-weight structure (hydrophilic part, e.g. serine, ethanolamine, glycerol, choline, etc.). Analysis of PLs is generally based on a wide range of

separation techniques (HPLC, GC, CE) with various detection systems. Before the actual analysis of the fatty acids, PLs are commonly separated into the relevant classes according to their polar groups [2] using a separation technique suitable for polar substances [3]. From the viewpoint of their chemical properties, these classes are relatively inhomogeneous and the ratio of the individual classes of PLs is not generally determined by GC. Instead of this ratio, the individual PLs are determined in the total hydrophobic phase [4, 5], or the contents of the fatty acids are determined in the individual PLs classes [6]. While analyzing PLs by GC, it is necessary to reduce their polarity and increase their volatility using a suitable derivatization agent. If the PLs contain a quaternary ammonium salt (phosphocholine), a demethylation agent must also be used [7]. Next to methylation [8, 9], trimethylsilylation [10] is preferred today because of its advantages, not only in the hydrophilic group normally occurring in PLs, but also for derivatization of rarely occurring lipids, frequently isolated from microbes living under extreme conditions [11], and also for broad-spectrum analysis of metabolites, including polar and phosphorylated substances [12, 13].

The study of PLs generally falls in the field of lipidomics, which is currently an important and rapidly evolving field.

Correspondence: Václav Matěj Bierhanzl, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 43, Prague 2, Czech Republic
 E-mail: ing.bierhanzl@gmail.com

Abbreviations: BSTFA, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; HMDS, hexamethyldisilazane; PLs, phospholipids; TMS₃-phosphate, tris(trimethylsilyl)phosphate; TMS₄-phosphoethanolamine, trimethylsilylated phosphoethanolamine; TMS₄-phosphoglycerol, trimethylsilylated phosphoglycerol; TMS₄-phosphoserine, trimethylsilylated phosphoserine

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.jss-journal.com

Micro-organisms are a very important group of organisms for lipidomics and are used in an enormous range of research and testing applications. From the viewpoint of bacterial lipidomics, PLs are present in higher concentrations in cell membranes and thus sensitive and accurate analysis of the lipid composition of cell membranes can be used for study, characterization, and identification of microbes. In the study of metabolic processes, it is more important to determine the contents of the individual classes of PLs than their acyl composition [14]. The acyl composition of PLs can affect the determination of the individual classes of PLs or their mutual ratios because the total polarity of a PL molecule depends strongly on both parts, and when fatty acid composition is not homogenous enough separation is carried out mostly into fractions instead of PL classes [15]. High-performance separation techniques such as normal-phase HPLC or hydrophilic interaction chromatography can be used for separation, however, detection is a serious problem because PLs cannot be detected by UV-VIS. So MS or evaporative light-scattering detection, which is expensive and not available for standard HPLC systems, is necessary [16]. Electromigration methods are as suitable as HPLC. They can be used to separate PLs [17]. According to their polar headgroups, separation of PLs in an electric field is also influenced by fatty acid chains. Different length and shape of acyls can move the migration time of analytes, so the determination is sometimes troublesome. This problem could be solved by determining not the individual PLs, but only their polar groups without their glycerol skeletons and hydrophobic acyls. Although these are polar substances, their suitable derivatives can be determined by GC [18]. For example, phosphoserine was determined by GC before the extensive use of MS detectors [19], because this is an important analyte, not only for lipidomics, but also for proteomics [20]. This metabolite is monitored in connection with some degenerative changes in the organism [21, 22]. The combination of GC with MS permits the determination of phosphoserine in a mixture of chemically very similar substances [23], for example its metabolites, and it is frequently determined together with other phosphorylated amino acids [24, 25]. This work was performed to develop a sensitive, robust, and reliable GC–MS method for the determination of phosphoserine together with phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate, following derivatization with silylation agents. This method can be used as a faster alternative to current methods in cases where they are not available, are too expensive, or are too tedious.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; Supelco, Bellefonte, PA, USA) and hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma–Aldrich, Steinheim) were used to silylate the analytes. Phosphoethanolamine (purity not declared), phosphoserine

(standard purity not declared), 1-phosphoglycerol (85%), and acetonitrile (HPLC grade) were supplied by Sigma–Aldrich, Prague. He (99.9995%, Linde Gas, Prague) was used as the carrier gas. Phosphoric acid (85%, p.a., Penta, CZ), TFA (99.9%, Romil, Cambridge, UK), and a mixture of standard hydrocarbons C₅–C₂₀ (Spectra-Physics) were used as supplied.

2.2 Sample preparation

Phosphoserine, 1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and phosphoric acid were weighed individually in 2 mg amounts into 2 mL vials and then dissolved in 600 μ L of a mixture of acetonitrile and HMDS (1:1, v/v); 2 μ L of TFA was added to each vial. Then the samples were maintained at a temperature of 40°C for 60 min in open vials to allow ammonia, formed as a side product of trimethylsilylation, to escape. In the next step, 400 μ L of BSTFA was added and the samples were closed with a cap with a septum and maintained for 30 min at 80°C. These samples were then analyzed by GC–MS.

2.3 Preparation of the calibration series

A stock solution was prepared from a mixture of standards with concentrations of 2000 μ g/mL (phosphoethanolamine), 1500 μ g/mL (phosphoserine), 1000 μ g/mL (phosphoglycerol), and 100 μ g/mL (phosphate), which were silylated (see Section 2.2) and then diluted 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-, and 200-fold with acetonitrile.

2.4 Validation

The linearity was tested first in the same range as the calibration series, although the value of the correlation coefficient across three orders of magnitude was greater than 0.99 only for tris(trimethylsilyl)phosphate (TMS₃-phosphate); it was between 0.95 and 0.98 for the other analytes, while the correlation coefficients for all the analytes were greater than 0.99 when testing the linearity across two orders of magnitude (concentrations of a hundred times of LOQ). The curve of the dependence of the concentration over three orders of magnitude obeys a quadratic dependence; in this case, the correlation coefficients for a quadratic dependence were far better than 0.99. The detection and quantification limits were determined from the calibration series and varied between 5 or 18 μ g/mL (TMS₃-phosphate) and 72 or 240 μ g/mL (TMS₄-phosphoethanolamine, more detail in Supporting Information Table S1). The repeatability was measured on a set of ten measurements, where the SD was measured for each analyte with a value between 2% (TMS₄-phosphoethanolamine) and

Table 1. Retention times, retention indices, and elution temperatures of the TMS derivatives of the phosphates

Analyte	Retention time (min)	Elution temperature (°C)	Retention index
TMS ₃ -phosphate	11.8	153	1282 ± 13
TMS ₄ -phosphoglycerol	19.0	222	1796 ± 17
TMS ₄ -phosphoethanolamine	19.3	225	1818 ± 17
TMS ₄ -phosphoserine	20.0	231	1876 ± 17

9% (TMS₃-phosphate). The reproducibility was tested on a series of ten measurements, repeated after one day and one week. The differences between the relative contents of the individual analytes did not change after one day; the greatest change was observed for TMS₄-phosphoserine (by 3%), but this is an unstable substance that almost completely decomposed after one week; thus, it is advisable to perform routine analysis during a single day.

2.5 Real sample

The method was tested on the aqueous fraction of the hydrolysate of the cell membrane lysate of the bacteria *Bacillus subtilis*, which remains unused after transesterification of membrane lipids, to determine the fatty acid fraction. Approximately 1 mL of the sample, containing <1000 µg of PLs, was obtained from the Department of Genetics and Microbiology of the Faculty of Science of Charles University, where this microbe is studied [26] with respect to production of potent antibiotic cyclooligopeptide surfactine.

2.6 Instrumentation

The GC–MS analysis was performed using a gas chromatograph coupled with a GC–MS–QP 5050A mass spectrometer (Shimadzu, Japan). Separation was performed using a DB-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm ID, stationary phase thickness 0.25 µm) from Agilent Technologies (USA). The linear velocity of He was set at 35 cm/s. A sample (2.5 µL) was injected using an AOC-20i automatic sampler (Shimadzu) at an injection temperature of 250°C in both the splitless mode (0.5 min) and split (1:100) mode. The mixture of hydrocarbons was measured for calculation of the retention indices and analysis in the SIM regime at a split of 1:250. The analyses were performed with the following temperature program: initial temperature 60°C, 2 min, then 9°C min^{−1} to 250°C, 5 min. The transfer line was maintained at a temperature of 250°C and the detector solvent cut time was 5 min. In an analysis of the mixed samples in the SIM mode, responses were measured for *m/z* 73, 299, 174, 188, 356, and 357, characteristic for the individual analytes. The chromatograms were processed using the GC Solution v. 1.21 (Shimadzu) software. The NIST 2011 database was used to evaluate the mass spectra.

3 Results and discussion

3.1 Trimethylsilylation of phosphates

It was found in preliminary experiments that single-step derivatization of all the analytes is not possible because of the great differences in reactivity between the hydroxyl and amine groups. Thus, the investigated phosphates were separated into two groups for the trimethylsilylation: (i) phosphates containing only hydroxyl groups (phosphoric acid, phosphoglycerol) and (ii) phosphates also containing amino groups (phosphoethanolamine, phosphoserine). While phosphates containing only hydroxyl functional groups can be fully trimethylsilylated using relatively inexpensive HMDS, amino groups can practically not be trimethylsilylated using this reagent. Trimethylsilylation of the hydroxyl groups in the first group of phosphates proceeds according to the scheme in Fig. 1.

The amine groups of the second group of phosphates must be subsequently trimethylsilylated using relatively expensive BSTFA that, however, has greater reactivity. It is not suitable to use only BSTFA for overall trimethylsilylation in a single step because the reaction of BSTFA with the hydroxyl groups is too violent and the reaction products are frequently precipitated, leading to completely unreproducible results. Consequently, two-step derivatization was employed, where the hydroxyl groups are trimethylsilylated in the first step using HMDS (weaker silylation reagent) and the amino groups are derivatized in the second step together with the remaining hydroxyl groups using BSTFA and the reaction is thus not too violent. This two-step trimethylsilylation using reagents with different reactivities has not yet been described in the literature. To ensure a standard procedure, two-step trimethylsilylation was used for all the samples. Figure 2 depicts a scheme for the second step in the trimethylsilylation. While phosphoethanolamine is completely trimethylsilylated on the amino group, the amino group of phosphoserine is trimethylsilylated only once, probably for steric reasons.

3.2 Identification of TMS derivatives of the analytes

Trimethylsilylated phosphorylated substances were measured by GC–MS and their mass spectra were compared with the spectra in databases and the literature. The characteristic fragments of TMS₃-phosphate correspond to trimethylsilyl (TMS) for *m/z* 73 and desmethyl-TMS₃-phosphate for *m/z* 299 (MS spectrum in Supporting Information Fig. S1).

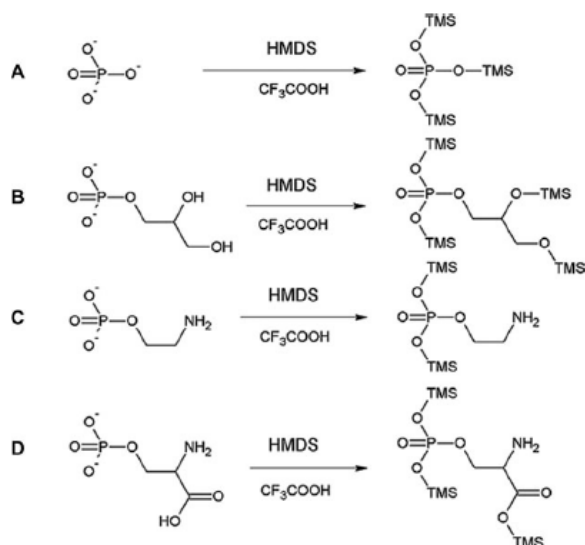


Figure 1. Scheme of the trimethylsilylation of the hydroxyl groups of phosphate (A), 1-phosphoglycerol (B), phosphoethanolamine (C), and phosphoserine (D) with hexamethyldisilazane (HMDS).

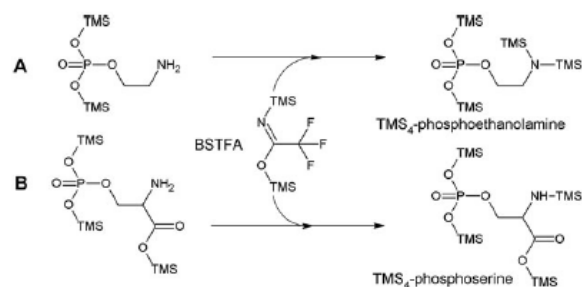


Figure 2. Scheme of the trimethylsilylation of the amino groups of TMS derivatives of phosphates with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. (A) Phosphoethanolamine, (B) phosphoserine.

In addition to fragments for m/z 73 and 299, the mass spectrum of trimethylsilylated phosphoglycerol (TMS₄-phosphoglycerol; see Supporting Information Fig. S2) also exhibits a very intense fragment at m/z 357, corresponding to tris(trimethylsilyl)ethyleneglycolphosphate. Theoretically, phosphoglycerol can exist in two positional isomers, as 1-phosphoglycerol and 2-phosphoglycerol. 2-Phosphoglycerol practically does not exist in biological matrices; however, it may be present in small amounts in synthetic chemicals. Although the mass spectra of the two isomers are very similar (both contain m/z 357), they have different retention times (see Fig. 3) and thus this isomer practically does not affect the analysis of the monitored phosphorylated substances.

In contrast to TMS₄-phosphoserine, TMS₄-phosphoethanolamine contains a fully trimethylsilylated amino group, as it does not contain a carboxyl group that would prevent complete trimethylsilylation. The mass spec-

tra of TMS₄-phosphoethanolamine (Supporting Information Fig. S3) and TMS₄-phosphoserine (Supporting Information Fig. S4) are very similar and thus m/z 174 and 188 were selected for their measurement, where the differences between the spectra of these substances are greatest. All the more intense fragments of TMS₄-phosphoethanolamine also occur in the spectrum of TMS₄-phosphoserine. The mass spectrum of TMS₄-phosphoethanolamine contains fragment m/z 174, which can be assumed to correspond to the bis(trimethylsilyl)ethylamine fragment. It is surprising that the same fragment m/z 174 also appears in the spectrum of TMS₄-phosphoserine even though it theoretically cannot yield the bis(trimethylsilyl)ethylamine fragment. As the intensity of m/z 174 for TMS₄-phosphoserine is much higher than for TMS₄-phosphoethanolamine, it can be assumed that the first is a different (minor) fragment in the latter case.

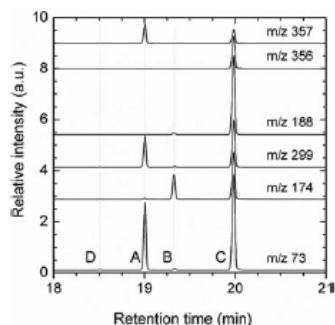


Figure 3. Chromatogram of a mixture of TMS₄-1-phosphoglycerol (A), TMS₄-phosphoethanolamine (B), and TMS₄-phosphoserine (C). TMS₄-2-phosphoglycerol (D) is present as an impurity. Column DB-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 2.5 μL sample, injection 250°C, split 1:250, temperature program: 60°C, 2 min, then 9°C/min to 250°C, 5 min.

As the NIST 2011 database does not contain the spectrum of TMS₄-phosphoserine, the measured mass spectrum was compared with the published results [18], where agreement was found both in the contents of the fragments and their relative intensities. The intense and characteristic fragment m/z 356, corresponding to the *N,O,O*-tris(trimethylsilyl)ethanolamine-*O*-phosphate fragment was selected for measurements in the SIM mode, where this fragment contains a monotrimethylsilylamine group and thus TMS₄-phosphoethanolamine and the other analytes do not contain it.

The above-mentioned fragments 73, 174, 188, 299, 356, and 357 were employed for MS detection of the analytes in the SIM regime with their separation, where their relevant retention times were measured and the occurrence of the characteristic fragments was compared (see Fig. 3). It can be observed in Fig. 3 that the separation of the analytes is adequate and there is sufficient reserve in the resolution for the occurrence of accompanying substances in real samples. The structures, monoisotopic mass, and occurrence of characteristic fragments suitable for determination of the individual analytes are given in the Supporting Information.

3.3 Retention indices

The results of the GC–MS analyses for calculation of the retention indices were used for more thorough characterization of the TMS derivatives of the phosphorylated substances. The measured retention times were used to calculate the elution temperatures, which were further used to calculate the retention indices for the individual analytes (Table 1). It is apparent from the results that analytes are eluted between hydrocarbons C₁₂ and C₁₉ under the experimental conditions.

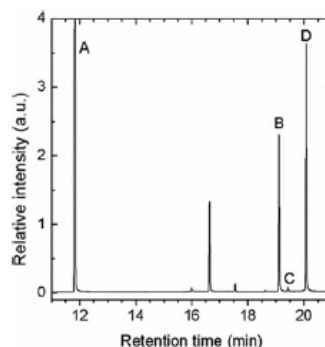


Figure 4. Chromatogram of an equimolar mixture of trimethylsilylated phosphates for m/z 73. (A) TMS₃-phosphate, (B) TMS₄-phosphoglycerol, (C) TMS₄-phosphoethanolamine, (D) TMS₄-phosphoserine. Conditions measured as stated in Fig. 3

As the MS response of the TMS₃-phosphate in the equimolar mixture of all four monitored analytes is in order of magnitude higher than that of the other components, split mode 1:100 was used to measure its retention time in the scan mode, while all the other measurements were performed in the splitless mode. For validation of the retention times, the equimolar mixture was also measured in the SIM mode for m/z 73 (Fig. 4), where large differences can be observed between the response factors of the analytes.

3.4 Analysis of a real sample

TMS₃-phosphate (5.7 μg/mL) a TMS₄-phosphoglycerol (below the detection limit) was found by the described procedure in a sample of the aqueous fraction of the hydrolysate of the cell membrane lysate of *B. subtilis*. The other two analytes were not detected. Earlier research on this bacterium indicates a high content of phosphatidylethanolamine [27] and relatively lower content of phosphatidylserine. As the detection limit of TMS₄-phosphoethanolamine is the highest of the monitored analytes, it can be assumed that a major part of the ammonium phosphorylated analytes was destroyed during alkaline hydrolysis of the membrane lysate. We are working on less destructive and more selective enzymatic hydrolysis yielding intact polar groups following splitting off of the acyl groups.

4 Conclusion

A new method has been developed for simultaneous analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate by GC–MS with two-stage trimethylsilylation using two silylation agents with different reactivities. The method enables effective derivatization of compounds

important from the viewpoint of lipid metabolism. The problem related to the large difference in the signals of trimethylsilylated phosphorylated substances in their simultaneous analysis was resolved using the scan and SIM mode in combination with split and splitless injection. The determined retention indices indicate that the derivatives are eluted between hydrocarbons C₁₂ and C₁₉. The described method is sufficiently effective and the use of the MS detector ensures sufficient selectivity against any potential interference in real samples. The measured spectra agree with the spectra in the commercial database and the spectrum of TMS₄-phosphoserine agrees with the formerly published results. Characteristic fragments were selected for the analysis of real samples, where their probable structures were determined. Their retention indices were calculated from the TMS retention times. Only phosphate and phosphoglycerol were found in the aqueous fraction of the cell membrane hydrolysate, probably because of the too radical procedure for the hydrolysis of membrane lysate.

The work was performed at the Department of Analytical Chemistry of the Faculty of Science of Charles University in Prague in the 2013/2014 academic year with support from grants SVV260084, APVV-0840-11, APVV-0416-10, APVV-0061-11, and APVV-0286-12.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Lie, Ø., Lambertsen, G., *J. Chromatogr. B* 1991, **565**, 119–129.
- [2] Kataoka, H., Nakai, K., Katagiri, Y., Makita, M., *Biomed. Chromatogr.* 1993, **7**, 184–188.
- [3] Caboni, M. F., Lercker, G., *J. Chromatogr. A* 1984, **315**, 223–231.
- [4] Kataoka, H., Sakiyama, N., Maeda, M., Makita, M., *J. Chromatogr. B* 1989, **494**, 283–288.
- [5] Perona, J. S., Ruiz-Gutierrez, V., *J. Sep. Sci.* 2004, **27**, 653–659.
- [6] Olsson, N. U., Kaufmann, P., *J. Chromatogr. A* 1992, **600**, 257–266.
- [7] Karlander, S.-G., Karlsson, K.-A., Pascher, I., *BBA-Lipid. Lipid Met.* 1973, **326**, 174–183.
- [8] Lee, J. W., Yamamoto, T., Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., *J. Sep. Sci.* 2011, **34**, 3553–3560.
- [9] Lee, J. W., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T., *J. Chromatogr. A* 2013, **1279**, 98–107.
- [10] Yon, C., Han, J.-S., *Exp. Mol. Med.* 2000, **32**, 243–245.
- [11] Opluštil, S., Chrástina, D., Rulík, M., Barták, P., Bednář, P., Čáp, L., *Chem. Listy* 2007, **101**, 236–240.
- [12] Almstetter, M. F., Appel, I. J., Gruber, M. A., Lottaz, C., Timischl, B., Spang, R., Dettmer, K., Oefner, P. J., *Anal. Chem.* 2009, **81**, 5731–5739.
- [13] Emond, P., Mavel, S., Aïdoud, N., Nadal-Desbarats, L., Montigny, F., Bonnet-Brilhault, F., Barthélémy, C., Merten, M., Sarda, P., Laumonnier, F., Vourc'h, P., Blasco, H., Andres, C. R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, **405**, 5291–5300.
- [14] Boumann, H. A., Hopmans, E. C., van de Leemput, I., Op den Camp, H. J. M., van de Vossenberg, J., Strous, M., Jetten, M. S. M., Sinnighe Damsté, J. S., Schouten, S., *Microbiol. Lett.* 2006, **258**, 297–304.
- [15] Fauland, A., Trötzmüller, M., Eberl, A., Afiani-Zadeh, S., Köfeler, H., Guo, X., Lankmayr, E., *J. Sep. Sci.* 2013, **36**, 744–751.
- [16] Jian, W., Edom, R. W., Xu, Y., Weng, N., *J. Sep. Sci.* 2010, **33**, 681–697.
- [17] Bo, T., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2006, **29**, 1018–1025.
- [18] Shieh, J.-J., Desiderio, D. M., *Anal. Lett.* 1977, **10**, 831–834.
- [19] Kataoka, H., Ueno, Y., Makita, M., *Agric. Biol. Chem.* 1991, **65**, 1587–1592.
- [20] Kataoka, H., Ueno, Y., Makita, M., *J. Pharm. Biomed.* 1992, **10**, 365–369.
- [21] Chen, J.-L., Tang, H.-Q., Hu, J.-D., Fan, J., Hong, J., Gu, J.-Z., *J. Gastroenterol.* 2010, **16**, 5874–5880.
- [22] Erdemoğlu, M., Kuyumcuoglu, U., Guzel, A. I., Celik, Y., Kale, E., *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011, **44**, 725–728.
- [23] Palumbo, A. M., Tepe, J. J., Reid, G. E., *J. Proteome Res.* 2008, **7**, 771–779.
- [24] Kataoka, H., Nakai, K., Makita, M., *J. Chromatogr. B* 1993, **615**, 136–141.
- [25] Kataoka, H., Nakai, K., Ueno, Y., Makita, M., *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992, **56**, 1300–1301.
- [26] Seydlová, G., Fišer, R., Čabala, R., Kozlík, P., Svobodová, J., Pátek, M., *BBA-Biomembranes* 2013, **1828**, 2370–2378.
- [27] Seydlová, G., Svobodová, J., *Folia Microbiol.* 2008, **53**, 303–307.

RESEARCH ARTICLE

Comparative Analysis of Volatile Defensive Secretions of Three Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method

Jan Krajčec¹, Martina Havlíková¹, Miroslava Bursova^{1,2}, Martin Šton¹, Radomír Cabala^{1,2}, Alice Exnerová³, Pavel Stys^{3*}, Zuzana Bosakova^{1*}

1 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **2** Toxicology Department, Institute of Forensic Medicine and Toxicology, General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, **3** Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

* bosakova@natur.cuni.cz (ZB); pavelstys@gmail.com (PS)



OPEN ACCESS

Citation: Krajčec J, Havlíková M, Bursova M, Šton M, Cabala R, Exnerová A, et al. (2016) Comparative Analysis of Volatile Defensive Secretions of Three Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method. PLoS ONE 11(12): e0168827. doi:10.1371/journal.pone.0168827

Editor: Joseph Clifton Dickens, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, UNITED STATES

Received: January 4, 2016

Accepted: December 7, 2016

Published: December 20, 2016

Copyright: © 2016 Krajčec et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by: Czech Science Foundation - P505/11/1459, awarded to AE (<http://www.gac.cz/en/>); Grant Agency of Charles University in Prague – 760216, awarded to MH; Grant Agency of Charles University in Prague – SVV, awarded to MH.

Abstract

The true bugs (Hemiptera: Heteroptera) have evolved a system of well-developed scent glands that produce diverse and frequently strongly odorous compounds that act mainly as chemical protection against predators. A new method of non-lethal sampling with subsequent separation using gas chromatography with mass spectrometric detection was proposed for analysis of these volatile defensive secretions. Separation was performed on RtX-200 column containing fluorinated polysiloxane stationary phase. Various mechanical irritation methods (ultrasonics, shaking, pressing bugs with plunger of syringe) were tested for secretion sampling with a special focus on non-lethal irritation. The preconcentration step was performed by sorption on solid phase microextraction (SPME) fibers with different polarity. For optimization of sampling procedure, *Pyrrhocoris apterus* was selected. The entire multi-parameter optimization procedure of secretion sampling was performed using response surface methodology. The irritation of bugs by pressing them with a plunger of syringe was shown to be the most suitable. The developed method was applied to analysis of secretions produced by adult males and females of *Pyrrhocoris apterus*, *Pyrrhocoris tibia-lis* and *Scantius aegyptius* (all Heteroptera: Pyrrhocoridae). The chemical composition of secretion, particularly that of alcohols, aldehydes and esters, is species-specific in all three pyrrhocorid species studied. The sexual dimorphism in occurrence of particular compounds is largely limited to alcohols and suggests their epigamic intraspecific function. The phenetic overall similarities in composition of secretion do not reflect either relationship of species or similarities in antipredatory color pattern. The similarities of secretions may be linked with antipredatory strategies. The proposed method requires only a few individuals which remain alive after the procedure. Thus secretions of a number of species including even the rare ones can be analyzed and broadly conceived comparative studies can be carried out.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Chemical intraspecific and interspecific communication is essential for most animals, and the low-molecular organic compounds participate in regulation of behavior, synchronization of physiological and developmental activities, and act as secondary defenses against predators, parasitoids, and parasites. The organic compounds functioning in interorganismal communication are called infochemicals [1]. These compounds also take part in aposematic signaling and advertise the prey noxiousness to the potential predators by means of olfactory or gustatory cues [2, 3]. These chemical warning signals are often combined with visual and vibrational (acoustic) signals or cues in a multimodal antipredatory signaling system [4].

The true bugs (Hemiptera: Heteroptera) is a large, diversified and cosmopolitan group of sucking insects including 95 families and over 50,000 described species [5]. They inhabit all the major biomes, from terrestrial to fresh-water and marine, and include such well known families as water scorpions, backswimmers, water striders, assassin bugs, plant bugs, bed bugs and shield bugs. Many species are phytophagous and true bugs are ranked as the fourth major insect group of agricultural pests [6]. Some species are carnivorous feeding on arthropods, gastropods and even small aquatic vertebrates. The predatory true bugs may function in regulation of arthropod pests of cultivated plants while the hematophagous species may be vectors of human and animal diseases [7].

Nearly all true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) are chemically defended against predators and produce defense infochemicals which are either autogenous (synthesized by bugs themselves from precursors contained in food; [6]) or sequestered (received in food non-metabolized and stored in special reservoirs; [7]). The glands producing defense secretion and their reservoirs differ between the larvae (nymphs) and adults [8]. The larvae produce defense secretion from larval dorsoabdominal glands (DAGs). The adult Heteroptera have lost DAGs or retained and transformed them to produce pheromones and allelochemicals, but not infochemicals with defensive function. Nearly all adult Heteroptera produce defense secretion from methathoracic glands (MTGs, scent glands). In some true bug taxa there are additional specialized prothoracic and mainly abdominal glands producing a variety of infochemicals, some of purely defensive function [9–14]. The identity of the antipredatory chemicals and the composition of secretion may be taxon-specific and sex-dependent [1]. The antipredatory infochemicals of true bugs are mostly volatile and strongly odorous, often repellent for vertebrate predators [15], and may be toxic for predatory arthropods and even for the secreting bug itself [16]. Short-chain alcohols, aldehydes, oxo-aldehydes, ketones, esters, alkanes, organic acids, monoterpenes and aromatic alcohol/aldehydes are typical compounds, and the composition of the secretion may depend on the physiological, nutritional and developmental state of the individual and on the season [17].

Most adult terrestrial Heteroptera release their defensive secretions readily upon attack. However, some true bugs (e.g. the firebugs, family Pyrrhocoridae) are reluctant to release their secretion because of behavioral constraints, reduced methathoracic glands (MTGs) or anatomical architecture of their secretion releasing MTGs system [18]. Even when not released, the secretion may still be effective by making a predator sick after consuming the bug, and this experience may induce learned aversion [15, 19].

Several procedures have been proposed for sampling volatile secretions; most of them require killing the insects. One of these procedures is rinsing the bug with dichloromethane, which kills it in a few seconds [20]. This method has the disadvantage that the sample is greatly diluted and substances that are not derived from the secretion but, e.g., from the surface of the body, can also be extracted. Another method is anaesthetizing the bugs using CO₂ or ethylacetate or killing them by freezing with subsequent dissection of the glands and extraction of their

content with methyl-*tert*-butylether, hexane or dichloromethane [11, 21–28], or puncturing the gland with a glass capillary [29]. Such procedures are appropriate for studies of large species (e.g. shield bugs, Pentatomidae) in which only a few individuals are needed for dissection and extraction of sufficient quantities of secretion [14, 25, 30]. On the other hand, the method is overly time-consuming in smaller species in which it is necessary to dissect a large number of individuals (Farine et al. used up to 2000 specimens of *Pyrrhocoris apterus* [16]). Non-lethal sampling methods include blowing air across a vessel containing the bugs with subsequent collection of the substances on various types of adsorbents, such as Super Q, active carbon or Porapak Q [31–34], sorption on a fiber (SPME) [35–37] or placing a paper napkin between the bugs and subsequent extraction of the napkin with dichloromethane [38]. The relatively newest procedure involves a temperature-desorption system that was used for analyzing pheromones [39, 40]. However, these procedures do not include any irritation of the insects that would simulate a predator attack and assure the discharging of the defensive secretion.

Gas chromatography (GC) combined with flame ionization, mass spectrometric or electroantennographic detection has been used for analysis of the secretions of true bugs [23, 25, 37, 41–48]. Mainly non-polar DB- or HB-5 capillary columns or parallel connected non-polar DB-1 and polar DB-WAX capillary columns have been used [20, 28, 36, 39, 41]. Because the secretions contain many different substances, preliminary separation can be carried out using high performance liquid chromatography prior to gas chromatography [49], but recently comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) has begun to be used [24, 50]. Substances are identified by comparison with a mass spectrometric database and by nuclear magnetic resonance [33].

Because of the great complexity of the secretion samples and the number of parameters that can affect the sampling process, it can be beneficial to employ the process optimization procedures that combine all the tested parameters together at the same time and substantially reduce the number of analyses required. Response surface methodology (RSM) is based on the fit of a polynomial equation to the multidimensional (multiparametric) experimental data which describes the behavior of the data set with the objective of making statistical predictions. RSM is a general approach for designing experiments; it efficiently reduces the development time and costs of the method. The main advantage of RSM as compared with the currently most widely used approach to optimization, namely one-factor-at-a-time OFAT (one parameter is changed while the others are fixed during optimization) is that only the most important experimental parameters are selected and optimized and that more than one parameter are changed simultaneously in one experiment according to the computer-designed plan of experiments [51–53].

In this study three species of the family Pyrrhocoridae, namely the Palearctic *Pyrrhocoris apterus* (L.), Oriental *P. tibialis* (Stål), and Mediterranean *Scantius aegyptius* (L.) were chosen to analyze and compare their secretions since they are closely related but differ in many biologically important traits. *Pyrrhocoris apterus* and *P. tibialis* are congeneric, closely related but largely allopatric species [54]. They have similar host plant (various Malvaceae in d. *Tilia* spp.; in case of *P. apterus* also an introduced locust tree, *Robinia pseudacacia*) but a different life style, and both are reluctant to discharge their defensive secretion upon an attack. *P. apterus* is gregarious, mostly brachypterous, flightless species, and possesses a warning coloration of conspicuous red-and-black color pattern. *P. tibialis* is non-gregarious, readily flying, and rather cryptically colored in shades of gray and brown. *Scantius aegyptius* is a macropterous (but flightless), epigeic, Mediterranean species occupying the southwestern part of the range of *P. apterus* and sharing with the latter not only similar red-and-black warning coloration, but also the same habitat and major hostplant (*Malva neglecta*; Malvaceae). Like both *Pyrrhocoris* species, it is also reluctant to discharge its defensive secretion.

This study was carried out to i) develop a non-lethal method for sampling the defensive secretion of true bugs using various kinds of mechanical irritation that would simulate the attack of a predator, and also find a method suitable for the species that are reluctant to release their secretion; ii) select the most advantageous sampling of the secretion using SPME fibers with various polarities for subsequent GC-MS analysis; iii) optimize the sampling using the response surface methodology; iv) employ the developed method for analysis and comparison of infochemicals secreted by adults of both sexes in the three species of Pyrrhocoridae differing in their biology and antipredatory strategies, and to assess the similarities and differences in secretions.

MTG secretion of *P. apterus* has already been analyzed by Farine [20] using dissected MTGs and their reservoirs. Except for *P. apterus*, *Dysdercus intermedius* Distant, *D. superstitionis* (F.), *D. fasciatus* Signoret, and *D. cingulatus* (F.) defensive secretion of no other pyrrhocorid species have been analyzed [20], and to our best knowledge such comparisons of secretion in closely related species of Heteroptera are surprisingly rare.

Materials and Methods

Chemicals

A mixture of *n*-alkanes (C_8 – C_{20}) dissolved in hexane for retention index determination was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Reference compounds, (*E*)-2-hexen-1-ol (> 96%), (*E*)-2-octen-1-ol (> 97%), 1-decyne (> 98%), 1-dodecene (≥ 99%), (*E,E*)-2,4-hexadienal (≥ 97%), 2-cyclohexen-1-ol (> 95%), (*E*)-2-hexenal (≥ 99%), (*E*)-2-octenal (≥ 95%), 4-*tert*-butylcyclohexyl acetate (mixture of *E* and *Z*, > 98%), allyl cyclohexanecarboxylate (≥ 98%), cyclopentanemethanol (≥ 98%), cyclopentanol (≥ 99%), cyclopentanone (≥ 99%), decanal (≥ 98%), 1-dodecanol (≥ 98%), dodecyl acetate (> 97%), hexyl acetate (≥ 99%), hexyl salicylate (≥ 99%), limonene (> 97%), nonanal (≥ 97%), octyl acetate (≥ 99%), *p*-cymene (> 99%), 1-tridecanol (≥ 99%), and α -hexylcinnamaldehyde (≥ 95%) were supplied by Sigma Aldrich (Munich, Germany).

Instrumentation, separation conditions and identification of the volatile components

The analyses were performed using a GCMS-QP2010 Plus instrument (Shimadzu, Japan), equipped with 20 m × 0.15 mm i.d., 0.15 μ m film thickness Rtx-200 column (trifluoropropylmethyl polysiloxane stationary phase, Restek, USA). This stationary phase was selected as a general purpose one with respect to its unique ability to separate substances in a relatively broad polarity range. Helium (99.999%, Linde, Czech Republic) was used as the carrier gas at a constant linear flow rate of 35 cm s⁻¹. Splitless-mode injection with SPME liner at 250°C was employed (split valve closed for 1 min). The oven temperature was maintained at 35°C for 3 min, ramped at 5°C min⁻¹ to 130°C, then ramped at 20°C min⁻¹ to 300°C and then maintained for 5 min (total run time, 35.50 min). The mass spectrometer was operated in the scan mode (*m/z* 35–500). The ion source and interface temperatures were 200 and 250°C, respectively.

The data were collected and evaluated using the GCMS software (Shimadzu, Japan), Origin 8 (Origin Lab corporation, Northampton, MA, USA), Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, DC, USA) and Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA) programs. Identification of the secretion components was made by comparing the obtained spectra with those in the NIST 2008 Mass Spectra Library. Series of *n*-alkanes (C_8 – C_{20}) and reference compounds (see Section *Chemicals*) were analyzed under the same experimental conditions as those used for the samples to either establish the retention indices or confirm the identity of

the analytes. Retention times of reference compounds were measured by injection of their diluted solutions in pentane. The dilution was selected for each standard individually in such a way that its retention time was constant and reproducible and did not change with higher dilution. The identity confirmation of the separated compounds was performed by comparing the experimental retention times, retention indices and mass spectra of the compounds with those of concurrently analyzed reference standards.

Sample preparation and bug samples

For the study of sampling procedure *Pyrrhocoris apterus* was selected, because it is easily available in large numbers [19], it was frequently used as a model in experimental studies [55] and its secretion has already been studied [20]. Moreover, *P. apterus* is characterized by a moderate chemical defense with a delayed effect on predator and only releases its defense secretion when it is strongly irritated [15, 19]. This species was used for optimization experiments focused on finding the most efficient approach for extracting and analyzing defensive secretion in Pyrrhocoridae. To optimize sampling conditions for all possible compounds four individuals of *P. apterus* were used together, always two males and two females.

Under the optimized sampling and separation conditions the defensive secretions of adults of three closely related true bug species (Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae, the firebugs), were studied: (1) *Pyrrhocoris apterus* (L., 1758) from Prague, Czech Republic, a common Eurasian aposematically colored species introduced to other continents as well, (2) *P. tibialis* (Stål, 1874), from Tianjin, China, an East Palaearctic species, and (3) *Scantius aegyptius* (L., 1758) from Greece (Kos Island and Crete), a Mediterranean species. The adults were sexed, fed with seeds of their original host plants (*Tilia cordata* in *P. apterus*, *Alcea rosea* in *S. aegyptius*, and *Hibiscus rosa-sinensis* in *P. tibialis*), and maintained separately in plastic containers at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and photoperiod L16:D8. Three males and three females of each species were used for the individual analysis, the sexes were sampled separately and the analysis was performed in triplicate ($n = 3$).

Three individuals were placed in 4 mL glass vial dosed with a polypropylene stopper (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a teflon septum (Supeko, Bellefonte, PA, USA), and the vial was then placed in an ultrasonic bath (Elma, Singen, Germany) or shaker (Heidolph, Schwabach, Germany). In the experiment employing irritation with a plunger, three individuals were placed in a syringe with a barrel volume of 12.5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany), which was placed in an incubated shaker for tempering the specimens (bioSan, Riga, Lithuania). Following a certain tempering time at the given temperature, the bugs were carefully compressed with the plunger of a syringe so that they could not move and the syringe tip was then closed with a rubber stopper. The bugs were compressed with the plunger until a thin liquid film appeared on their body. Then the rubber stopper was removed from the syringe tip, 5 mL of air was drawn in and an SPME (solid phase microextraction) fiber was immediately inserted into the tip of the barrel.

The following experimental conditions were studied for each sampling method: i) irritation with ultrasonics: type of fiber, irritation temperature, intensity of the ultrasonics, irritation time, SPME sampling time and temperature of SPME sorption; ii) for irritation in a shaker: type of fiber, irritation temperature, rate of shaking, irritation time, SPME sampling time and temperature of SPME sorption and iii) for irritation using compression in the barrel of a syringe: type of fiber, temperature prior to compression, tempering time prior to compression, time and temperature of SPME sorption.

The volatile compounds were extracted from the syringe barrel using a manual SPME sampler with a selected fiber assembly (all Supelco, Bellefonte, PA, USA) coated with: i)

7 μm polydimethylsiloxane (PDMS), ii) 85 μm polyacrylate (PA) and iii) triple phase 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Each SPME fiber was thoroughly conditioned for 15 min before and after each analysis in an external syringe oven at 250°C under vacuum. Before each analysis of defensive secretion, a control analysis of SPME sampler itself and SPME sampling of the syringe itself (blank) was performed. The insects were tempered during the sorption on SPME fiber to increase vapor pressure.

Comparison of secretions between true-bug species

In order to consider the intra- and inter-specific chemical diversity of defensive chemicals, we constructed a cluster tree based on qualitative similarities in chemical profiles among all analysed samples. The clustering was based on distance matrix, in which the distance between each pair of samples was expressed as a number of compounds exclusively present in one of the samples and absent in the other. Single linkage clustering algorithm was used for tree construction. All 135 detected compounds were considered, including the fully identified compounds as well as partially identified chemicals, characterized by their retention behaviour and mass spectra with similarity (match factor in NIST 2008 data base) lower than 85%. Three independent biological replicates for each species and sex were used, each consisting of a pooled sample of three individuals, except for *P. apterus* females, in which only two replicates were available.

Results and Discussion

Selection of parameters and response definition

The studied parameters were selected with respect to several factors. One of the main requirements on sampling of volatile secretions was that the bugs would not be killed and destroyed, so the method would be suitable for a limited material of rare species. We found that the critical sampling temperature for *P. apterus* is 40°C, because higher temperature is lethal. Therefore, this temperature has been arbitrarily set as the highest applied temperature also for other two tested species. For SPME, the choice of the polarity of the sampling fiber is the most critical condition for reliable and reproducible analysis of a sample. As the detailed composition of the secretions of the studied species of Pyrrhocoridae is unknown and can depend on many factors (described in the introduction), three different SPME fibers with different polarities were studied—polar PA, nonpolar PDMS fibers and composite bipolar DVB/CAR/PDMS fiber covering a wide range of volatilities and polarities. The type of fiber, irritation temperature and time, and the temperature of SPME sorption constituted the basic set of parameters for each of the proposed irritation methods. Ultrasonics was supplemented by the parameter of the ultrasonics intensity and the shaker by the shaking rate parameter. Selected parameters together with their tested levels (low, middle and high) are summarized in Table 1. The individual parameters for sampling using a syringe are listed on Table 2. For this sampling method the parameter of the type of fiber is omitted, because optimization was performed for each fiber separately. Sets of measurements, combining the factors and their levels are given in the Supporting Information (S1–S3 Tables).

In addition to developing a non-lethal method of sampling volatile secretions, we also attempted to obtain the largest possible amount of secretions. The following responses were chosen: the number of peaks with an area of at least 20,000 arbitrary units (a.u.) and the sum of their areas.

Table 1. Selected Parameters and Their Tested Levels for Sampling Secretion Using Ultrasonics and Shaker.

Parameter	Level		
	Low	Middle	High
irritation time (min)	1	3	5
irritation temperature (°C)	25	32.5	40
intensity of the ultrasonics (%)	30	65	100
rate of shaking (rpm)	300	750	1200
temperature of SPME sorption (°C)	25	32.5	40
SPME sampling time (min)	30	60	90

doi:10.1371/journal.pone.0168827.t001

Table 2. Selected Parameters and Their Tested Levels for Sampling Secretion Using Compression in the Plunger of a Syringe.

Parameter	Level		
	Low	Middle	High
temperature prior to compression (°C)	25	32.5	40
tempering time prior to compression (min)	1	3	5
temperature of SPME sorption (°C)	25	32.5	40
time of SPME sorption (min)	30	60	90

doi:10.1371/journal.pone.0168827.t002

Optimization procedure

The secretion sampling method was optimized and Tables 3 and 4 provide the obtained optimum parameters.

It can be seen from Table 3 that, on the basis of the required responses (maximum number of peaks, maximum sum of the areas of all the peaks), the DVB/CAR/PDMS fiber seemed to be the best of the fibers studied. Irritation by ultrasonics was more effective than irritation in a shaker, because it generated a greater number of peaks and maximum sum of the areas of all the peaks. When the secretion was sampled using compression of the bugs by the plunger of a syringe (see Table 4), polar (PA) and nonpolar (PDMS) fibers exhibited much lower responses and again unambiguously the best results were obtained with DVB/CAR/PDMS fibers. The advantageousness of irritation by ultrasonics and compression by the plunger can be seen from comparison of the required responses obtained in all the tested systems. Irritation by ultrasonics generates a smaller number of peaks than compression with a plunger, but the

Table 3. Optimum Conditions for the Method of Sampling Secretions Using Ultrasonics and a Shaker.

Parameter	Ultrasonics	Shaker
type of fiber	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
irritation time (min)	1	5
irritation temperature (°C)	25	25
temperature of SPME sorption (°C)	40	40
SPME sampling time (min)	90	30
intensity of the ultrasonics (%)	100	–
rate of shaking (rpm)	–	300
number of peaks	23	15
sum of absolute peaks areas	49 660 000	13 770 000

doi:10.1371/journal.pone.0168827.t003

Table 4. Optimum Conditions for the Method of Sampling Secretions Using Compression in the Plunger of a Syringe.

type of fiber	PDMS	PA	DVB/CAR/PDMS
temperature prior to compression (°C)	25	40	40
tempering time prior to compression (min)	1	5	1
temperature of SPME sorption (°C)	25	40	40
time of SPME sorption (min)	30	90	90
number of peaks	10	8	59
sum of absolute peaks areas	1 092 000	7 079 000	35 620 000

doi:10.1371/journal.pone.0168827.t004

overall response is somewhat higher than when using a plunger. The sampling method employing compression with the plunger of a syringe combined with DVB/CAR/PDMS was chosen as the most advantageous, generating the greatest number of peaks and probably simulating best the real danger to the bug when being seized by a large insectivorous predator, and when releasing its full set of antipredatory chemicals.

For the responses “maximum number of peaks” and “maximum sum of their areas” the coefficients of determination (R^2) were 0.9710 and 0.8720, respectively. These results indicate very good agreement (97.1 and 87.2% of explained variability) between the experimental data and the built up model. Examples of two response surfaces of plots for this sampling method are given in Fig 1, depicting the interrelationships of selected parameters with the response. It can be seen from the two graphs that increasing time of SPME sorption are accompanied by

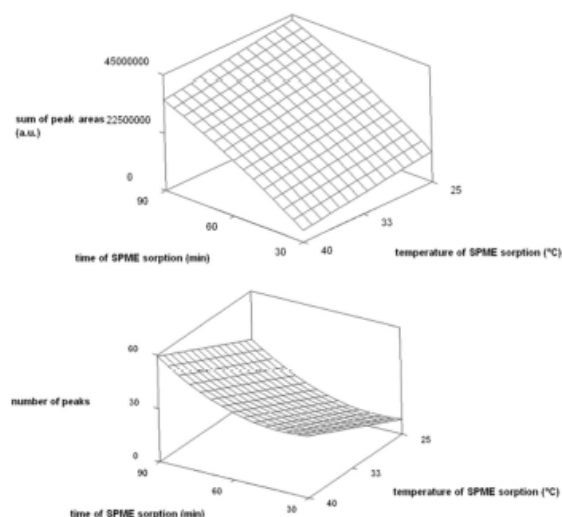


Fig 1. The response surface plot. The plot depicts the dependence of the sum of all the peaks (upper) (a.u., arbitrary units) and the number of peaks (bottom) on the temperature of SPME sorption and time of SPME sorption; irritation by compressing the true bugs with the plunger of a syringe; SPME sorption on a DVB/CAR/PDMS fiber; tempering time prior to compression 1 min; temperature prior to compression 40°C.

doi:10.1371/journal.pone.0168827.g001

an increase in the areas of all the peaks and also in their number. The increasing temperature of SPME sorption generates decreasing sum of peaks areas but increasing number of peaks which is more important for qualitative analysis.

Analysis of defensive secretions in adults of *Pyrrhocoris apterus*, *Pyrrhocoris tibialis* and *Scantius aegyptius* by GC-MS. Under the optimized conditions defensive secretions of all the three studied species were analyzed. Sampling was performed under the conditions listed in Table 4 (bold column) by sorption on a DVB/CAR/PDMS fiber after compressing the bugs with the plunger of a syringe. The actual GC analysis was performed under the conditions described in Section *Sample preparation and bug samples*. The bugs were sexed and the identical experiments were carried out separately for males and females with three individuals in each analysis. Identifications of the individual peaks obtained for males and females of all three studied species, the corresponding retention times, their standard deviations and relative peak areas ($n = 3$) are summarized in Table 5, and only peaks with response (A) greater than 20,000 a.u. and similarity (match factor in NIST 08 database) higher than 85% were selected for the identification and following normalization.

We can scrutinize the similarities and differences among species from the viewpoints of two major hypotheses: (a) *Pyrrhocoris apterus* and *P. tibialis* should be more similar to each other (at least in critical traits) than any of them to *Scantius aegyptius* since they are more closely related as indicated by their generic classification (*Pyrrhocoris* x *Scantius*), (b) *P. apterus* and *S. aegyptius* should be more similar since they are Müllerian (or quasi-Batesian; the term referring to mimetic relations between unequally defended species [56–58]) mimics sharing the same conspicuous aposematic coloration and occurring together at the same localities, habitats and host plants.

It can be seen in Table 5 that 24 compounds (24 in males, 24 in females) were identified in the defensive secretions of *Pyrrhocoris apterus*, namely 6 hydrocarbons (mainly dodecane, tridecane and pentadecane), 3 alcohols, 7 aldehydes (especially (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2,4-hexadienal, nonanal, (*E*)-2-octenal and decanal), 5 esters (mainly methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoate) and 3 organic acids and in addition 1-methoxyoctane. With the exception of 2-ethylhexanoic acid and 2-propyl-1-pentanol these compounds were found in the both sexes. In comparison with the results obtained by Farine et al. [20] the profiles of the main compounds were similar and 10 from 35 compounds found by Farine matched (especially (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-hexenal, tridecane and methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoate). The prevalent less polar or non-polar compounds identified in the secretions by Farine may correspond to using non-polar solvent (pentane) for gland extraction. Moreover, the samples extracted with pentane were concentrated under nitrogen flow and therefore, some volatile compounds could be lost.

Table 5 shows that the defensive secretions of *Pyrrhocoris tibialis* (altogether 41 compounds; 36 in males, 41 in females) were found to contain 11 hydrocarbons, 9 alcohols (mainly 1-dodecanol, (*E*)-2-hexen-1-ol and (*E*)-2-octen-1-ol), 8 aldehydes (especially (*E*)-2-octenal, nonanal and (*E*)-2-hexenal), 2 ketones and 8 esters of carboxylic acids. The secretions also contained limonene, probably derived from the seeds with which the insects were fed, and also 3-methylbutanoic acid and smaller amounts of 1-ethoxynaphthalene.

Composition of defensive secretions of *Scantius aegyptius* (altogether 38 compounds; 37 in males, 38 in females) contained 10 hydrocarbons, 10 alcohols (mainly 2-cyclohexen-1-ol, cyclopentanemethanol and 1-dodecanol), 3 aldehydes (nonanal, decanal and α -hexylcinnamaldehyde), 2 ketones and 11 esters of carboxylic acid. The secretions also contained limonene and smaller amounts of 1-ethoxynaphthalene.

Most of the compounds found in the secretions are highly volatile substances with low molecular weights and we may assume that most of them have either defensive function or act

Table 5. Retention Time, Standard Deviation of Retention Time, Relative Peak Abundance, Similarity of Mass Spectra, and Identification Method of Compounds Identified in the Defensive Secretions of Males and Females of *P. apterus*, *P. tibialis* and *S. aegyptius*.

Compound	t_{R} (min) $\pm$ SD	Relative Abundance (%) and Spectra Similarity (S)												Identification
		<i>Pyrrhocoris apterus</i>				<i>Pyrrhocoris tibialis</i>				<i>Scantius aegyptius</i>				
		Male	S	Female	S	Male	S	Female	S	Male	S	Female	S	
Hydrocarbons														
1 octan-1,3-diene	3.31 $\pm$ 0.06					0.03	87	1.91	95					B
2 3,7-dimethyl-1,6-octadiene	5.38 $\pm$ 0.03									0.25	85	0.34	85	B
3 1-decyne	8.05 $\pm$ 0.05					4.20	95	0.55	94	0.46	91	2.24	96	A, B
4 <i>p</i> -cymene	8.54 $\pm$ 0.02					0.38	87	0.21	90	0.18	89	0.59	80	A, B
5 undecane	9.16 $\pm$ 0.03	0.11	86	0.09	85	1.01	86	0.70	93	0.34	92	0.13	90	A, B
6 6-dodecene	11.79 $\pm$ 0.06					0.11	85	0.15	89					B
7 dodecane	11.86 $\pm$ 0.07	1.47	96	0.62	96	3.83	97	2.82	98	10.84	97	2.92	97	A, B
8 1-dodecene	11.97 $\pm$ 0.03					1.19	90	1.42	95	2.89	93	1.13	95	A, B
9 tridecane	14.45 $\pm$ 0.05	10.85	96	10.29	96	1.29	92	1.16	96	0.63	92	0.90	90	A, B
10 tetradecane	16.91 $\pm$ 0.02	1.54	95	0.26	94	17.72	97	6.62	97	7.62	97	9.01	95	A, B
11 pentadecane	19.52 $\pm$ 0.06	0.55	85	0.48	87	3.05	87	2.14	89	2.08	92	2.54	89	A, B
12 hexadecane	21.41 $\pm$ 0.07	0.25	90	0.26	89	4.20	96	2.50	96	1.95	94	2.42	92	A, B
Alcohols														
13 cyclopentanol	3.55 $\pm$ 0.03									0.28	87	0.14	86	A, B
14 2,3-butanediol	5.02 $\pm$ 0.06	1.72	96	4.12	93									B
15 (<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	5.59 $\pm$ 0.03							15.06	96					A, B
16 cyclopentanemethanol	6.42 $\pm$ 0.05									11.42	96	12.96	94	A, B
17 2-cyclohexen-1-ol	6.88 $\pm$ 0.05									12.07	85	18.85	88	A, B
18 2-propyl-1-pentanol	9.70 $\pm$ 0.02			3.46	86									B
19 (<i>E</i>)-2-octen-1-ol	11.16 $\pm$ 0.06							9.65	96					A, B
20 2,6-dimethyl-7-octen-2-ol	11.60 $\pm$ 0.08					1.67	93	1.17	94	1.75	95	0.62	89	B
21 2-methoxyphenol	13.52 $\pm$ 0.05											1.25	85	B
22 isotridecanol	15.42 $\pm$ 0.07									1.47	88	1.64	89	B
23 2-isopropyl-5-methyl-1-heptanol	15.61 $\pm$ 0.05					2.47	88	1.38	88					B
24 2-methyl-1-undecanol	20.22 $\pm$ 0.05					0.18	75	0.14	86					B
25 3,7,11-trimethyl-1-dodecanol	20.74 $\pm$ 0.04									1.23	87	0.50	85	B
26 1-dodecanol	21.10 $\pm$ 0.02	0.14	93	0.10	91	9.48	98	7.52	98	9.21	97	10.01	96	A, B
27 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	21.22 $\pm$ 0.06					2.81	85	1.10	87	1.58	86	1.87	85	B
28 2-ethyl-1-dodecanol	22.27 $\pm$ 0.04					0.30	86	0.06	90					B
29 1-tridecanol	22.99 $\pm$ 0.04					1.08	90	0.79	95	0.81	94	0.95	90	A, B
Aldehydes														
30 (<i>Z</i>)-3-hexenal	5.23 $\pm$ 0.09	0.37	85	0.52	85									B
31 hexanal	5.56 $\pm$ 0.05	0.09	88	0.09	90	0.17	89	0.53	86					B
32 (<i>E</i>)-2-hexenal	8.17 $\pm$ 0.04	18.52	97	23.81	97	0.38	86	3.28	96					A, B
33 (<i>E,E</i>)-2,4-hexadienal	10.11 $\pm$ 0.07	1.07	87	0.43	85			0.12	88					A, B
34 nonanal	13.96 $\pm$ 0.06	6.20	97	1.83	97	0.92	91	1.01	92	0.49	90	0.78	96	A, B
35 (<i>E</i>)-2-octenal	14.06 $\pm$ 0.06	1.55	87	2.56	85	0.64	86	2.95	95					A, B
36 decanal	16.57 $\pm$ 0.05	1.64	95	1.05	98	0.68	89	0.53	89	0.74	91	1.21	90	A, B
37 tetradecanal	21.36 $\pm$ 0.08							0.38	88					B
38 α -hexylcinnamaldehyde	25.55 $\pm$ 0.03					0.98	87	0.69	92	1.12	94	0.66	92	A, B
Ketones														
39 Cyclopentanone	6.27 $\pm$ 0.05									3.77	97	0.34	85	A, B
40 2-methyl-2-cyclopenten-1-one	8.48 $\pm$ 0.06									1.22	85	2.36	85	B

(Continued)

Table 5. (Continued)

	Compound	t_{ret} (min) $\pm$ SD	Relative Abundance (%) and Spectra Similarity (S)												Identification
			<i>Pyrrhocoris apterus</i>				<i>Pyrrhocoris tibialis</i>				<i>Scantius aegyptius</i>				
			Male	S	Female	S	Male	S	Female	S	Male	S	Female	S	
41	2-ethylcyclohexanone	18.55 $\pm$ 0.06					0.62	89	0.36	81					B
42	1-(4-tert-butylphenyl)propan-2-one	23.13 $\pm$ 0.04					0.54	89	0.15	86					B
Esters															
43	1-butanol-3-methyl acetate	7.18 $\pm$ 0.06									0.55	91	0.40	89	B
44	2-buten-1-ol-3-methyl acetate	8.19 $\pm$ 0.03									0.28	85	0.23	88	B
45	hexyl acetate	10.12 $\pm$ 0.05									0.44	91	1.32	90	A, B
46	methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoate	10.25 $\pm$ 0.06	14.01	87	4.60	87									B
47	(E)-2-hexen-1-ol acetate	10.79 $\pm$ 0.07							0.47	94	0.63	95	0.87	94	B
48	acetic acid, undec-2-enyl ester	15.92 $\pm$ 0.05									1.19	88	0.62	89	B
49	octyl acetate	16.14 $\pm$ 0.04									0.75	91	0.37	90	A, B
50	4-tert-butylcyclohexyl acetate *	18.64 $\pm$ 0.02					3.91	90	3.24	90	4.37	91	3.90	92	A, B
51	4-tert-butylcyclohexyl acetate *	19.65 $\pm$ 0.06					0.72	88	0.46	87	0.18	85	0.58	86	A, B
52	allyl cyclohexane propionate	20.93 $\pm$ 0.06					1.25	88	1.68	87	1.32	86	0.79	87	A, B
53	indan-1,3-diol monoacetate	21.59 $\pm$ 0.03					2.23	89	1.38	89					B
54	verdyl acetate	21.64 $\pm$ 0.07					1.28	86	1.01	87					B
55	phenylethyl isovalerate	22.84 $\pm$ 0.06	0.53	95	0.05	90									B
56	isopropyl laurate	23.89 $\pm$ 0.06	0.21	87	0.33	85									B
57	dodecyl acetate	23.95 $\pm$ 0.04					0.64	85	0.41	91	0.38	91	0.35	90	A, B
58	hexyl salicylate	24.87 $\pm$ 0.05					0.27	87	0.39	92	0.05	94	0.25	92	A, B
59	methyl dihydrojasmonate	25.59 $\pm$ 0.06	0.23	86	2.22	85									B
60	2-ethylhexyl salicylate	25.68 $\pm$ 0.05	0.21	89	2.51	88									B
Others															
61	3-methylbutanoic acid	6.40 $\pm$ 0.03	0.91	91	0.15	94	1.70	96	1.81	97					B
62	limonene	7.65 $\pm$ 0.07					7.38	93	5.09	93	3.93	93	3.67	91	A, B
63	(E)-2-hexenoic acid	11.62 $\pm$ 0.07	0.11	86	0.15	92									B
64	2-ethylhexanoic acid	13.28 $\pm$ 0.04	1.20	86											B
65	1-ethoxynaphtalene	23.27 $\pm$ 0.06					0.83	85	0.47	88	0.35	90	0.45	92	B
66	1-methoxyoctane	25.30 $\pm$ 0.06	1.08	85	4.13	88									B

* E or Z isomer

t_{ret} is the retention time of the relevant substance, SD standard deviation ($n = 3$), relative abundances (% areas of the relevant peaks) as a result of chromatogram internal normalization. The methods used for the identification: A—retention time and mass spectrum of the relevant substance was compared with the reference compound; B—the mass spectrum of the relevant substance was compared with NIST 2008 mass spectra library; S—similarity of the compound spectrum with the spectrum in the NIST 2008 database

doi:10.1371/journal.pone.0168827.t005

as intraspecific chemical signals. Saturated short-chain aldehydes are very effective chemical irritants, hydrocarbons can facilitate penetration of reactive aldehydes through the cuticle of arthropod predators and some esters can also assist in wetting the cuticle of arthropod predators [20]. The secretions of all the studied species also contained a large number of minority branched hydrocarbons (especially methylated) which were not included in Table 5 because the determination of methyl group position is difficult without reference standards.

Defensive secretions of *S. aegyptius* and *P. tibiaialis* match in 24 compounds, whereas defensive secretions of *P. apterus* and *S. aegyptius* match in 9, and *P. apterus* and *P. tibiaialis* in 14 compounds (all unisexual occurrences counted as presence in a species). A cluster tree based

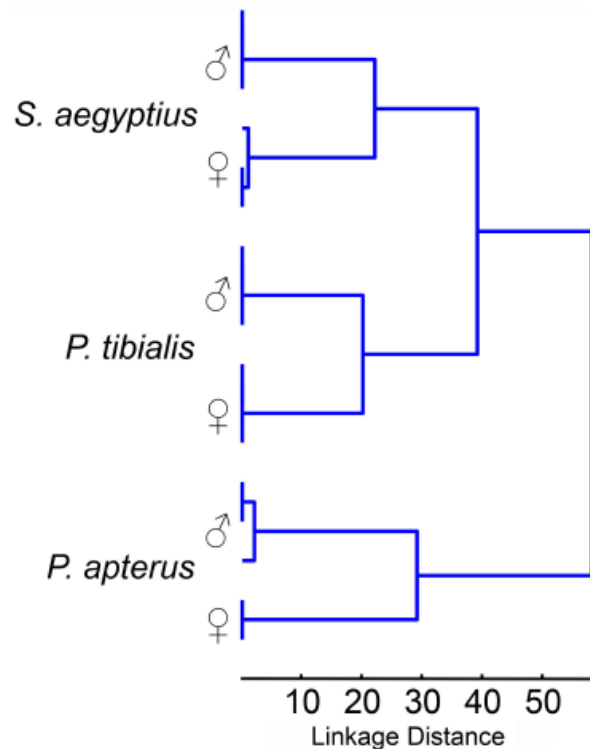


Fig 2. Dendrogram depicting the qualitative similarities in chemical profiles among the analysed samples. The clustering was based on distance matrix, in which the distance between each pair of samples was expressed as a number of compounds exclusively present in one of the samples and absent in the other. All 135 detected compounds were considered, single linkage clustering algorithm was used for tree construction (for details, see Section *Comparison of secretions between true-bug species*).

doi:10.1371/journal.pone.0168827.g002

on qualitative phenetic similarities of the chemical profiles of individual pyrrhocorid species (with sexes considered as separate entities) is shown in Fig 2.

It seems that interspecific differences and similarities reflect neither phylogenetic relationships between the species nor mimicry in colour pattern between *P. apterus* and *S. aegyptius*. The absence of several compounds in *P. apterus* may reflect its gregarious life style not requiring long-distance intraspecific communication. Some of the similarities and differences may also result from different natural host plants whose seeds were used for feeding the cultured populations.

In the present samples we find several patterns of shared similarity of chemicals. Those present in all the three species are probably conservative plesiomorphic characters of the clade containing genera *Pyrrhocoris* (with *P. apterus* and *P. tibialis*) and *Scantius* (with *S. aegyptius*).

Their number is high in hydrocarbons (6 compounds out of 12), but very low in alcohols (1 out of 17), aldehydes (2 out of 9) and nil in esters (0 out of 18), ketons (0 out of 4) and "others" (0 out of 6). This suggests that occurrence of the individual compound of alcohols, aldehydes and esters is mostly species-specific, while the few common ones of these groups (1-dodecanol, nonanal and decanal) are probably essential for functioning of the whole system.

The shared presence of a compound in two species is complementary to absence of this particular compound (or its replacement or transformation) in the third species. This happened in 3 hydrocarbons, 3 alcohols and 6 esters shared by *P. tibialis* and *S. aegyptius*, and 4 aldehydes shared by *P. apterus* and *P. tibialis*. Strangely, no compounds are shared exclusively by *P. apterus* and *S. aegyptius*. Of the complementary absences, there are 3 hydrocarbons, 3 alcohols and 6 esters missing in *P. apterus*, 4 aldehydes in *S. aegyptius*, but no unique absence was found in *P. tibialis*.

The secretion of the two *Pyrrhocoris* species contained greater number of aldehydes than the secretion of *Scantius aegyptius* (Table 5, 6–8 versus 3). Since the aldehydes are known to have antipredatory defensive function [6, 59, 60], this difference corresponds with the difference in palatability of *P. apterus* and *S. aegyptius* for avian predators (A. Exnerova et al., unpublished), where *S. aegyptius* appears to be considerably less well defended of the two species and may be a quasi-Batesian mimic of *P. apterus*. Moreover, most of the aldehydes are shared by both *Pyrrhocoris* species, with (*E*)-2-hexenal being dominant. Thus the composition of aldehydes appears rather to follow the phylogenetic relationships between the species than be a result of mimetic convergence.

The composition of hydrocarbons was mostly similar in all the three species, with only some of them missing in *P. apterus*, which is likely to represent a derived situation, convergence between two non-congeneric species (*P. tibialis* and *S. aegyptius*) is less likely. In all the three species, one of the dominant hydrocarbons is tridecane, known for its antipredatory function against arthropod predators, where it facilitates penetration of aldehydes through the cuticle [61].

Interspecific differences in the composition of alcohols and esters are difficult to interpret, because of their less known and possibly multiple and context-dependent functions [6, 60, 62]. High proportion of both alcohols and esters is species-specific, which indicates their interspecific signaling function [60, 62–64]. The strikingly smaller number of different alcohols and esters in *P. apterus* may be connected with its gregarious lifestyle with smaller need for long-distance chemical communication.

Limonene, which is like other terpenoids obtained by the bugs from their host plants, was present only in *S. aegyptius* and *P. tibialis*. Its absence in *P. apterus* may indicate its unavailability in linden seeds in contrast to those of *Alcea* and *Hibiscus*. Along with other terpenoids, limonene plays role in a chemical defense of the bugs, as it serves as an ant alarm pheromone [65].

Chromatograms obtained for the secretions produced by the males and females of all the studied true bugs are given in Fig 3.

The chromatograms obtained for male and female of the individual species differ slightly. Whereas three dominant peaks corresponding to tridecane (9), (*E*)-2-hexenal (32) and methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoate (46) are present in the male, as well as in the female chromatograms of *P. apterus*, 2-propyl-1-pentanol (18) is only found in females. The chromatogram of *P. tibialis* female is enriched by five additional compounds, especially by (*E*)-2-hexen-1-ol (15) and (*E*)-2-octen-1-ol (19), whereas male and female chromatograms of *S. aegyptius* differ especially in the relative abundance of dodecane (7), 2-cyclohexen-1-ol (17) and cyclopentanone (39). Generally, the secretions of females of all the three species contained larger number of alcohols than the secretion of conspecific males (Table 5). This may suggest the

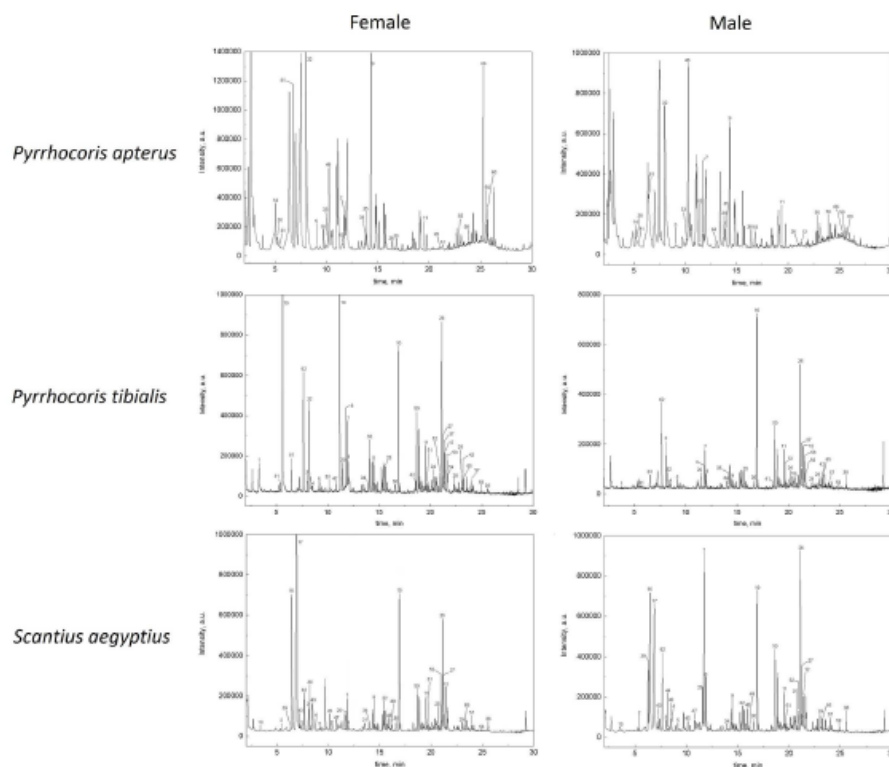


Fig 3. SPME-GC-MS analysis of the all studied true bugs. Sampling the secretion by compression with the plunger of a syringe; SPME sorption on a DVB/CAR/PDMS fiber; details of the sampling conditions given in [Table 4](#); numbering of the peaks corresponds to [Table 5](#).

doi:10.1371/journal.pone.0168827.g003

epigamic pheromonal function of the particular alcohols [62]. On the other hand, there was minimum of sexual dimorphism in composition of aldehydes, supporting their interspecific function in an antipredatory defense [6, 59, 60], and in composition of esters, which were reported as non-epigamic intraspecific attractants and alarm pheromones [60, 63, 64].

In no true bug species the exact function of numerous infochemicals of the secretion is known—in antipredatory context it can range from signaling to irritation up to being lethally toxic [66]. In addition to metathoracic glands representing the major source of defense infochemicals in adults, also other specialized glands and sequestered noxious plant compounds may play role in defense [7, 59]. It should be born in mind that also non-defensive infochemicals may be detected in the adults of true bugs (e.g. pheromones produced in dorsoabdominal glands persisting in adults from larval stage though with an altered function and no more secreting defense substances). We should emphasize that a similar extraction “in vivo” as

having been used presently is also applicable to other arthropods (e.g., spiders, millipedes, a variety of insects in addition to true bugs), and may be used for all kinds of a rich array of exo-crinous, supra-integumentally released, and often extremely complex defensive secretions.

Conclusions

A set of non-lethal methods has been developed for SPME sampling of the volatile secretions of three species of true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae) as a part of their defensive mechanisms. Particular attention was paid to optimization of the input parameters, including the means of irritation, and the optimization was performed using multi-parameter response surface methodology. On the basis of the required information (maximum number of peaks, maximum sum of all the peaks), the best method seemed to be irritation of the bugs by compression with the plunger of a syringe and use of a composite DVB/CAR/PDMS fiber for SPME sampling. This method also simulates best the natural attack by a vertebrate predator. GC separation was performed using a column Rtx-200 with fluorinated stationary phase providing good selectivity even for substances with very different polarity scales.

The developed method was used for sampling of volatile defensive secretions of adult males and females of *Pyrrhocoris apterus*, *P. tibialis* and *Scantius aegyptius* (all Pyrrhocoridae). The method applied has the advantage that only several individuals of each sex are sufficient for the analysis and thus even rare and not easily available species can be analyzed. Moreover, the method is non-lethal for the insects, which may be later potentially used in further studies requiring live individuals. The outlined methods can be widely used in similar studies on other insects although the optimization procedure and fiber evaluation would be necessary to perform for any new species studied owing to large variation of chemicals potentially involved.

The chemical composition of secretion, particularly that of alcohols, aldehydes and esters, is species-specific in all the three pyrrhocorid species studied. The overall similarities in composition of secretion do not reflect the relationship of species or mimicry between *Pyrrhocoris apterus* and *Scantius aegyptius*. The similarity of secretions between the bug species is associated with their antipredatory strategies. For instance the small number of alcohols and esters in *Pyrrhocoris apterus* is probably associated with its high gregariousness while low numbers of aldehydes in *Scantius aegyptius* reflects its higher palatability. The sexual dimorphism in occurrence of particular compounds is largely limited to alcohols and suggests their epigamic intra-specific function.

Supporting Information

S1 Table. Ultrasonics. Experimental parameters, their levels and modeling experimental plan of the face centered central composite design for sampling secretion using ultrasonics. (DOCX)

S2 Table. Shaker. Experimental parameters, their levels and modeling experimental plan of the face centered central composite design for sampling secretion using shaker. (DOCX)

S3 Table. Compression in the Plunger of a Syringe. Experimental parameters, their levels and modeling experimental plan of the face centered central composite design for sampling secretion using compression with the plunger of a syringe. (DOCX)

Acknowledgments

We are thankful to Robert Hanus for his help with preparing the schematic model for duster tree.

Author Contributions

Conceptualization: ZB RC AE PS.

Data curation: JK MH MS.

Formal analysis: MB RC.

Funding acquisition: AE MH.

Investigation: ZB RC.

Methodology: JK MB.

Project administration: ZB PS.

Resources: JK MH MS AE PS.

Software: MB MS.

Supervision: ZB PS.

Visualization: JK MH MB.

Writing – original draft: ZB JK PS AE.

Writing – review & editing: ZB JK AE PS.

References

1. Vet LEM. From chemical to population ecology: infochemical use in an evolutionary context. *J Chem Ecol.* 1999; 25(1):31–49.
2. Roper TJ, Marples NM. Odour and colour as cues for taste-avoidance learning in domestic chicks. *Anim Behav.* 1997; 53(6):1241–50. PMID: [9236020](#)
3. Skelhorn J, Rowe C. Birds learn to use distastefulness as a signal of toxicity. *Proc R Soc Lond [Biol].* 2010; 277(1688):1729–34.
4. Rowe C, Halpin C. Why are warning displays multimodal? *Behav Ecol Sociobiol.* 2013; 67(9):1425–39.
5. Henry TJ. Biodiversity of Heteroptera. In: Footitt R, Adler PH editor. *Insect Biodiversity: Wiley-Blackwell*; 2007. p. 223–63.
6. Aldrich Jr. Chemical Ecology of the Heteroptera. *Ann Rev Entomol.* 1988; 33(1):211–38.
7. Soudder GGE, Duffey SS. Cardiac glycosides in the Lygaeinae (Hemiptera: Lygaeidae). *Can J Zool.* 1972; 50(1):35–42.
8. Staddon JE. Operant behavior as adaptation to constraint. *J Exp Psychol Gen.* 1979; 108(1):48–67.
9. Kozlík P, Kraljčík J, Kalíková K, Tesařová E, Čabala R, Exnerová A, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two *Graephosoma* species (Insecta: Heteroptera). *J Chromatogr B.* 2013; 930(0):82–9.
10. Kraljčík J, Kozlík P, Exnerová A, Štys P, Bursová M, Čabala R, et al. Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera. *J Chromatogr A.* 2014; 1336(0):94–100.
11. Ho HY, Millar JG. Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zool Stud.* 2001; 40(3):193–8.
12. Pavis C, Malosse C, Ducrot PH, Descoins C. Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Chemistry of secretions of five instars and

- role of (E)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. *J Chem Ecol.* 1994; 20(9):2213–27. doi: [10.1007/BF02033198](https://doi.org/10.1007/BF02033198) PMID: [24242802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24242802/)
13. Krall BS, Bartelt RJ, Lewis CJ, Whitman DW. Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*. *J Chem Ecol.* 1999; 25(11):2477–94.
 14. Moraes MCB, Pareja M, Laumann RA, Borges M. The Chemical Volatiles (Semiochemicals) Produced by Neotropical Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol.* 2008; 37(5):489–505. PMID: [19061033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19061033/)
 15. Hotová Svádová K, Exnerová A, Kopečková M, Štys P. How Do Predators Learn to Recognize a Mimetic Complex: Experiments with Naive Great Tits and Aposematic Heteroptera. *Ethology.* 2013; 119(10):814–30.
 16. Farine JP, Bonnard O, Brossut R, Le Quere JL. Chemistry of pheromonal and defensive secretions in the nymphs and the adults of *Dysdercus cingulatus* Fabr. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J Chem Ecol.* 1992; 18(1):65–76. doi: [10.1007/BF00997165](https://doi.org/10.1007/BF00997165) PMID: [24254633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24254633/)
 17. Gunawardena NE. Seasonal changes in the chemical composition of the defensive secretion of the rice pest *Leptocoris oratorius* (Hemiptera: Coreidae). *J Nat Sci Coun Sri Lanka.* 1994; 22(3):239–43.
 18. Schuh RT, Slater JA. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history: Cornell University Press; 1995.
 19. Hotová Svádová K, Exnerová A, Štys P. Gregariousness as a defence strategy of moderately defended prey: experiments with and avian predators. *Behaviour.* 2014; 151(11):1617–40.
 20. Farine JP, Bonnard O, Brossut R, Le Quere JL. Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J Chem Ecol.* 1992; 18(10):1673–82. doi: [10.1007/BF02751094](https://doi.org/10.1007/BF02751094) PMID: [24254711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24254711/)
 21. Nagnan P, Cassier P, Andre M, Llosa JF, Guillaumin D. Fine structure and physicochemical analysis of the metathoracic scent glands of *Lincolnia malevolus* (Rolston) and *L. spurcus* (Rolston) (Heteroptera: Pentatomidae). *Int J Insect Morphol Embryol.* 1994; 23(4):355–70.
 22. Zarbin PHG, Borges M, Dos Santos AA, De Oliveira ARM, Simonelli F, Marques FDA. Alarm Pheromone System of Stink Bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *J Braz Chem Soc.* 2000; 11(4):424–8.
 23. Zhang Q-H, Aldrich JR. Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. *Naturwissenschaften.* 2003; 90(11):505–8. doi: [10.1007/s00114-003-0466-8](https://doi.org/10.1007/s00114-003-0466-8) PMID: [14610647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14610647/)
 24. Kalinova B, Jiros P, Zdárek J, Wen X, Hoskovec M. GC×GC/TOF MS technique-A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta.* 2006; 69(3):542–7. doi: [10.1016/j.talanta.2005.10.045](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.045) PMID: [18970602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18970602/)
 25. Pareja M, Borges M, Laumann RA, Moraes MCB. Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol.* 2007; 53(7):639–48. doi: [10.1016/j.jinsphys.2007.04.004](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.04.004) PMID: [17574569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17574569/)
 26. Durak D, Kalender Y. Fine structure and chemical analysis of the metathoracic scent gland secretion in *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera, Pentatomidae). *C R Biol.* 2009; 332(1):34–42. doi: [10.1016/j.crevi.2008.10.004](https://doi.org/10.1016/j.crevi.2008.10.004) PMID: [19200924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19200924/)
 27. Yang CY, Kim J, Ahn S-J, Kim D-H, Cho MR. Identification of the Female-Produced Sex Pheromone of the Plant Bug *Apolygus spinolae*. *J Chem Ecol.* 2014; 40(3):244–9. doi: [10.1007/s10886-014-0407-3](https://doi.org/10.1007/s10886-014-0407-3) PMID: [24647725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24647725/)
 28. Aldrich JR, Zancunio JC, Vilela EF, Torres JB, Cave RD. Field tests of predaceous pentatomid pheromones and semiochemistry of *Podisus* and *Supputius* species (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *An Soc Entomol Bras.* 1997; 26(1):1–14.
 29. Aldrich JR, Numata H, Borges M, Bin F, Waite GK, Lusby WR. Artifacts and pheromone blends from *Nezara* spp. and other stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Z Naturforsch C: Biosci.* 1993; 48(1–2):73–9.
 30. Favaro CF, Santos TB, Zarbin PH. Defensive compounds and male-produced sex pheromone of the stink bug, *Agroecus griseus*. *J Chem Ecol.* 2012; 38(9):1124–32. Epub 2012/08/24. doi: [10.1007/s10886-012-0172-0](https://doi.org/10.1007/s10886-012-0172-0) PMID: [22914958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22914958/)
 31. Stránský K, Václavík I, Ubík K, Čejka J, Křeček J. Volatiles from Stink Bug, *Graphosoma lineatum* (L.), and from Green Shield Bug, *Palomena prasina* (L.), (Heteroptera: Pentatomidae). *J High Res Chrom.* 1998; 21(8):475–6.
 32. Miklas N, Lasnier T, Renou M. Male Bugs Modulate Pheromone Emission in Response to Vibratory Signals from Conspecifics. *J Chem Ecol.* 2003; 29(3):561–74. PMID: [12757319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12757319/)
 33. Takita M, Sugie H, Tabata J, Ishii S, Hiradate S. Isolation and estimation of the aggregation pheromone from *Eysarcoris lewisi* (Distant) (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool.* 2008; 43(1):11–7.

34. Fountain M, Jästad G, Hall D, Douglas P, Farman D, Cross J. Further Studies on Sex Pheromones of Female Lygus and Related Bugs: Development of Effective Lures and Investigation of Species-Specificity. *J Chem Ecol*. 2014; 40(1):71–83. doi: [10.1007/s10886-013-0375-z](https://doi.org/10.1007/s10886-013-0375-z) PMID: [24390623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390623/)
35. Ho H-Y, Kou R, Tseng H-K. Semiochemicals from the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata* (Wolff): Components of metathoracic gland, dorsal abdominal gland, and sternal gland secretions. *J Chem Ecol*. 2003; 29(9):2101–14. PMID: [14584678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14584678/)
36. Djozan D, Baheri T, Farshbaf R, Azhari S. Investigation of solid-phase microextraction efficiency using pencil lead fiber for in vitro and in vivo sampling of defensive volatiles from insects' scent gland. *Anal Chim Acta*. 2005; 554(1–2):197–201.
37. Byers JA. Production and Predator-Induced Release of Volatile Chemicals by the Plant Bug *Lygus hesperus*. *J Chem Ecol*. 2006; 32(10):2205–18. doi: [10.1007/s10886-006-9140-x](https://doi.org/10.1007/s10886-006-9140-x) PMID: [17001534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17001534/)
38. Cheng L, Roussis V. Sex attractant in the marine insect *Trochopus plumbeus* (Heteroptera: Veliidae). A preliminary report. *Mar Ecol Prog Ser*. 1998; 170:283–6.
39. Drijfhout F, Van Beek T, Visser JH, De Groot A. On-line Thermal Desorption–Gas Chromatography of Intact Insects for Pheromone Analysis. *J Chem Ecol*. 2000; 26(6):1383–92.
40. Griepink F, Drijfhout F, Van Beek T, Visser JH, De Groot A. Analysis of Sex Pheromone Gland Content of Individual *Symmetrischema tangolias* by Means of Direct Gland Introduction into a Two-dimensional Gas Chromatograph. *J Chem Ecol*. 2000; 26(4):1013–23.
41. Williams L III, Evans PE, Bowers WS. Defensive chemistry of an aposematic bug, *Pachycoris stallii* Uhler and volatile compounds of its host plant *Ocrotus californicus* Muell.-Arg. *J Chem Ecol*. 2001; 27(2):203–16. PMID: [14768810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14768810/)
42. Aldrich JR, Blum MS, Fales HM. Species-specific natural products of adult male leaf-footed bugs (Hemiptera: Coreidae). *J Chem Ecol*. 1979; 5(1):53–62.
43. Gough AJE, Hamilton JGC, Games DE, Staddon BW. Multichemical defense of plant bug *Hottel gam-biae* (Westwood) (Heteroptera: Scutelleridae). *J Chem Ecol*. 1985; 11(3):343–52. doi: [10.1007/BF01411421](https://doi.org/10.1007/BF01411421) PMID: [24309966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24309966/)
44. Gunawardena NE, Herath HMWKB. Trans-2-hexenal/N-tridecane combination: a natural fumigant of the defensive secretion of *Coridius janus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Natl Sci Coun Sri Lanka*. 1992; 20(2):209–20.
45. Prudic KL, Noge K, Becerra JX. Adults and Nymphs Do Not Smell the Same: The Different Defensive Compounds of the Giant Mesquite Bug (*Thasus neocalifornicus*: Coreidae). *J Chem Ecol*. 2008; 34(6):734–41. doi: [10.1007/s10886-008-9480-9](https://doi.org/10.1007/s10886-008-9480-9) PMID: [18496737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18496737/)
46. Eliyahu D, Ceballos RA, Saeidi V, Becerra JX. Synergy versus potency in the defensive secretions from nymphs of two Pentatomomorphan families (Hemiptera: Coreidae and Pentatomidae). *J Chem Ecol*. 2012; 38(11):1358–65. doi: [10.1007/s10886-012-0200-0](https://doi.org/10.1007/s10886-012-0200-0) PMID: [23080436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23080436/)
47. Jacobs DH, Apps PJ, Viljoen HW. The composition of the defensive secretions of *Thaumastella namaquensis* and *T. elizabethae* with notes on the higher classification of the Thaumastellidae (Insecta: Heteroptera). *Comp Biochem Physiol, B: Comp Biochem*. 1989; 93B(2):459–63.
48. Evans CE, Staddon BW, Games DE, editors. Analysis of gland secretions of Pentatomidae (Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometry techniques 1990: Plenum.
49. Krall BS, Zilkowski BW, Kight SL, Bartelt RJ, Whitman DW. Chemistry and defensive efficacy of secretion of burrowing bug (*Sehirus cinctus cinctus*). *J Chem Ecol*. 1997; 23(8):1951–62.
50. Sanda M, Zacek P, Streinz L, Dracinsky M, Koutek B. Profiling and characterization of volatile secretions from the European stink bug *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) by two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2012; 881–82:69–75.
51. Myers RH, Montgomery DC. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments: Wiley; 2002.
52. Ryan TP. Modern Experimental Design: Wiley; 2006.
53. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B*. 2012; 910(0):2–13. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020).
54. Kerzhner IM. Family Pyrrhocoridae Amyot & Serville, 1843. Rieger BAC, editor. Amsterdam, Netherlands 2001. 248–58 p.
55. Socha R. Pyrrhocoris apterus (Heteroptera)—an experimental model species—a review. *Eur J Entomol*. 1993; 90(3):241–86.
56. Balogh ACV, Gamberale-Stille G, Leimar O. Learning and the mimicry spectrum: from quasi-Bates to super-Müller. *Anim Behav*. 2008; 76(5):1591–9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.07.017](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.07.017).
57. Ruxton GD, Sherratt TN, Speed M. Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry. OUP Oxford; 2004.

58. Speed MP. Warning signals, receiver psychology and predator memory. *Anim Behav.* 2000; 60(3):269–78. Epub 2000/09/29. doi: [10.1006/anbe.2000.1430](https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1430) PMID: [11007635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11007635/)
59. Remold H. Scent-Glands of Land-Bugs, their Physiology and Biological Function. *Nature.* 1963; 198(4882):764–8.
60. Blum MS. Chemical defenses of arthropods. New York & London: Academic Press; 1981.
61. Remold H. Über die biologische Bedeutung der Duftdrüsen bei den Landwanzen (Geocorisae). *Z VERGL PHYSIOL.* 1962; 45(6):636–94.
62. Schwarz JJ, Gries G. 2-Phenylethanol: context-specific aggregation or sex-attractant pheromone of *Boisea rubrolineata* (Heteroptera: Rhopalidae). *Can Entomol.* 2010; 142(05):489–500.
63. Blatt SE, Borden JH, Pierce HD Jr., Gries R, Gries G. Alarm Pheromone System of the Western Conifer Seed Bug, *Leptoglossus occidentalis*. *J Chem Ecol.* 1998; 24(6):1013–31.
64. Zhang QH, Aldrich JR. Pheromones of milkweed bugs (Heteroptera: Lygaeidae) attract wayward plant bugs: *Phytocoris mirid* sex pheromone. *J Chem Ecol.* 2003; 29(8):1835–51. Epub 2003/09/06. PMID: [12956510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12956510/)
65. Blum MS. Alarm pheromones. In: Kerkut GA, Gilbert L. I., editor. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Vol. 9. Oxford: Pergamon; 1985. p. 193–224.
66. Aldrich JR, Lusby W. R., Kochansky J. P., Hoffman M. P., Wilson L. T. and Zalom F. G.. *Lygus* bug pheromones vis-a-vis stink bugs. Brown JM, editor 1988. 213–5 p.

VI - Propagační leták k řídicí jednotce



GC x GC MODULÁTOR



ŘÍDÍCÍ MODUL PRO GCXGC APLIKACE

- Tlakově-pulsní řízení průtoku
- Odpadá potřeba kryogenního chlazení
- Modulace není závislá na bodu varu analytů
- Více parametrů pro vývoj metody GC x GC
- Vhodný pro kombinaci FID/MS

GC x GC modulátor zajišťuje tlakovým pulsem nosného plynu periodický a rychlý nástřik frakcí eluentu z první kolony na kolonu v druhé dimenzi. Základem modulátoru byl původně třífcestný ventil, který rozděloval nosný plyn do dvou větví. Tyto větve byly připojeny pomocí dvou transferline ke skladovací kapiláře. Řízením tlaku a přepínáním třífcestného ventilu bylo dosaženo modulace GC x GC.

Tento nový modulátor již neobsahuje třífcestný ventil. Místo něho jsou instalovány dva elektromagnetické uzavírací ventily, které nezávisle řídí nosný plyn v obou větvích. V kombinaci s T-kusy využívajícími technologii SilFlow™ dochází k výraznému zkvalitnění modulace.

DŮLEŽITÉ VLASTNOSTI:

- Mnohem lepší řízení tlaku v systému
- Vyšší účinnost modulace
- Široký rozsah modulačních časů

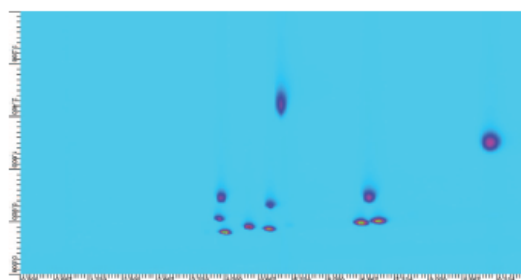
GC × GC MODULÁTOR

TECHNICKÉ PARAMETRY:

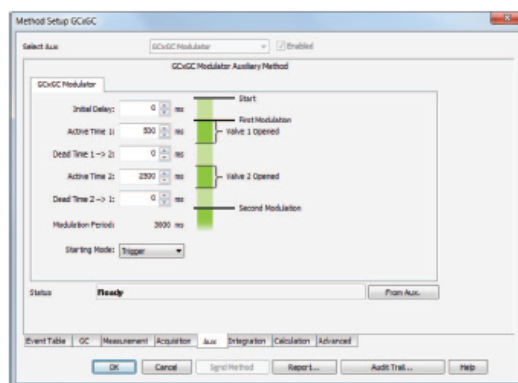
Maximální tlak nosného plynu	2,5 bar
Řízení toku nosného plynu	2 elektromagnetické ventily
Délka skladovací kapiláry	35 cm*
Délka transferline A	40 cm*
Délka transferline B	40 cm*
Připojení separačních kolon	T-kus SilFlow™
Řízení tlaku	Mechanické
Připojení nosného plynu	1/8" tube fitting
Připojení ventilů	1/8" tube fitting
Komunikace	RS232
Řídící a monitorovací SW	Clarity**
Rozměry (š × v × h)	300 × 120 × 300 mm
Hmotnost	2,92 kg

* Optimalizováno pro systém GC × GC (kolona 1. dimenze = 10 m × 0,15 mm ID, kolona 2. dimenze = 1 m × 0,25 mm ID).

** Clarity je chromatografický software společnosti DataApex.



2D chromatogram testovací směsi 11 těkavých organických rozpouštědel



Řídící modul v Clarity station.

Chromservis s.r.o., Jakobiho 327, 109 00 Praha 10 – Petrovice
 www.chromservis.eu, tel: +420 274 021 211, prodej@chromservis.eu
 Chromservis SK s.r.o., Nobelova 34, 831 02 Bratislava
 www.chromservis.eu, tel: +421 911 181 098, predaj@chromservis.eu

VII - Potvrzení o vystavovaném modulátoru



Chromservis s.r.o., Jakobiho 327, 109 00 Praha 10 – Petrovice
tel.: +420 274 021 211, fax.: +420 274 021 220
www.chromservis.cz, e-mail: prodej@chromservis.cz

Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
RNDr. Radomír Čabala
Hlavova 8
120 00 Praha 2

V Praze 14.10.2015

Potvrzujeme, že prototyp tlakového pulzního modulátoru vyrobený v rámci grantu GAUK 894513 (Nový pulzní tlakový modulátor pro komprehenzivní plynovou chromatografii – Martin Ston) byl vystaven a představen na konferenci/výstavě LaboExpo 2015 v Praze (23. - 24.9.2015) v Kongresovém centru v prezentaci a na stánku firmy Chromservis sro.

Obr. – vystavení pulzního modulátoru



S pozdravem

Mgr. Luděk Vlček
Ředitel prodeje

Mgr.
Luděk Vlček

Digitálně podepsal Mgr. Luděk Vlček
DN: c=CZ, cn=Mgr. Luděk Vlček,
st=Praha, l=Praha 4, Kloboučnická
19, 14000, o=Chromservis s.r.o.,
title=Obchodní ředitel,
serialNumber=ICA - 741296
Datum: 2015.10.14 10:09:07 +02'00'

IČ: 25086227, DIČ: CZ25086227, společnost je zapsaná v OR vedeném Městským soudem v Praze, oddíl C, vložka číslo 48475
Bankovní spojení: ČSOB Praha, CZK: 110540809/0300, EUR: 112667213/0300, USD: 126260684/0300
VAT No.: CZ25086227, Chromservis s.r.o. is registered for business operations by Městský soud in Prague, part C, item 48475
Bank account: CSOB Prague, CZK: 110540809/0300, EUR: 112667213/0300, USD: 126260684/0300