

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Natan Horáček

Popis chemické rozmanitosti polycyklických diterpenů tropických
termitů
Description of chemical diversity of polycyclic diterpenes in tropical
termites

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Zuzana Bosáková CSc.
Konzultant: Mgr. Pavlína Kyjaková, Ph.D.

Praha 2021

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: 14. 6. 2021

Abstrakt

Jednou ze společných vlastností různých zástupců společenského hmyzu je schopnost obrany jejich hnízd, která často nabývá podoby obrany chemické s pomocí sekundárních metabolitů. Strukturně nejbohatší je nesporně chemická obrana termitů, u jejichž vojáků bylo identifikováno hned několik set obranných látek. Škála těchto látek je velmi široká a sahá od lineárních β -nenasycených aldehydů přes lineární terpenoidy, cyklické monoterpeny až k polycyklickým diterpenům s různou mírou substituce kyslíkatými funkčními skupinami. Tyto polycyklické diterpeny jsou typické pro evolučně nejmladší a také nejrozšířenější podčeleď termitů, tj. Nasutitermitinae. Druhy z podčeledi Nasutitermitinae byly v minulosti chemicky velmi podrobně studovány právě kvůli nepřebornému množství nových polycyklických diterpenů, jichž je dnes popsáno přibližně 70. Přesto tato linie termitů zůstává i nadále zajímavým předmětem bádání, a to především díky několika rodům z okolí rodu *Subulitermes* (tzv. skupina *Subulitermes*), které byly v minulosti díky chabým znalostem o jejich taxonomii a díky malé velikosti těla a celých hnízd opomíjeny jak ve studiích systematických, tak z pohledu chemické diverzity jejich obranných látek.

V této práci se věnuji jihoamerickým zástupcům skupiny *Subulitermes* a snažím se využít moderní technická řešení chemické analýzy v kombinaci s genetickými nástroji, abych dosáhl několika cílů. K tomuto účelu používám primárně plynovou chromatografii s hmotnostní (MS) a infračervenou (FTIR) detekcí. Výsledky potom zpracovávám novými inforatickými metodami jako je automatické vyhodnocení pomocí MZmine 2 a tvorba molekulárních sítí.

Prvním cílem je přispět k systematickému rozřídění skupiny *Subulitermes* s pomocí chemotaxonomie obranných látek. Nepřehledná a na vyhodnocení složitá data jsem zpracoval automatickou detekcí pomocí programu Mzmine 2. Vztahy mezi detekovanými spektry jsem zobrazil pomocí molekulární sítě. Popisuji tímto způsobem 11 rozdílných chemotypů přiřazených 13 druhům definovaným pomocí genetické analýzy mitochondriální cytochromoxidázy II.

Dalším cílem bylo hledání nových, dosud nepopsaných diterpenických struktur. Na základě hmotnostních a infračervených spekter jsem identifikoval přítomné monoterpeny, seskviterpeny a pár již známých polycyklických diterpenů. Pro tento účel jsem sestavil knihovnu již popsanych

polycyklických diterpenů termitů a statisticky ji zpracoval. Dále jsem ve vzorcích identifikoval kolem 12 možných nepopsaných struktur. Čtyři látky jsem se pokusil izolovat pomocí preparativní plynové chromatografie, ale preparace narazila na vysokou teplotní nestabilitu těchto látek. Na základě knihovny hmotnostních spekter jsem popsal vztah mezi strukturou a poměrem intenzit dvou v mých spektrech výrazných fragmentů. Tento poznatek ve spojení s interpretací IR spekter jsem použil k návrhu struktury těchto dvou fragmentů a celkové struktury jedné ze studovaných látek.

Klíčová slova – polycyklické diterpeny, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, infračervená spektroskopie, obranné látky, molekulární sítě, Mzmine 2, preparativní plynová chromatografie, termity, termití vojáci, skupina *Subulitermes*

Abstract

Ability to defend their nests belongs among the characteristics shared by different groups of social insects, which is often manifested by chemical defense using various secondary metabolites. Structural richness of defensive chemicals undoubtedly reaches its maximum in termites, whose soldiers are known to produce multiple hundred different compounds. These range from linear β -unsaturated aldehydes, through linear terpenoids and cyclic monoterpenes to polycyclic diterpenes with a wide array of oxygenated modifications. These polycyclic diterpenes are characteristic of the evolutionary modern and the most diversified termite subfamily Nasutitermitinae. Diverse species of Nasutitermitinae were extensively studied in the past with respect to the fascinating diversity of new polycyclic diterpenes, with roughly 70 structures being described so far. Yet, this lineage still remains an interesting target of investigations, especially thanks to several genera belonging to *Subulitermes* group, which were largely ignored by chemical and systematical studies due to their poorly known taxonomy and the small size of their bodies and nests.

In my thesis, I focus on South-American representatives of the *Subulitermes* group, in an attempt to take advantage of modern technical solutions of chemical analytics in combination with genetic tools, to reach several goals. To do so, I primarily use gas chromatography coupled with mass spectrometry and infrared spectroscopy (FTIR). I am processing the data obtained by those methods by means of modern informatic methods, such as automatic data processing by Mzmine 2 and molecular networking.

My first goal was to contribute to the systematics of the *Subulitermes* group using chemical taxonomy of defensive compounds. I processed the complex data using Mzmine 2 program for automatic peak detection and I interpreted the relationships between the detected spectra through molecular networking. In this way, I succeeded in describing 11 different chemotypes, assigned to 13 species as defined by genetic analysis of mitochondrial cytochrome oxidase II.

Another goal was to search for new, so far undescribed diterpene structures. Based on interpretation of mass and infrared spectra I have identified monoterpenes, sesquiterpenes and several previously described polycyclic diterpenes. For this purpose, I have created and statistically processed a library of mass spectra of polycyclic diterpens from termites.

Beside this, I detected 12 compounds that are possibly new diterpene structures. I have tried to purify four of them from the complex mixture with preparative gas chromatography, but this approach failed because of their unpredicted thermal lability. Based on library of mass spectra I have described relationships between the structures of selected compounds and the ratio of relative intensities of two fragments prominent in my spectra. I used this in combination with IR spectra to propose the structure of those two fragments and the full structure of one of the candidate molecules.

Key words — Polycyclic diterpenes, gas chromatography, mass spectrometry, infrared spectroscopy, defensive compounds, molecular networking, Mzmine 2, preparative gas chromatography, termites, termite soldiers, *Subulitermes* group

Poděkování

Velké díky patří Mgr. Pavlíně Kyjakové Ph.D. a Mgr. Robertu Hanusovi Ph.D. za jejich pomoc při tvorbě této práce. Pavlíně Kyjakové pak dále děkuji za pomoc s technickým řešením práce. Robertu Hanusovi a RNDr. Janu Křivánkovi také za to, že mě vzali s sebou na expedici do Francouzské Guyany. Další velké díky patří RNDr. Lucii Bednárové CSc. a Mgr. Adéle Baptistové za pomoc s infračervenou spektroskopií a Mgr. Tomáši Pluskalovi Ph.D. za pomoc s HPLC-MS měřením. Poděkovat chci také Nicolasi Kaczmarekovi z Université Libre de Bruxelles za poskytnutá taxonomická a morfologická data. Díky samozřejmě patří všem z laboratoře Chemie Společenského Hmyzu za všestrannou pomoc.

Nakonec bych rád velmi poděkoval své vedoucí práce prof. RNDr. Zuzaně Bosákové CSc. za to, že mi umožnila jít za mými cíli.

1. Obsah

1. OBSAH	8
2. SEZNAM ZKRATEK	10
3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	12
3.1 CHEMICKÁ OBRANA TERMITŮ	12
3.1.1 <i>Struktura a biosyntéza polycyklických diterpenů</i>	14
3.1.1.1 Struktura a funkce	14
3.1.1.2 Názvosloví polycyklických diterpenů	16
3.1.1.3 Definice skupiny <i>Subulitermes</i> (<i>Subulitermes</i> group)	16
3.1.1.4 Biosyntéza polycyklických diterpenů	17
3.2 GC	18
3.2.1 <i>Chromatografické kolony</i>	18
3.2.2 <i>Injektor</i>	19
3.2.2.1 PTV injektor	21
3.2.3 <i>Detektory v GC</i>	21
3.2.3.1 GC-MS.....	22
3.2.3.1.1 Kvadrupól	24
3.2.3.1.2 TOF	25
3.2.3.2 GC-FTIR	26
3.2.4 <i>Preparativní GC</i>	26
3.3 AUTOMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	28
3.3.1 <i>Výstavba EIC a detekce píků v EIC</i>	29
3.3.1.1 Výstavba EIC	29
3.3.1.2 Detekce píků v EIC	30
3.3.2 <i>Dekonvoluce spekter</i>	30
3.3.3 <i>Alignment</i>	31
3.3.4 <i>Přístupy k automatické identifikaci látek</i>	32
4. CÍLE PRÁCE	33
5. METODY	34
5.1 SBĚR VZORKŮ.....	34
5.2 GENETICKÁ ANALÝZA	34
5.3 ANALYTICKÉ TECHNIKY	35
5.3.1 <i>Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí</i>	35
5.3.2 <i>Dvoudimenzionální plynová chromatografie s TOF detekcí</i>	35
5.3.3 <i>Plynová chromatografie s FTIR</i>	36
5.3.4 <i>Preparativní plynová chromatografie</i>	36
5.3.5 <i>HPLC – MS</i>	37
5.3.6 <i>TLC</i>	37
5.4 ZPRACOVÁNÍ DAT	37
5.4.1 <i>Excalibur 3 - manuální zpracování</i>	37
5.4.2 <i>MZmine 2 - (semi)automatická detekce</i>	38
5.4.3 <i>Chemotaxonomická analýza</i>	41
5.4.4 <i>Strukturní analýza</i>	41
5.4.5 <i>Zpracování knihovny hmotnostních spekter</i>	42
6. VÝSLEDKY	42

6.1 PŘEDBĚŽNÉ MĚŘENÍ A AUTOMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	42
6.2 DENDROGRAM.....	46
6.3 PREPARACE VYBRANÝCH LÁTEK ZE SMĚSI.....	51
6.4 KNIHOVNA HMOTNOSTNÍCH SPEKTER DITERPENŮ	54
6.5 OBECNÉ TRENDY V EI-MS FRAGMENTACI POLYCYKLICKÝCH DITERPENŮ TERMITŮ.....	57
6.5.1 <i>Fragmenty m/z 135 a 151</i>	57
6.5.2 <i>Základní fragmenty</i>	58
6.6 SESTAVENÍ MOLEKULÁRNÍ SÍTĚ.....	59
6.7 STRUKTURNÍ ANALÝZA	60
7. DISKUZE	66
8. ZÁVĚR.....	69
9. POUŽITÁ LITERATURA	70

2. Seznam zkratek

ABGM – *automatic barcode gap discovery method*

COW – *correlation optimized wrapping*

CWT – *continuous wavelet transform*

EI – elektronová ionizace

EIC – extrahovaný iontový chromatogram

FID – plamenoionizační detektor

GC – plynová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-FTIR – plynová chromatografie propojená s infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací

GLC – separace mezi plynnou a kapalnou fází

GMYC – *generalized mixed Yule-coalescent model*

GSC – separace mezi plynnou a pevnou fází

HPLC-MS/MS – vysokoúčinná chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

LC×GC – kombinovaná dvoudimenzionální kapalinová a plynová chromatografie

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

MCR – *multivariate curve resolution*

MS – hmotnostní spektrometr

PFC – preparační sběrač frakcí

PTV – injektor s programovatelnou teplotou

R+D – počet cyklů a dvojných vazeb

RI – retenční index

SCOT – kapilární kolona se stacionární fází uchycenou na porózní vrstvě

SSI – injektor s/bez děliče toku

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

tSNE – *t-distributed stochastic neighbor embedding*

TOF – analyzátor doby letu

PCA – analýza hlavních komponent

PLOT – kapilární kolona s porózní vrstvou

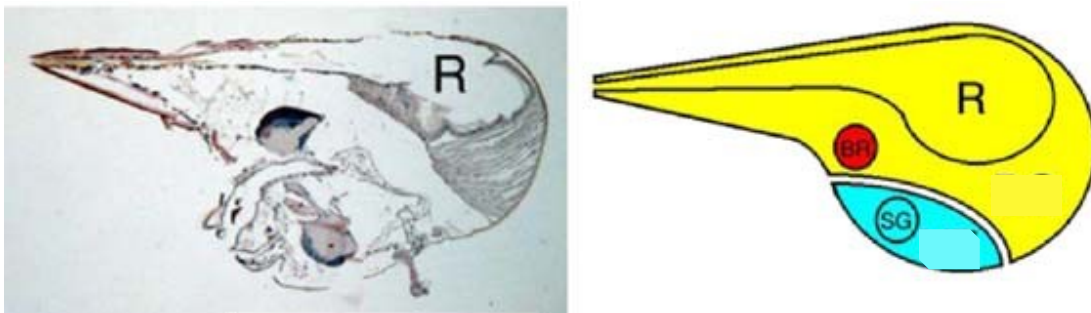
WCOT – kapilární kolona se stacionární fází nanesenou na stěně

GC×GX-TOF-MS – komprehensivní plynová chromatografie s hmotnostním detektorem doby letu

3. Úvod do problematiky

3.1 Chemická obrana termitů

Společenský hmyz tvoří obrovskou masu suchozemských organismů a je tak lákavou kořistí pro mnohé predátory. Tento selekční tlak jej donutil k řadě obranných adaptací a termity, jako nejstarší společenský hmyz, v tom nejsou výjimkou. Naopak, jejich obranné dovednosti jsou velmi rozvinuté a mimo jiné mají kastu vojáků, kteří se specializují právě na obranu kolonie. Mechanická obrana zahrnuje obranu pasivní, například výstavbu opevněného hnízda, nebo obranu aktivní, jejímž nejtypičtějším příkladem jsou pro boj specializovaná kusadla vojáků [1]. Evolučně nejstarší čeledi termitů používají primárně právě tuto mechanickou obranu, v kombinaci se specializovaným chováním, které jim umožňuje vlastním tělem, zejména hlavou, blokovat chodby jejich hnízda. Chemická obrana u těchto čeledí naopak není příliš rozvinutá. Zásadní evoluční novinkou, která umožnila rozvoj chemické obrany do její současné podoby, je vznik tzv. frontální žlázy, tedy vakovitého orgánu, který ústí na čelní straně hlavy (odtud název frontální) otvorem zvaným fontanela, jehož rezervoár však může vyplňovat významnou část hlavové dutiny, nebo dokonce zasahovat až hluboko do abdomenu vojáků (**obr. 1**). Tento jedinečný orgán se vyvinul u moderní linie termitů zvané Neoisoptera (sdružuje čeledi Stylotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae a Termitidae), a najdeme jej u okřídlených dospělců, jimž slouží k obraně před predací během svatebního letu, ale plně vyvinut je zejména u vojáků [2]. Právě frontální žlázy termitích vojáků



Obr. 1: Vlevo podélný řez hlavou vojáka druhu *Nasutitermes takasagoensis* barvený hematoxylinem. Vpravo schéma hlavy stejného vojáka. R, rezervoár frontální žlázy; BR, mozek (*brain*); SG, podjícnová zauzlina (*suboesophageal ganglion*). Podle (M. Hojo, M. Morioka, T. Matsumoto, T. Miura, Identification of soldier caste-specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (2005) 347-354).

jsou zdrojem nepřehledného bohatství obranných sekundárních metabolitů, které s postupem evoluce stále více nahrazovaly mechanickou obranu. U podčeledi Nasutitermitinae, která je druhově nejbohatší a jednou z nejpokročilejších skupin vyšších termitů (Termitidae), dochází u vojáků k úplné ztrátě kusadel, a tedy i mechanické obrany. Hlava vojáků je naopak vybavena typickým „nosem“ (odtud název celé podčeledi) (**obr. 1**), tedy kuželovitým výběžkem, na jehož špičce ústí vývod frontální žlázy a který slouží k aplikaci obranných látek na dálku jejich rozstříkáním. Není divu, že právě u této skupiny je repertoár obranných chemikálií zdaleka nejbohatší.

Složení chemického sekretu frontální žlázy vykazuje jasné evoluční trendy. Evolučně nejstarší rody termitů s frontální žlázou, patřící do čeledi Rhinotermitidae, produkují kontaktní jedy. Strukturně se většinou jedná o ketony a β -ketoaldehydy [3]. Zajímavý je druh *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae), jehož dominantní obrannou látkou je (*E*)-1-nitropentadec-1-en, který funguje jako kontaktní jed. Mechanismus účinku se odvíjí od silně elektrofilní nitroalkenové skupiny a připisuje se Michaelově adici s nukleofilním substrátem, např.: sulfhydridy, hydroxyly a amino skupinami [4]. Unikátní je také tím, že se jedná o jednu z několika málo nitrolátek identifikovaných u hmyzu, protože hmyz většinou nitrolátky syntetizovat neumí [5]. Dále byly v obranném sekretu různých druhů detekovány uhlovodíky a lineární karboxylové kyseliny [2].

Terpenoidy jako obranné látky se začínají objevovat ve formě lineárních terpenoidů, například geranylinalool u rodu *Reticulitermes* z čeledi nižších termitů Rhinotermitidae. Evolučně mladší rody vyšších termitů jako jsou *Cubitermes* a *Crenetermes* (Cubitermitinae) produkují nesubstituované monocyklické (např.: neocembren a cubiten) a bicyklické (např.: cubugen a bifloratrien) diterpeny. Druh *Cavitermes tuberosus* z podčeledi Termitinae produkuje nesubstituovaný bicyklický diterpen caviten [6]. Zástupci pokročilé podčeledi vyšších termitů Nasutitermitinae se vyznačují tvorbou substituovaných polycyklických diterpenů. Jejich charakteristická struktura a strukturní podobnost mezi jednotlivými typy uhlovodíkových skeletů vybízí k navržení jejich biosyntézy z monocyklického diterpenu neocembrenu [7].

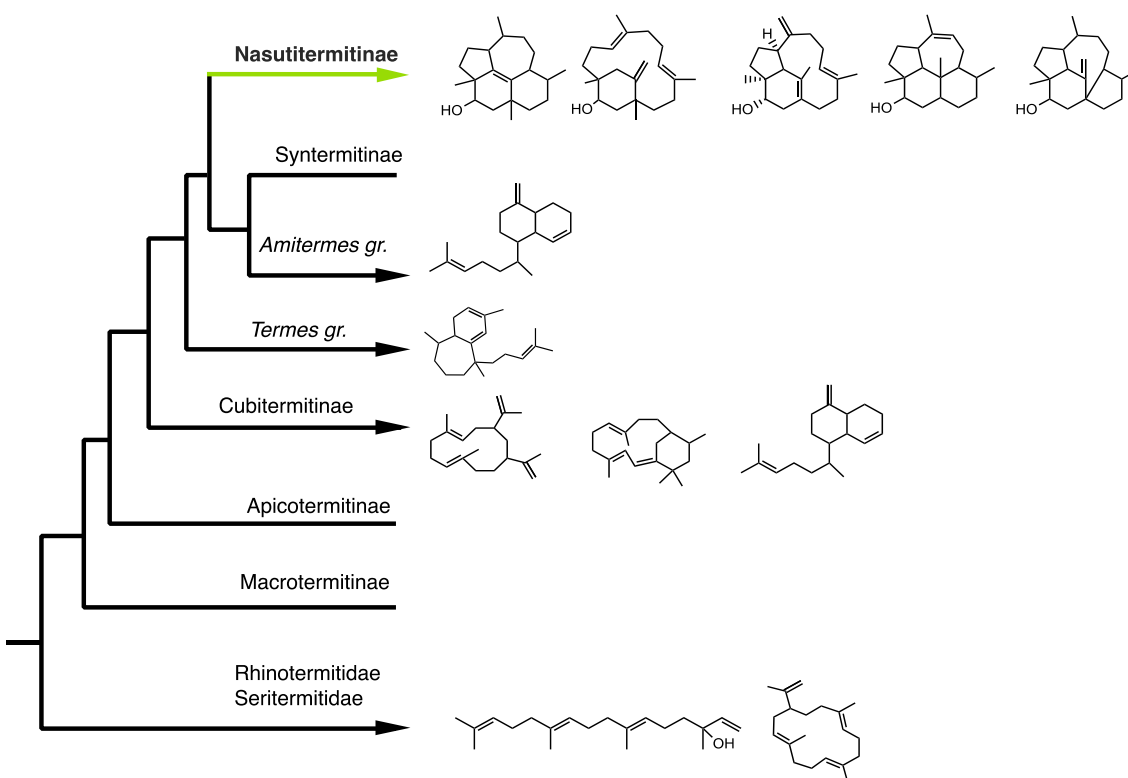
3.1.1 Struktura a biosyntéza polycyklických diterpenů

3.1.1.1 Struktura a funkce

Terpenoidy jsou přírodní látky, které vznikají polymerizací molekuly isoprenu (2-methylbutan-1,3-dienu). Isopreny lze spojovat několika různými způsoby do delších polymerů. Nejčastější způsob je uhlík číslo 4 (C4) s uhlíkem číslo 1 (C1). Mezi triterpeny a karotenoidy je častá vazba C4 s C4, některé nepravidelné monoterpeny jsou formovány spojením C4 s C2/3. Od počtu propojených izoprenových jednotek se odvíjí názvosloví terpenoidů. Jedna isoprenoidní jednotka, tedy pět uhlíků, je označována jako hemiterpen, dvě jako monoterpeny, tři jako seskviterpeny, čtyři jako diterpeny, atd. Isomerie je v případě terpenoidů velmi častý jev a rozlišuje se pět druhů isomerie: strukturní, poziční, geometrická, konformační a stereoisomerie [8].

Počet chemických struktur popsanych terpenoidů se odhaduje na 80 000 a jsou tak strukturně nejbohatší skupinou přírodních látek na zemi. Z terpenoidů jsou odvozeny některé pro život klíčové stavební nebo funkční biomolekuly primárního metabolismu, jako jsou látky steroidní povahy (např. steroidní hormony, ekdysteroidy hmyzu), postranní řetězec ubichinonu, farnesyl a geranyl-geranyl (využitý v prenylačních posttranslačních modifikacích proteinů), cholesterol, fytol, který je navázaný na pyrolové jádro chlorofylu, různé vitamíny (například vit. A, E, K1), nebo skvalen. Největší množství terpenoidů je ovšem produkováno formou sekundárních metabolitů a slouží jako semiochemikálie nebo obranné látky. Obecně nejvíce terpenoidů používaných jako obranné látky najdeme u rostlin. Velká a známá skupina obranných látek rostlin řadících se do terpenoidů jsou například srdeční glykosidy. Velké množství látek bylo popsáno u bakterií, které produkují převážně seskviterpeny, ale vyskytují se i monoterpeny a diterpeny. Terpeny produkují i mořské organismy jako řasy, houby, měkkýši a ryby. Zelené řasy produkují například caulerpenynen [9]. Veškerý hmyz produkuje juvenilní hormony, což je skupina seskviterpenů používaná jako hormony regulující vývoj. Konkrétně se jedná o epoxyderivát methylfarnesoátu. Zajímavé je, že jako obranné látky využívá terpenoidy jen několik vývojových linií hmyzu, zejména Hemiptera, švábi spolu s termity, brouci a motýli. Jak uvedeno výše, podčeleď vyšších termitů Nasutitermitinae se vyznačuje produkcí polycyklických diterpenů jako svých obranných látek. Hlavní bojová funkce polycyklických diterpenů je pravděpodobně imobilizovat nepřítel, typicky mravence jako hlavní predátory termitů. Fungují totiž jako skvělá lepidla. Velký hydrofobní skelet se dobře váže na hydrofobní povrchy a kyslíkaté skupiny následně

propojí jednotlivé molekuly vodíkovými můstky a způsobí lepidý efekt [10]. Uhlovodíkový skelet je tvořen dvaceti uhlíky a součet dvojných vazeb a kruhů se rovná nejčastěji pěti. Popsáno bylo zatím pět typů uhlovodíkového skeletu, a to sekotrinervitan (cykly = 2, dvojně vazby = 3), trinervitan (cykly = 3, dvojně vazby = 2), kempen (cykly = 4, dvojně vazby = 1), ripperteny (cykly = 4, dvojně vazby = 1) a longipen (cykly = 4, dvojně vazby = 1) (**obr. 2**) [11]. Typy skeletů se dále mohou lišit polohou dvojných vazeb. Funkční skupiny navázané na skeletech jsou zpravidla kyslíkaté a jedná se většinou o alkoholy, oxo skupiny, epoxidy, acetáty, propaonáty, methoxy skupiny, ethyl estery a karboxylové kyseliny. Kombinací všech výše uvedených chemických parametrů vzniká celková diverzita termitích diterpenů, která čítá kolem 70 identifikovaných unikátních struktur [11].



Obr. 2: Fylogenetický strom skupin termitů s vyvinutou frontální žlázou (Neoisoptera) a příklady terpenoidních struktur typických pro vojáky jednotlivých linií. Zeleně je zvýrazněná podčeď Nasutitermitinae, kam patří i skupina *Subulitermes*, které se věnuje tato práce. Struktury u této skupiny jsou příklady pěti polycyklických diterpenových skeletů, zprava: ripperten, secotrinervitan, trinervitan, kempen, longipen.

3.1.1.2 Názvosloví polycyklických diterpenů

Pro přehlednost a snadné vytvoření názvu ze vzorce a naopak se při pojmenování polycyklických diterpenů tradičně používá semitriviální názvosloví s následujícími pravidly. Uspořádání na asymetrickém uhlíku se značí písmeny α a β po čísle uhlíku, na kterém je skupina tvořící enantiomerii umístěna. α udává umístění funkční skupiny za rovinou a β před rovinou. Uhlovodíkový skelet se pojmenovává triviálním názvem s koncovkou podle počtu dvojných vazeb, před který se píše poloha dvojných vazeb. Všechny funkční skupiny se píší před polohu dvojných vazeb v abecedním pořadí.

3.1.1.3 Definice skupiny *Subulitermes* (*Subulitermes* group)

Podčeleď *Nasutitermitinae* se podle Krishny [12] dělí na dvě skupiny nazývané skupina *Nasutitermes* (*Nasutitermes* group) a skupina *Subulitermes* (*Subulitermes* group). Skupina *Subulitermes* je především neotropická, jednotliví zástupci se ovšem vyskytují se také v jihovýchodní Asii, Austrálii a Africe [13-14]. Jde o termity převážně humivorní (hlínožravé), hnízda mají podzemní, v rozkládajících se kořenech, nebo v hnízdech jiných druhů termitů. Na rozdíl od skupiny *Nasutitermes* se jedná o velmi málo studovanou skupinu a popis obranných látek a jejich chemická taxonomie jsou z tohoto důvodu velmi zajímavé. Jedná se o velmi malé termity a studium jejich sekundárních metabolitů je proto instrumentálně náročné. Jejich malá velikost a fakt, že jsou si jednotlivé druhy velmi podobné, zvyšuje možnost výskytu kryptických druhů, které se dají odhalit pomocí genetické a/či chemické analýzy. Tyto důvody činí ze skupiny *Subulitermes* velmi zajímavý objekt studia. Rody, které se řadí do skupiny *Subulitermes* jsou (v této práci studované vyznačené tučně): *Aciculitermes*, *Afrosubulitermes*, ***Agnathotermes***, *Angularitermes*, ***Anhangatermes***, ***Araujotermes***, ***Atlantitermes***, *Australitermes*, *Ceylonitermellus*, *Convexitermes*, ***Coatitermes***, ***Cyranotermes***, *Eleanoritermes*, *Emersonitermes*, *Enetotermes*, *Ereymatermes*, *Eutermellus*, *Latisubulitermes*, *Leucopitermes*, *Macrosulitermes*, *Malagasitermes*, *Malaysiotermes*, *Mimeutermes*, *Occultitermes*, *Oriensubulitermes*, *Paraconvexitermes*, *Periaciculitermes*, *Postsubulitermes*, *Sabahitermes*, *Spatulitermes*, *Subulioiditermes*, ***Subulitermes***, *Tarditermes*, *Verrucositermes* [12]. Rod ***Caetetermes*** je podle Krishny [12] zařazen do skupiny *Nasutitermitinae*, ale podle Rochy [15] sdílí charakteristické morfologické znaky primárně s druhy ze skupiny *Subulitermes* a já se přikláním k tomuto názoru.

3.1.1.4 Biosyntéza polycyklických diterpenů

Biosyntéza terpenoidů začíná, jak u rostlin, tak u živočichů, silně konzervovanou cestou propojování izoprenových jednotek do delších lineárních struktur. Isopren se do syntézy zapojuje ve formě pyrofosfátu a to ve dvou izomerních formách dimethylallylpyrofosfátu a isopentenylpyrofosfátu. Postupně vznikají geranylpyrofosfát, farnesylpyrofosfát a geranylgeranylpyrofosfát. Prodlužování lineárního skeletu je katalyzováno enzymy souhrnně nazývanými isoprenylpyrofosfátsyntázami. Lineární pyrofosfátové prekurzory pak dále slouží k syntéze příslušných terpenů, tedy mono-, seskvi-, di-, tri-, a dalších terpenů. Enzymy katalyzující vznik terpenů z pyrofosfátů se souhrnně označují jako terpen syntázy. Rostlinné terpen syntázy jsou hojně studované na rozdíl od hmyzích, které dlouhou dobu zůstávaly opomíjeny. U hmyzu obecně je popsáno jen několik terpen syntáz u řádů Hemiptera (ploštice a křísi), Coleoptera (brouci) a Lepidoptera (motýli), syntetizující monoterpenické a sekviterpenické feromony. Identifikované hmyzí terpen syntázy nejsou příbuzné terpen syntázám u rostlin a pravděpodobně se vyvinuly z isoprenylpyrofosfátsyntáz nezávisle na rostlinách [16-18].

Možné geny kódující termití terpen syntázy byly u termitů poprvé popsány v roce 2019 [19], ale jejich aktivita nebyla doposud testována. V roce 1981 Prestwich at. al. [7] dokázali, že termití vojáci dokážou syntetizovat diterpeny *de novo*. Často citovaná, nikdy však prokázaná, cesta biosyntézy polycyklických diterpenů termitů jde přes postupnou cyklizaci monocyklického neocembrenu vzniklého zacyklením geranylgeranylpyrofosfátu [7]. Nicméně se nepodařilo prokázat přítomnost značených obranných látek při aplikaci tritiem značeného neocembrenu ani *in vivo* ani *in vitro*. Není jisté, zda se značený hydrofobní neocembren dostal v daných esejích k příslušnému enzymu [20]. Tyto reakce by měly být katalyzovány právě enzymy z rodiny terpen syntáz. Největší strukturní rozmanitost dávají termitím diterpenickým obranným látkám jejich kyslíkaté funkční skupiny. Ty jsou pravděpodobně připojeny k terpenickému skeletu pomocí různých cytochromů P450, které jsou zvýšeně produkovány právě ve frontální žláze termitích vojáků [19]. Biosyntéza termitích diterpenů tedy stále zůstává tajemstvím a čeká na své popsání.

3.2 GC

Plynová chromatografie (GC) je dynamická metoda sloužící k separaci směsi těkavých látek. Analyty se rozdělují mezi mobilní a stacionární fázi. Poměr množství dané látky v mobilní a stacionární fázi při separaci (vyjádřeno rozdělovacím koeficientem) je příčinou charakteristické doby průtoku látky a tedy i příčinou její separace [21]. Podle stacionární fáze můžeme chromatografii rozdělit na separaci mezi plynnou a pevnou fází (GSC) anebo mezi plynnou a kapalnou fází (GLC). První separace byly provedeny na pevné fázi, kde hlavní interakcí mezi analytem a stacionární fází je adsorpce. Příklady stacionárních fází jsou zesíťovaný silikagel, zeolit, grafitový uhlík nebo molekulární síto. GSC se dnes využívá převážně k separaci permanentních plynů. GLC, jak ji teoreticky navrhl Martin a Synge [22], a následně sestrojil a publikoval James a Martin (1951) [23], je dominantním přístupem k separaci směsi těkavých látek. Kapalná stacionární fáze je zde nanesená na pevném nosiči.

Vlastní separace je nejvíce ovlivněna třemi konstrukčními prvky plynového chromatografu: injektorem, kolonou, a detektorem. Každá z těchto součástí silně ovlivňuje podobu, délku, kvalitu a výpovědní hodnotu analýzy.

3.2.1 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony dělíme podle konstrukčního řešení na náplňové a kapilární. Náplňové kolony mají velký průměr (typicky 0,32–0,64 cm) a krátkou délku (typicky 0,61–3,05 m) [24]. Jsou kompletně vyplněné nosičem stacionární fáze. Jedná se většinou o křemelinu nebo grafitový uhlík. Kvalita separace je ovlivněna rovnoměrným naplněním kolony, velikostí a tvarem částic [25]. Jako materiál pro náplňové kolony se používala nerezová ocel nebo sklo. Sklo oproti nerezové oceli má více inertní povrch, interakce mezi analytem a stěnou kolony jsou tak menší. Nevýhodou skla je křehkost.

Sestrojení kapilárních kolon bylo navrženo již koncem padesátých let [26], ale rozšířily se až v letech osmdesátých. První kapilární kolony byly z nerezové oceli a následně ze skla. Koncem sedmdesátých let byla sestrojena křemenná kapilára potažená polyimidem [27]. Hlavními výhodami křemičitých kolon (potažených polyimidem) jsou jejich inertnost, chemická čistota, ohebnost a bytelnost [28]. Problémem u křemičitých kolon je přítomnost aktivních skupin na jejich

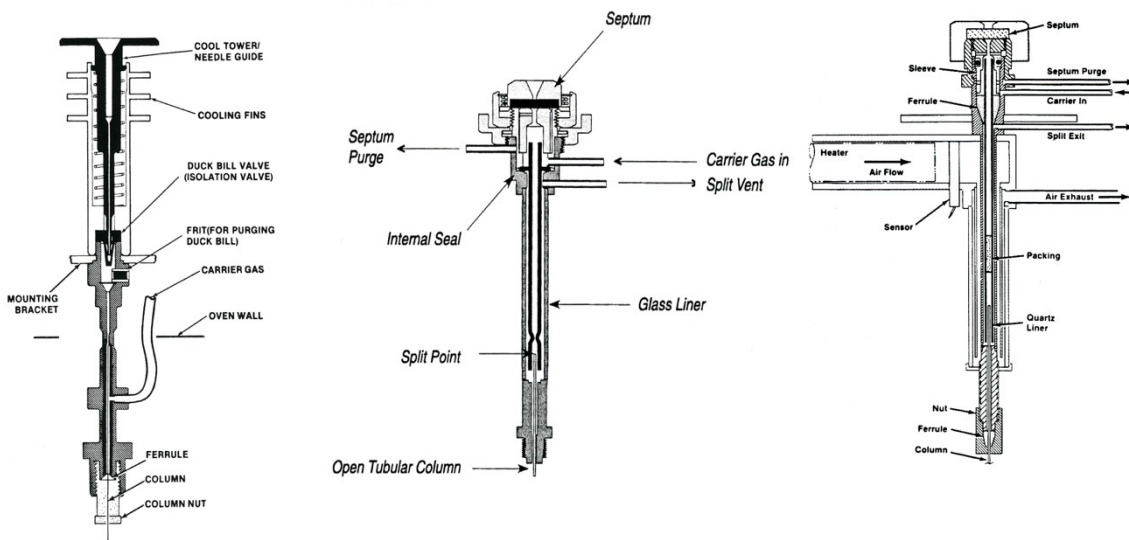
vnitřním povrchu (jedná se především o hydroxylové skupiny, které mohou tvořit vodíkové můstky s analyty) [29]. Tyto skupiny je nutné deaktivovat, následně nanést stacionární fázi a nakonec stacionární fázi ukotvit [30]. Nevýhodou popsaného přístupu je, že výsledná stacionární fáze není příliš tepelně stabilní, kolony jsou náročné na přípravu a kvalita výsledných kolon je nekonzistentní [31]. V dnešní době jsou stacionární fáze chemicky vázané přímo na silanolové skupiny. Jedná se o hydroxy skupinami zakončené různě substituované polysiloxany, které za zvýšené teploty reagují se silanolovými skupinami. Takto navázané polymery mohou být dále zesítované pro větší stabilitu [32].

Kapilární kolony se tradičně podle výroby, stacionární fáze a jejího ukotvení dělí na tři skupiny: kapiláry s potaženou stěnou WCOT, kapiláry s porózní vrstvou PLOT a kapiláry s potaženou pomocnou vrstvou SCOT. Výhoda SCOT kolon oproti WCOT spočívala v možnosti nanesení větší vrstvy stacionární fáze, která je poměrně stabilní, zatímco WCOT mohly být potaženy pouze tenkou vrstvou. Toto omezení ovšem padlo s nástupem zesítovaných stacionárních fází a SCOT kolony jsou již zastaralé [24].

V současné chemické analýze jsou jednoznačně nejvyužívanější WCOT kapilární kolony, popřípadě PLOT kolony pro GSC. Naproti tomu náplňové kolony se občas využívají kvůli schopnosti pojmout velkou kvantitu vzorku díky vysokému objemu stacionární fáze, a tedy i malé možnosti předávkování kolony. Uplatňují se tedy zejména v preparativní chromatografii.

3.2.2 Injektor

Injektor slouží ke zplynění a následnému nástřiku vzorku na kolonu. Jeho výběr a nastavení ovlivní šířku zóny nástřiku a tím i efektivitu a rozlišení separace. Zároveň je injektor místo, kde může dojít k diskriminaci určitého typu analytu, nebo k rozkladu termolabilních látek. Jednotlivá konstrukční řešení jsou: nástřik přímo na kolonu, nástřik s/bez děliče toku (SSI) a nástřik s programovatelnou



Obr. 3: Schématické nákresy tří možných technických řešení nástřiku, zprava: Nástřik přímo na kolonu (cold on-column), SSI, PTV.

teplotou (PTV) (**obr. 3**). Tyto tři konstrukční typy mohou být použity v různých módech podle typu vzorku analyzovaných látek a dávkovaného množství vzorku na kolonu [33]. V dnešní době nejčastější metodou nástřiku je nástřik SSI [34]. Tento injektor se skládá ze septa uzavírajícího místo nástřiku, termostatu s přívodem nosného plynu, ventilu pro čištění septa, ventilu pro dělení toku, otvoru pro kolonu, otvoru pro nástřik a v termostatu umístěného lineru [35]. V módu bez děliče toku je ventil pro dělení toku uzavřený a téměř všechny vzorek odchází na kolonu. V případě módu s děličem toku je ventil otevřen a o tom, kolik vzorku se dostane na kolonu, rozhoduje dělicí poměr přítoku nosného plynu a odtoku ventilem pro dělení toku [35]. Nástřik na kolonu je technicky nejjednodušší. Termostat (někdy může být připojen) i liner jsou zde vynechány a vzorek je kompletně převeden rovnou na kolonu. PTV nástřik má nejširší využití. Technické řešení má podobné jako SSI, ale termostat je upraven tak, aby mohl teplotu velmi rychle zvyšovat nebo snižovat [34]. Velkou nevýhodou SSI oproti ostatním typům nástřiku je diskriminace silně těkavých látek v módu s děličem toku a tepelný rozklad tepelně nestabilních látek v módu bez děliče toku [36, 37]. Dále v módu bez děliče toku může dojít k neúplnému přenosu látek s vysokým bodem varu [33]. Dávkování přímo na kolonu převede kompletně celý nástřik vzorku na kolonu a nedochází tedy k diskriminaci analytů. Zároveň tento nástřik probíhá za poměrně nízké teploty bez

přítomnosti lineru. Zmenší se tak pravděpodobnost rozkladu nestabilních látek. Kompletně se všemi látkami jsou bohužel také nastříknuty všechny nečistoty a dochází tak k rychlé degradaci kolony [33, 38]. PTV při dobrém nastavení minimálně diskriminuje těkavé i netěkavé látky a minimálně rozkládá látky tepelně nestabilní. Jeho největší nevýhodou je nutnost optimalizace a přívodu chladícího média (IN_2 , ICO_2).

3.2.2.1 PTV injektor

PTV injektor se skládá z odporové cívky, sloužící ke kontrolovanému zvyšování teploty, a pláště, který je možno chladit tekutým CO_2 nebo dusíkem. Velkou výhodou PTV injektoru oproti přímému nástřiku na kolonu nebo nástřiku SSI, který se používá nejčastěji, je menší diskriminace analytů s vysokou teplotou varu, šetrnější nástřik termolabilních analytů a menší negativní vliv netěkavých analytů. Nejdůležitější vlastností ovšem je možnost nástřiku velkého objemu vzorků, až stovek μl [39]. PTV může fungovat v několika módech. Každý z těchto módů je optimální pro jinou kombinaci analytů a objemů nástřiku. První mód je PTV bez děliče toku, který je charakterizovaný dávkováním při teplotě blízké bodu varu rozpouštědla a uzavřeným *split* ventilem při jeho odpařování. Rozpouštědlo tedy uniká přes kolonu. Výhodou je, že pokud je teplota správně optimalizována, nedojde zde ke ztrátě těkavých analytů. Druhou metodou je *solvent vent* PTV dávkování, při němž je teplota držena hluboko pod bodem varu rozpouštědla. Rozpouštědlo je eliminováno přes *split* ventil proudem nosného plynu. Následně je *split* ventil uzavřen a PTV je rychle ohřát, čímž dojde k nadávkování vzorku na kolonu. Takto se dá nadávkovat i několik stovek μl roztoku. Je dobré zde použít náplňový liner, který zabrání, aby se rozpouštědlo dostalo na kolonu. Zároveň zde může dojít ke ztrátě těkavých analytů. Náplňový liner bohužel může katalyzovat reakce nestabilních analytů. Třetí metoda se nazývá *vapor overflow*. Teplota PTV je zde držena vysoko nad bodem varu rozpouštědla. Odpařující se rozpouštědlo vytvoří chladné místo v lineru, kde se kondenzují analyty s vysokou teplotou varu. Páry rozpouštědla jsou vypuštěny přes *purge vent*. Touto metodou se nevyhnutelně ztratí velká část analytů s nízkou teplotou varu [40].

3.2.3 Detektory v GC

Detektory v plynové chromatografii můžeme pro přehlednost rozdělit podle fyzikálních jevů, které používají pro detekci. Detekce změny v elektrických vlastnostech materiálu používá například

tepelně vodivostní detektor. Jedny z nejstarších detektorů zaznamenávají změnu v hustotě plynu. Dále se dají měřit různé spektrální vlastnosti efluentu. Nejčastější jsou detektory založené na ionizaci [41]. Do této kategorie patří v GC nejpoužívanější plamenoionizační detektor (FID), dále pak detektor elektronového záchytu, fotoionizační detektor, heliový ionizační detektor a dusíko-fosforový detektor. Dále by do této skupiny mohl patřit i hmotnostní detektor (MS), který také ionizuje molekuly analytu, ale většinou se řadí do své vlastní kategorie [42]. Detektory také můžeme dělit na koncentrační a hmotnostní podle toho, zda jejich odezva záleží na koncentraci analytu v nosném plynu nebo na hmotnostním toku. Detektory z jiných kategorií jde porovnat pouze v případě, že koncentrace a hmotnostní tok jsou fixní. Obě skupiny detektorů mají také rozdílnou závislost plochy píku na množství vzorku. Plochy píků u koncentračních detektorů jsou převráceně závislé na průtoku nosného plynu, zatímco u hmotnostního detektoru jsou závislé na obsahu analytu v nosném plynu a tedy se nemění s hmotnostním tokem nosného plynu [43]. Nakonec se detektory dělí podle selektivity na univerzální a selektivní.

Nejpoužívanějším detektorem v plynové chromatografii je plamenoionizační detektor FID. Jedná se o hmotnostní, téměř univerzální detektor (pokud se jedná o organické látky) s nízkým limitem detekce (2×10^{-12} gC/s). FID ovšem vyniká hlavně ve svém lineárním rozsahu (10^6 – 10^7), nízkém mrtvém objemu a rychlé odezvě, díky které se vedle hmotnostního detektoru doby letu dá zapojit jako detektor v komprehensivní dvoudimensionální plynové chromatografii [42]. Pro plamen se používá většinou kombinace vzduchu, vodíku a dusíku. Hlavní konstrukční atributy jsou hořák zakončený tryskou a velmi blízko nad ním sběrná elektroda. Mezi elektrodou a hořákem je většinou napětí 200–300 V [44]. Plamen má v nejteplejší části 2000–3000 °C. Tato teplota není dostatečná pro ionizaci organických látek a nabití částice vznikají pravděpodobně reakcí radikálů po symetrickém štěpení vazby uhlík-uhlík a následné reakci s kyslíkem [42, 45, 46]. Odezva tedy závisí na počtu uhlíků a jejich substituentech. Tento předpoklad vedl k zavedení pojmu efektivní uhlíkové číslo, tedy číslo které vyjadřuje vztah struktury a odezvy [47].

3.2.3.1 GC-MS

Zařazení hmotnostního spektrometru (MS) jako detektoru v GC rozšíří chromatogram o druhou dimenzi v podobě hmotnostních spekter, tedy záznam o tom, kolik a jak těžkých/nabitých iontů se v dané chvíli vytvořilo v iontovém zdroji. Hmotnostní spektra nám podávají dodatečnou informaci

o struktuře a identitě eluovaných látek, která může v určitých případech pomoci v rozlišení koeluuujících píků [48]. Chromatogram je následně vytvořen součtem intenzit všech zaznamenaných iontů v daném spektru, které bylo naměřeno v určitém čase. Z tohoto popisu plynou hned dvě nevýhody hmotnostní detekce v separačních metodách. Zaprvé, odezva detektoru je silně závislá na ionizaci molekuly. A zadruhé, odezvu molekul, ani když si jsou strukturně blízké, nejde spolehlivě porovnat. Změření hmotnostního spektra také určitý čas trvá a délka tohoto měření nepřímo úměrně ovlivní počet měření za sekundu, a tedy i tvar píků. Tento problém se ovšem týká pouze určitých druhů hmotnostní detekce. Poslední nevýhodou je oproti předešlým detektorům poměrně složitá a nákladná instrumentace.

Hmotnostní detektor potřebuje ionizovat molekuly a pracuje za vysokého vakua, jeho propojení s kapilární plynovou chromatografií je tedy díky nízkým průtokům efluentu v plynné fázi nasnadě. Technicky se vždy skládá ze vstupu, iontového zdroje, analyzátoru iontů a detekce iontů. Propojení mezi plynovým chromatografem a hmotnostním detektorem je zprostředkováno pomocí vyhřívané *transfer line*. Díky tomu, že efluent je v plynné fázi, může být zavedena kolona přímo do iontového zdroje [35].

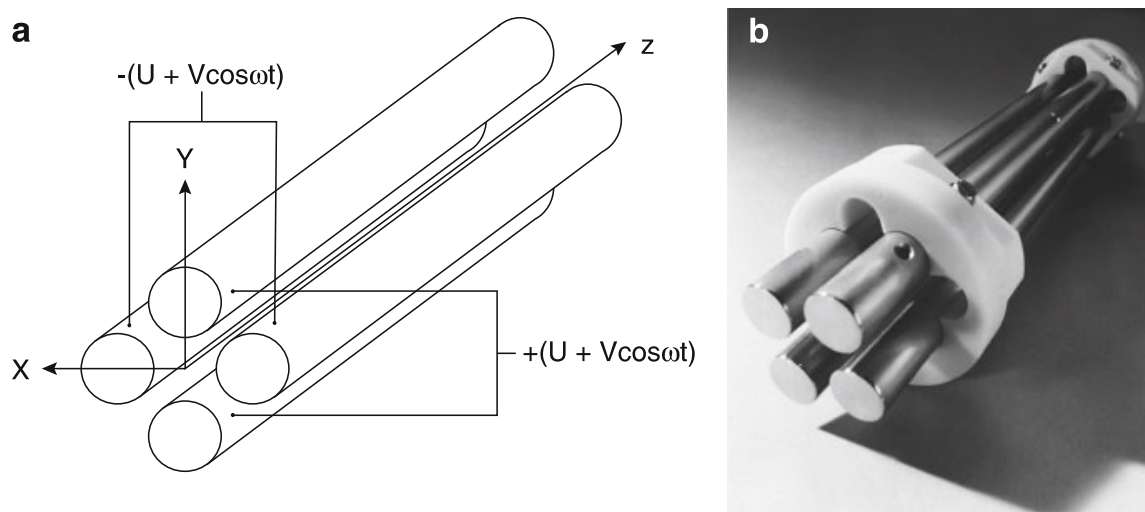
Hmotnostní analyzátory jsou schopné analyzovat pouze nabitě ionty, a proto je většinou nejprve nutné neutrální molekuly na ionty převést. K tomuto účelu slouží iontový zdroj. GC-MS používá hlavně tři iontové zdroje. Elektronovou ionizaci (EI), chemickou ionizaci a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku [34]. Elektronová ionizace spočívá v bombardování analytu vysoce energetickými elektrony. Energie těchto elektronů musí být vyšší než ionizační energie molekul. Většinou se používají elektrony o energii 70 eV. Jedná se o hodnotu, při které vzniká statisticky nejvíce různých fragmentů molekul. Elektron s dostatečnou energií tedy umožní při kontaktu s molekulou oddělení dalšího elektronu a tím dostaneme kladný iont. EI je tedy primárně kladná ionizační technika, kde pravděpodobnost, že se z neutrální molekuly stane nabitý iont a dostane se k detektoru, je přibližně 1:800. EI může generovat i negativní ionty elektronovým záchytem, nicméně energie musí být daleko nižší než 70 eV. Záchyt takových elektronů je krajně nepravděpodobný [49]. Technické řešení iontového zdroje pro EI navrhl Bleakney [50] a zdokonalil Nier [51]. Elektrony jsou generovány žhaveným kovovým drátem, který je umístěn vně ionizační komory. Ve stěně komory je otvor, kterým elektrony procházejí dovnitř a na druhé straně je past pro jejich zachycení. Mezi filamentem a stěnou komory je uloženo urychlovací napětí

takové, aby dodalo elektronům požadovanou energii. Tímto způsobem vzniká úzký proud elektronů o definované energii. Kolmo na tento proud je veden proud neutrálních analytů. Kolizí vznikají ionty, které jsou pro minimalizaci ztrát okamžitě vytlačeny z ionizační komory elektrodou o nízkém napětí zvanou *repeller* [52].

Ionizované molekuly jsou stanoveny pomocí hmotnostního analyzátoru, zařízení, které měří poměr hmoty a náboje jednotlivých iontů. Hmotnostní analyzátor dělíme podle fyzikálních základů, na kterých pracují, a podle toho s jakou přesností určují hmotu iontů. Pravými spektrometry jsou analyzátor doby letu, jež stanovují hmotu molekul podle rychlosti, za kterou uletí určitou dráhu, a sektorové analyzátor dělící ionty v závislosti na jejich hybnosti. Cyklotron a Orbitrap jsou analyzátor iontů schopné velmi vysokého rozlišení a jejich společnými vlastnostmi je měření úhlové frekvence a následný převod tohoto záznamu na spektrum pomocí Fourierovy transformace. Nejrozšířenějšími analyzátor díky své operační jednoduchosti, malé velikosti a nízké ceně, jsou hmotnostní analyzátor, které nefungují jako spektrometry, ale jako laditelné hmotnostní filtry. Jedná se o kvadrupól a iontovou past [53].

3.2.3.1.1 Kvadrupól

Kvadrupól se skládá ze čtyř tyčových elektrod (**obr. 4**), které jsou paralelně uspořádány. Na protějších elektrodách je vždy vloženo stejnosměrné napětí o stejné polaritě a intenzitě. Napětí se



Obr. 4: Schéma analyzátoru iontů typu kvadrupól (a). Fotografie kvadrupólu (b).

skládá ze stejnosměrné a střídavé složky, kde stejnosměrná je časově nezávislá a střídavá se s časem mění. Díky měnícímu se napětí iont během své pouti kvadrupólem osciluje. Pokud je poměr stejnosměrné a střídavé složky nastaven optimálně, projde pouze iont o stanoveném m/z [53]. O jaké m/z se bude jednat, určí hodnota poměru stejnosměrné a střídavé složky. Z toho plyne název hmotnostní filtr. Trajektorie iontu je závislá na jeho hmotnosti, tento vztah popisují Mathieuovy rovnice. Lehké ionty ovlivňuje zejména frekvence střídavého napětí, těžké ionty zase intenzita stejnosměrného napětí [54]. Rozlišení kvadrupólu s elektrodami s kruhovým průřezem je jednotkové. Dokáže tedy rozlišit pouze ionty jejichž rozdíl m/z je roven jedné. Ideálním průřezem elektrody je parabola. Kvadrupól s parabolickým průřezem elektrod by mohl mít rozlišení o něco vyšší. Rozlišení je nicméně také velmi závislé na kvalitě výroby elektrod. Parabolický tvar je daleko těžší na výrobu než tvar kruhový a proto se příliš nevyrábí [55].

3.2.3.1.2 TOF

Velmi často používaným hmotnostním spektrometrem v GC je analyzátor doby letu. TOF na začátku měření udělí všem analyzovaným iontům určité zrychlení elektrickým impulzem. Rychlost, kterou udělí iontu je úměrná jeho m/z . TOF byl po sektoru druhý sestrojený hmotnostní analyzátor a jeho obrovskou výhodou oproti sektoru byla skenovací rychlost a teoreticky neomezený hmotnostní rozsah. Nicméně TOF skládající se pouze z urychlovací elektrody, letové trubice a detektoru má velmi špatnou rozlišovací schopnost. Kvadrupól byl díky své jednoduché konstrukci, vysoké frekvenci snímání a vyššímu rozlišení lepší volba [55]. Jednoduchý TOF je možné technicky upravit a zvýšit tak jeho rozlišení. Dále pak je nutné upravit TOF tak, aby bylo možné v kombinaci s ním použít i jiné než pulzní ionizační techniky. Úpravy zlepšující rozlišení jsou primárně tři. Měření ve vysoce čistém vakuu, pulzní a zpožděná extrakce iontů a reflektor [56]. Zpožděná extrakce kompenzuje rozdíly v rozdělení iontů v prostoru a rozdíly v udělených kinetických energiích jednotlivých iontů. Reflektor je soustava dvou a více kruhových elektrod s postupně se zvyšujícím se napětím. Tato soustava je umístěna do dráhy iontů. Ionty jsou reflektorem odraženy na detektor. Tento jev má za následek prodloužení letové dráhy, ale hlavně fokusaci iontů danou různou délkou dráhy průletu iontu reflektorem. Délka dráhy je dána kinetickou energií iontů a ta je závislá na jejich hmotnosti. Oba tyto jevy zlepšují rozlišení mezi dvěma ionty. Ortogonální zrychlení je umožněno přidáním první sady zrychlení udělujících

elektrod hned k iontovému zdroji [57]. Tyto elektrody urychlí ionty ve směru kolmém na směr urychlení pomocí druhé sady elektrod a výsledně také dráhu letu iontů [58].

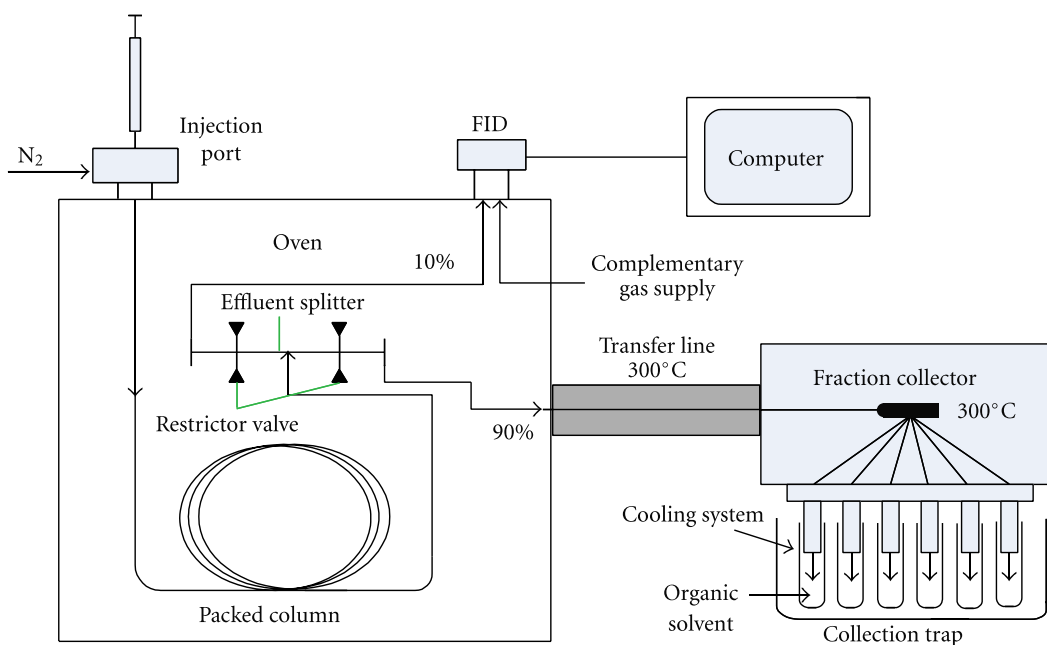
3.2.3.2 GC-FTIR

Infračervený spektrometr (IR) by mohl být ideálním detektorem pro GC. Všechny molekuly vykazují vibrační přechody a absorbují tedy v infračervené oblasti. IR spektrometr může být navíc univerzální i selektivní detektor, pokud se rozhodneme detekovat pouze jeden pás spektra, ve kterém absorbuje určitá funkční skupina. Navzdory těmto vlastnostem není jako detektor moc rozšířený, a to zejména proto, že není příliš citlivý, má náročnou instrumentaci a IR spektra nejsou snadná na interpretaci [59]. Instrumentální řešení můžeme rozdělit na *on-line* kontinuální a imobilizující efluent. Kontinuální měření většinou probíhá ve skleněné cele s vnitřním povrchem potaženým zlatem a oběma konci uzavřenými materiálem neabsorbujícím v IR oblasti spektra, rozměry jsou 0,3–1 mm (vnitřní průměr) a 5–10 cm (délka). Tato trubice je připojena přes *transfer line* ke konci GC kolony a zasazena do spektrometru [60]. Nevýhodou tohoto přístupu je rozmývání píků v cele s velkým mrtvým objemem a nízká citlivost. Tyto nedostatky lze řešit metodami kryogenického záchytu [61]. Technické řešení imobilizující efluent jsou dvě a obě mají oproti *on-line* detekci o řád lepší citlivost [61]. Jedná se o přímé uskladnění a izolaci matrice. Obě řešení jsou si v zásadě podobná. Efluent je v prvním případě fixován na pohyblivé desce, v druhém případě na rotujícím kotouči. Fixace je provedena chlazením tekutým dusíkem a následně je provedeno spektroskopické měření [59].

3.2.4 Preparativní GC

Preparativní plynová chromatografie je analytická technika zaměřující se na izolaci jednotlivých komponent směsi. Hlavní rozdíly oproti analytické plynové chromatografii jsou ve způsobu nástřiku vzorku, v objemech a v koloně. Dále je nutné technicky vyřešit sběr často velmi těkavých analytů [62]. Dávkočič se používá většinou v módu bez děliče toku, dále je možné dávkovat vzorek přímo na kolonu dávkočičem s programovatelnou teplotou zplynění (PTV), nebo kombinovaným LC×GC preparativním systémem [63]. Pro efektivní preparaci je nutné na kolonu dávkovat poměrně vysoká množství vzorku. Kolona toto množství musí být schopná pojmout. Proto se většinou používají kapilární kolony s širokým vnitřním poloměrem a silnou vrstvou stacionární

fáze. Pro separace opravdu velkého množství vzorku je možné použít náplňovou kolonu, ale za cenu snížení počtu teoretických pater [64]. Varianty zařízení pro sběr vzorku jsou různé, ale komerčně dostupný je pouze sběrač frakcí (PFC) firmy GERSTEL (**obr. 5**). PFC se skládá z *transfer line*, která připojuje PFC k plynovému chromatografu, z vyhřívaného osmicestného děliče toku a chlazených Dewarových nádob pro skleněné kapiláry zachytávající efluent. Skleněné kapiláry jsou jedním koncem připojeny k děliči toku a druhou k solenoidovým kohoutkům. Efluent vždy proudí cestou s nejnižším odporem. Pokud je tedy příslušný solenoidový kohoutek otevřený, proudí do příslušné kapiláry efluent. Šest z osmi vstupů děliče toku je připojeno ke kapilárám sběrným, jeden je připojen k výstupu z chromatografu a poslední k odpadní kapiláře. Pro záchyt analytů mohou být kapiláry chlazeny CO₂ nebo kapalným dusíkem. Druhou variantou je naplnit kapiláry rozpouštědlem a zachytávat analyty přímo do něho [62, 64]. Místo PFC je možné použít kus kolony s velkým poloměrem a velkým objemem stacionární fáze. Kolona může být chlazená. Výhodou tohoto přístupu je možnost upravit analytickou GC za pomoci běžných komerčně dostupných součástek. Nevýhodou je poměrně obtížná automatizace. Další možností záchytu je na



Obr. 5: Schématické znázornění preparativního plynového chromatografu s FID detektorem a připojeným sběračem frakcí (PFC).

trubičku s inertním sorbentem. Obě techniky většinou využívají Deanův spínač pro přepínání mezi detektorem a sběračem frakcí [65].

V literatuře často zmiňované problémy preparativní GC jsou možnost nástřiku pouze malého množství vzorku, malé množství frakcí a nedostatečná separace jednotlivých analytů [66].

Možnost nástřiku jen malého objemu vzorku, která je jedním z omezení nástřiku s/bez děliče toku, je možné vyřešit zasazením například PTV nástřikového zařízení a dávkovat v módu umožňující několikanásobný nástřik. Standardní PFC od firmy GERSTEL umožňuje sbírat maximálně šest frakcí. Jiná nekomerční řešení se většinou nedostávají ani na tuto hodnotu. Je ovšem možné zapojit dvě PFC pomocí bezobjemového děliče toku a rozšířit tak možnost sběru na dvanáct frakcí [67].

Přístupy k zvýšení separační účinnosti, a tedy i zvýšení čistoty frakcí, spočívají většinou v implementaci multidimenzionální plynové chromatografie. V tomto případě se využívá takzvaný přístup „*heart cut*“, kde je část efluentu z první kolony přesměrována na kolonu sekundární. Sekundární kolona má jinou stacionární fázi a je většinou podobné délky jako kolona primární. Kolony jsou každá ve vlastním termostatu a jsou propojeny Deanovým spínačem [68, 69].

3.3 Automatické zpracování dat

Využití vysoce účinných separačních metod propojených s hmotnostní detekcí při analýze komplexních vzorků vede k produkci obrovského množství vícerozměrných dat [70]. Množství a nepřehlednost dat většinou není problém v cílené kvantitativní nebo kvalitativní analýze. Na druhou stranu, abychom při necílené metabolické analýze mohli z takto komplexních dat vytěžit maximální množství informace, je nezbytné využití automatického zpracování dat [71]. Pro tento účel existuje velké množství různých komerčních i volně dostupných programů využívající různé algoritmy pro řešení jednotlivých problémů. Každý program a přístup má své výhody a nevýhody a proto je dobré jednotlivé přístupy důkladně optimalizovat [70]. Tady je největší nevýhoda komerčních programů, které se zaměřují především na své datové formáty a postup řešení dovoluje jen malé zásahy řešitele. Pro vyhodnocení dat nepotřebujeme většinou širší znalost algoritmů, na jejichž základě programy fungují, ale tato neznalost může vést k chybám, které zhoršují výsledné zpracování. Komerční programy na rozdíl od programů volně dostupných nepublikují algoritmy,

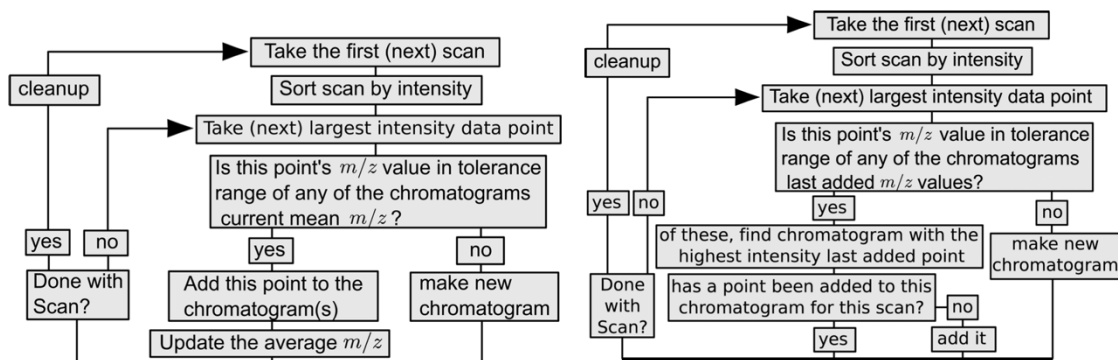
na jejichž základě fungují. Proto jsou často brány volně dostupné programy za lepší alternativu [72, 73]. Souhrn dostupných programů pro metabolomiku je možné najít v článku Misra a Mohaparta (2019) [74].

Metabolomická analýza má většinou dvě hlavní části: 1) preprocesování a 2) statistické zpracování dat [75]. Zde opět různé programy využívají různé postupy k preprocesování naměřených dat, ale můžeme zde najít obecné společné kroky. Jedná se o filtraci šumu, konstrukci extrahovaného iontového chromatogramu (EIC), detekci píků, dekonvoluci EIC, alignment a identifikaci [70, 72, 73, 76].

3.3.1 Výstavba EIC a detekce píků v EIC

3.3.1.1 Výstavba EIC

Asi nejdůležitější částí zpracování dat jsou první dva kroky preprocesování, protože chyby zde se projeví ve všech následujících krocích a mají zásadní vliv na statistické zpracování a celkový závěr [77, 78]. I když se algoritmy pro detekci EIC liší program od programu, mají většinou podobnou obecnou strukturu, jejíž hlavní rozdíly jsou v detailním řešení jednotlivých kroků (**obr. 6**). Jednotlivé hmoty každého skenu jsou nejprve poskládány od nejintenzivnější po nejméně intenzivní. Následně počínaje nejintenzivnější hmotou je rozhodnuto, jestli už byla nebo nebyla detekována. Pokud ne, je založen nový EIC, do kterého budou zařazeny všechny následně detekované hmoty, které spadají do intervalu hmot určeného uživatelem. Je třeba definovat hodnotu m/z , podle které se utvoří interval kolem detekované hmoty. Tato hodnota může být buď



Obr. 6: Schéma procesu výstavby extrahovaného iontového chromatogramu (EIC), který využívají dva velmi často používané programy XCMS (vlevo) a MZmine (vpravo).

relativní nebo absolutní. Studie [78] ukázala, že lepších výsledků lze dosáhnout absolutní tolerancí. Poté, co se projde celý sken od nejintenzivnější hmoty po nejméně intenzivní, je výsledek zkontrolován a přejde se k dalšímu skenu. Největší rozdíly jsou v určení hmoty, ze které je vypočteno rozpětí a v řešení kontroly výsledku [77, 78].

3.3.1.2 Detekce píků v EIC

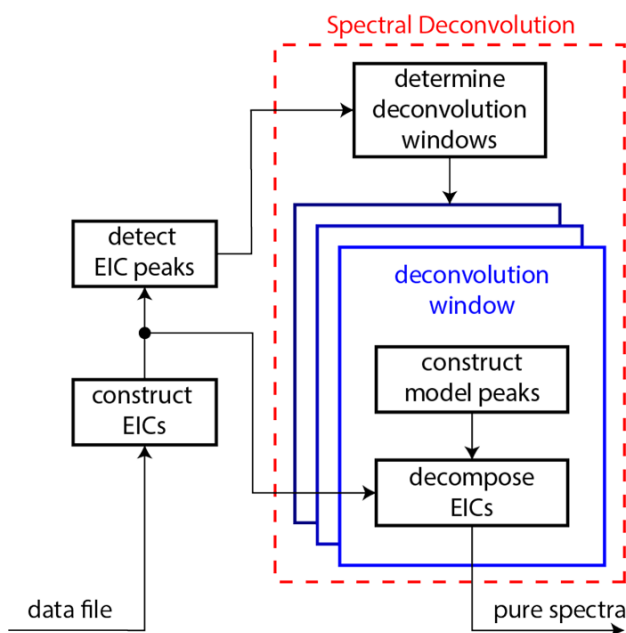
Pro detekci EIC píků opět existuje mnoho algoritmů [79]. Jednou z nejčastěji používaných technik je algoritmus *centWave* a jeho úpravy [72, 80, 81]. *CentWave* algoritmus používá pro detekci píku z EIC výpočet *continuous wavelet transform* (CWT). Před CWT jsou EIC filtrovány. Nejprve je vypočtena základní linie EIC jako aritmetický průměr hodnot intenzit, poté, co byl EIC prodloužen o určitou oblast v obou směrech. EIC bude smazán, pokud není intenzita uživatelem definovaného počtu skenů nad touto hodnotou. Druhý filtr spočívá v porovnání poměru intenzity signálu k šumu (S/N). Podobným způsobem jako základní linie je určena průměrná hodnota intenzity šumu a jeho směrodatná odchylka. Směrodatnou odchylkou je vynásobena uživatelem definovaná hodnota S/N. EIC je vyřazen, pokud je tato hodnota stejná nebo nižší než průměrná intenzita signálu šumu. Následně proběhne vlastní CWT [80].

3.3.2 Dekonvoluce spekter

Po detekci píků z EIC je nutné sestavit zpět čisté spektrum náležící danému analytu (**obr. 7**). Sestavení spektra je prováděno takzvanou spektrální dekonvolucí [82, 83]. Tento krok se značně liší pro LC-MS a pro GC-MS. Cílem je primárně odfiltrování šumu a rozlišení spektra koelujících analytů. Zatímco v LC-MS je složitější krok odfiltrování šumu, v GC-MS se primárně řeší rozlišení koelujících analytů. Při dekonvoluci spekter si GC-MS záznam představujeme jako matici která vznikla lineární kombinací matice koncentrací čistých látek (sloupce) v jednotlivých retenčních časech a matice relativních intenzit hmot (sloupce jednotlivé hmoty, řádky jednotlivé látky). Řádky výsledné matice tedy představují spektrum a sloupce kompletní eluční profil jedné hmoty, tato matice tedy představuje výsledek GC-MS měření. Řešením dekonvoluce je rozdělení výsledné matice na kombinaci hmotnostní matice spolu s koncentrační. Změřenou máme ale pouze matici výslednou a rozdělit tuto matici není vůbec snadný problém [84].

Klasický starší typ dekonvolučních algoritmů, jako je třeba AMDIS, *metabolite detector* nebo ADAP-GC 2.0 mají společný krok sestavení modelového píku. Modelový pík slouží tedy jako předloha pro navržení koncentrační matice a s její pomocí je dopočtena spektrální matice. Hlavní krok klasických dekonvolučních algoritmů je výběr a sestavení modelového tvaru píku z jednotlivých EIC. Následuje sestavení očištěného spektra za dosazení modelového píku [83, 85, 86].

Novější dekonvoluční algoritmy, které jsou součástí softwarů ADAP-GC 4.0 nebo eRah, používají princip *multivariate curve resolution* (MCR) [87, 88]. Pokud se vrátíme k maticím zobrazujícím měření, tak MCR metody modelový pík postupně konstruuji a řeší tedy obě matice zároveň. Modelový pík je zde součástí řešení, nikoli vstupním údajem [89]. MCR tedy zvládne lépe rozdělit dva koelující píky než klasický postup. Nevýhodou MCR algoritmů je jejich výpočetní náročnost [88].



Obr. 7: Jednotlivé kroky detekce a výstavby očištěného spektra látky pomocí balíku ADAP-GC 4.0 implementovaného v programu MZmine 2.

3.3.3 Alignment

Dalším krokem v metabolickém zpracování dat je alignment neboli sestavení tabulky vzorků se srovnanými analyty z měření jednotlivých vzorků. Algoritmy, které produkují takové tabulky, musí kompenzovat změny v retenčních časech analytů v různých měřeních [90]. Algoritmů

řešících tento problém je opět nepřehledné množství. Jako příklad zde uvedu pár nejznámějších zástupců různých přístupů. Velmi často se používají takzvané *wrapping* algoritmy, které aplikují nelineární transformaci na chromatogram na ose retenčního času, aby byla maximalizována korelace mezi spektry. Jejich příkladem je třeba *correlation optimized wrapping* algoritmus (COW). Ten porovnává podobnost mezi vzorkem a referencí, přičemž chromatogram rozdělí na segmenty, které mají dovolenou jistou míru pohyblivosti [91, 92]. Dalším příkladem je Icoshift, který na rozdíl od COW aplikuje konstantní změnu na všechny datové body nebo chromatogram rozdělí na oblasti a změnu aplikuje na ně. Změna je v podobě delece nebo inserce části chromatogramu na začátku nebo na konci. Změna v retenci je tedy lineární. Výpočetně jsou méně náročné než *wrapping* metody, a tudíž se lépe aplikují na velké sady dat [93]. Obě předešlé metody pracují s daty bez detekovaných píků, tedy s hrubými daty. Metody, které pracují s již detekovanými spektry, využívají programy jako je XCMS a MZmine 2 (sám nebo s modulem ADAP). Jako příklad použijeme alignment algoritmus používaný modulem ADAP, protože byl použit v této práci. Postup se skládá ze dvou částí. První je výběr spekter a druhý krok je výběr nejlepšího spektra jako reference. Algoritmus tedy vezme první nezařazený pík a vytvoří z něj interval retenčních časů. Spektrum první složky v tomto intervalu slouží jako reference a ostatní spektra jsou s ní srovnány pomocí hodnoty, která je složena ze skóre vypočteném z podobnosti spekter a retenčního času vynásobeného uživatelem zvoleným faktorem, který udá, zda bude brán v potaz více retenční čas nebo spektrum. Pokud má komponenta skóre vyšší než nastavená hranice, bude zařazena. Z těchto zařazených komponent je pak vybrána pro každý vzorek právě jedna s největším skóre. Druhá etapa opakuje první pro každou vybranou komponentu a utvoří tak skupiny vybraných komponent. Komponenta, která má největší průměrné skóre po kroku dva je vybrána jako reference. S tímto spektrem jsou následně všechny ostatní porovnávány [86, 94].

3.3.4 Přístupy k automatické identifikaci látek

Automatická identifikace v GC-MS je většinou založena na porovnávání očištěných spekter jednotlivých složek alignment listu s knihovnou. To umožňuje vysoká reprodukovatelnost GC-MS spekter daná elektronovou ionizací při definovaném napětí 70 eV. Využití měkkých ionizačních technik v LC-MS neumožňuje tak snadné srovnání s knihovnou, a proto je zde vyvíjeno značné úsilí pro vývoj nových identifikačních metod. Pokud je to možné, jsou metody vyvíjené pro LC-

MS následně upraveny pro využití s GC-MS. Sem spadají *in silico* generované knihovny. Nejprve je vygenerována strukturní knihovna a těmto strukturám jsou následně vygenerována spektra. Generování spekter se děje na základě databází fragmentačních reakcí nebo pomocí strojového učení, kde je nejprve program naučen na velké sadě spektrálních a strukturních dat a následně je spektrum takovým programem vygenerováno. Tyto postupy jsou velmi výpočetně náročné a výsledky bývají neuspokojivé [72]. Poslední dobou se rozvíjejí způsoby, které analyty přímo neidentifikují, ale umožní nám je zařadit do skupin na základě jejich spektrální podobnosti. Takovou metodou je výstavba molekulárních sítí. Molekulární síť je vizuální reprezentace podobnosti spekter jednotlivých složek a jejich vzájemných vztahů. Stojí na jednoduchém předpokladu, že podobné látky budou mít podobná spektra. Její velkou výhodou je možnost zařazení tabulky dodatečných dat a možnost jejich vizualizace v témže grafu. Podobnost mezi molekulami je počítána na základě kosinové podobnosti. Látka je charakterizovaná hmotnostním spektrem, které je možné reprezentovat jako vektor daný hmotami jednotlivých iontů. Kosinus úhlu svíraného dvěma vektory se nazývá kosinová podobnost. V molekulárních sítích se nazývá kosinové skóre. Jednotlivé molekuly tvoří uzly sítě a kosinové skóre tvoří spojnice mezi těmito uzly. Důležité je zvolení hranice stanovující, které spojnice budou vidět a které ne. Tímto způsobem se seskupí molekuly s podobnými spektry, a tedy i podobnou strukturou [95-98].

4. Cíle práce

Tato práce si klade následující cíle:

- A) charakterizovat chemickou diverzitu obranných látek vojáků jihoamerických zástupců skupiny *Subulitermes* a rozřadit knihovnu vzorků na jednotlivé druhy
- B) srovnat získanou chemotaxonomickou klasifikaci s genetickou klasifikací sestavenou ze vzorků stejných termitích kolonií
- C) Najít strukturně zajímavé látky v obranném sekretu vojáků, zejména pak polycyklické diterpeny, a pokud by se jednalo o nové látky, co nejlépe je strukturně charakterizovat
- D) Sestavit knihovnu hmotnostních spekter termitích polycyklických diterpenů, která by pomohla s hledáním nepopsaných struktur

E) Najít obecné souvislosti mezi strukturou a hmotnostním spektrem, které by mohly pomoci v porozumění fragmentace termitích polycyklických diterpenů

Východiskem mojí práce je dlouhodobá terénní práce mojí domovské laboratoře Chemie společenského hmyzu (ÚOCHB) v deštných lesích Francouzské Guyany, které jsem se zúčastnil a pomohla mi získat potřebné vzorky. Druhým východiskem pak je spolupráce s belgickou partnerskou laboratoří Evoluční biologie a ekologie (Université Libre de Bruxelles, prof. Y Roisin a jeho studenti), která zajistila genetické analýzy, jichž jsem se také měl možnost zúčastnit.

5. Metody

5.1 Sběr vzorků

První sada vzorků (vzorky v tabulce 1) termitích vojáků byla určena k charakterizaci chemotypů jednotlivých druhů. Extrahoval jsem celá těla termitích vojáků po dobu deseti minut v objemu 2 μ l rozpouštědla na jedince. Druhou sadu vzorků jsem sbíral pro strukturní charakterizaci vybraných látek. Celá těla termitích vojáků jsem extrahoval v hexanu 12 h. Použitý objem rozpouštědla se pohyboval kolem 4 μ l na jedince. Obě sady byly sbírány ve Francouzské Guyaně (okolí přehrady Petit-Saut) v letech 2018–20. Každý vzorek byl vždy tvořen pouze jedinci z dané sebrané kolonie. Spolu s extraktem vojáků jsem od každé kolonie odebral 10 vojáků a 10 dělníků a zafixoval v 80 a 100 % EtOH pro morfologickou a genetickou analýzu. Jako kontrola pro každou kolonii sloužilo 50 do hexanu extrahovaných dělníků, kteří neobsahují obranné látky. Všechny vzorky byly skladovány v -20 °C a při převozu zabaleny do polystyrenového termoboxu.

5.2 Genetická analýza

Genetická delimitace druhů byla provedena Nicolasem Kaczmarekem z Université Libre de Bruxelles. Druhy byly rozděleny pomocí sekvence mitochondriálního genu cytochromoxidázy II (COII). Definice druhů byla sestavena algoritmy *automatic barcode gap discovery method* (ABGM) a *generalized mixed Yule-coalescent model* (GMYC). Kombinace těchto dvou metod umožnila navrhnout hypotézu primárních druhů (PSHs). Obě metody měly podobný výsledek,

lišily se jen v případě druhu *Coatitermes I*, který byl metodou ABGM rozdělen na dvě podskupiny a metoda GMYC ho označila jako jednu skupinu. Po porovnání obou metod a chemických profilů jedinců z rodu *Coatitermes I* jsme se přiklonili k výsledku metody GMYC.

5.3 Analytické techniky

5.3.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro GC měření jsem použil chromatograf TRACE 1310 ve spojení s hmotnostní detektorem ISQ LT typu kvadrupól s elektronovou ionizací. Použil jsem kolonu TG-5MS (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m). Vzorek jsem dávkoval pomocí dávkovače s děličem toku (*split/splitless*) v módu bez děliče toku. Teplotu dávkovače jsem nastavil na 250 °C. Hmotnostní rozsah detektoru jsem nastavil na rozpětí *m/z* 29–650. Sběr dat detektorem jsem nastavil se čtyřminutovým zpožděním, abych zabránil přetěžování detektoru rozpouštědlem. Jako nosný plyn jsem použil helium s průtokem 1,5 ml/min v programu konstantního průtoku. Teplotní program pro měření oplachů vojáků jsem nastavil takto: 50 °C (1 min), následovalo stoupaní 8 °C/min na hodnotu 320 °C (10 min). *Transferline* měla teplotu 260 °C. Pro kontrolu preparace byl použit teplotní program: 50 °C po dobu 0,05 minuty, následovalo stoupaní po 5 °C/min do 60 °C a následně po 30 °C/min na 280 °C drženo 3 min.

5.3.2 Dvoudimenzionální plynová chromatografie s TOF detekcí

Některé vzorky jsem pro další informace o polaritě přítomných látek nebo pro detekci koelujících píků změřil na dvoudimenzionální plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC×GC-TOF-MS; Pegasus 4D, Leco). Jako primární kolonu jsem použil nepolární Rxi (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m). Jako sekundární kolona byla použita polární kolona Zb-5MS (1,980 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m). Vzorky jsem dávkoval pomocí dávkovače s děličem toku (*split/splitless*) v módu bez děliče toku. Teplota injektoru byla nastavena na 250 °C. Před kolonu byla zařazena krátká předkolonka ZB-5MS. Teplotní program jsem použil tento: 50 °C po 1 min, následovalo stoupaní 8 °C/min do teploty 320 °C, která byla držena po dobu 20 min. Modulátor byl čtyřtryskový a efluent byl chlazen pomocí tekutého dusíku. Modulační čas jsem nastavil mezi 3 a 5 sekundami pro různé vzorky, čas horkého pulsu 0,60 s a dobu chlazení 0,90 s. Teplotu *transferline* jsem

nastavil na 260 °C. Jako detektor jsem použil detektor doby letu s otevřeným iontovým zdrojem od firmy LECO. Jeho teplota byla 220 °C. Zpoždění sběru dat jsem nastavil na 400 s, aby nebyl přetěžován iontový zdroj. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min.

5.3.3 Plynová chromatografie s FTIR

Infračervená spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet 6700 s GC-IR rozhraním (Thermo Scientific, USA) ve spojení s GC chromatografem Agilent 6850 s kolonou DB-5 (30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, film 0,25 μm). IR spektrometr je vybaven standardním MIR zdrojem, KBr děličem paprsků a MCT-A detektorem. Přístroj a kyvetový prostor byl proplachován dusíkem. Získaná IR spektra jsou výsledkem 10 skenů každých 2,5 s se spektrálním rozlišením 4 cm⁻¹ s použitím Happ-Genzel apodizační funkce. Pro separaci jsme jako výchozí parametry použili výsledky získané pomocí GC-MS s programem 50 °C (1 min) po 8 °C/min do 320 °C (10 min), které jsme modifikovali s ohledem na technická omezení GC-FTIR uspořádání (maximální teplota pro spojení GC-FTIR 240 °C používaná na *post-run*) na program 50 °C (1 min) po 8 °C/min do 220 °C (90 min) pro isokratickou eluci jednotlivých složek.

5.3.4 Preparativní plynová chromatografie

Preparativní chromatograf je upravený model od firmy Agilent. Jako detektor používá plamenoionizační detektor. Nástřík (5 μl) vzorků jsem provedl pomocí autosampleru s PTV dávkovačem od firmy Gerstel. Teplotní program PTV jsem nastavil: 0 °C po 0,08 min následovalo stoupání po 720 °C/min do 350 °C drženo 2 min. Nakonec pokles 100 °C/min na 250 °C. Teplotní program separace začal na 60 °C, následovalo stoupání po 30 °C/min do 220 °C drženo po 1 min, a nakonec stoupání po 10 °C/min do 290 °C drženo po 1,5 min. Látky jsem separoval na nepolární koloně Rxi-5MS (30 m x 0,53 mm, tloušťka filmu 1,50 μm). Na konci kolony byl křížový dělič toku s jedním portem zaslepeným. Zbylé dva porty dělily tok mezi PFC (preparativní sběrač frakcí) a detektor. Teplota *transferline* jsem nastavil na 320 °C a samotný dělič toku v PFC byl ohříván také na 320 °C. PFC má možnost sbírat šest frakcí, ale tři porty ze šesti jsem zaslepil z důvodu snížení spotřeby tekutého dusíku. Všechny zapojené sběrače frakcí jsem chladil tekutým dusíkem na 0 °C.

5.3.5 HPLC – MS

Látky jsem analyzoval na UHPLC Vanquish Horizon s hmotnostním spektrometrem Orbitrap ID-X. Použil jsem nepolární kolonu ACCUCORE VANQUISH C18+1.5 μm , 150 x 2.1 mm. Průtok mobilní fáze jsem nastavil 0,450 ml/min. Mobilní fáze A byla voda a mobilní fáze B acetonitril. Gradient začal s 95 % A a 5 % B po 0,5 min. Následoval přechod do 100 % fáze B, který trval 15,00 min (skončil v 15,50 minutě RT) a byl držen po dobu 1,80 minuty (17,30 min RT). Nakonec byl nastaven rychlý přechod do 95 % A a 5 % B trvající 0,20 min (17,50 min RT). Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním *full scan* módu (sprejovací napětí 3 kV) v rozmezí 100–1000 *m/z*. Rozlišení bylo nastaveno na 60000. Teplota kapiláry byla 325 °C a teplota vyhřívané ESI sondy byla 350 °C, jako nosný plyn byl použit dusík. Data jsem zpracoval pomocí programu Mzmine 2.

5.3.6 TLC

TLC deska byla hliníková fólie se silikagelem jako stacionární fází s velikostí pórů 60 Å. Velikost částic se pohybovala mezi 5 a 17 μm a tloušťka vrstvy byla 200 μm . Jako mobilní fáze jsem použil směs ethylacetátu s dichlormethanem v poměru 8:2. Látky jsem detekoval pomocí manganistanu draselného a následně sušil po dobu deseti sekund horkovzdušnou pistolí.

5.4 Zpracování dat

5.4.1 Excalibur 3 - manuální zpracování

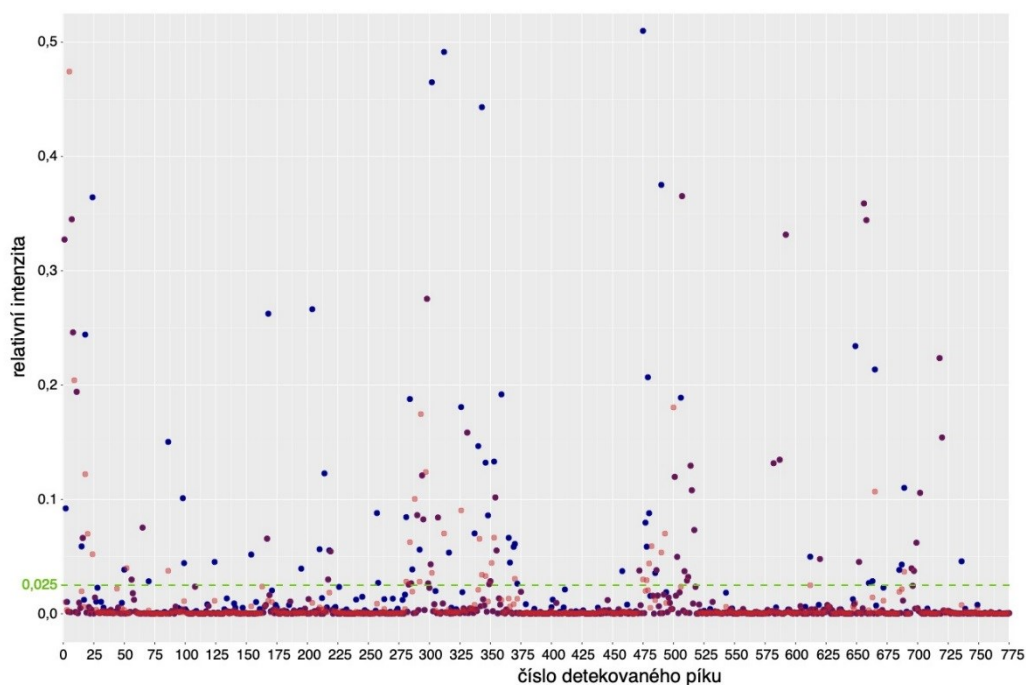
Všechna měřená data jsem manuálně vyhodnocoval v programu Excalibur 3. Chromatogramy z první sady vzorků jsem srovnal podle podobnosti do skupin. Následně jsem prošel detekované majoritní píky a porovnal jejich spektra. Vytipoval jsem tímto způsobem zajímavé látky vhodné pro preparaci a další identifikaci. Vysoký počet vzorků a látek znemožňoval plné manuální zpracování a vzorky tak musely být zpracovány automaticky. U druhé sady vzorků sloužilo manuální vyhodnocení k přibližnému přiřazení sbíraných kolonií k jednotlivým druhům bez potřeby genetické analýzy.

5.4.2 MZmine 2 - (semi)automatická detekce

První sadu naměřených dat jsem nejprve rozřídil do skupin podle přibližně podobných koncentrací látek (**tabulka 1**). Automatická detekce píků se skládala z následujících kroků. Nejprve jsem sestavil tabulku detekovaných hmot pro jednotlivé skeny od jednotlivých vzorků. Do tabulky byly automaticky zahrnuty pouze hmoty vyšší než nastavená hodnota, rozdílná pro každou skupinu. Z takto detekovaných hmot jsem sestavil tabulku hmot náležící každému vzorku. Tabulku hmot jsem zpracoval modulem *ADAP chromatogram builder*. Tento modul vezme jednotlivé hmoty, které je možné detekovat kontinuálně po určený počet skenů a nad určenou hranicí. Detekované body jsou poskládány do chromatogramů náležejících vždy jedné hmotě. Následně jsou připravené chromatogramy dekonvolovány. Chromatogramy jednotlivých hmot byly tedy rozebrány na jednotlivé píky. Vznikla tak tabulka píků jednotlivých hmot. Pro dekonvoluci jsem použil modul *ADAP Wavelets*. Následně jsem provedl spektrální dekonvoluci, tedy proces, při kterém jsou determinovány modelové píky a fragmentační spektra na základě chromatogramů jednotlivých hmot a dekonvolucí z nich navržených píků. Z takto vyhodnocených dat jsem sestavil *alignment list* pomocí modulu *ADAP Aligner (GC)*. Vznikla tak tabulka píků, kde v řádcích jsou jednotlivé látky označené jejich retenčními časy a ve sloupcích jsou jednotlivé vzorky (podrobné nastavení jednotlivých kroků v **tabulce 1**).

Sestavenou tabulku se 44 vzorky a 775 detekovanými analyty jsem exportoval do csv formátu. Tuto tabulku jsem dále zpracoval pomocí programu Rstudio. Udělal jsem sumu všech píků náležících k jednomu vzorku a touto sumou jsem následně podělil všechny plochy píků náležících tomuto vzorku. Tak byla sestavena tabulka relativních ploch píků. Relativní plochy jsem sečetl pro každou látku a přiřadil k tabulce jako další sloupec. Tento sloupec jsem následně vydělil počtem všech nenulových záznamů v řádku a výsledky přiřadil jako druhý sloupec. Sloupec odpovídal průměrným hodnotám ze zaznamenaných ploch. Tyto dva údaje jsem vynesl do grafu a s jejich pomocí určil hodnotu *cutoff* (**obr. 8**).

Z původní tabulky jsem pak smazal všechny záznamy se součtem hodnot menším než 0,025. Následně jsem ručně upravil původní tabulku v programu MZmine. Tedy každý záznam jsem překontroloval a při detekci chyby upravil. Promazaná tabulka sloužila jako pomoc pro zacílení na důležité části. Vznikla tak tabulka o 384 detekovaných analytech, kterou jsem zpracoval v programu R stejným způsobem jako tabulku první. V MZmine jsem následně odmazal kusy, které i tak byly pod hodnotou 0,025. Vzniklou tabulku o 76 analytech jsem vyexportoval jako finální výsledek.



Obr. 8: Graf sumy ploch jednotlivých píků (modrá) a jejich průměrná hodnota (černá) zaznamenaných v první tabulce. Zelená linie je linie cutoff.

Tabulka 1: Vzorky byly rozděleny do tří skupin podle podobné intenzity píků a následně byly rozděleny dvě z těchto skupin na části s vysokou a nízkou základní linií (v průběhu měření proběhla výměna iontového zdroje). Tabulka chronologicky (zleva doprava) popisuje jednotlivé kroky automatického vyhodnocování s rozepsanými nastavitelnými parametry. K jednotlivým parametrům je uvedeno přesné nastavení.

		asymmetric baseline corrector		Mass detector = centroid	min. group size in # of scans	group intensity threshold	min. highest intensity	m/z tolerance	SN threshold	min. feature height	Wavelet (ADAP)						ADAP GC-aligner					
		smoothing	asymmetric								min. coefficient as threshold	Peak duration range	RT window range	Deconvolution window width (min)	Retention time tolerance (min)	Minimum Number of Peaks	min. confidence	RT tolerance	m/z tolerance	score threshold	score weight	
velmi koncentrované	vysoká základní linie G18-008 G19-001 G19-031 G19-103 M05-100	100000	0.005	2×10^4	4	2×10^3	2×10^4	0.03	10	2.5×10^4	110	0.0-1.0	0.01-0.1	0.2	0.05	4	0	0.04	0.03	0.94	0.3	
																						G18-004A
																						G18-018
																						G18-046
																						G18-053
																						G18-102
																						G18-116
																						G18-130
																						G18-201
																						G18-210
koncentrované	vysoká základní linie G19-005 G19-004 G19-005 G19-004 G19-005 G19-005 L14-006 L14-006 P03-030 P03-030 P10-110	100000	0.005	1.5×10^4	4	1.5×10^3	1.5×10^4	0.03	10	2×10^4	110	0.0-1.0	0.01-0.1	0.2	0.05	4	0	0.04	0.03	0.94	0.3	
																						G19-006
																						G19-028
																						G19-029
																						G19-034
																						G19-038
																						G19-046
																						G19-049
																						G19-051
																						L05-10d
nělho koncentrované	vysoká základní linie G18-007 G18-111 G18-194 G18-032 G18-036	100000	0.005	10^3	4	10^3	10^3	0.03	10	5×10^3	110	0.0-1.0	0.01-0.1	0.2	0.05	4	0	0.04	0.03	0.94	0.3	
																						G18-143
																						G18-210
																						G19-009
																						G19-010
																						G19-011
nělho koncentrované	nízká základní linie G18-143 G18-210 G19-009 G19-010 G19-011 L22-10A	100000	0.005	5×10^2	4	5×10^2	5×10^2	0.03	10	5×10^3	110	0.0-1.0	0.01-0.1	0.2	0.05	4	0	0.04	0.03	0.94	0.3	

5.4.3 Chemotaxonomická analýza

Výslednou tabulku jsem opět zpracoval v programu R vybaveném knihovnami *poppr*, *ggtree2*. Všechny plochy v tabulce jsem odmocnil pro snížení rozptylu silně zastoupených analytů (snížení heteroscedasticity) a převedl na relativní plochy. Tabulku jsem zpracoval analýzou základních komponent (*principal component analysis*, PCA). Prvních šest základních komponent pro každý vzorek, které dohromady představovaly 53 % z celkové variability, jsem využil ke spočítání matice vzájemných Euklidovských vzdáleností pro všechny existující páry vzorků, kterou jsem dále považoval za matici „chemických rozdílností“ mezi každou dvojicí vzorků (*dissimilarity matrix*). Tuto matici jsem následně zpracoval shlukovací metodou *Neighbor joining* a zobrazil jako strom chemických podobností (**obr. 11**).

5.4.4 Strukturní analýza.

Počet nenasyceností (R+D) jsem určil ze sumárního vzorce dosazením do předpisu $R+D = a-b/2+1$ za předpokladu, že se v molekule vyskytují pouze prvky C, H a O, kde a je počet uhlíků, b je počet vodíků, kyslíky se nezapočítávají. Předpis je odvoditelný z vaznosti jednotlivých prvků.

Retenční indexy jsem počítal podle Kovatse [99]. Počítal jsem tedy s retenčním časem, nikoliv teplotou. Porovnáním s retenčními indexy počítanými podle van der Doola [100] s retenční teplotou je rozdíl v obou indexech minimální.

Hmotnostní spektra látek detekovaných automatickou detekcí jsem zpracoval metodou molekulárních sítí v programu *MetGem* s nastavením pro výpočet kosinového skóre: tolerance m/z 0,03, minimální počet shodných píků 6. Vizualizace sítě: maximální počet sousedů 10, minimální hodnota kosinového skóre 0,70, maximální velikost připojených komponent 1000. Pro kontrolu byla vygenerována druhá síť pomocí t-SNE algoritmu: alespoň 1 kosinové skóre nad 0,70, počet iterací 1000, *perplexity* 6, učicí rychlost 200, *early exaggeration* 12. Strukturu obou sítí jsem porovnal pro minimalizaci možnosti špatného klastrování kvůli chybnému nastavení vstupních parametrů. Výsledek molekulární sítě jsem porovnal s retenčními časy molekul, jejich hmotnostními spektry a infračervenými spektry. Tímto způsobem jsem určil skupiny látek s charakteristickými funkčními skupinami. Nakonec jsem vybral čtyři látky, které byly podrobeny bližší charakterizaci. První (**I=17** v **tabulce 2**) byla polycyklický diterpen pouze s jednou keto skupinou, ale v průběhu preparace se ukázalo, že se jedná o artefakt látky **II**. Druhá (**II =34**)

náležela k nejčastější skupině látek, tedy polycyklickým diterpenům s jednou hydroxy a jednou keto skupinou. Dalším důvodem jejího výběru bylo její charakteristické dobře interpretovatelné hmotnostní spektrum. Další dva polycyklické diterpeny (**III-IV**) jsem vybral z druhu nalezeného až při druhém sběru a důvodem byla vysoká atypičnost jejich hmotnostních spekter. Nový chemotyp také zatím nebyl zařazen do **tabulky 2**. Mezi první a druhou sadou vzorků byla vyměněna chromatografická kolona a posun retenčních časů značně znáročňuje kompletní srovnání nového chemotypu s již srovnanými vzorky.

5.4.5 Zpracování knihovny hmotnostních spekter

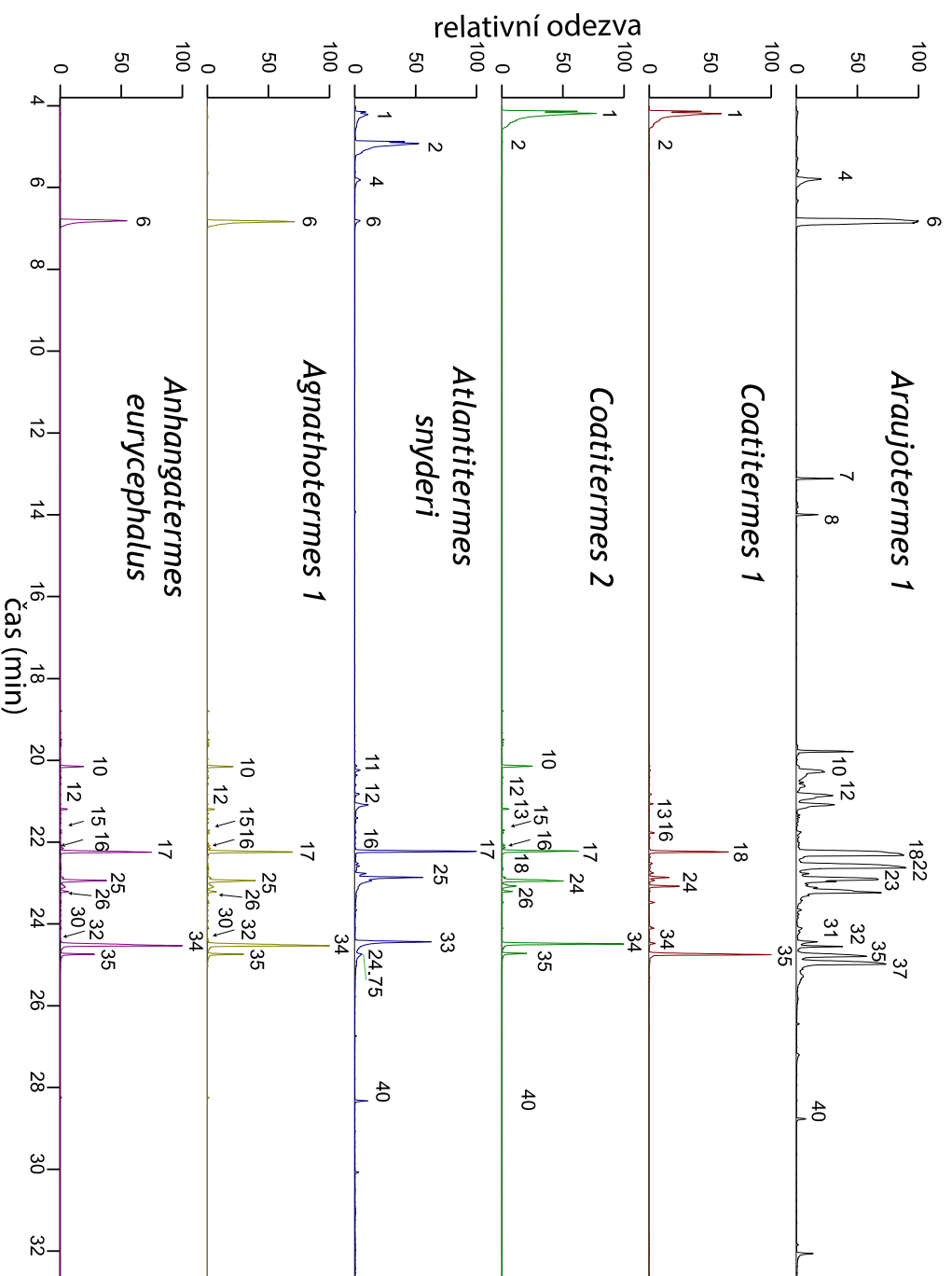
Knihovnu jsem sestavil na základě spekter popisovaných v literatuře. Jednalo se o tabulku, kde řádky byly jednotlivé látky a každý sloupec jedna hmota. Hmoty začínaly od m/z 41 a končily m/z 664. Tabulku jsem dále zpracoval programem Rstudio. Odstranil jsem všechny prázdné sloupce a takto upravenou tabulku statisticky zpracoval. Nejprve jsem tabulku převedl na distanční matici Euklidovských vzdáleností a zobrazil ji jako strom pomocí metody *Neighbor joining* a přiřadil ke stromu *heatmap*, kde ve sloupcích byly vidět jednotlivé hmoty a řádky byly přiřazeny látkám. Druhá metoda byl výpočet kosinových vzdáleností mezi jednotlivými strukturami a jejich zobrazení jako *heatmap* (**obr. 14**). Oba výpočty ukázaly velmi podobné výsledky, nicméně strom s přidruženou *heatmap* byl nepřehledný a špatně čitelný, proto ho v práci neuvádím.

6. Výsledky

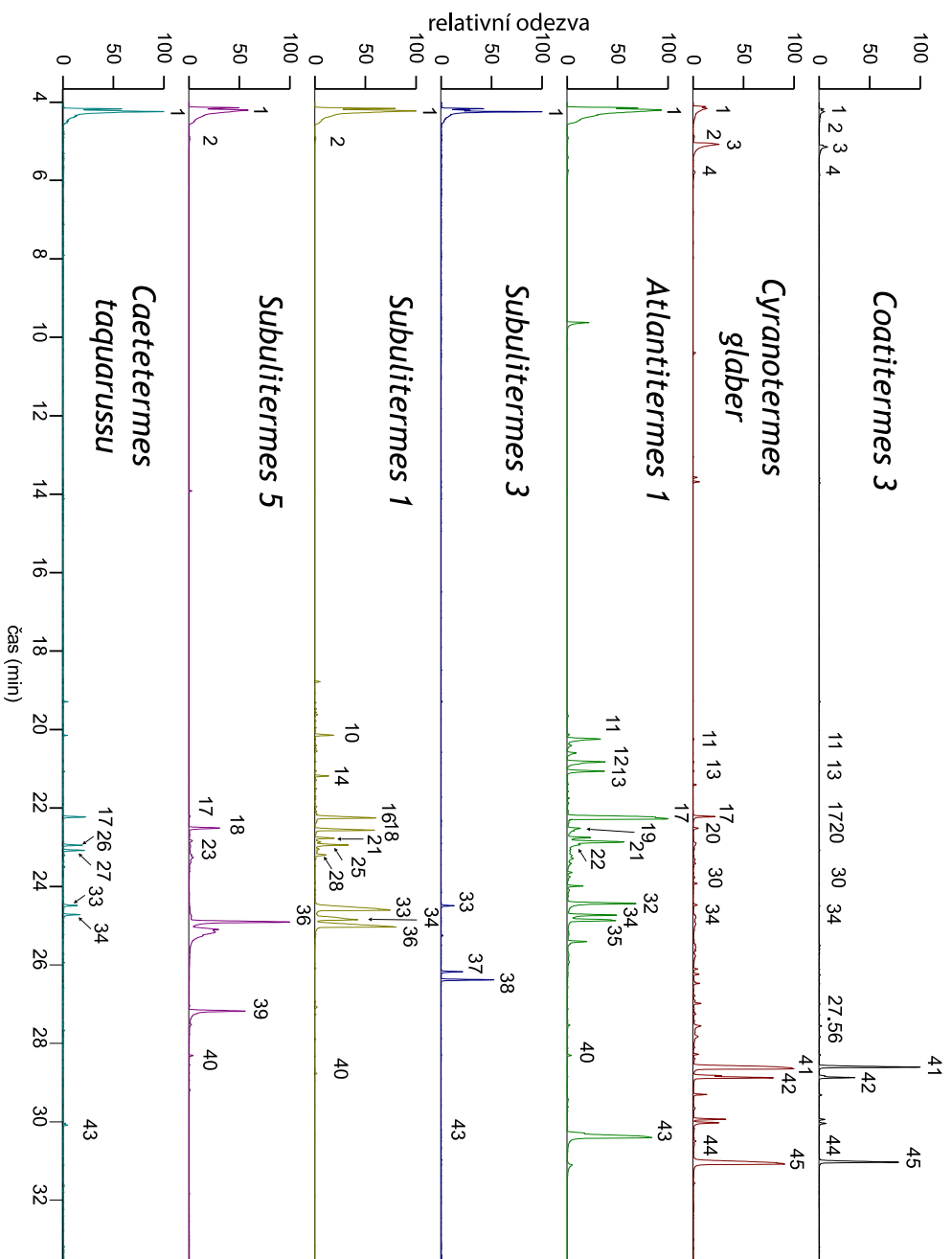
6.1 Předběžné měření a automatické zpracování

První sadu 44 vzorků jsem změřil pomocí jednodimenzionálního GC-MS a pokusil se o ruční vyhodnocení. Chromatogramy jsem nejprve srovnal podle vizuální podobnosti a následně moje srovnání porovnal s genetickou analýzou (**obr. 9–10**). Ukázalo se, že některé skupiny vzorků jde od sebe bezpečně vizuálně rozlišit podle celkových chemických profilů, které reprezentují jednotlivé druhy. Primárně se jednalo o jednotlivé druhy rodu *Subulitermes*, druh *Araujotermes 1*, *Cyranotermes glaber* spolu s *Coatitermes 3* a *Anhangatermes eurycephalus* spolu s *Agnathotermes 1*. Naopak jako velmi obtížně rozlišitelné se jevíly zbylé vzorky rodu *Coatitermes*, dále pak druh *Atlantitermes snyderdi* a *Caetetermes taquarussu*.

Podrobnějším zkoumáním spekter jsem dospěl k názoru, že jsou ve vzorcích přítomny (kromě jiných analytů) mono- a bicyklické monoterpeny a polycyklické diterpeny se čtyřmi druhy funkčních skupin: a) oxo, b) hydroxy a c) dihydroxy d) acetoxy. Monoterpeny byly identifikovány na základě vyhodnocení jejich hmotnostních spekter a následným potvrzením pomocí srovnání jejich retenčních indexů a databázových hmotnostních spekter. Polycyklické diterpeny s jednou a dvěma hydroxy skupinami jsou v literatuře hojně popisovány a podle spekter se některé z mnou detekovaných látek daly přiřadit k již popsaným strukturám. Na druhou stranu, polycyklických diterpenů s jednou keto skupinou je v literatuře popsáno jen velmi málo. Vybral jsem proto reprezentativní vzorky od každého druhu a nechal je změřit pomocí GC-FTIR. IR spektra jsem následně srovnal s hmotnostními. IR spektra vesměs potvrdila funkční skupiny odhadnuté na základě hmotnostních spekter. Výjimkou byly polycyklické diterpeny s dvěma hydroxy skupinami. Píky eluující mezi 24. a 25. minutou podle hmotnostních spekter vyhodnocené jako dioly vykazovaly pásy v oblasti kolem 3629 cm^{-1} a 1723 cm^{-1} , které jsem přiřadil k jedné hydroxy skupině a jedné keto skupině. EI-MS těchto látek ovšem vykazuje molekulární iont s $m/z = 304$ a to odpovídá sumárnímu vzorci $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Počet cyklů a dvojných vazeb je tedy roven 5. Struktury zaznamenané v literatuře, pokud nemají dvojně vazby přidané z kyslíkatých funkčních skupin, mají R+D rovno právě pěti ve všech pěti typech uhlovodíkového skeletu. Tento poznatek je v souladu s předpokládanou společnou biosyntetickou cestou z jednoho monocyklického diterpenového prekurzoru. Na základě EI-MS a IR navržené struktury mají R+D rovno pěti, ale s připočtenou dvojnou vazbou z keto skupiny. V uhlovodíkovém skeletu tedy chybí pravděpodobně jedna dvojná vazba.



Obr. 9: Srovnání chemických profilů druhů obsahujících polycyklické diterpeny s hydroxy a keto skupinou jako hlavní komponentou. Čísla odkazují k označení látek v **tabulce 2** (*Araujotermes 1*, *Coatitermes 1*, *Coatitermes 2*, *Atlantitermes snyderi*, *Agnathotermes 1*, *Anhangatermes eurycephalus*)



Obř. 10: Srovnání chemických profilů druhů obsahující polycyklické diterpeny s acetátem jako funkční skupinou jako hlavní komponentu. Čísła odkazují k označení látek zaznamenaných v tabulce 2 (Cyranotermes glaber, Coaititermes 3, Atlantitermes 1, Subulitermes 3, Subulitermes 1, Subulitermes 5, Caetetermes taquarussu).

6.2 Dendrogram

Analyzoval jsem celkově 44 vzorků rozdělených do 13 druhů pomocí genetické analýzy. Jednotlivé druhy se lišily v počtu vzorků, které jsem měl k dispozici: *Coatitermes 1* = 15 vz., *Atlantitermes snyderdi* = 9 vz., *Coatitermes 2* = 7 vz., *Araujotermes 1* = 3 vz., *Atlantitermes 1* = 2 vz., ostatní druhy po jednom vzorku (**obr. 11**). Dobře se vyčlenily druhy *Araujotermes 1*, *Atlantitermes snyderdi*, *Coatitermes 1* a *2*, které nicméně byly problematické v odlišení mezi sebou. Dál je poměrně dobře vyčleněný *Atlantitermes 1*. Na druhou stranu u některých druhů nelze vyloučit chybu v přípravě a práci se vzorkem, protože jejich chemické profily se naprosto shodují s profily jiných druhů.

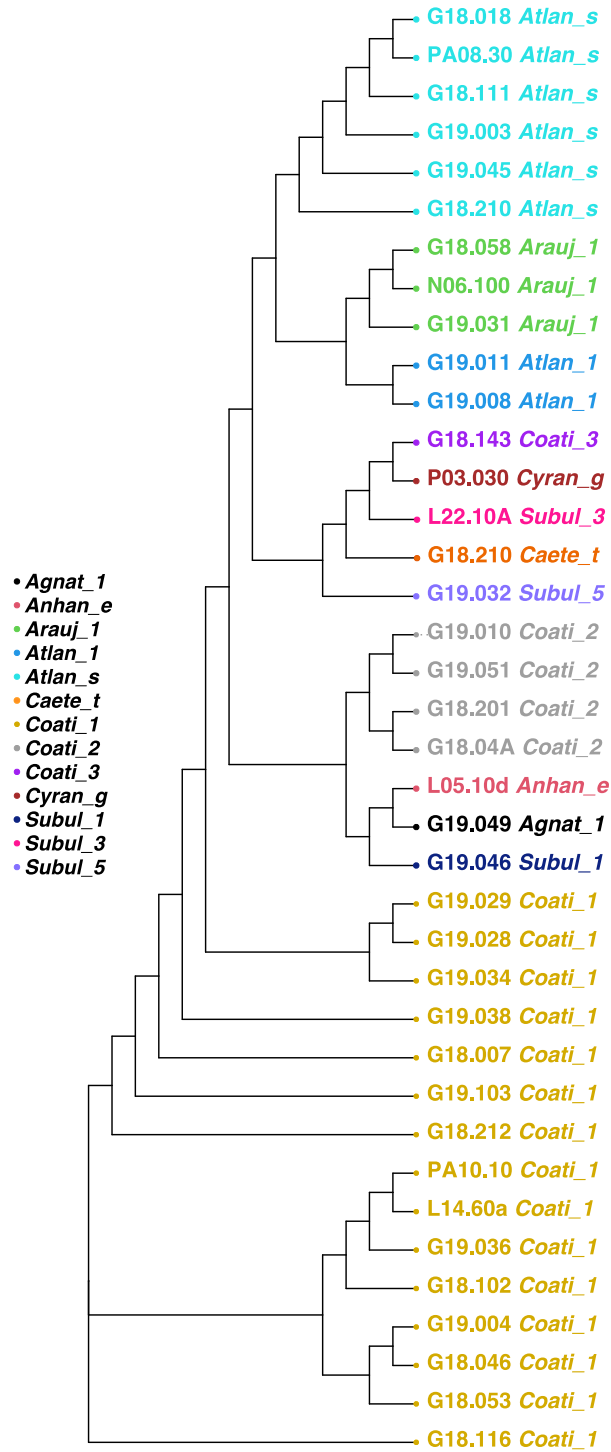
Druhy *Coatitermes 1* a *2* se vyznačují vysokou podobností a pro potvrzení jejich rozdělení dle druhové identity jsem provedl PCA analýzu, která potvrdila jejich separaci (**obr. 12 nahoře**). Chemické profily jsou i vnitrodruhově dosti variabilní. Některé vzorky měly příliš nízkou koncentraci a malý objem znemožňoval jejich zahuštění, a tak je nebylo možné zařadit do statistického zpracování. Tato variabilita znesnadňuje jejich chemický popis. Pro srovnání druhů *Coatitermes 1* a *2* jsem plochy píků po odmocninné transformaci a převedení na relativní proporce píků zprůměroval a vynesl s odchylkami do grafu (**obr. 12 dole**). Pro oba druhy je typická přítomnost velkého píku monoterpenů α - a β - pinenu, přítomnost diterpenů s jednou keto skupinou s RI=2183 (**17**) a diterpenů s jednou hydroxy a jednou keto skupinou s RI=2430 (**34**) (**obr. 9 a 12**). Velmi dobře se vyčlenil druh *Araujotermes 1*, a to zejména díky přítomnosti málo koncentrovaných monoterpenů limonenu, γ -terpinenu a 3-carenu, a dvěma seskviterpenům nenalezeným i u jiných druhů, tj. humulenu a δ -cadinenu. Dále pro něj byly typické diterpeny s RI=2448 (**36**), 2430 (**34**) a 2361 (**31**). Chemický profil druhu *Atlantitermes snyderdi* se pohyboval mezi chemickými profily druhů *Araujotermes 1* a *Coatitermes 1* a *2*. Monoterpenická složka byla složena z obou pinenů, limonenu a 3-carenu. Velmi typická pro něj je absence diterpenů s RI=2430 (**34**). Dvojice *Cyranotermes glaber* a *Coatitermes 3* a *Agnathotermes 1* a *Anhangatermes eurycephalus* (**tabulka 2**) se naprosto shodují svými chemickými profily a pro nedostatek vzorků není možné říct, zda došlo k chybě ve vzorkování nebo jsou profily autentické. Pro *Atlantitermes 1* mám pouze dva vzorky, ale jejich chemický profil je velmi specifický a shoduje se u obou vzorků. Všechny druhy lze dále rozdělit na dvě skupiny podle toho, zda vytvářejí primárně diterpeny s funkčními

skupinami hydroxy a oxo (*Agnathotermes 1*, *Anhangatermes eurycephalus*, *Araujotermes 1*, *Atlantitermes snyderi*, *Subulitermes 1*, *Caetetermes taquarussu* a *Coatitermes 1 a 2*; **(obr. 9)**) nebo diterpeny se základním píkem m/z 43 a výrazně vyšší retencí, přiřazené k acetátem několikanásobně substituovaným diterpenům (*Cyranotermes glaber*, *Coatitermes 3*, *Subulitermes 3*, *Subulitermes 5*, *Atlantitermes 1*; **(obr. 10)**).

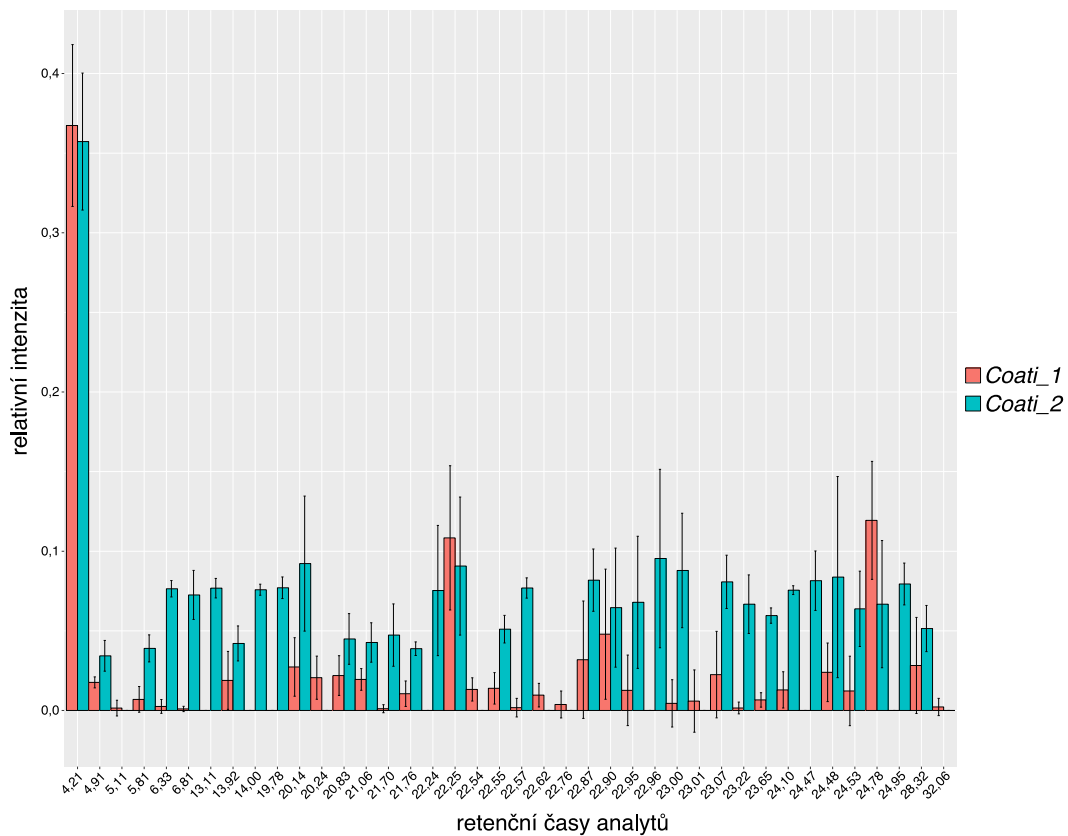
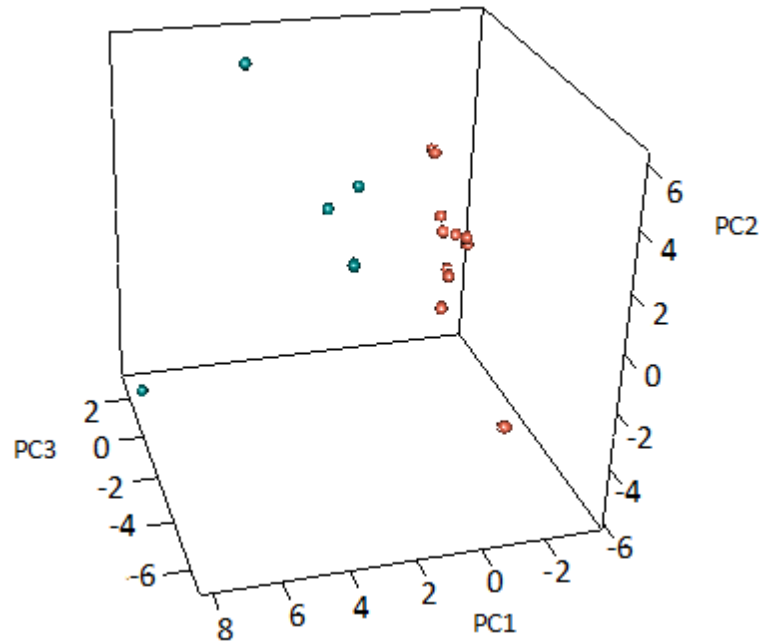
Tabulka 2: Tabulka s detekovanými látkami přiřazených do skupin podle struktur a funkčních skupin, jejich retenčním časem a retenčním indexem (RI). Tečky znázorňují přítomnost látky v oplachu vojáků jednotlivých druhů (*Cynanotermes glaber*, *Coatitermes 3*, *Atlantitermes 1*, *Subulitermes 3*, *Subulitermes 1*, *Subulitermes 5*, *Coatitermes taquarussu*, *Araujotermes 1*, *Coatitermes 1*, *Coatitermes 2*, *Atlantitermes snyderi*, *Agnathotermes 1*, *Anhangotermes eurycephalus*)

číslo látky	Typ	Název	Retenční čas	RI	<i>Agnat_1</i>	<i>Anhan_e</i>	<i>Arauj_1</i>	<i>Atlan_3</i>	<i>Cynan_3</i>	<i>Coat1_3</i>	<i>Subul_1</i>	<i>Subul_3</i>	<i>Subul_5</i>	<i>Coet_1</i>	<i>Coat1_1</i>	<i>Coat1_2</i>	<i>Atlan_1</i>
1	dicyklický monoterpen	α -pinen	4,21	980	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
2	dicyklický monoterpen	β -pinen	4,91	1012	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3	lineární monoterpen	myrcen	5,11	1021	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
4	monocyklický monoterpén	limonen	5,81	1038	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
5	monocyklický monoterpén	γ -terpinen	6,33	1068	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
6	dicyklický monoterpen	3-carenen	6,81	1092	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
7	monocyklický seskviterpen	humulen	13,11	1470	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
8	dicyklický seskviterpen	δ -cadinen	14,00	1529	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
9	diterpen-bez funkčních skupin	-	19,78	1965	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
10	diterpen-bez funkčních skupin	-	20,14	1995	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
11	diterpen-bez funkčních skupin	-	20,24	2003	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
12	diterpen-bez funkčních skupin	-	20,83	2055	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
13	diterpen-bez funkčních skupin	-	21,06	2075	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
14	lineární terpen	-	21,70	2132	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
15	diterpen-keeton	-	21,76	2138	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
16	diterpen-keeton	-	22,24	2182	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
17	diterpen-keeton (I)	-	22,25	2183	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
18	diterpen-keeton	-	22,54	2210	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
19	diterpen-keeton	-	22,55	2211	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
20	diterpen-keeton	-	22,57	2213	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
21	diterpen-hydroxid	-	22,76	2231	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
22	diterpen-hydroxid	*	22,87	2242	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
23	diterpen-keeton	-	22,90	2245	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
24	diterpen-hydroxid	**	22,94	2249	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
25	diterpen-keeton	-	22,95	2250	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
26	diterpen-keeton	-	22,96	2251	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
27	diterpen-hydroxid, keeton	-	23,07	2261	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
28	diterpen-hydroxid	-	23,21	2274	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
29	diterpen-keeton, acetal	-	23,22	2275	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
30	diterpen-hydroxid, keeton	-	23,65	2317	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
31	diterpen-keeton, acetal	-	24,10	2361	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
32	diterpen-hydroxid, keeton	-	24,46	2397	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
33	diterpen-hydroxid, keeton	-	24,48	2399	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
34	diterpen-hydroxid, keeton (II)	3-hydroxy-2-oxoox(II)-trimerian	24,78	2430	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
35	lineární terpen	-	24,95	2448	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
36	diterpen-hydroxid, keeton	-	24,95	2448	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
37	diterpen-acetal	2 β ,3 α ,9 α -triacetoxý-1(15),8(19)-trimerianol	26,18	2579	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
38	diterpen-acetal	-	26,38	2616	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
39	diterpen-acetal, keeton	-	27,18	2710	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
40	lineární triterpen	skvalen	28,32	2852	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
41	-	-	28,66	2894	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
42	diterpen-acetal	-	28,88	2922	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
43	diterpen-acetal	-	30,38	3124	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
44	diterpen-acetal	-	30,41	3128	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
45	diterpen-acetal	-	31,08	3222	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Pozn.: * a ** Obě spektra jsou si velmi podobná a shodují se se spektrem 9 α -hydroxy-1(15),8(19)-trimerianol nebo 2 α -hydroxy-1(15),8(9)-trimerianol



Obr. 11: Fylogenetický strom skupiny Subulitermes s odstraněnými větvemi, které byly mylně automaticky přiřazeny (*Cyranotermes glaber*, *Coatitermes* 3, *Atlantitermes* 1, *Subulitermes* 3, *Subulitermes* 1, *Subulitermes* 5, *Caetetermes taquarussu*, *Araujotermes* 1, *Coatitermes* 2, *Atlantitermes snyderi*, *Agnathotermes* 1, *Anhangatermes eurycephalus*).



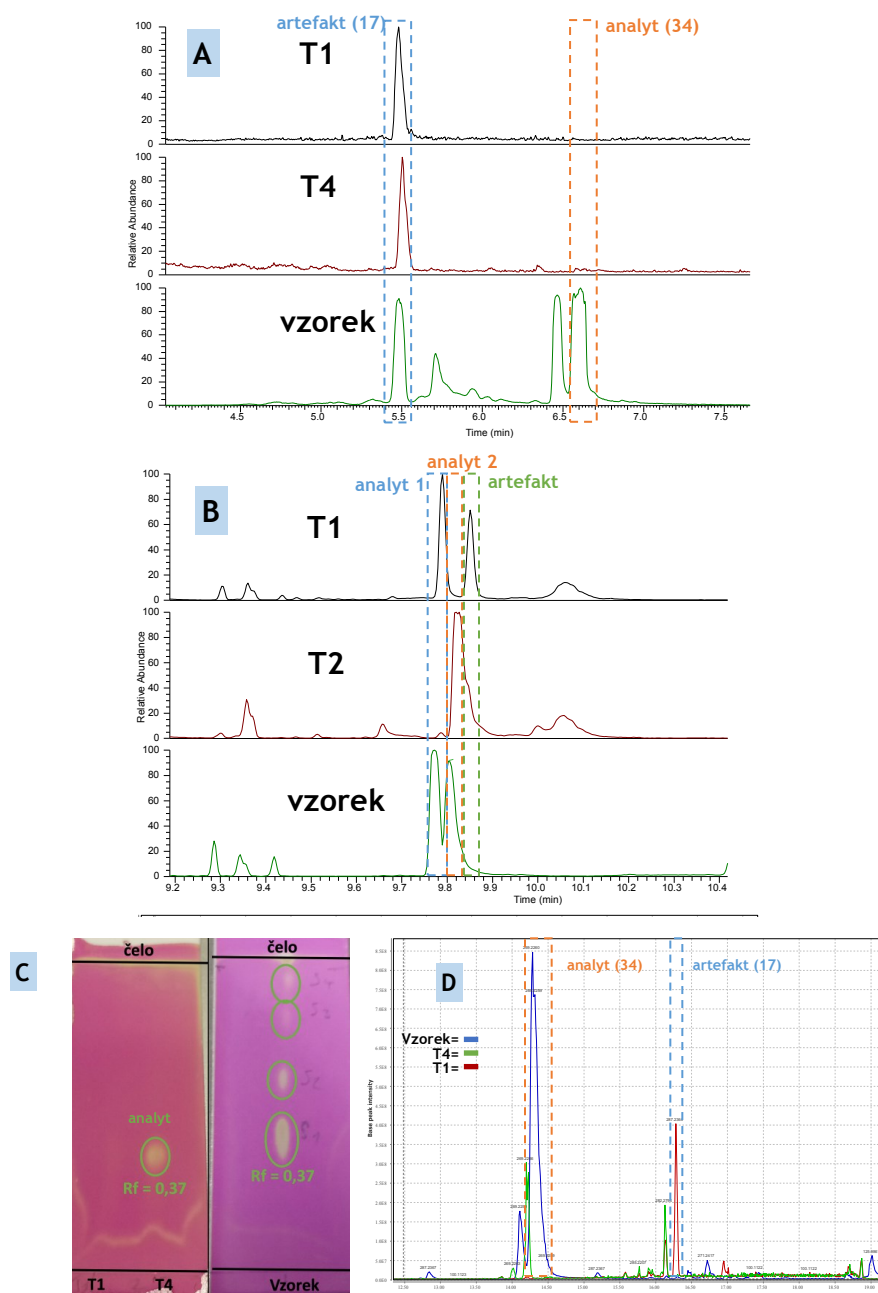
Obr. 12: Srovnání dvou velmi blízkých druhů *Coatitermes 1* a *Coatitermes 2* na základě relativních ploch píků. Nahoře 3D zobrazení PCA, dole sloupcový graf znázorňující průměr relativních ploch ze všech vzorků od každého druhu (chybová úsečka značí směrodatnou odchylku).

6.3 Preparace vybraných látek ze směsi

Pro preparaci byly vybrány čtyři diterpenické struktury. První dvě (**I**, **II**) z preparovaných látek jsem vybral proto, že jde o diterpeny vyskytující se u druhů *Coatitermes 1* a *2*, jejichž výskyt je ve Francouzské Guyaně v námi navštívených lokalitách častý, a tedy i počet vzorků a jejich celková kvantita byly dostačující. První z těchto dvou látek **I (17)** RI=2183 byla určena jako keton a měla viditelný molekulární iont na m/z 286 a výrazné fragmenty m/z 135, 175 a 187. V IR měla velmi silný pík v pásu 1722 cm^{-1} , který je přiřazen keto skupině. Podrobnější analýza ukázala, že keto skupina vzniká jako artefakt tepelným rozkladem nativního diterpenu pravděpodobně v inletu GC. Druhá látka **II (35)** RI=2430 má $M^+ = 304$ a velmi výrazné fragmenty $m/z = 135$ a 151 (**obr. 21 C**). IR spektrum ukázalo zajímavé pásy 3629 , 3080 , 3009 , 1723 a 1635 cm^{-1} , které indikují skupiny hydroxy, geminální dvojnou vazbu a keto. Obě látky se vyskytují ve stejných vzorcích. Preparace proběhla na plynovém chromatografu s připojeným PFC a PTV jako injektorem. Při optimalizaci postupu preparace byly sběrné pasti proplachovány *n*-hexanem, následně deuterovaným dichlormethanem při preparaci pro analýzu NMR. Čistotu vypreparované frakce jsem zkontroloval pomocí GC-MS. Nejprve jsem preparoval čtyři *n*-alkany (C_{24} - C_{26}) s elučními časy pokrývajícími rozpětí elučních časů preparovaných látek, pro kontrolu kvality postupu. Následovala zkouška preparace terpenoidů, kde při kontrole byly nalezeny v obou frakcích sbíraných v rozdílných časech píky se stejným spektrem i retenčním časem. Opět jsem preparativní chromatograf přečistil a zkontroloval funkčnost solenoidových kohoutů, hadiček propojujících solenoidové kohouty a skleněné trapy, a čistotu a kvalitu propojení děliče toku (jak v PFC tak ve vlastním chromatografu) se skleněnými trapy. Vše bylo v pořádku, kontrolní uhlovodíky se dobře preparovaly. Látky se tedy asi rozkládaly někde v plynovém chromatografu a první látka byla artefaktem tepelného rozkladu látky druhé. Nejpravděpodobnější místa rozkladu v preparativním GC budou v inletu nebo v děliči toku v PFC. Preparované frakce i původní vzorek jsem změřil na TLC a HPLC-MS/MS (**obr. 13**). Separaci směsi na TLC jsem dostal čtyři viditelnější píky, z čehož jeden byl obzvlášť výrazný. Při separaci obou frakcí jsem detekoval jednu skvrnu ve frakci s druhou látkou a žádnou ve frakci s první. Podle GC-MS měly mít oba vzorky podobnou koncentraci stejné látky z první frakce. Detekoval jsem pouze jednu skvrnu ve vzorku s frakcí 4, která navíc retenčně odpovídá nejpolarnější látce ve vzorku.

Měření HPLC-MS/MS ukázalo, že ve frakci číslo dvě je jedna čistá látka, která se vyskytuje ve vzorku, v první frakci byla detekována jedna látka, která se ve vzorku nevyskytuje. Látky se tedy pravděpodobně rozkládají v inletu. Chyby zde byly tedy v detekci, a ne v samotné látce. Všechny vypreparované vzorky byly tedy odpařeny a převedeny do deuterovaného dichlormethanu. První frakce byla označena jako artefakt a dále nebyla preparována.

Další dvě látky (**III-IV**) byly ze zatím nepopsaného druhu a byly vybrány pro vysokou atypičnost svého hmotnostního spektra. Jednalo se tedy o jinak substituovaný diterpen, který by se nemusel při analýze rozkládat. Tomu také napovídala absence artefaktů v měření pomocí GC-MS. Nalezeny byly ve třech vzorcích z druhé várky. Morfologicky odpovídají druhům patřících do skupiny *Subulitermes*, ale svým chemickým profilem jsou nezařaditelné. Genetická analýza na nich ještě nebyla provedena. Zde nejprve nebyl problém v preparaci ani v potvrzení preparace. Nicméně po více opakování se začal ve vzorcích objevovat neznámý artefakt. Nejprve byl opět přiřazen k rozpadu v inletu, ale po změření NMR spekter vyšlo najevo, že tepelný rozpad probíhá až v PFC a znečišťuje preparát.



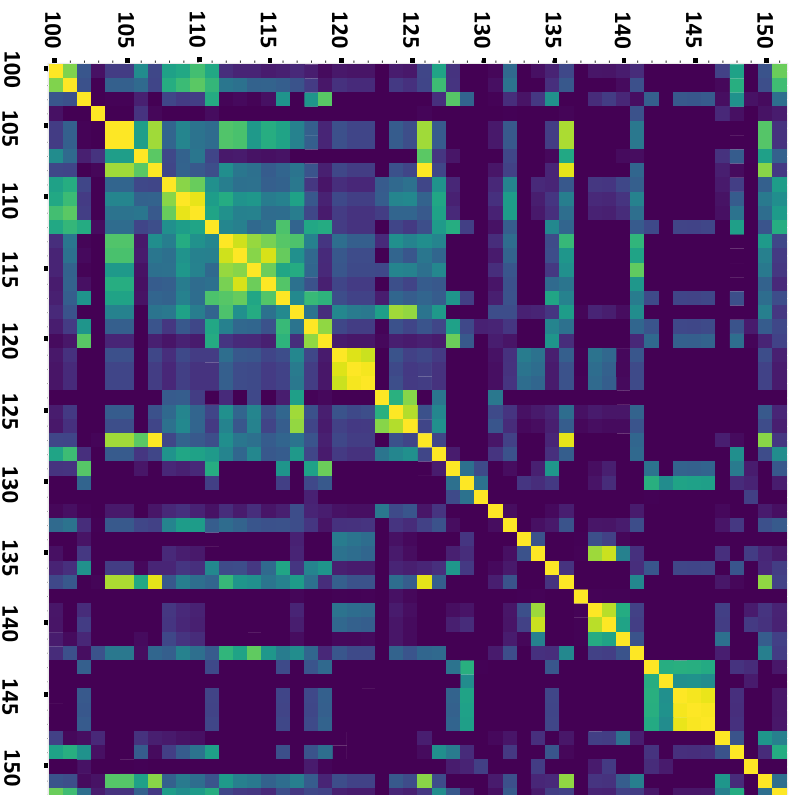
Obr. 13: Výsledky preparace 4 (I-IV) analytů (v A, C, D ze vzorku *Coatitermes I*, v B ze vzorku neznámého termity) a potvrzení jejich tepelného rozkladu v inletu plynového chromatografu. **A** - srovnání kontroly preparace na GC-MS frakce T1 (I), do které byl jímán artefakt frakce T4 s analytem (II) a vlastní vzorek druhu *Coatitermes I*. **B** - srovnání kontroly pomocí GC-MS frakce T1 s analytem 1 (III) frakce T2 s analytem 2 (IV) a vzorku neznámého druhu. **C** - TLC srovnání vzorku druhu *Coatitermes I* s frakcí s artefaktem I (T1) a frakcí (T4) s analytem II. **D** - HPLC-MS analýza stejných vzorků T1 (červená) artefakt (I), T4 (zelená) analyt (II), vzorek (modrá).

6.4 Knihovna hmotnostních spekter diterpenů

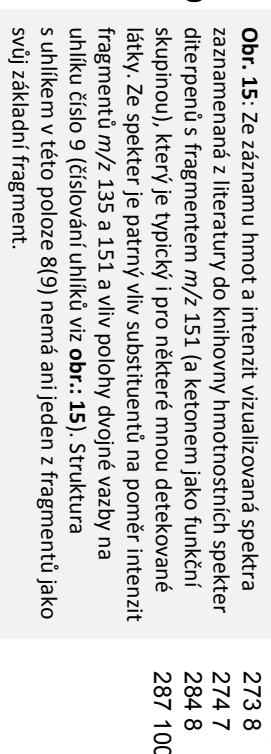
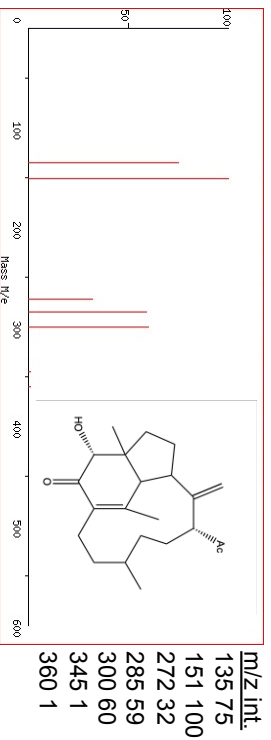
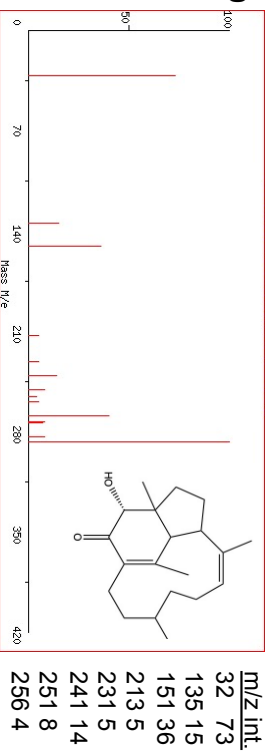
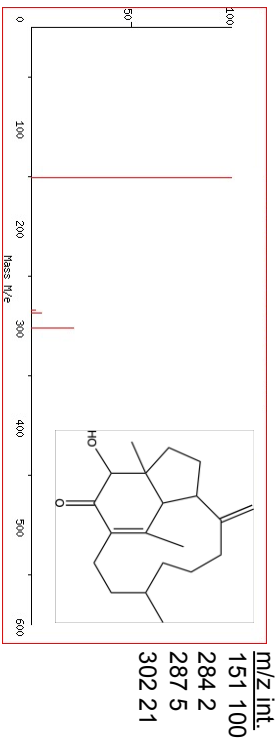
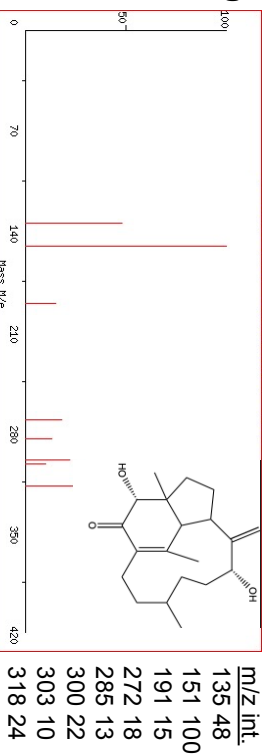
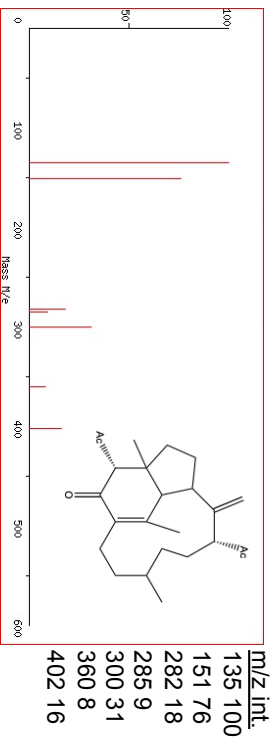
Knihovnu spekter jsem vytvořil na základě v literatuře dostupných spekter identifikovaných látek a obsahuje 54 struktur. Při zpracování dostupných dat jsem narazil na několik problémů, díky kterým je mnou zaznamenaných látek méně než celkově popsanych. Některá hmotnostní spektra jsou zaznamenána pouze s vysokým rozlišením. Druhý problém byl se starší literaturou, kde se často objevují spektra bez intenzity fragmentů a někdy nejsou dohledatelné publikace s popsáním spektrem. Souhrnně knihovna obsahuje 6 spekter secotrinervitanů, 41 spekter trinervitanů, 3 spektra kempenů, 2 spektra rippertenů a 1 spektrum longipenu. Nejčastěji se vyskytuje 1(15), 8(19)-trinervitadien s 20 zaznamenanými strukturami. Analýza knihovny spekter byla provedena pomocí shlukovacích metod PCA, K-means t-SNA, ale bez uspokojivého výsledku. Pokusil jsem se tedy seskupit látky pomocí obyčejného výpočtu Euklidovské vzdálenosti a zobrazil jsem ji shlukovacím algoritmem v dendrogramu. Druhá metoda, kterou jsem se pokusil najít podobnost mezi jednotlivými látkami, je kosinová vzdálenost a zobrazil jsem jí jako heatmap. Obě tato zobrazení došla k podobným výsledkům (**obr. 14**). Obrázek 14 ukazuje pouze výsledky kosinové podobnosti, protože jsou si oba výsledky podobné a vizualizace dendrogramu byla značně nepřehledná.

Názvy látek zařazených do statistického zpracování

3a-hydroxy-7(8),11(12),15(17)-secotinviatlen - 100
2g,3a-dihydroxy-7(8),11(12),15(17)-secotinviatlen - 101
3a,10a-diacetoxy-7(8),11(12),15(17)-secotinviatlen - 102
3o-acetoxy-7(8),11(12),15(17)-secotinviatlen - 103
10g-acetoxy-3g-hydroxy-7(8),11(12),15(16)-secotinviatlen - 104
6g-acetoxy-3g-hydroxy-7(8),11(12),15(16)-secotinviatlen - 105
3a-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 106
9g-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 107
2a,3a-dihydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 108
2a,3g-dihydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 109
2g,3a-dihydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 110
3o-acetoxy-2g-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 111
3p-acetoxy-2c-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 112
2o-acetoxy-3g-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 113
3o-acetoxy-2a-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 114
2a,3a-diacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 115
2a,3g-diacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 116
3a,9a-diacetoxy-2-o-xo-1(15),8(19)-hinerviatlen - 117
2g,3a,9a-hiacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 118
2g,3a,13a-hiacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 119
2g,3a,9a,13g-hiacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 120
2g,3a,9a,11x-hiacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 121
2g,3a,9a,11x-hiacetoxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 122
2g,3a,9a,11x-hiacetoxy-2-o-xo-1(15),8(19)-hinerviatlen - 123
3o-hydroxy-2-o-xo-1(15),8(19)-hinerviatlen - 124
9a-acetoxy-3c-hydroxy-2-o-xo-1(15),8(19)-hinerviatlen - 125
3a,9p-dihydroxy-2-o-xo-1(15),8(19)-hinerviatlen - 126
2a-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 127
2a,3p-dihydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 128
3a,9g,13a-hiacetoxy-15(17),11(12)-hinerviatlen - 129
9g-acetoxy-3a,13a-dipropiony-15(17),11(12)-hinerviatlen - 130
3a,13o-diacetoxy-9p-propiony-15(17),11(12)-hinerviatlen - 130
2-o-xo-3g-hydroxy-1(15),8(19)-hinerviatlen - 131
2g,3o-dihydroxy-1(15),11(12)-hinerviatlen - 132
9g-acetoxy-13o-xo-3g-propiony-1(112),15(17)-hinerviatlen - 133
13o-xo-3a,9p-dipropiony-1(112),15(17)-hinerviatlen - 134
3a,13a-diacetoxy-1(12),15(17)-hinerviatlen - 135
3c-hydroxy-1(2),11(12)-hinerviatlen - 136
11g,12g-epoxy-3a,9g,13a-dihydroxy-15(17)-hinerviatlen - 137
11g,12g-epoxy-3a,9g,13a-dipropiony-15(17)-hinerviatlen - 138
9g-acetoxy-11g,12g-epoxy-3a,13a-dipropiony-15(17)-hinerviatlen - 139
11g,12g-epoxy-3a,13a-dipropiony-15(17)-hinerviatlen - 140
9g-acetoxy-11g,12g-epoxy-13a-hydroxy-3o-propiony-15(17)-hinerviatlen - 141
3g,8g-epoxy-2a-hydroxy-1(15)-hinerviatlen - 142
17a-acetoxy-8g,19-epoxy-7a-hydroxy-17-methyl-2g,3a,9a,14c-ketopropiony-1(15)-hinerviatlen - 143
17a-acetoxy-8g,19-epoxy-7a-hydroxy-2g,3a,9a,14c-ketopropiony-1(15)-hinerviatlen - 144
17a-acetoxy-8g,19-epoxy-7a-hydroxy-2g,3a,9g,14a-ketopropiony-1(15)-hinerviatlen - 145
17a-acetoxy-8g,19-epoxy-7a-hydroxy-2g,3a,9a,14c-ketopropiony-1(15)-hinerviatlen - 146
3a-hydroxy-8(19)-kempen - 147
9a-hydroxy-8(19)-kempen - 148
3a,6a-diacetoxy-10-o-xo-20-kacetoxy-1(112)-kempen - 149
3a-hydroxy-15(16)-pipiten - 150
3c-hydroxy-15(17)-hngipen - 151

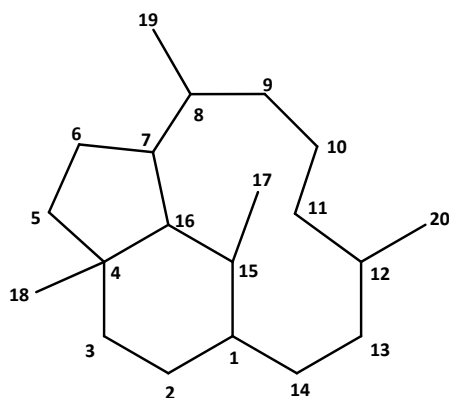


Obř. 14: Vypočtená kosinová vzdálenost vizualizovaná jako *heatmap*. Čím jsou si struktury podobnější tím vyšší je jejich kosinové skóre. Žlutá pole ukazují nejvyšší podobnost a fialová nejnižší. Jednotlivým strukturám jsem přiřadil čísla, která odpovídají číslům na okrajích. Nápadná je velká oblast struktur 105 - 128 náležící primárně 1(15), 8(19)-trinerviatlenům s primárně acetoxy a hydroxy funkčními skupinami, která se dále rozlišuje do menších podskupin podle podobnosti kombinace funkčních skupin. Zajímavá je podoblast 124 - 126 spolu s 117, do které patří hlavně struktury s ketonem jako funkční skupinou a 8(19) dvojnou vazbou. Zdá se, že na spektru má primární vliv povaha substituentů a poloha dvojných vazeb a až sekundární typ skeletu. Nicméně nedostatek spekter tetracyklických diterpenů a převaha 1(15), 8(19)-trinerviatlenů neumožňují tento závěr potvrdit.



Obř. 15: Ze záznamu hmot a intenzit vizualizovaná spektra zaznamaná z literatury do knihovny hmotnostních spekter diterpenů s fragmentem m/z 151 (a ketonem jako funkční skupinou), který je typický i pro některé mrou detekované látky. Ze spekter je patrný vliv substituentů na poměr intenzit fragmentů m/z 135 a 151 a vliv polohy dvojně vazby na uhlíku číslo 9 (číslování uhlíků viz **obr. 15**). Struktura s uhlíkem v této poloze (8(9)) nemá ani jeden z fragmentů jako svůj základní fragment.

6.5 Obecné trendy v EI-MS fragmentaci polycyklických diterpenů termitů

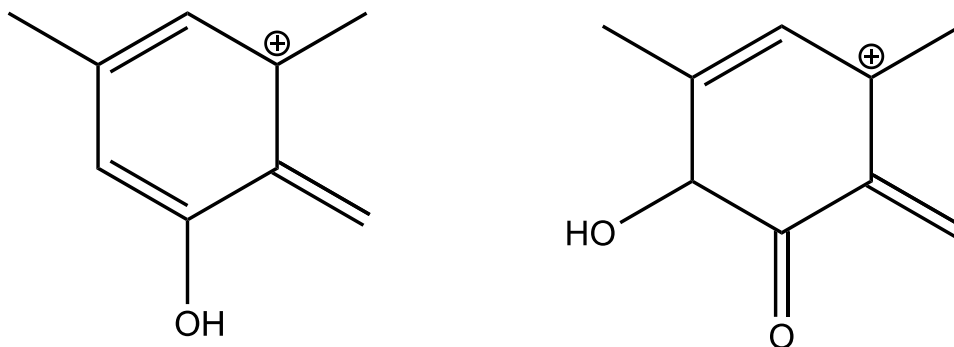


Obr. 16: Modelový skelet trinervitanu s vyznačeným číslováním uhlíků.

6.5.1 Fragментy m/z 135 a 151

Fragment m/z 151 obsahují v knihovně spekter pouze struktury, které mají na uhlíku číslo 2 keto skupinu nebo hydroxy skupinu a na uhlíku číslo 3 hydroxy nebo acetoxy skupinu (**obr. 15**). Intenzita fragmentů závisí na kombinaci substituentů. Pokud je na druhém uhlíku keto skupina, na třetím hydroxy a dvojná vazba v poloze 8(19) (**obr. 16** ukazuje číslování trinervitanového skeletu), pak je m/z 151 základním fragmentem spektra. Pokud je hydroxy skupina nahrazena acetátem, bude základním fragmentem m/z 135 a m/z 151 bude stále poměrně vysoký. Pokud je dvojná vazba přesunuta do polohy 8(9), pak jsou oba píky stále přítomny, ale nejedná se již o intenzivní píky. Fragment m/z 151 má pravděpodobně sumární vzorec $C_9H_{11}O_2$ (**obr. 17**). Poznatky o intenzitách tomu odpovídají. Acetát tu bude pravděpodobněji odstupovat jako celá skupina a nezanechá na molekule atom kyslíku. Strukturní návrh obou fragmentů je vidět na obrázku (**obr. 17**).

Pokud jsou přítomny dvě hydroxy skupiny nebo hydroxy skupina a acetát na třetím uhlíku, závisí intenzita píků na substituci na uhlíku číslo 9. Fragment m/z 151 má nejvyšší intenzitu v případě, že jsou obě skupiny -OH a dvojná vazba má polohu 8(9). Celková fragmentace je silně



Obr. 17: Navržené fragmenty m/z 135 a 151.

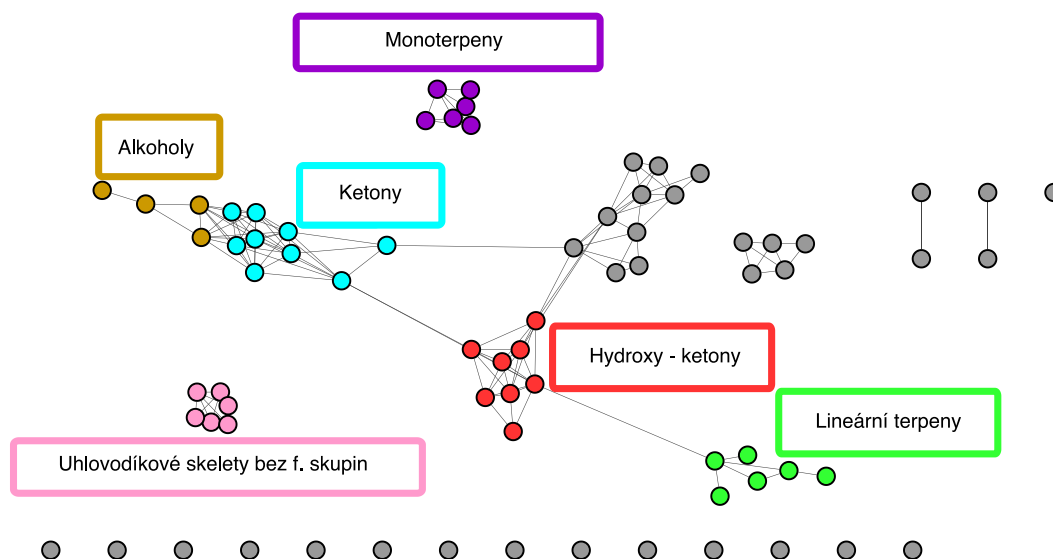
ovlivněna substituenty na uhlíku číslo 9 a otázkou je, zda změna na tomto uhlíku mění jen postupný fragmentační mechanismus nebo s ním navržený fragment přímo interaguje. Fragment m/z 135 je následně výrazný u struktur, které mají substituovaný cyklohexan (v celkovém skeletu) alespoň jednou hydroxy skupinou, acetátem, nebo keto skupinou s hydroxy skupinou nebo acetátem.

6.5.2 Základní fragmenty

Vcelku malou ale nezanedbatelnou informační hodnotu mají základní fragmenty, kde některé jsou vysoce specifické pro určité skupiny látek. Například pokud je základní fragment m/z 43 nebo 57, bude se pravděpodobně jednat o molekulu substituovanou acetáty nebo propaonáty. Pro odtržení fragmentu $C_2H_3O^+$ (m/z 43) a $C_3H_5O^+$ (m/z 57) bude potřebná i určitá celková konfigurace. Skupina popsanych struktur s fragmentem m/z 57 je tvořena velmi podobnými strukturami se čtyřmi navázanými propaonáty. Jaký vliv má struktura na tvorbu tohoto fragmentu podle zaznamenaných dat zjistit nelze. Na druhou stranu skupina s fragmentem m/z 43 je tvořena šesti z dvaadvaceti popsanych struktur s jedním až třemi acetáty jako substituenty. Společný motiv je alespoň jeden acetát a v jeho okolí alkohol nebo acetát. Dále velmi záleží na kompletní konfiguraci molekuly. Další základní fragmenty detekované u více než jedné struktury jsou m/z 159 a 282, které oba patří skupinám látek s 1–3 propaonáty (m/z 159) a 4 acetáty (m/z 282).

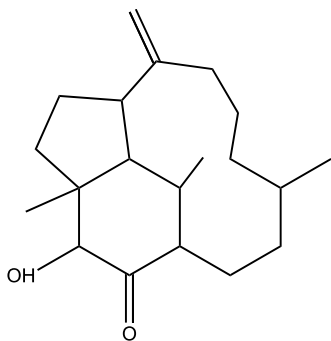
6.6 Sestavení molekulární sítě

Molekulární síť jsem sestavil pro lepší orientaci v detekovaných látkách pomocí programu *Metgen* a vizuálně upravil v programu *Cytoscape* (**obr. 18**). Výsledkem bylo sedm větších shluků. Pět z těchto shluků jsem podle IR a MS spekter přiřadil skupinám: monoterpény, monosubstituované alkoholy a ketony (vytvořily společnou skupinu, uvnitř které bylo vidět dělení na obě podskupiny), diterpény substituované hydroxy a keto skupinou, lineární terpény, a polycyklické diterpény bez dvojných vazeb. Zbylé dva shluky nebyly klasifikovány, protože zahrnovaly poměrně různé spektrální typy a spektra se mi tak nepodařilo s jistotou přiřadit k jednomu druhu. Samostatné body náležejí látkám, jejichž podobnost byla nižší než kosinus 0,7.



Obr. 18: Molekulární síť vygenerovaná pomocí programu *Metgen* a zpracovaná pomocí programu *Cytoscape*. Body jsou jednotlivé detekované látky a spojeny jsou v případě, pokud jejich kosinová podobnost byla vyšší než 0,7. Skupiny alkoholy, ketony, uhlovodíků bez f. skupin a hydroxy – ketony jsou polycyklické diterpény.

6.7 Strukturní analýza



Molecular Weight: 304.47

Obr. 19: Navržená struktura diterpenu s retenčním časem RI=2430

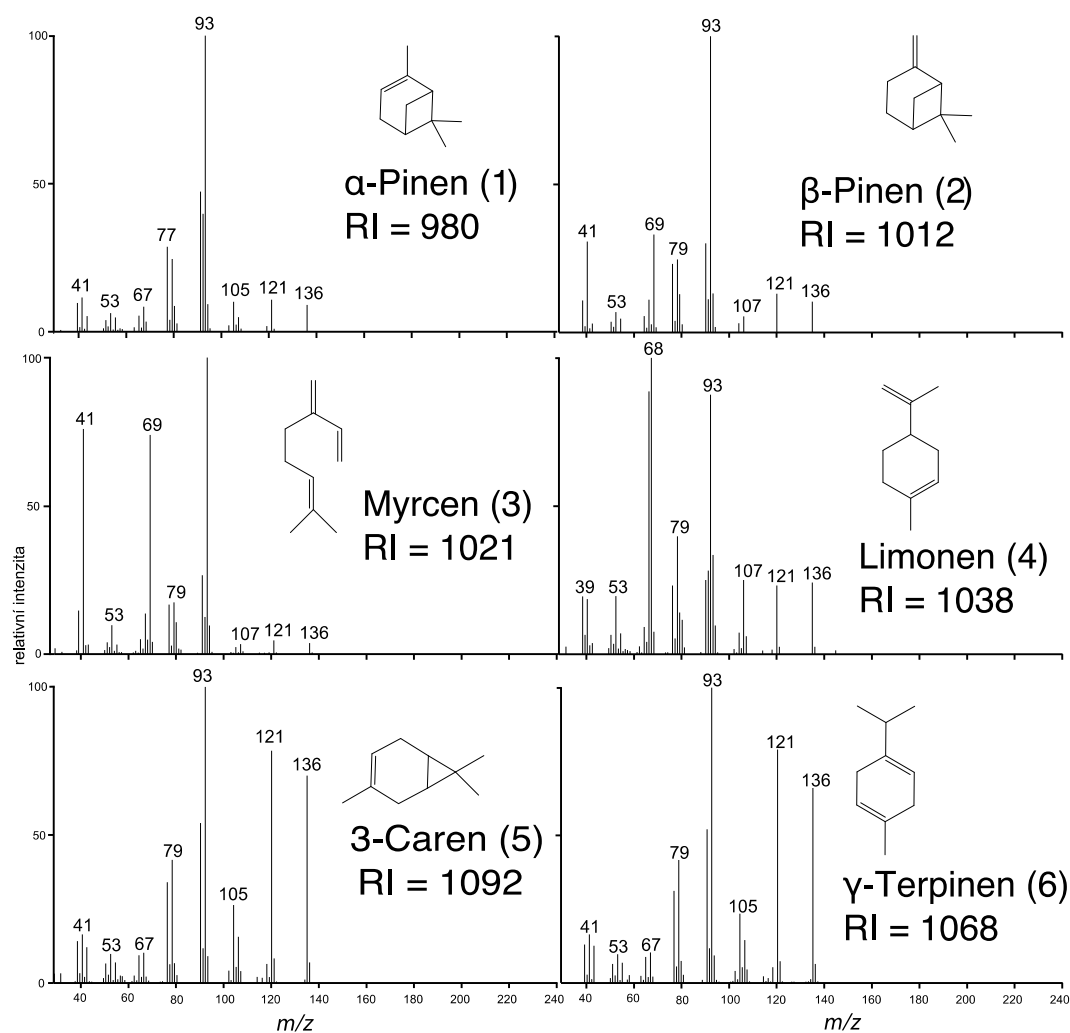
Strukturní analýza je založená na interpretaci MS, IR a NMR spekter a retenčních indexů. Jak už bylo zmíněno, monoterpenická frakce byla identifikována na základě MS spekter a retenčních indexů (**obr. 20**). Struktura detekovaných polycyklických diterpenů byla navržena na základě IR a MS spekter (**obr. 21-23**). První látka podrobená strukturní analýze byla látka číslo **34**, RI=2430 (**obr. 19**), která se vyskytuje u většiny pozorovaných druhů. Fragmentům m/z 135 a 151 náleží sumární vzorec $C_9H_{11}O_1$ a $C_9H_{11}O_2$. Navržené sumární vzorce jak již zmiňovaný molekulárního iontu, nebo fragmentů, jsem potvrdil pomocí GC-HRMS: $M^+ = 304,240 \Delta = 1$ ppm, $151,076 \Delta = 4$ ppm, $135,082 \Delta = 1$ ppm. m/z 135 jako molekulární iont je typický pro často detekovanou skupinu trinervitanů s dvěma dvojnými vazbami a dvěma OH skupinami. Nicméně IR spektrum má jasný pás na 1723 cm^{-1} , který jsem přiřadil ketonu. Tím pádem ale dostaneme polycyklický diterpen s $R+D = 5$, ale jednu nenasyčenost zabírá keto skupina, a tedy na uhlovodíkový skelet zbydou jen 4 nenasyčenosti. Článek Valterové [101] popisuje strukturu se stejnými funkčními skupinami a $R+D=6$. Fragmentační spektrum této molekuly je velmi podobné spektru zkoumanému, ale výrazné hmoty vyšší než m/z 213 jsou přesně o dvě jednotky nižší. Odhadl jsem proto, že se bude jednat o látku velice podobnou této a rozdíly ve spektru jsou zapříčiněny chybějící dvojnou vazbou v poloze 1(15). V literatuře je popsáno dalších 8 struktur polycyklických diterpenů s jednou keto skupinou. Ty, které mají keto skupinu v poloze 2 (5 struktur včetně dvou zmiňovaných), se vyznačují fragmentem m/z 151. Čtyři z těchto pěti struktur mají dvojnou vazbu v poloze 1(15), 8(19) a je zde jasně viditelný trend v intenzitě fragmentu m/z 135. Molekula, která nemá skupinu na uhlíku číslo 9 jen v poloze 2 a 3 a polohu dvojných vazeb 1(15), 8(19), postrádá fragment m/z 135. Pokud u stejného skeletu je uhlík číslo 9 a 3 substituován OH skupinou, je intenzita fragmentu m/z

135 (48). Pokud je uhlík 9 substituován acetátem, pak se zvedne intenzita fragmentu m/z 135 (75) a pokud jsou uhlíky 3 i 9 substituovány acetátem, jsou intenzity fragmentů m/z 135 (100) a 151 (76). Zároveň v IR by konjugovaná dvojná vazba v poloze 1(15) s keto skupinou v poloze 2 byla vidět pásem kolem 1690 cm^{-1} . Na základě IR, EI-MS spekter a spekter z knihovny se nejpravděpodobněji bude jednat o trinervitan s jednou vazbou v poloze 8(19), keto skupinou v poloze 2 a OH skupinou buď v poloze 3 nebo v poloze 9. Kvůli složení fragmentu m/z 151 bych se přikláněl k poloze 3.

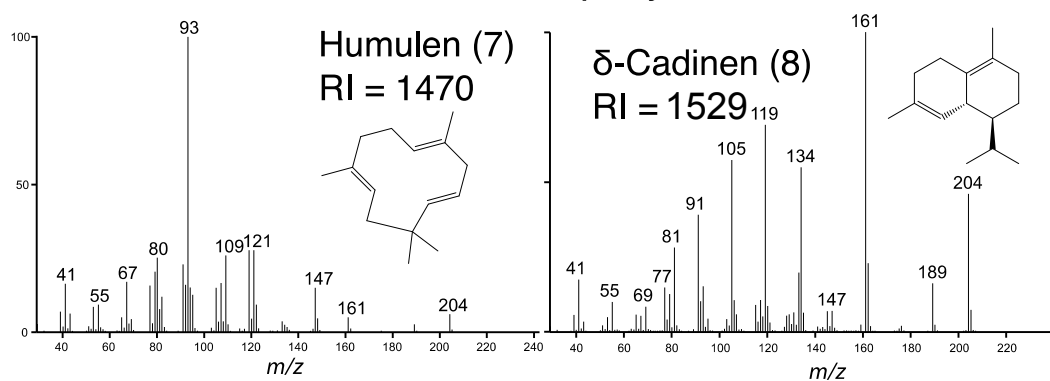
Další dvě struktury pocházely ze stejného zatím nezařazeného druhu a byly vybrány pro atypičnost svého spektra. Předběžná analýza hmotnostního spektra ukázala silné píky v oblasti vysokých hmot, výraznou ztrátu methyly a H_2O a $M^+ = 284$. Obě látky mají spektrum velmi podobné až na drobnou změnu v intenzitě fragmentu $m/z = 195$ a 211. Molekulární iont by naznačoval kyslík jako funkční skupiny a $R+D = 7$. IR spektrum ukázalo pás v oblasti 1755 a 1243 cm^{-1} opět přiřaditelný acetátu. Pás kolem 3020 cm^{-1} by mohl být produkovaný $=\text{CH}$ vazbou uhlík-vodík, pás kolem 1635 cm^{-1} přiřaditelný vazbě $\text{C}=\text{C}$ chybí. m/z 284 tedy nebude molekulární iont, ale fragment po rozštěpení acetátu, na molekule zbyde hydroxyl. Podobné štěpení je opět vidět v literatuře. Molekulární iont tedy bude m/z 326. Obě molekuly eluují v krátkém sledu v oblasti artefaktů vzniklých tepelným odštěpením OH skupiny z hydroxy ketonů. Retenční čas jednotlivých struktur nejvíce závisí na počtu kyslíkových modifikací a jejich konfiguraci, až druhotně na jejich charakteru. Vytyčit retenční oblast charakteristickou pro jednotlivé funkční skupiny je tedy značně náročné a v literatuře se retenční indexy uvádějí jen velmi zřídka. Obecný trend, který by se dal s dostatkem dat jednoduše popsat, tedy není.

NMR spektra všech tří látek byla znečištěna rozpouštědly, zejména hexanem. Ve spektrech druhých dvou látek byly jasně identifikovatelné nečistoty náležící artefaktu vznikajícím teplotním rozkladem v PFC. První látka měla vzorek rozpouštědly značně znečištěnější než ostatní, protože vzorek vzniknul kombinací odpařením a následným přerozpuštěním v deuterovaném dichlormethanu.

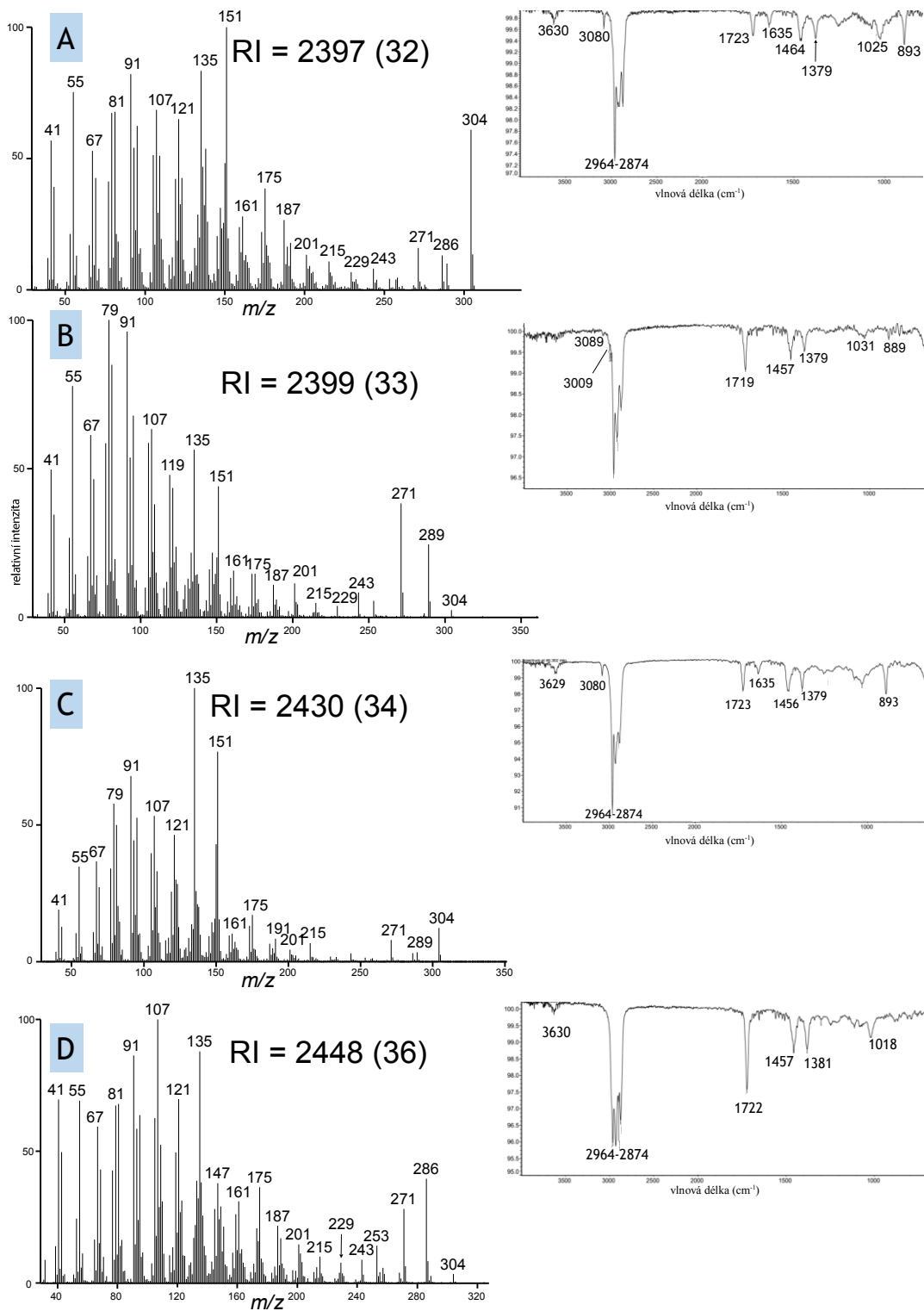
monoterpeny



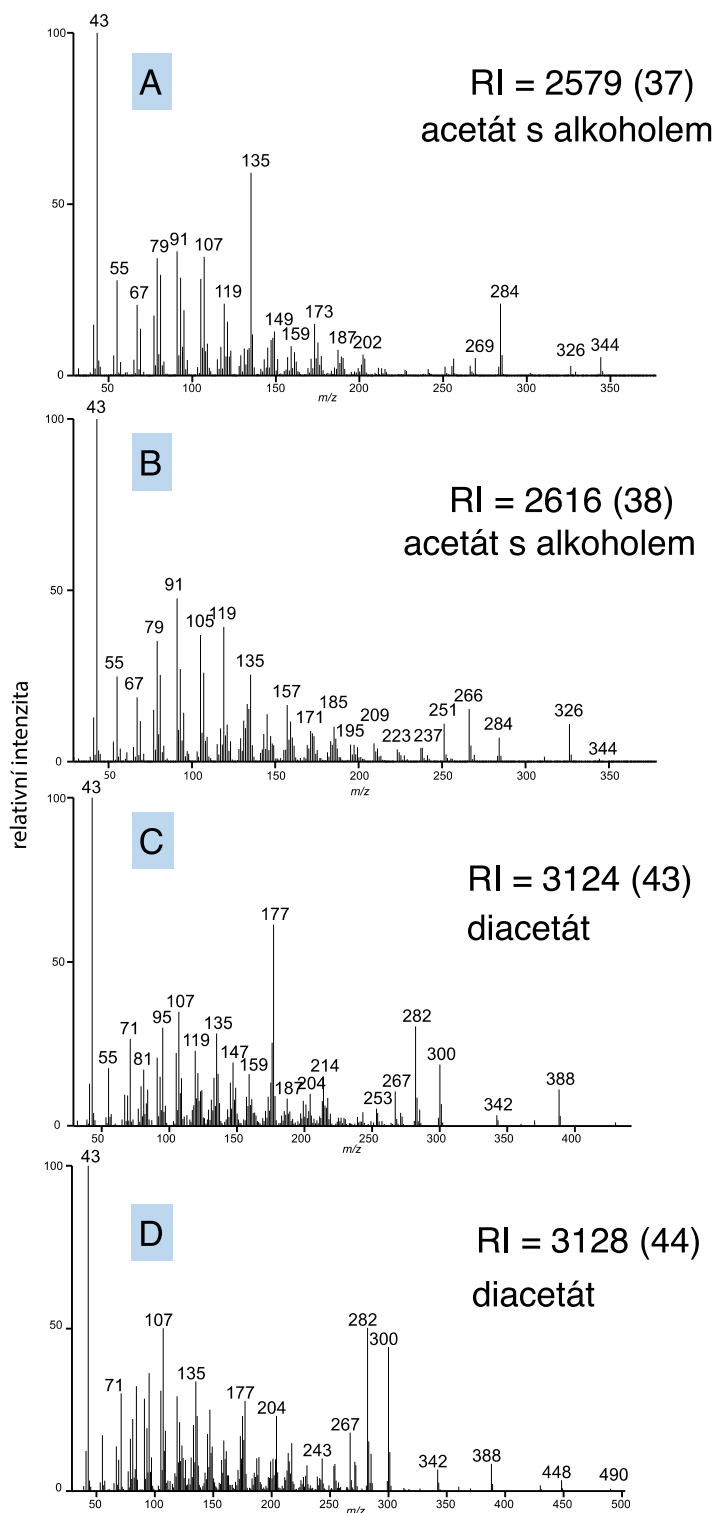
seskviterpeny



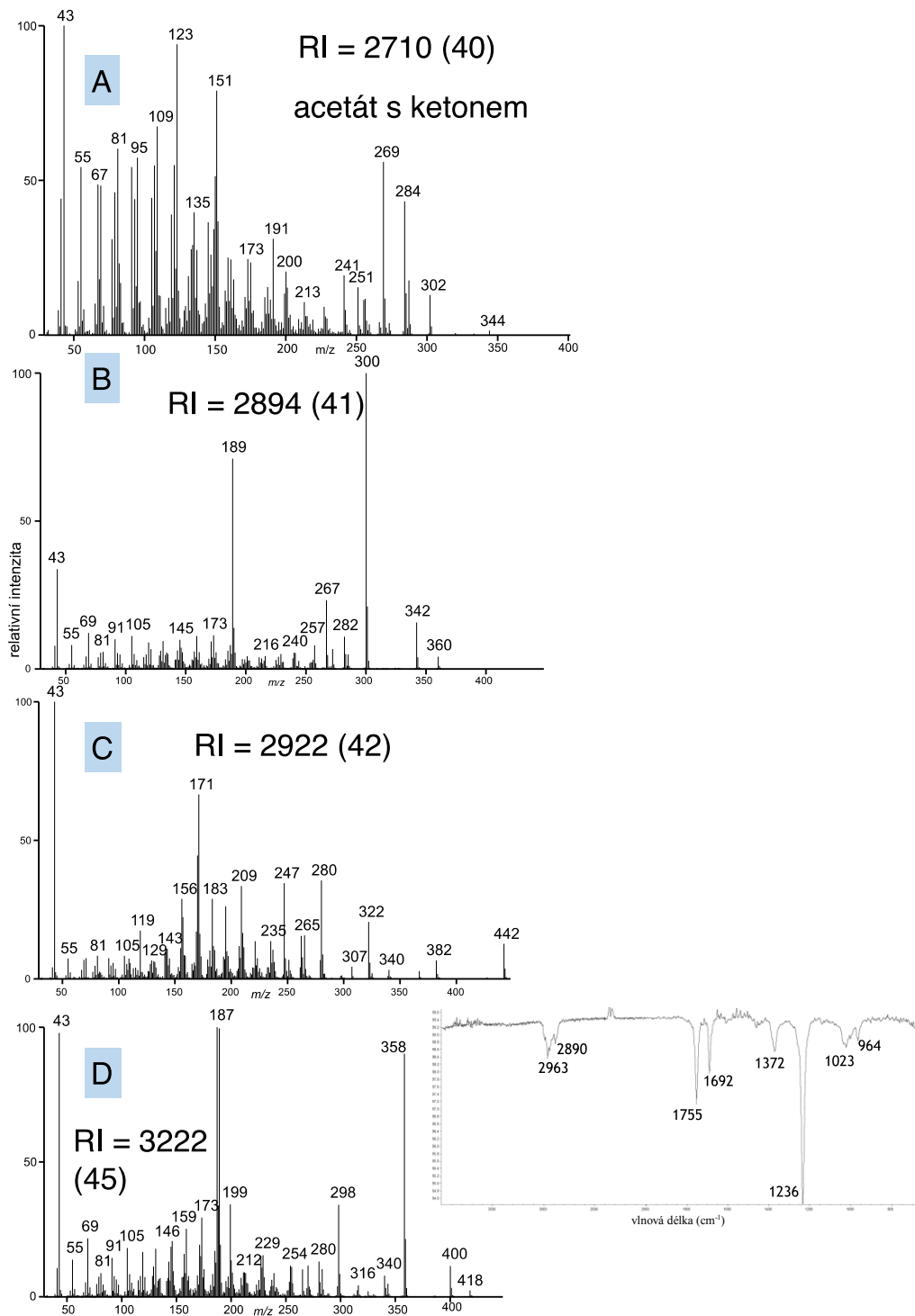
Obr. 20: Hmotnostní spektra a retenční indexy nalezených monoterpenů a seskviterpenů.



Obr. 21: Hmotnostní spektra, infračervená spektra a retenční indexy polycyklických diterpenů s hydroxy a oxo funkční skupinou. **A** – přítomno v *Atlan_s* a *Atlan_1*; **B** – *Agnat_1*, *Anhan_e*, *Subul_3 a_1*, *Caet_t*, *Coati_1 a_2*; **C** – *Arauj_1*, *Cyran_g*, *Coati_3*, *Subul_1*, *Caete_t*, *Coati_1 a_2*, *Atlan_1*; **D** – *Arauj_1*, *Atlan_s*, *Subul_1 a_5*.



Obr. 22: Hmotnostní spektra a retenční indexy polycyklických diterpenů s jedním až dvěma acetyty. IR spektra nebyla naměřena nebo nebylo možné je přiřadit. **A** – *Subul_3*; **B** – *Subul_3*; **C** – *Subul_3*, *Caete t.*, *Atlan 1*; **D** – *Atlan 1*.



Obr. 23: Hmotnostní spektra, infračervená spektra a retenční indexy polycyklických diterpenů druhů *Cyranotermes glaber* a *Coatitermes 3* (B-D) a *Atlantitermes 1* (A). Pravděpodobně obsahují acetáty, konjugovaný keton s dvojnou vazbou a kyselinu. *Cyranotermes glaber* byl měřen pomocí GC-FTIR, ale kvůli nevysvětlené vysoké odlišnosti retenčních vlastností látek při tomto měření oproti GC-MS se podařilo přiřadit pouze jedno spektrum.

7. Diskuze

V této práci se mi podařilo popsat 11 chemických profilů náležících 13 geneticky definovaným druhům ze skupiny *Subulitermes*. Dvě dvojice geneticky definovaných druhů měly chemický profil nerozlišitelný. V obranném sekretu vojáků jsem identifikoval 6 monoterpenů, které se u všech druhů (s výjimkou *Araujotermes 1*) vyskytovaly ve velmi vysokých kvantitách. Druhý typ molekul tvořící majoritní píky u většiny druhů byly disubstituované polycyklické diterpeny. Podle substituentů na diterpenickém skeletu by se daly druhy rozdělit na ty, které mají jako majoritní pik diterpen substituovaný keto a hydroxy skupinou a diterpeny substituované jedním až dvěma acetáty. Mezi druhy produkující acetáty substituované diterpeny patří *Subulitermes 3*, *Cyranotermes glaber*, *Coatitermes 3* a *Atlantitermes 1*. Otázkou je, zda *Coatitermes 3* má chemický profil velmi podobný chemickému profilu *Cyranotermes glaber* nebo zde jde pouze vzorkovací chybou. Na druhou stranu *Atlantitermes 1* a *Cyranotermes glaber* jsou oba velmi atypicky velicí na skupinu *Subulitermes* a nabízí se otázka, jestli vůbec do této skupiny patří. Zároveň je zajímavý rozdíl mezi druhy *Subulitermes 1*, *3* a *5* kde *S. 3* a *S. 5* mají velmi zvláštní chemické profily. Tyto poznatky volají po hlubší fylogenetické analýze této skupiny.

Vzniklý fylogenetický strom (**obr. 10**) rozlišuje jednotlivé druhy, ale vztahy mezi některými skupinami nejsou úplně spolehlivé. Použitá výše popisovaná metoda upozaduje vliv látek nalezených pouze u jednoho až dvou vzorků. Druhy, které by měly být odhadem na úplně samostatných větvích se objevují na mnou sestaveném stromě blíže, než bylo očekáváno. Dalším důvodem pro tento jev je výskyt artefaktů vzniklých teplotním rozkladem molekul, které jsou společné pro víc různých originálních metabolitů. Sestavil jsem proto několik stromů, kde jsem vynechal různé oblasti tabulky (například oblast s artefakty, oblast s monoterpeny, nebo vše kromě monoterpenů), nicméně pokud byla jakákoliv část vynechána, nedostal jsem stejně kvalitní výsledek. Tvorba artefaktů byla experimentálně ověřena jako stabilní a specifická pro množství originální látky, tedy pro vzniklý chemický profil důležitá.

Celkově jsem zaznamenal 45 různých struktur obranných látek. Čtrnáct struktur z tohoto celku jsem označil za artefakty teplotního rozkladu původních látek. Jedná se o polycyklické diterpeny bez funkčních skupin a ketony bez jiné funkční skupiny. Čtyři struktury se mi podařilo přiřadit strukturám již popsaným. Zbylé struktury jsem určil na základě hmotnostních a

infračervených spekter jako dosud nepopsané (**obr. 21–23**). Velmi zajímavé jsou potom látky v **obr. 23 B–D**, které podle fragmentace budou diterpenického původu, ale naprosto se odlišují jak od spekter zaznamenaných mnou tak od spekter uvedených v literatuře.

Pro sestavení *alignment listu* jsem využil program MZmine. Datový soubor, který jsem analyzoval, byl sice poměrně malý, ale vyskytovaly se zde všechny aspekty, které představují výzvu pro automatické zpracování. Na retenci polycyklických diterpenů ve vzorku nemá příliš velký vliv teplotní program použitý k separaci a všechny eluují ve velmi úzkém úseku retenčního času a hmotnostní spektra jsou si velmi podobná. Lepivé a tepelně labilní látky dále často tvoří pik s neideálním tvarem a jsou problematické pro detekční algoritmy. Píky s neideálním elučním profilem jsou zejména problém v detekci píků z EIC. Tento krok vyžaduje poměrně pečlivou optimalizaci zejména v oblasti šířky píku a parametru *RT wavelet range*, který ovlivňuje podobu *wavelet* pro identifikaci píků. Bohužel se také jedná o výpočetně nejnáročnější krok. Délka výpočtu je také úměrná počtu detekovaných hmot, a tedy i prvotnímu nastavení hladiny pro detekci. Následkem chybného nastavení je částečné zmenšení plochy detekovaného píku nebo jeho úplné vyřazení. Druhý krok, který vyžadoval širší optimalizaci, byla vlastní tvorba *alignment listu*. Látky podobné si svým spektrem i retenčním časem se poměrně špatně rozlišují. Musel jsem nastavit vysokou hranici podobnostního skóre, abych se vyhnul chybnému seskupení píků. To, spolu s vysokou variabilitou určení apexu píku kvůli jeho tvaru, zapříčinilo málo sjednocený *alignment*. Program perfektně fungoval na látky se spektrem, které obsahovalo malý počet velmi výrazných fragmentů. Spektra s více homogenním profilem, nebo lišící se pouze ve fragmentech o nízkých hmotách, představovala pro softwarové zpracování problém. Výsledek automatického vyhodnocení jsem následně zpracoval metodou molekulárních sítí, ve které se seskupily látky podle struktury velikosti uhlovodíkového skeletu a funkčních skupin. Kombinací obou metod se značně zjednodušila interpretace a prohledávání jednotlivých zaznamenaných spekter.

Sestavená knihovna hmotnostních spekter mi pomohla při rozřazování látek do skupin i při vlastním návrhu struktury analyzovaných látek. Protože se jedná o strukturně variabilní skupinu látek s omezeným množstvím velmi podobných uhlovodíkových skeletů je možné ze spekter, pokud vezmeme dostatečně velký vzorek, odhadnout vliv substituentů na vlastní spektrum molekuly. Mohl jsem tak navrhnout teoretickou strukturu dvou nejprominentnějších fragmentů v těchto dvou látkách (*m/z* 135 a 151). Dále jsem navrhnul několik identifikačně návodných

fragmentů, které mohou pomoci při hrubém zařazení molekuly. V literatuře je často uváděn iont m/z 135 jako typický pro trinervitany. Je pravda, že se tento iont často vyskytuje u 1(15), 8(19) nenasyčených trinervitanů, ale stejně tak je přítomný i u 15(16) rippertenu. Tento fragment tedy není podle mého názoru typický pro trinervitanový skelet, ale pro určitou kombinaci skeletu, substituentů a dvojných vazeb.

Preparativní plynová chromatografie se ukázala i přes všechny své výhody (zejména dobrou separaci látek, vysokou reprodukovatelnost analýzy a velmi přesný sběr frakcí) jako špatná metoda pro izolaci těchto látek kvůli jejich poměrně vysoké teplotní nestabilitě. Ztráta preparované látky díky rozkladu v inletu je výrazně snížena využitím PTV injektoru a vzniklé teplotní artefakty jsou odseparovány v koloně. Problematický je rozklad ve sběrné kapiláře nebo pravděpodobněji v děliči frakcí, kde artefakty znečistí vlastní preparát. Znečišťování se děje postupně a dá se odstranit vyčištěním přístroje. Počet preparací, po kterém se začnou objevovat artefakty v čisté frakci není pravidelný a špatně se odhaduje. Preparace dostatečného množství čisté látky touto metodou se tedy v tuto chvíli zdá jako nemožná. Navrhl jsem proto úpravu preparativního GC nejprve s vynecháním kovového děliče toku v PFC a manuálním sběru frakcí přímo do vialky s rozpouštědlem. Pokud by tato metoda fungovala, bylo by možné nahradit kovový dělič toku komerčně prodávaným skleněným „Y“ s deaktivovaným povrchem a automaticky tak sbírat jednu frakci. Dále plánuji použít alternativní přístup preparace pomocí HPLC. Problém by ovšem mohl nastat s rozdělením strukturně i retenčně velmi podobných analytů. HPLC se k preparaci polycyklických diterpenů termitů používá, ale pro očištění jedné látky je nutné vzorek preparovat několikrát. Operuje se proto s poměrně vysokými kvantitami látek, která je získatelná z větších termitů. Termiti rodu *Subulitermes* jsou ale několikanásobně menší než rod *Nasutitermes*, získání podobného množství látky je tedy nerealistické.

8. Závěr

A) Popsal jsem jedenáct rozdílných chemických profilů náležících třinácti geneticky definovaným druhům a rozřídil podle nich vzorky z obou sad.

B) Na základě statisticky popsané podobnosti mezi jednotlivými chemotypy jsem sestavil fylogenetický strom, takto vzniklou klasifikaci jsem srovnal s klasifikací vzniklou na základě sekvenace genu COII.

C) Detekované struktury jsem rozřídil podle funkčních skupin a velikosti uhlovodíkového skeletu. Preparace vybraných látek pomocí preparativní GC byla neúspěšná, protože se analyty teplotně rozkládaly.

D) Sestavil jsem knihovnu polycyklických diterpenů termitů. Tato knihovna obsahuje hmotnostní spektra 52 popsaných struktur.

E) Na základě této knihovny jsem popsal vztah mezi strukturou a poměrem intenzit fragmentů m/z 135 a 151. Dále jsem navrhl jednoduché souvislosti mezi strukturou a základním fragmentem spektra. Zároveň jsem navrhl strukturu fragmentů m/z 135 a 151.

Na tuto práci bych chtěl dále navázat následujícími kroky: a) Pokusit se o preparaci diterpenů pomocí preparativní HPLC a pokusit se technicky upravit preparativní GC pro lepší práci s termolabilními látkami; b) Pokusit se charakterizovat uhlovodíkový skelet polycyklických diterpenů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie; c) Rozšířit knihovnu hmotnostních spekter o známá hmotnostní spektra polycyklických diterpenů z jiných organismů, primárně rostlin a bakterií; d) Rozšířit počet vzorků druhů, od nichž mám pouze jeden vzorek pro potvrzení jejich navrženého profilu; e) Prozkoumat souvislost mezi odchylkami v chemickém profilu jednotlivých kolonií druhu *Coatitermes 1* a porovnat je s v terénu zaznamenanou ekologií, která by mohla naznačovat druhové rozdíly.

9. Použitá literatura

- [1] G.D. Prestwich, Defense Mechanisms of Termites, *Annual Review of Entomology*, 29 (1984) 201-232.
- [2] J. Šobotník, A. Jirošova, R. Hanus, Chemical warfare in termites, *Journal of Insect Physiology*, 56 (2010) 1012-1021.
- [3] G.D. Prestwich, Chemical Defense by Termite Soldiers, *Journal of Chemical Ecology*, 5 (1979) 459-480.
- [4] A. Jirošová, P. Majer, A. Jančařík, K. Dolejšová, R. Tykva, J. Šobotník, P. Jiroš, R. Hanus, Sphinganine-like biogenesis of (*E*)-1-nitropentadec-1-ene in termite soldiers of the genus *Prorethra*, *ChembioChem*, 248 (2014) 533-536.
- [5] J. Vrkoč, K. Ubik, 1-Nitro-trans-1-pentadecene as the defensive compound of termites, *Tetrahedron Letters*, 15 (1974) 1463-1464.
- [6] P. Kyjaková, K. Dolejšová, J. Krasulová, L. Bednářová, R. Hadravová, R. Pohl, R. Hanus, The evolution of symmetrical snapping in termite soldiers need not lead to reduced chemical defence, *Biological Journal Linnean Society*, 115 (2015) 818-825.
- [7] G.D. Prestwich, R.W. Jones, M.S. Collins, Terpene biosynthesis by nasute termite soldiers (Isoptera: Nasutitermitinae), *Insect Biochemistry*, 11 (1981) 331-336.
- [8] A. Ludwiczuk, K. Skalicka-Woźniak, M. Georgiev, Terpenoids, in: *Pharmacognosy*. S. B. McCreath, R Delgoda (Ed.), *Elsevier*, (2017) p. 233-266.
- [9] J. Gershenzon, N. Dudareva, The function of terpene natural products in the natural world, *Nature Chemical Biology*, 3 (2007) 408-414.
- [10] G.D. Prestwich, Interspecific variation in the defence secretions of *Nasutitermes* soldiers, *Biochemical Systematics and Ecology*, 7 (1979) 211 - 221.
- [11] E. Gössinger, Chemistry of the secondary metabolites of termites, in: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 109*, *Springer*, (2019) p. 1-384.
- [12] K. Krishna, D.A. Grimaldi, V. Krishna, M.S. Engel, Treatise on the Isoptera of the World: Termitidae (Part Two), *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 377 (2013) 1495-1989.

- [13] F. Gathorne-Hardy, A review of the South-East Asian Nasutitermitinae (Isoptera: Termitidae), with descriptions of one new genus and a new species and including a key to the genera, *Journal of Natural History*, 35 (2001) 1485-1506.
- [14] L. Miller, The Australian genera of the *Subulitermes* branch of the Nasutitermitinae (Isoptera: Termitidae), *Australian Journal of Entomology*, 23 (1984) 119-125.
- [15] M.M. Rocha, C. Cuezco, J.P. Constantini, D.E. Oliveira, R.G. Santos, T.F. Carrijo, E.M. Canello, Overview of the morphology of neotropical termite workers: history and practice, *Sociobiology*, 66 (2019) 1-32.
- [16] F. Beran, T.G. Köllner, J. Gershenzon, D. Tholl, Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites, *New Phytologist*, 223 (2019) 52-67.
- [17] Y. Zhou, X. Liu, Z. Yang, Characterization of terpene synthase from tea green leafhopper being involved in formation of geraniol in tea (*Camellia sinensis*) leaves and potential effect of geraniol on insect-derived endobacteria, *Biomolecules*, 9 (2019) 808.
- [18] K. Darragh, A. Orteu, D. Black, K.J. Byers, D. Szczerbowski, I.A. Warren, P. Rastas, A. Pinharanda, J.W. Davey, S. Fernanda Garza, A novel terpene synthase controls differences in anti-aphrodisiac pheromone production between closely related *Heliconius* butterflies, *PLOS Biology*, 19 (2021) e3001022.
- [19] M. Hojo, S. Shigenobu, K. Maekawa, T. Miura, G. Tokuda, Duplication and soldier-specific expression of geranylgeranyl diphosphate synthase genes in a nasute termite *Nasutitermes takasagoensis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 111 (2019) 103177.
- [20] A.K. Singh, G.D. Prestwich, Synthesis of tritium - labelled cembrene - A, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 23 (1986) 377-382.
- [21] L.M. Blumberg, Theory of gas chromatography, in: *Gas Chromatography*, C. Poole (Ed.), Elsevier, (2012) p. 19-78.
- [22] A.J. Martin, R.L. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins, *The Biochemical Journal*, 35 (1941) 1358-1368.

- [23] A. James, A. Martin, Gas-liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid, *The Biochemical Journal*, 63 (1951) 144.
- [24] M.M. Rahman, A. Abd El-Aty, J.H. Choi, H.C. Shin, S.C. Shin, J.H. Shim, Basic overview on gas chromatography columns, *Analytical Separation Science*, (2015) 823-834.
- [25] E.F. Barry, R.L. Grob, Packed Column Gas Chromatography, in: *Columns for Gas Chromatography*, Wiley, (2007) p. 15-93.
- [26] M. Golay, Gas Chromatography 1957 (Lansing Symposium) V.J. Coates, H.J. Noebels, I.S. Fagerson (Ed.), *New York: Academic Press*, (1957) p. 1-13.
- [27] K.D. Bartle, P. Myers, History of gas chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 547-557.
- [28] R.D. Dandeneau, E. Zerenner, An investigation of glasses for capillary chromatography, *Journal of High Resolution Chromatography*, 2 (1979) 351-356.
- [29] M. Lee, R. Kong, C. Woolley, J. Bradshaw, Fused silica capillary column technology for gas chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, 22 (1984) 136-142.
- [30] W. Jennings, Evolution and application of the fused silica column, *Journal of High Resolution Chromatography*, 3 (1980) 601-608.
- [31] D. Wang, S.L. Chong, A. Malik, Sol-Gel Column Technology for Single-Step Deactivation, Coating, and Stationary-Phase Immobilization in High-Resolution Capillary Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 4566-4576.
- [32] E.F. Barry, R.L. Grob, Capillary Column Gas Chromatography, in: *Columns for Gas Chromatography*, Wiley, (2007) p. 94-209.
- [33] R. Bailey, Injectors for capillary gas chromatography and their application to environmental analysis, *Journal of Environmental Monitoring*, 7 (2005) 1054-1058.
- [34] M. Lorenzo, Y. Pico, Gas chromatography and mass spectroscopy techniques for the detection of chemical contaminants and residues in foods, in: *Chemical Contaminants and Residues in Food*, D. Schrenk, A. Cartus (Ed.), *Elsevier*, (2017) p. 15-50.
- [35] E. Stauffer, Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, in: *Fire Debris Analysis*, E. Stauffer, J. A. Dolan, R. Newman (Ed.), *Elsevier*, (2008) p. 235-293.

- [36] K. Grob Jr, Evaluation of injection techniques for triglycerides in capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 178 (1979) 387-392.
- [37] M. Buchgraber, F. Ulberth, E. Anklam, Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography, *Journal Chromatography A*, 1036 (2004) 197-203.
- [38] R. Arrendale, O. Chortyk, Construction and application of a cold on - column injection system for capillary gas chromatography, *Journal of High Resolution Chromatography*, 8 (1985) 62-68.
- [39] E. Hoh, K. Mastovská, Large volume injection techniques in capillary gas chromatography, , *Journal Chromatography A*, 1186 (2008) 2-15.
- [40] M. Godula, J. Hajšlová, K. Maštouska, J. Křivánková, Optimization and application of the PTV injector for the analysis of pesticide residues, *Journal of Separation Science.*, 24 (2001) 355-366.
- [41] J.G. Ševčík, 1. Introduction, in: *Detectors in gas chromatography*, Elsevier, (2011) p. 15-38.
- [42] C.F. Poole, Ionization-based detectors for gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1421 (2015) 137-153.
- [43] I. Halasz, Concentration and Mass Flow Rate Sensitive Detectors in Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, 36 (1964) 1428-1430.
- [44] I. McWilliam, R. Dewar, Flame ionization detector for gas chromatography, *Nature*, 181 (1958) 760-760.
- [45] A.T. Blades, The flame ionization detector, *Journal of Chromatographic Science*, 11 (1973) 251-255.
- [46] T. Holm, Aspects of the mechanism of the flame ionization detector, *Journal Chromatography A*, 842 (1999) 221-227.
- [47] M. Kállai, Z. Veres, J. Balla, Response of flame ionization detectors to different homologous series, *Chromatographia*, 54 (2001) 511-517.
- [48] C. Ruckebusch, L. Blanchet, Multivariate curve resolution: a review of advanced and tailored applications and challenges, *Analytica Chimica Acta*, 765 (2013) 28-36.
- [49] J.H. Gross, Practical Aspects of Electron Ionization, in: *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, (2017) p. 293-324.

- [50] W. Bleakney, A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor, *Physical Review*, 34 (1929) 157.
- [51] A.O. Nier, A mass spectrometer for isotope and gas analysis, *Review of Scientific Instruments*, 18 (1947) 398-411.
- [52] J.H. Gross, Principles of Ionization and Ion Dissociation, in: *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, (2017) p. 29-84.
- [53] P.E. Miller, M.B. Denton, The quadrupole mass filter: basic operating concepts, *Journal of Chemical Education*, 63 (1986) 617.
- [54] K. Blaum, C. Geppert, P. Müller, W. Nörtershäuser, E. Otten, A. Schmitt, N. Trautmann, K. Wendt, B. Bushaw, Properties and performance of a quadrupole mass filter used for resonance ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, 181 (1998) 67-87.
- [55] J.H. Gross, Instrumentation, in: *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, (2017) p. 151-292.
- [56] B. Mamyrin, Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects), *International Journal of Mass Spectrometry*, 206 (2001) 251-266.
- [57] U. Boesl, Time-of-flight mass spectrometry: introduction to the basics, *Mass Spectrometry Reviews*, 36 (2017) 86-109.
- [58] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 19 (2000) 65-107.
- [59] T. Visser, FT-IR detection in gas chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 627-636.
- [60] S. Nagajyothi, Y. Swetha, J. Neeharika, P. Suresh, N. Ramarao, Hyphenated techniques-a comprehensive review, *International Journal for Advance Research and Development*, 2 (2017) 63-71.
- [61] N. Ragunathan, K.A. Krock, C. Klawun, T.A. Sasaki, C.L. Wilkins, Gas chromatography with spectroscopic detectors, *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 349-397.
- [62] L. Kim, P. Marriott, Preparative gas chromatography, *Gas chromatography, 2st edition*, C.F. Poole (Ed.), Elsevier, (2021) p. 395-414.
- [63] T. Özek, F. Demirci, Isolation of natural products by preparative gas chromatography, in: *Natural Products Isolation*, S.D. Sarker, L. Nahar (Ed.), Springer, (2012) p. 275-300.

- [64] D. Sciarrone, S. Pantò, C. Ragonese, P. Dugo, L. Mondello, Evolution and status of preparative gas chromatography as a green sample-preparation technique, *Trends in Analytical Chemistry*, 71 (2015) 65-73.
- [65] S. Nojima, C.S. Apperson, C. Schal, A simple, convenient, and efficient preparative GC system that uses a short megabore capillary column as a trap, *Journal of Chemical Ecology*, 34 (2008) 418-428.
- [66] H.L. Zuo, F.Q. Yang, W.H. Huang, Z.N. Xia, Preparative gas chromatography and its applications, *Journal of Chromatographic Science*, 51 (2013) 704-715.
- [67] C. Meinert, M. Moeder, W. Brack, Fractionation of technical p-nonylphenol with preparative capillary gas chromatography, *Chemosphere*, 70 (2007) 215-223.
- [68] D. Sciarrone, S. Pantò, C. Ragonese, P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, Increasing the Isolated Quantities and Purities of Volatile Compounds by Using a Triple Deans-Switch Multidimensional Preparative Gas Chromatographic System with an Apolar-Wax-Ionic Liquid Stationary-Phase Combination, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 7092-7098.
- [69] D. Sciarrone, S. Pantò, P. Donato, L. Mondello, Improving the productivity of a multidimensional chromatographic preparative system by collecting pure chemicals after each of three chromatographic dimensions, *Journal of Chromatography A*, 1475 (2016) 80-85.
- [70] Z. Li, Y. Lu, Y. Guo, H. Cao, Q. Wang, W. Shui, Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection, *Analytica Chimica Acta*, 1029 (2018) 50-57.
- [71] S. Castillo, P. Gopalacharyulu, L. Yetukuri, M. Orešič, Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108 (2011) 23-32.
- [72] L. Yi, N. Dong, Y. Yun, B. Deng, D. Ren, S. Liu, Y. Liang, Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review, *Analytica chimica acta*, 914 (2016) 17-34.
- [73] H. Tian, B. Li, G. Shui, Untargeted LC-MS data preprocessing in metabolomics, *Journal of Analysis and Testing*, 1 (2017) 187-192.
- [74] B.B. Misra, S. Mohapatra, Tools and resources for metabolomics research community: A 2017-2018 update, *Electrophoresis*, 40 (2019) 227-246.

- [75] R. Spicer, R.M. Salek, P. Moreno, D. Cañueto, C. Steinbeck, Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis, *Metabolomics*, 13 (2017) 1-16.
- [76] I. Karaman, Preprocessing and pretreatment of metabolomics data for statistical analysis, *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*, (2017) 145-161.
- [77] O.D. Myers, S.J. Sumner, S. Li, S. Barnes, X. Du, Detailed investigation and comparison of the XCMS and MZmine 2 chromatogram construction and chromatographic peak detection methods for preprocessing mass spectrometry metabolomics data, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 8689-8695.
- [78] O.D. Myers, S.J. Sumner, S. Li, S. Barnes, X. Du, One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 8696-8703.
- [79] W. Jiang, Y. Qiu, Y. Ni, M. Su, W. Jia, X. Du, An automated data analysis pipeline for GC-TOF-MS metabolomics studies, *Journal of Proteome Research*, 9 (2010) 5974-5981.
- [80] P. Du, W.A. Kibbe, S.M. Lin, Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching, *Bioinformatics*, 22 (2006) 2059-2065.
- [81] A. Alonso, S. Marsal, A. Julià, Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 (2015) 23.
- [82] B.N. Colby, Spectral deconvolution for overlapping GC/MS components, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 3 (1992) 558-562.
- [83] X. Du, S.H. Zeisel, Spectral deconvolution for gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics: current status and future perspectives, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4 (2013) e201301013.
- [84] V.A. Likić, Extraction of pure components from overlapped signals in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *BioData Mining*, 2 (2009) 1-11.
- [85] K. Hiller, J. Hangebrauk, C. Jäger, J. Spura, K. Schreiber, D. Schomburg, MetaboliteDetector: comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 3429-3439.

- [86] Y. Ni, Y. Qiu, W. Jiang, K. Suttlemyre, M. Su, W. Zhang, W. Jia, X. Du, ADAP-GC 2.0: deconvolution of coeluting metabolites from GC/TOF-MS data for metabolomics studies, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 6619-6629.
- [87] X. Domingo-Almenara, J. Brezmes, M. Vinaixa, S. Samino, N. Ramirez, M. Ramon-Krauel, C. Lerin, M. Díaz, L. Ibáñez, X. Correig, eRah: a computational tool integrating spectral deconvolution and alignment with quantification and identification of metabolites in GC/MS-based metabolomics, *Analytical Chemistry*, 88 (2016) 9821-9829.
- [88] A. Smirnov, Y. Qiu, W. Jia, D.I. Walker, D.P. Jones, X. Du, ADAP-GC 4.0: application of clustering-assisted multivariate curve resolution to spectral deconvolution of gas chromatography–mass spectrometry metabolomics data, *Analytical Chemistry*, 91 (2019) 9069-9077.
- [89] L.W. Hantao, H.G. Aleme, M.P. Pedroso, G.P. Sabin, R.J. Poppi, F. Augusto, Multivariate curve resolution combined with gas chromatography to enhance analytical separation in complex samples: A review, *Analytica Chimica Acta*, 731 (2012) 11-23.
- [90] R. Smith, D. Ventura, J.T. Prince, LC-MS alignment in theory and practice: a comprehensive algorithmic review, *Briefings in bioinformatics*, 16 (2015) 104-117.
- [91] K. Kumar, Chemometric assisted correlation optimized warping of chromatograms: optimizing the computational time for correcting the drifts in chromatographic peak positions, *Analytical Methods*, 10 (2018) 1006-1014.
- [92] G. Tomasi, F. Van Den Berg, C. Andersson, Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data, *Journal of Chemometrics*, 18 (2004) 231-241.
- [93] G. Tomasi, F. Savorani, S.B. Engelsen, icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7832-7840.
- [94] Y. Ni, M. Su, Y. Qiu, W. Jia, X. Du, ADAP-GC 3.0: improved peak detection and deconvolution of co-eluting metabolites from GC/TOF-MS data for metabolomics studies, *Analytical Chemistry*, 88 (2016) 8802-8811.
- [95] J. Watrous, P. Roach, T. Alexandrov, B.S. Heath, J.Y. Yang, R.D. Kersten, M. van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J.M. Raaijmakers, Mass spectral molecular networking of living microbial colonies, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) E1743-E1752.

- [96] M. Wang, J.J. Carver, V.V. Phelan, L.M. Sanchez, Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, *Nature Biotechnology*, 34 (2016) 828-837.
- [97] F. Olivon, N. Elie, G. Grelier, F. Roussi, M. Litaudon, D. Touboul, MetGem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 13900-13908.
- [98] N. Elie, C. Santerre, D. Touboul, Generation of a Molecular Network from Electron Ionization Mass Spectrometry Data by Combining MZmine2 and MetGem Software, *Analytical Chemistry*, 91 (2019) 11489-11492.
- [99] E.S. Kovats, Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Advances in Chromatography*, 1 (1965) 229-247.
- [100] H. Van Den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A* 11 (1963) 463-471.
- [101] I. Valterová, M. Buděšínský, F. Tureček, J. Vrkoč, Minor diterpene components of the defense secretion from the frontal gland of soldiers of the species *Nasutitermes costalis* (Holmgren), *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 49 (1984) 2024-2039.