

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra analytické chemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Karolína ERDEOVÁ

**SEPARACE FOSFOLIPIDŮ METODOU  
VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE  
SEPARATION OF PHOSPHOLIPIDS BY HIGH PRESSURE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2015

---

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 22. 5. 2015

.....

podpis

## Abstrakt

Fosfolipidy jsou součástí buněčných membrán všech živých organismů. Jedná se o nejvýznamnější skupinu polárních lipidů, vyznačující se amfifilními vlastnostmi. Tyto vlastnosti vyplývají z jejich molekulární struktury, která se skládá z hydrofobních mastných řetězců a polární hlavice. Podle polární hlavice se dělí fosfolipidy do příslušných tříd. Poměr fosfolipidových tříd, zastoupených v bakteriální membráně, značně odráží životní pochody mikroorganismu. Pomocí změn v zastoupení těchto tříd lze sledovat vliv vnějšího prostředí, čehož se využívá v mikrobiologickém výzkumu.

Pro sledování fosfolipidového složení vyšlechtěného kmene *Bacillus subtilis*, který je intenzivně zkoumán pro produkci antibiotik, se stále využívá tenkovrstvá chromatografie. Její časová náročnost výzkum značně zpomaluje, a proto byly podmínky tohoto uspořádání přeneseny na HPLC. Pro tyto účely byla metoda optimalizována formou nelineárního gradientu.

Vhodnost metody byla testována na vzorku bakteriálních membránových lipidů, který obsahoval pět fosfolipidových tříd, z čehož dvě majoritní. Jejich poměrné zastoupení lze stanovit, nicméně je nutno pečlivě volit objem nastříkovaného vzorku, aby se zabránilo překročení úzkého koncentračního rozsahu metody.

### Klíčová slova:

fosfolipidy, HPLC, optimalizace, validace, HILIC, NP-HPLC

## Obsah

Abstrakt .....	3
Klíčová slova: .....	3
Seznam zkratk a symbolů .....	5
1 Úvod .....	6
2 Teoretická část .....	7
2.1 Fosfolipidy .....	7
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	10
2.3 Metody .....	10
2.3.1 Normální a reversní mód LC .....	11
2.3.2 HILIC .....	11
2.4 Detektory .....	12
2.4.1 ELSD a CAD .....	12
2.4.2 Hmotnostně-spektrometrický detektor .....	12
2.4.3 UV a DAD .....	13
3 Experimentální část .....	14
3.1 Chemikálie .....	14
3.1.1 Příprava standardů .....	14
3.1.2 Příprava mobilní fáze .....	14
3.2 Instrumentace .....	14
3.3 HPLC Metoda .....	15
3.4 Reálný vzorek .....	17
4 Výsledky .....	18
4.1 Identifikace fosfolipidových tříd .....	18
4.2 Rozlišení .....	20
4.3 Analýza reálného vzorku .....	22
5. Diskuze .....	24
6. Závěr .....	27
7. Literatura .....	29

## Seznam zkratk a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CAD	koronový detektor
CL	kardiolipin
DAD	detektor diodového pole
ELSD	detektor světelného rozptylu
ESI	ionizace elektrosprejem
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP-TLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometr
NP-LC	kapalinová chromatografie v normálním módu
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylethanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PI	fosfatidylinositol
PL	fosfolipid
PS	fosfatidylserin
RP-LC	kapalinová chromatografie v obráceném módu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová oblast spektra

## 1 Úvod

Současně využívanou metodou k určení poměru fosfolipidových tříd na Katedře genetiky a mikrobiologie (KGM) PřF UK je tenkovrstvá chromatografie, která sice nevyžaduje nákladné laboratorní přístroje, zato je ale náročná časově a nezbytná je i manuální zručnost pracovníka. Její další nevýhodou je nízká citlivost, obtížná kvantifikace a nemožnost elektronického sběru dat, který usnadňuje plánování analýz u většiny současně používaných chromatografických metod. Katedra Analytické chemie (KAch) PřF UK spolupracuje s RNDr. Gabrielou Seydlovou Ph.D. na vývoji instrumentální analytické metody, kterou by se zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd dalo měřit v přijatelném čase a s minimálními nároky na obsluhu. Spolupráce mezi výše zmíněnými katedrami je dlouhodobá, pracovnice KGM PřF UK již v minulosti využívaly přístrojového vybavení a zkušeností odborníků KACh PřF UK během výzkumného projektu<sup>1</sup>, jenž zkoumá produkci surfaktinu, potenciálně významného antibiotika a detergentu, který produkuje kmen bakterie *Bacillus subtilis*, studovaný na KGM PřF UK.

Cílem této práce je vyvinout přesnou, rychlou a nenákladnou metodu, která umožní určit poměr fosfolipidů, zastoupených v membráně *Bacillu subtilis*, a která by umožnila mikrobiologům sledovat a upravovat žádoucím směrem životní pochody bakterie, které se citlivě odráží právě v poměru jednotlivých fosfolipidových tříd. Přes množství publikovaných prací, zabývajících se separačními a spektrálními metodami analýzy fosfolipidů, žádná z nich nespĺňuje optimálně požadavky KGM PřF UK.

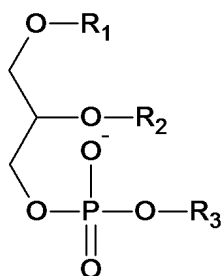
Impulsem k této práci byla oponentura prof. RNDr. Ladislava Feltla, CSc. k diplomové práci bc. Jany Mikulecké<sup>2</sup>, kde navrhoval použít stávající vyzkoušené podmínky TLC pro HPLC. Mezi dalšími požadavky na vyvinutí této metody bylo použití nenáročného UV detektoru, jehož případné pořízení by nemělo přesáhnout finanční možnosti standardní mikrobiologické laboratoře.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Fosfolipidy

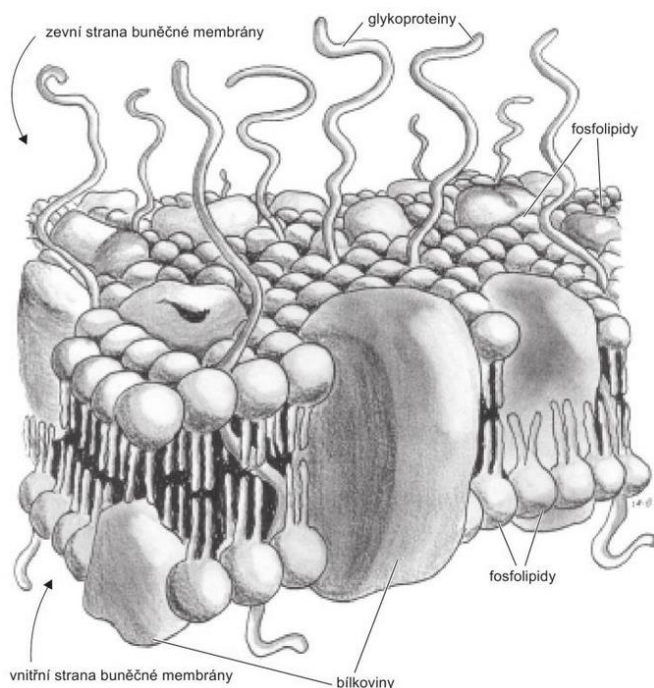
Jedná se o polární lipidy, estery glycerolu a dvou mastných kyselin (MK), nacházejících se na hydroxylových skupinách na pozicích *sn*-1 a *sn*-2 a kyseliny fosforečné na pozici *sn*-3 (viz obr. 2.1) Kyselina fosforečná může být ještě dále esterifikována.

Z chemického hlediska jsou fosfolipidy amfifilní molekuly – obsahují hydrofilní část (hlavici) a jeden nebo dva hydrofobní uhlovodíkové řetězce tvořené navázanými MK. Hlavice je se zbytkem molekuly propojena fosfátovou skupinou. Stejně znaky sdílejí i další typy membránových lipidů – steroly a glykolipidy.



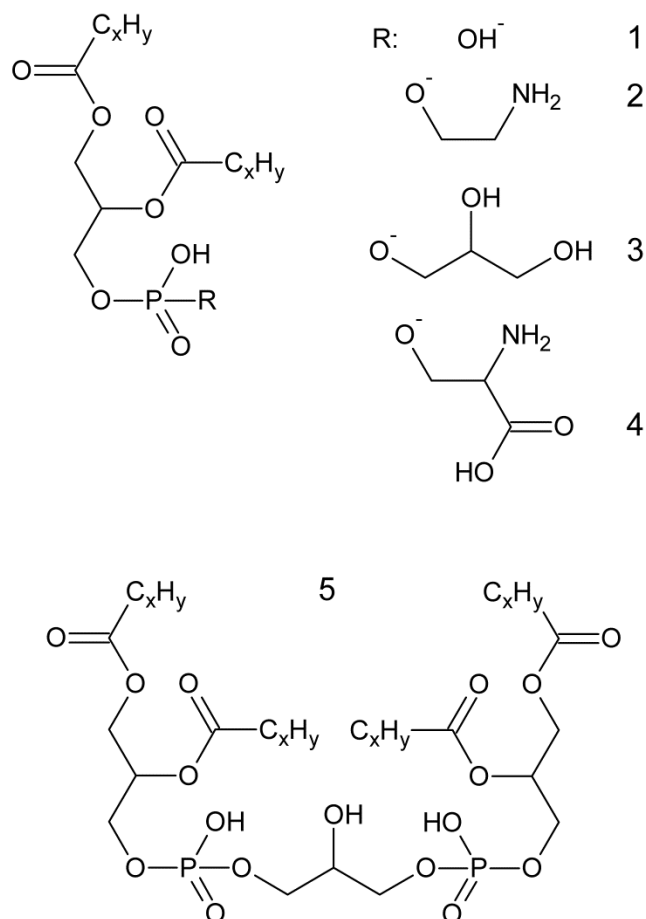
Obr. 2.1 Obecná struktura fosfolipidů: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> – mastné kyseliny; R<sub>3</sub> – nízkomolekulární látka, určující příslušnost k fosfolipidové třídě (serin, glycerol apod.).

Hydrofilní molekuly se vyznačují dobrou rozpustností ve vodě, což je dáno přítomností polárních funkčních skupin, obsahujících volné elektronové páry, které mohou vytvářet vodíkové můstky a jiné nekovalentní interakce s polárními molekulami vody. Hydrofilní hlavice PL je tedy solvatována vodou, zatímco hydrofobní řetězec se snaží agregovat s jinými hydrofobními molekulami. Hydrofobní molekuly jsou nenabitě a nepolární, vodíkové můstky netvoří a ve vodě jsou nerozpustné. Tato amfifilita molekul vede k vytváření micel nebo lipidové dvojvrstvy, které je energeticky nejvýhodnější. Hlavice jsou orientovány směrem do vody, uhlovodíkové řetězce naopak dovnitř micely či lipidové dvojvrstvy, kde jsou před vodou chráněny. Fosfolipidová dvojvrstva je strukturním základem buněčných membrán a určuje její fyzikální a chemické vlastnosti jako je fluidita, tlaková a teplotní stabilita, propustnost pro konkrétní látky a s tím související mezibuněčná komunikace<sup>3</sup>.



Obr. 2.2 Obrázek lipidové dvojvrstvy, znázorňující mimo fosfolipidů také proteiny a jejich zapojení do buněčné membrány<sup>4</sup>.

PL se nacházejí ve všech biologických membránách, které jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou (viz obr. 2.2), obsahující kromě lipidů také integrální membránové proteiny a další hydrofobní látky. PL frakce jsou složité směsi různých chemických individuí, které lze klasifikovat jak podle zastoupení MK, tak podle polárních hlavic do jednotlivých tříd. Polární hlavice vznikají různými biochemickými cestami. Nejčastěji se PL frakce dělí do těchto sedmi tříd: kyselina fosfatidová (PA), fosfatidylinositol (PI), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylcholin (PC), fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL). Zastoupení různých tříd v jednotlivých membránách je ovlivněno vnějšími podmínkami a liší se v závislosti na organismu a tkáni, některé třídy mohou i úplně chybět<sup>5</sup>. Struktury fosfolipidů, jimiž se zabývá tato práce, jsou na obr. 2.3.



Obr. 2.3 Struktury fosfolipidů vyskytujících se v membráně *B. subtilis*. Kyselina fosfatidová (1), fosfatidylaethanolamin (2), fosfatidylglycerol (3), fosfatidylserin (4), kardiolipin (5).

Fosfolipidy a sfingolipidy mají velký význam pro integritu buněčných membrán a dalších biologických funkcí, jako jsou buněčné signalizace, buněčné proliferace, enzymatické aktivace či vývoj mozku<sup>6</sup>. Změnou vnějších podmínek PL dvojvrstvy může dojít ke změně jejího složení, což vede např. ke změně fluidity membrány (způsobené změnou v poměru nasycených a nenasycených MK), dále fosfolipidy ovlivňují transport látek či buněčnou signalizaci<sup>2</sup>.

Nedávné studie ukázaly, že PL mají pozitivní nutriční účinky na lidské zdraví - snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, snížení hladiny cholesterolu v krvi či zlepšení funkce mozku. Dále byly intenzivně studovány jejich antioxidační vlastnosti, bakteriostatické vlastnosti a inhibiční účinek PL na rakovinu tlustého střeva. Změny ve složení PL byly zaznamenány u různých nemocí, čímž mohou sloužit jako diagnostické markery. Charakteristickým příkladem tohoto markeru je snížení hladiny plazmalogenů

v šedé hmotě mozkové u pacientů s Alzheimerovou chorobou<sup>7,8,9</sup> či snížení hladiny kardiolipinu v červených krvinkách u pacientů s Barthovým syndromem<sup>10,11</sup>.

Význam PL rovněž souvisí s jejich průmyslovým využitím, zejména v potravinářském průmyslu. Kombinací PL s proteiny se vyrábí emulgátory nebo stabilizátory emulze. Dále jsou využívány pro několik biomedicínských aplikací, jako je emulgace ve farmacii či příprava liposomů pro kosmetiku a podávání léků<sup>12</sup>.

### 2.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je gram-pozitivní, sporulující bakterie, která je růstově nenáročná a patří tedy k nejrozšířenějším druhům mikroorganismů. Některé kmeny jsou schopny produkovat surfaktin – antibiotikum a povrchově aktivní látku, jež zasahuje do cytoplazmatické membrány. Podíl aniontových fosfolipidů, zastoupených v membráně *Bacilla subtila*, roste v závislosti na zvyšující se koncentraci surfaktinu. Jedná se především o CL, který tvoří téměř čtvrtinu membránových fosfolipidů *Bacillu subtilis*. Mezi další fosfolipidy, zastoupené v cytoplazmatické membráně této bakterie patří PA, PE, PG a PS. PI a PC se v membráně nenacházejí a tudíž se jimi náš výzkum nebude zabývat<sup>12,13</sup>.

### 2.3 Metody

Bylo vydáno již velké množství publikací, popisující metody použité k charakterizaci a stanovení PL. Jednou z prvních technik byla TLC a následně HP-TLC. Obě techniky se dodnes používají, buď samostatně, nebo ve spojení s dalšími přístroji (např. hmotnostní spektrometr)<sup>14</sup>. Před analýzou na MS musí být pásy PL odebrány z TLC desek a poté re-extrahovány do vhodného rozpouštědla. Tato metoda je ovšem časově náročná a vyžaduje zručnost pracovníka. Kvantitativní stanovení je navíc složité a často nepřesné<sup>6</sup>.

Zdaleka nejčastěji používaná analytická metoda pro kvantifikaci PL je HPLC spojená buď MS nebo s ELSD detekcí. Separace pomocí HPLC vykazuje větší přesnost, reprodukovatelnost, stabilitu a nižší limit detekce. Princip rozdělení složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi je analogický TLC, nicméně konstrukční uspořádání HPLC umožňuje rychlejší, selektivnější a především citlivější analýzu. PL můžeme separovat do jednotlivých tříd na základě jejich rozdílné polarity. Tato metoda je v neustálém

vývoji již od roku 1975, kdy docházelo k separaci a stanovení derivátů PL (obsahující primární aminoskupinu) za použití UV detektoru<sup>15</sup>.

### 2.3.1 Normální a reversní mód LC

Reversní mód kapalinové chromatografie (RP-LC), který je v současné době nejpoužívanějším LC uspořádáním, je pro klasifikaci jednotlivých PL tříd vyloženě nevhodný, neboť je potřeba separovat PL podle jejich polárních hlav a nikoliv dle jejich acylů<sup>16</sup>.

Normální mód (NP-LC) oproti RP-LC využívá polární stacionární fázi, nejčastěji silikagel, se kterým interagují analyty svými polárními skupinami. V případě PL se jedná právě o ty části molekul, dle kterých jsou klasifikovány do tříd. NP-LC vyžaduje použití pouze mírně polárních (bezvodých) mobilních fází (MF), které lze použít rovněž pro extrakci PL z biologických matric. Tradičně používaným extrakčním činidlem je směs chloroformu a methanolu (Folchovo činidlo) v různém poměru. Protože použití methanolu v MF by znemožňovalo spektrofotometrickou detekci (viz kap. 2.4.3), je nutné zvolit jiné kombinace rozpouštědel. Těmto účelům vyhovuje směs hexanu a propan-2-olu, používaná jako MF také v TLC<sup>13</sup>.

### 2.3.2 HILIC

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je alternativní způsob chromatografie v analýze silně polárních sloučenin. V posledních letech se tato metoda těší velké popularitě, jelikož polární sloučeniny nejsou v RP-LC dostatečně zadržovány a naopak u NP-LC jsou zadržovány příliš. Používají se polární organické mobilní fáze (více než 60% organického rozpouštědla, méně než 40% vody), které jsou méně viskózní ve srovnání s RP-LC (u té nemusí být podíl vodné složky omezen). Polární analyty mají lepší rozpustnost v HILIC mobilní fázi, než u NP-LC, kde je mobilní fáze bezvodá. Mezi další výhody HILIC patří dobrá kompatibilita s MS<sup>17</sup>. Množství komerčně dostupných kolon, určených především pro HILIC, stále roste. Nejčastěji se používají kolony z oxidu křemičitého a jeho případné modifikace s různými polárními funkčními skupinami – např. aminovými, kyanidovými, diolovými a sulfoalkylbetainovými skupinami. Dále se používají polymerové kolony, modifikované např. cyklodextriny a cyklofruktany<sup>18</sup>.

### 2.4 Detektory

Detekce PL se nejčastěji provádí na základě absorpce v UV oblasti, rozdílné molekulové hmotnosti a rozptylu světla na analytech po odpaření mobilní fáze.

#### 2.4.1 ELSD a CAD

Standardní metoda pro separaci a stanovení PL v potravinářských matricích je HPLC ve spojení s ELSD<sup>19</sup>. Jedná se o univerzální detektor, mezi jehož výhody patří kompatibilita s velkým množstvím rozpouštědel a gradientovou elucí (na rozdíl od refraktometrického detektoru). Signál navíc není závislý na stupni nasycení a délce acylové řetězce (výhoda oproti UV detektoru). Tento způsob navíc není ovlivněn průtokem rozpouštědla nebo okolní teplotou. Reprezentuje destruktivní, kvantitativní analýzu (polo- nebo) netěkavých rozpuštěných látek, za relativně nízkou cenu. Problémem může být nelinearita odezvy detektoru v případě kvantitativní analýzy. Řešením těchto problémů by mohl být CAD (koronový detektor). Oba detektory jsou podobné, ale liší se způsobem, kterým jsou rozpuštěné částice detekovány.

#### 2.4.2 Hmotnostně-spektrometrický detektor

V posledních letech se rozšířila detekce pomocí spřažení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Výhody detekce MS spočívají v měření jednotlivých molekulových hmotností, s čímž souvisí větší přesnost, selektivita, citlivost ve srovnání s ostatními detektory.

Jelikož PL třídy nejsou chemická individua, jejich molekulová hmotnost je závislá na druhu navázaných MK, je tedy nutné sledovat pro každou třídu desítky molekulových hmotností, případně jejich interval, který je ovšem nutno znát ještě před začátkem měření. Pro analýzu neznámých vzorků PL je nutné použít široký interval sledovaných molekulových hmotností, což může negativně ovlivnit citlivost. Spřažení HPLC-MS vylučuje použití některých mobilních fází, které by mohly poškodit MS. Jedná se zejména o minerální a jiné netěkavé pufrы a rozpouštědla, která se obtížně odpařují. Navíc pořizovací cena je vysoká a provozní náklady rovněž. Tyto faktory se zdají být limitující pro masové zavedení LC-MS v nesespecializovaných biologických laboratořích<sup>20</sup>.

### 2.4.3 UV a DAD

Spektrofotometrické detektory měří absorpenci látek obvykle v oblasti vlnových délek od 180 do 800 nm. Jelikož PL absorbují pouze při vlnových délkách, které odpovídají UV oblasti okolo 200 nm<sup>21, 22</sup>, použití tohoto detektoru pro analýzu fosfolipidů je problematické. Přitom právě tento detektor by byl nejvhodnější pro mikrobiologická pracoviště pro svou uživatelskou nenáročnost, nízké provozní náklady, pořizovací cenu a relativní univerzálnost použití. Nízká absorpance PL limituje použití některých rozpouštědel pro přípravu mobilní fáze, zejména methanol, který se běžně používá jako extrakční činidlo PL. Toto omezení činí vývoj metod pro HPLC s UV detekcí celkem obtížným. Důkazem toho jsou desítky článků zabývajících se separací PL v tomto uspořádání, které se liší použitou MF, aniž by se během let prosadila jakákoliv standardní univerzálně používaná metoda pro spektrofotometrickou detekci<sup>23,24</sup>.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

#### 3.1.1 Příprava standardů

Standardní vzorky fosfolipidů od firmy Sigma-Aldrich (viz tab. 3.1) byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Od každého standardu byl odvážen 1 mg na analytických vahách Sartorius 2004 MP s přesností na 0,1 mg, který byl poté rozpuštěn v 1 ml složky A mobilní fáze za pomoci sonikace v ultrazvukové lázni, takže použité koncentrace standardů fosfolipidů činily 1 mg/ml.

Tabulka 3.1: Čistoty použitých látek

Chemikálie	Čistota [%]	Výrobce
Standardy		
Kyselina fosfatidová	98	Sigma-Aldrich
Fosfatidylethanolamin	97	Sigma-Aldrich
Fosfatidylserin	70	Sigma-Aldrich
Fosfatidylglycerol	99	Sigma-Aldrich
Kardiolipin	98	Sigma-Aldrich
Rozpouštědla		
Hexan, HPLC grade	97	Sigma-Aldrich
Propan-2-ol, LC-MS grade	99	Fluka

#### 3.1.2 Příprava mobilní fáze

Pro gradientovou separaci fosfolipidů na HPLC jsme použili dvousložkovou mobilní fázi, skládající se z těchto složek: složka A. hexan:propan-2-ol (3:2, v/v), složka B. hexan:propan-2-ol:voda (56,7:37,8:5,5)<sup>21</sup>. Mobilní fáze byly před použitím vždy přefiltrovány a uchovávány v reagenčních lahvích.

### 3.2 Instrumentace

Separace byla prováděna pomocí chromatografického systému Shimadzu 20 A a polární kolony Luna Silica od firmy Phenomenex. Podrobná sestava systému je uvedena

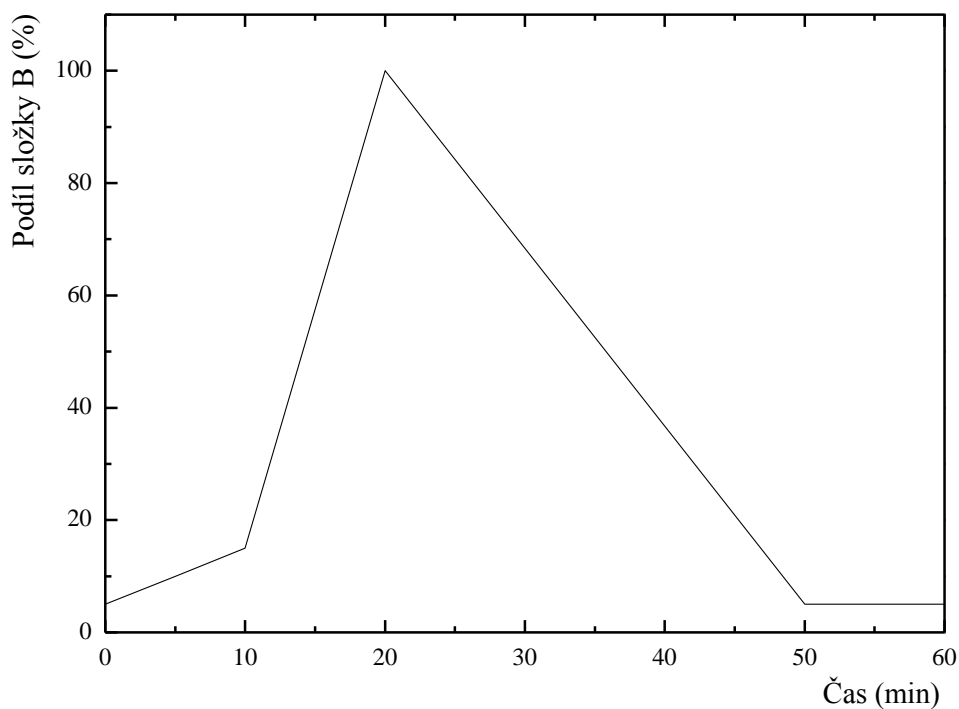
v tabulce 3.2. Analyty byly detekovány spektrofotometricky při vlnové délce 205 nm. Objem nástřiku vzorků na kolonu byl 20  $\mu$ l.

Tabulka 3.2: Chromatografický systém

Část chromatografu	Model
Odplyňovač	DGU-20A5R
Pumpa	LC-20AD
Kolona	Luna Silica 150 x 2.0 mm, vel. částic 3 $\mu$ m
UV-VIS Detektor	SPD-20AV

### 3.3 HPLC Metoda

Pro HPLC separaci byla zvolena gradientová eluce, konkrétně gradient vody ve směsi s hexanem a propan-2-olem (viz kap. 3.1.2). Optimalizace gradientu se odvíjela od publikovaných podmínek<sup>21</sup>, kde byly použity dvě rychlosti vodného gradientu (viz obr 3.1).

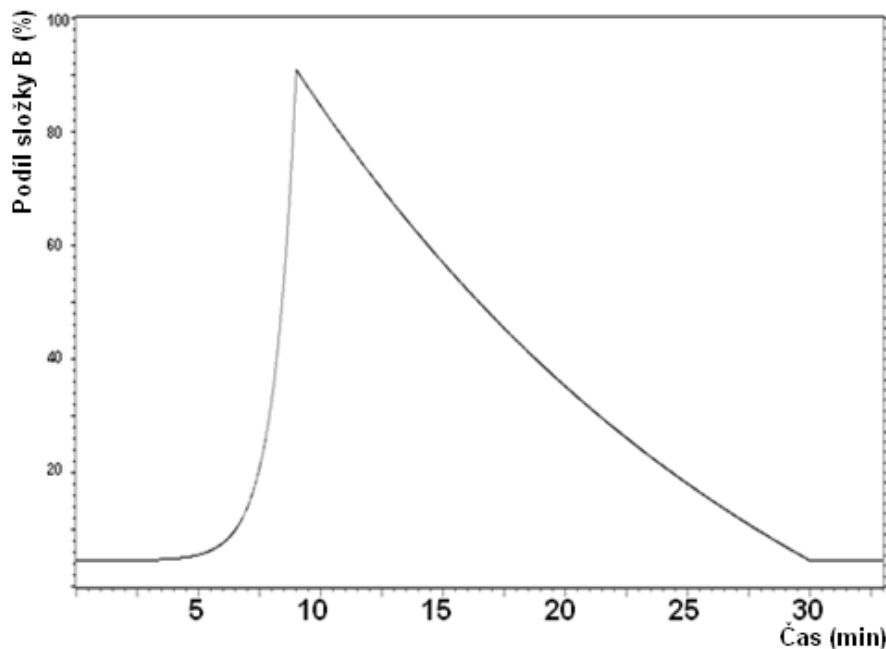
Obr. 3.1 Průběh výchozího gradientu<sup>21</sup>

Jelikož byl původní gradient použitý pro kolonu s jinými rozměry, bylo nutno přepočítat rychlost průtoku pomocí on-line kalkulátoru ([ww.hplc.cz](http://www.hplc.cz)). Gradient byl s přihlédnutím k poměru délek kolon zkrácen na 45 % (viz tab. 3.3).

Tabulka 3.3: Přepočet parametrů gradientu

	Původní kolona/gradient	Použitá kolona/gradient
délka (mm)	250	150
průměr (mm)	4,6	2,0
průměr částic ( $\mu\text{m}$ )	5	3
konec gradientu (min)	20	9
průtok (ml/min)	1,5	0,28
celkový čas (min)	55	33

Používaný HPLC systém umožňuje nelineární gradient, a proto byl používaný gradient definován křivkou, nikoli dvěma přímkami. Parametry této křivky jsou složité a jejich přesná matematická podstata není v rámci ovládacího softwaru vysvětlena. Pro nejúčinnější separaci stanovovaných látek byl použit gradient na obr. 3.2, jeho parametry (finální čas gradientu a sklon křivky - curve) byly optimalizovány empiricky. Vzhledem k nižší reprodukovatelnosti gradientové eluce bylo nalezení podmínek pro optimální rozlišení všech analytů obtížné.



Obr. 3.2 Náhled použitého gradientu. Výstup z měřícího softwaru; graficky upravený.

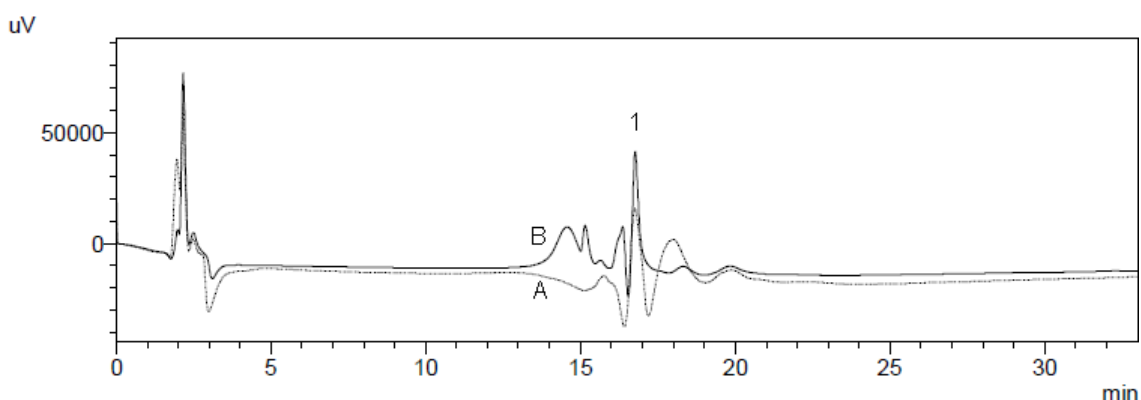
### 3.4 Reálný vzorek

Reálným vzorkem pro analýzu fosfolipidů byl vysušený lyzát membrány *B. subtilis* ATCC 21332, poskytnutý RNDr. Gabrielou Seydlovou, Ph.D. z KGM PřF UK. Vzorek byl připraven standardním způsobem<sup>1</sup>.

## 4 Výsledky

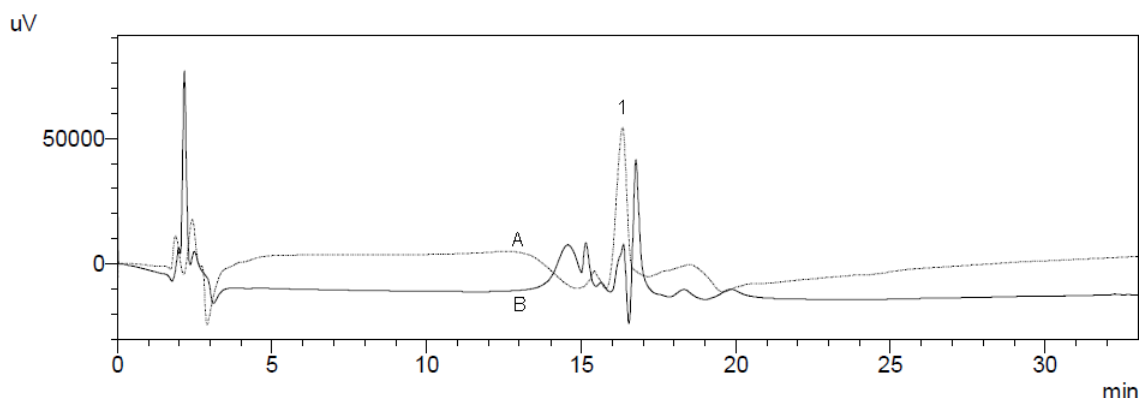
### 4.1 Identifikace fosfolipidových tříd

Prvním krokem identifikace bylo ověření separačních podmínek analýzou ekvimolární směsi standardů všech fosfolipidových tříd (viz kap. 3.1). Následovalo stanovení retenčních časů jednotlivých standardů a jejich porovnání s chromatogramem směsi. Vzhledem k tomu, že se retenční časy samostatných standardů s retenčními časy analytů ve směsném chromatogramu shodovaly, byl tento způsob identifikace považován za dostatečný. Analyty eluovaly v následujícím pořadí: CL, PE, PA, PG, PS.



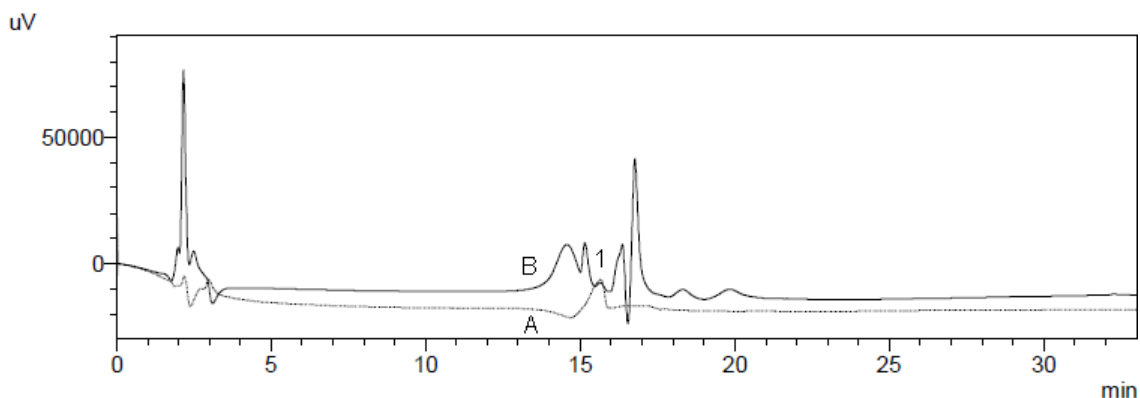
Obr. 4.1 Porovnání chromatogramu fosfatidylserinu (A) a směsi PL (B). Fosfatidylserin je vyznačen (1). Měřeno za podmínek nelineárního gradientu viz kap. 3.2; tab 3.3.

Fosfatidylserin eluoval jako poslední ze všech analytů, v čase 16.76 min (viz obr. 4.1). Jeho silná retence je pravděpodobně způsobena přítomností dvou disociovatelných funkčních skupin, které dávají molekule charakter obojetného iontu.



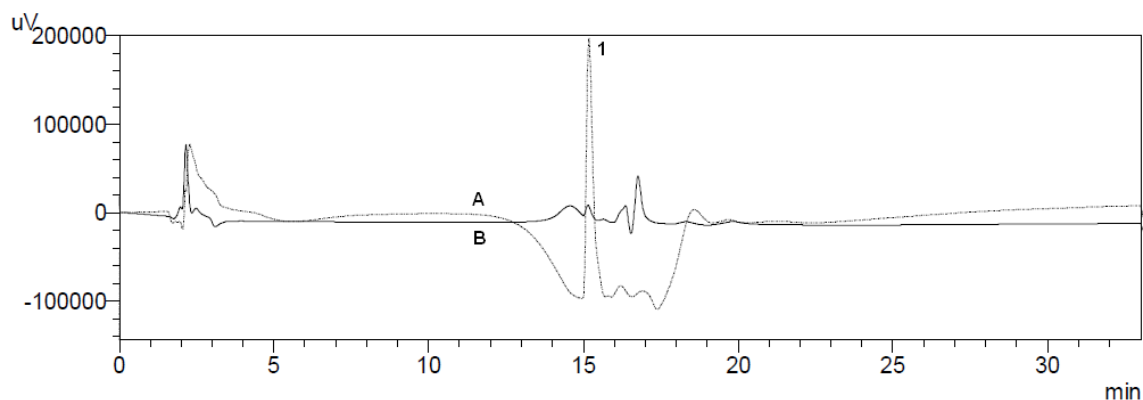
Obr. 4.2 Porovnání chromatogramu fosfatidylglycerolu (A) a směsi PL (B). Fosfatidylglycerol je vyznačen (1). Podmínky viz obr. 4.1.

Druhým nejdéle zadržovaným analytem na koloně byl fosfatidylglycerol. Eluoval v čase 16,34 min (viz obr. 4.2) a rozdíl v intenzitě odezvy v případě samostatného standardu a standardu ve směsi byl mnohem větší, než u předchozího analytu. Koncentrace PG ve směsi, jež byla namíchána ze zásobních roztoků, je pětikrát menší, a tudíž je rozdíl ve velikosti odezvy PG v této směsi a v zásobním roztoku očekávatelný.



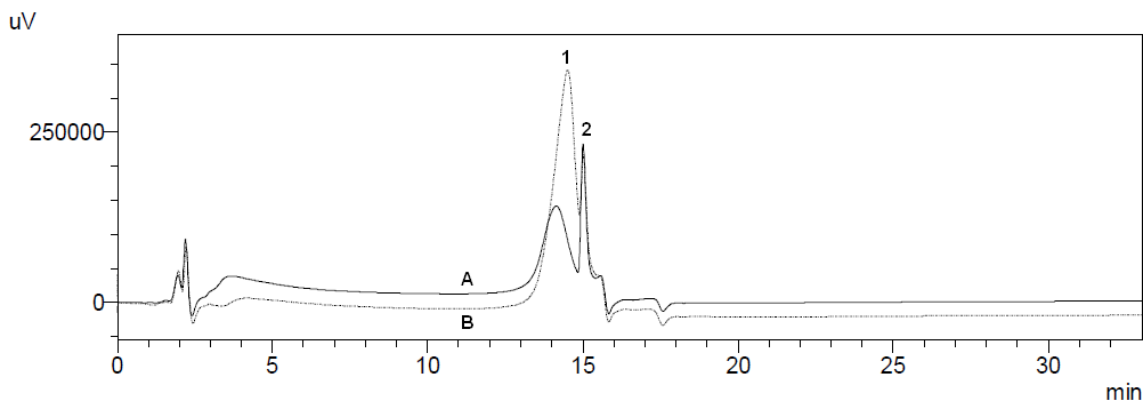
Obr. 4.3 Porovnání chromatogramu kyseliny fosfatidové (A) a směsi PL (B). Kyselina fosfatidová je vyznačena (1). Podmínky viz obr. 4.1.

Jako třetí v pořadí eluovala kyselina fosfatidová, a to v čase 15,64 min. Odezva tohoto analytu byla ze všech nejmenší, a to řádově menší než u ostatních analytů. Příčiny takto nízké odezvy nejsou z chromatogramu zřejmé, mohou být způsobeny mnoha faktory, jež jsou probrány v diskuzi (kap.5).



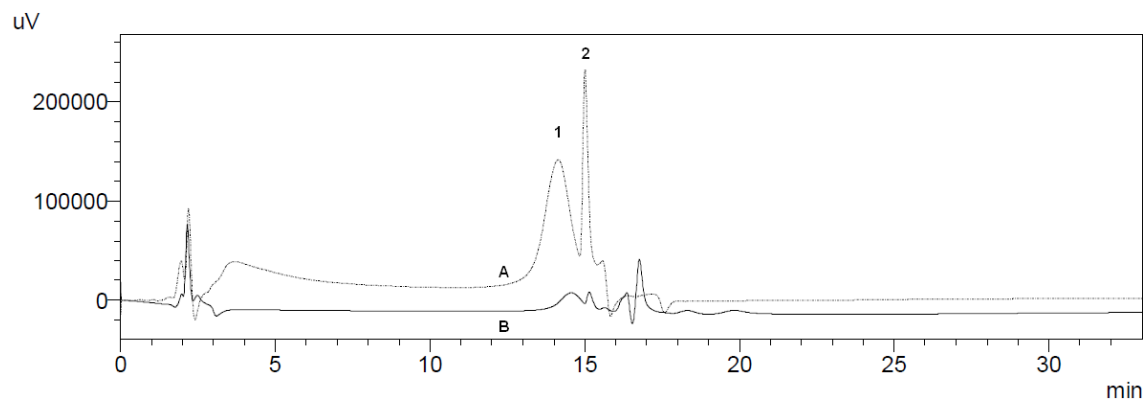
Obr. 4.4 Porovnání chromatogramu fosfatidylethanolaminu (A) a směsi PL (B). Fosfatidylethanolamin je vyznačen (1). Podmínky viz obr. 4.1.

Fosfatidylethanolamin eluoval v čase 15,14 min (viz obr. 4.4). Jeho charakteristický tvar peaku, který zajišťoval vysoké rozlišení, posléze sloužil jako interní standard pro ověření retenčního času kardiolipinu (viz obr. 4.5).



Obr. 4.5 Porovnání chromatogramu směsi kardiolipinu (1) a fosfatidylethanolaminu (2). Ekvimolární směs obou standardů (A), směs obsahující kardiolipin v dvojnásobném přebytku (B). Podmínky viz obr. 4.1.

Analýza kardiolipinu dopadla nejednoznačně. Pro spolehlivé určení jeho retenčního času 14,56 min bylo zapotřebí použití přídavku fosfatidylethanolaminu ke standardu kardiolipinu (viz obr. 4.6), aby byla vyloučena jeho záměna s odezvami jiných látek.



Obr. 4.6 Porovnání chromatogramu (A) směsi kardiolipinu (1) s fosfatidylethanolaminem (2) a směsi (B). Podmínky viz obr. 4.1.

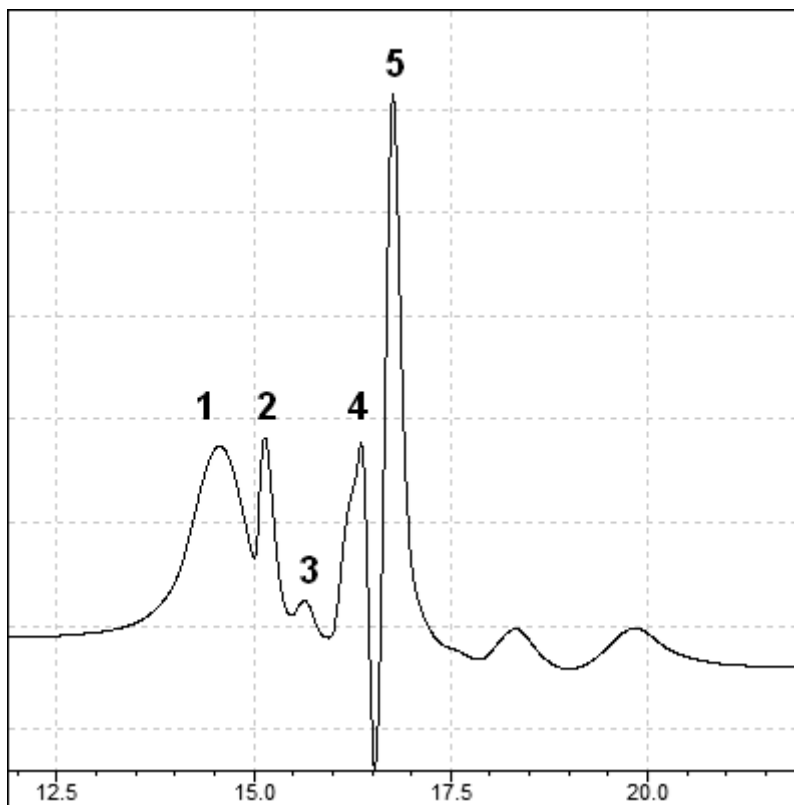
## 4.2 Rozlišení

Po identifikaci peaků všech standardů bylo spočítáno rozlišení pro jednotlivé dvojice (viz tab. 4.1). Pro výpočet hodnot byly použity retenční časy a šířky peaků v polovině jejich výšky z důvodů špatně definovatelné základní linie.

Tabulka 4.1: Rozlišení peaků

	retenční čas min	šířka peaku v ½ výšky min	rozlišení
kardiolipin	14,564	0,554	0,95
fosfatidylethanolamin	15,142	0,162	1,60
kyselina fosfatidová	15,642	0,207	1,73
fosfatidylglycerol	16,359	0,282	1,00
fosfatidylserin	16,763	0,197	1,00

I přestože hodnoty rozlišení u dvou dvojic (CL-PE, PG-PS) jsou menší než 1,5, tak v případě PG-PS je rozlišení dostatečné pro kvalitativní analýzu (viz obr. 4.7). Jelikož peak PG je rozmyt na začátku (frontuje), jeho šířka v polovině výšky je větší, než by byla u peaku gaussovského tvaru, pro nějž je používán standardní vzorec na výpočet rozlišení. V případě dvojice CL-PE je nízké rozlišení způsobeno nadměrným rozmytím zóny kardiolipinu.

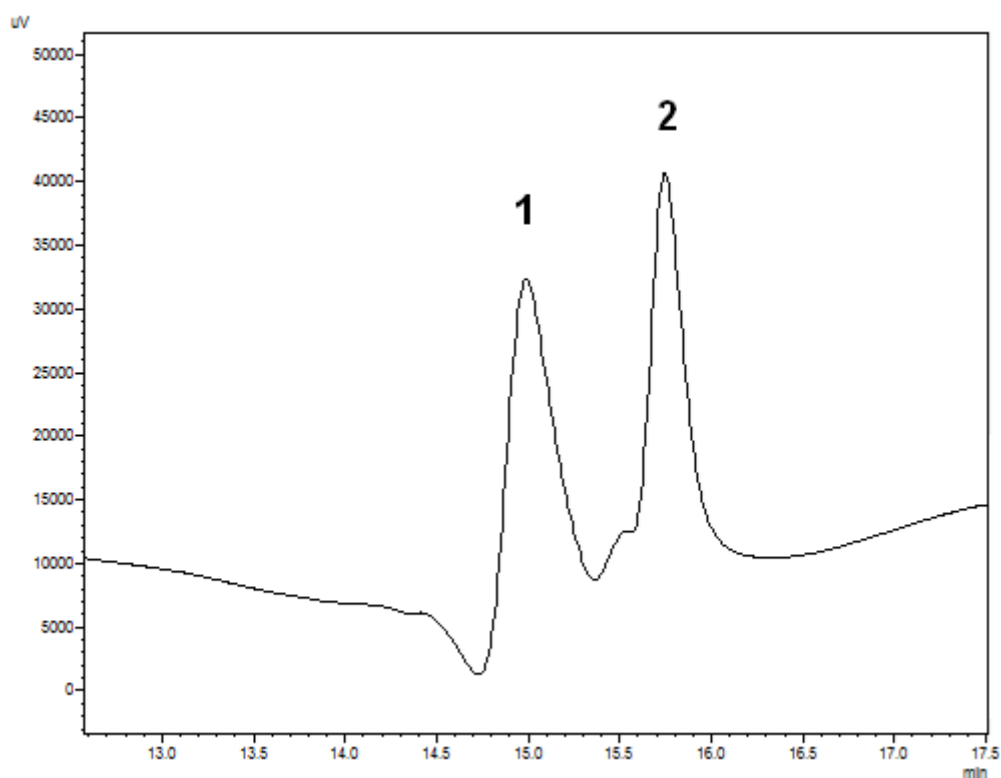


Obr. 4.7 Chromatogram standardů fosfolipidů. Kardiolipin (1), fosfatidylethanolamin (2), kyselina fosfatidová (3), fosfatidylglycerol (4), fosfatidylserin (5). Podmínky viz obr. 4.1.

## 4.3 Analýza reálného vzorku

Hmotnost suchého vzorku bakteriálních membránových lipidů (viz kap. 3.4) poskytnutých KGM PŘF UK nebyla udána a vzhledem k přípravě vzorku ji ani nelze definovat<sup>25</sup>. Z předešlých zkušeností lze předpokládat, že se jedná o cca 1 mg a od této úvahy se odvíjelo i použité ředění, jehož účelem bylo naředit reálný vzorek na podobnou koncentraci, jako standardy. Objem přidané složky A mobilní fáze činil 200  $\mu\text{l}$ .

Nejprve byl na kolonu nadávkován objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , aby se předešlo případnému zahlcení systému. Při takto malém objemu byly detekovány pouze PE a PG (viz obr. 4.8), dva majoritně zastoupené fosfolipidy v membráně *B. subtilis*1.

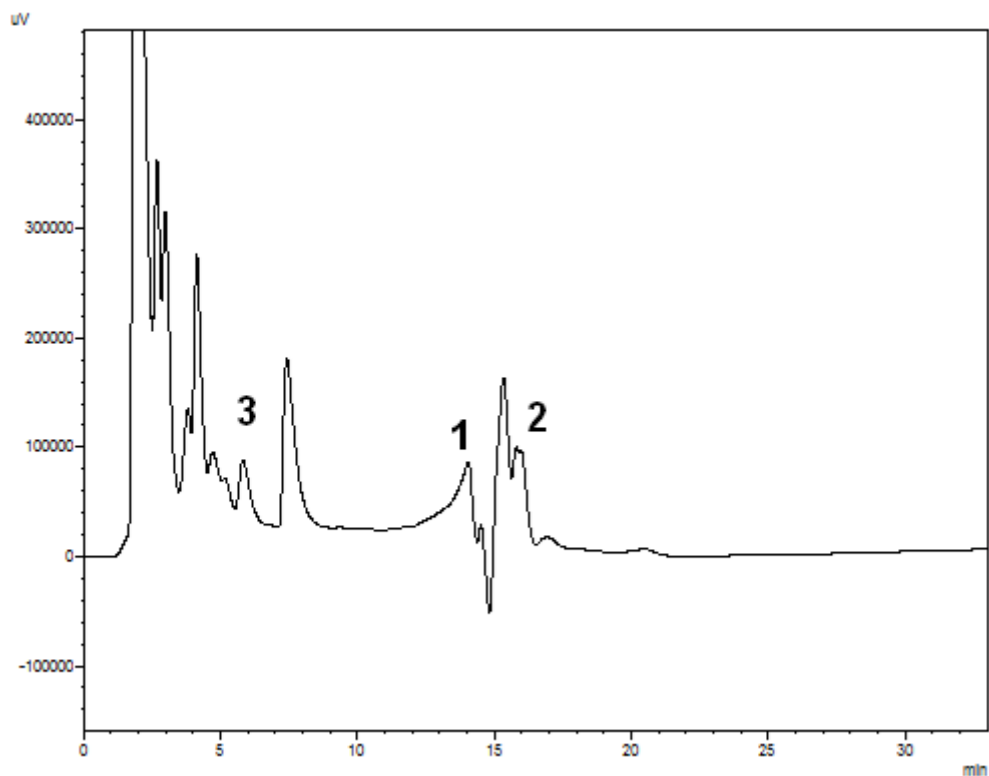


Obr. 4.8 Chromatogram membránových lipidů bakterie. Dávkový objem 1  $\mu\text{l}$ . Fosfatidylethanolamin (1), fosfatidylglycerol (2). Podmínky viz obr. 4.1.

Za účelem stanovení zbývajících minoritních fosfolipidů byl nejdříve zvýšen dávkový objem na 20  $\mu\text{l}$ . Za těchto podmínek byla detekována i kyselina fosfatidová. Dalším krokem k detekci zbývajících analytů bylo zakoncentrování vzorku. Nejdříve

bylo zbývající rozpouštědlo odpařeno v proudu N<sub>2</sub> a poté byl vzorek doplněn 50 μl složky A mobilní fáze.

Při zvýšení koncentrace analytů na cca čtyřnásobek byly již pozorovatelné odezvy dalších fosfolipidů, nicméně rozlišení mezi PG a PS je příliš nízké k tomu, aby bylo možno určit jejich poměr. Navíc PE nejspíše koeluuje s CL (viz obr. 4.9).



Obr 4.9 Chromatogram reálného vzorku o čtyřnásobné koncentraci oproti obr. 4.8. Směsný peak CL a PE (1), koeluující peak PG a PS (2). Reálný vzorek může obsahovat glykolipidy a jiné polární lipidy extrahované spolu s fosfolipidy (3). Podmínky viz obr. 4.1.

## 5. Diskuze

Separační účinnost použité metody se ukázala být za určitých podmínek dostatečná, přestože analýzy standardů fosfolipidů i samotného vzorku doprovázelo mnoho komplikací různého charakteru. Reprodukovatelnost retenčních časů analytů odpovídala dlouhodobě, a to i za použití nově připravených mobilních fází, z čehož vyplývá, že používaná metoda gradientové eluce je dostatečně robustní pro klasifikaci fosfolipidů podle jednotlivých tříd.

Spolehlivě reprodukovatelné retenční časy umožňují dlouhodobé určování poměru fosfolipidových tříd. Jedním z hlavních účelů této práce bylo porovnání separace vzorku na tenkovrstvé a kapalinové chromatografii. Fosfatidylglycerol a fosfatidylethanolamin se ukázaly být majoritními složkami ve vzorku membránových lipidů jak u TLC, tak i HPLC. Odezvy zbývajících fosfolipidů byly sice pozorovány, ovšem pouze při nástřiku většího objemu vzorku. Při nástřiku menšího objemu nedochází k detekci některých fosfolipidů, zatímco zvýšením koncentrace některé peaky koeluuji. Zóna kardiolipinu se ukázala být násobně delší než u ostatních fosfolipidů. Tento jev by mohl být vysvětlený faktem, že se jedná o difosfatidylglycerol, jehož molekulová hmotnost je mnohem větší ve srovnání s ostatními separovanými fosfolipidy. Dlouhá zóna kardiolipinu může být při vyšší koncentraci zároveň příčinou koeluce s odezvou fosfatidylethanolaminu. Za těchto okolností je metoda použitelná pouze v nízkém koncentračním rozsahu. Jelikož je hmotnost dodávaného vzorku membránových lipidů neznámá a nedefinovatelná vzhledem k metodě jejich izolace<sup>25</sup>, byla by zapotřebí kolona s lepším rozlišením. Těmto požadavkům by vyhovovala např. kolona obsahující částice s pevným jádrem, která má daleko vyšší rozlišení a tak by byla použitelná ve větším koncentračním rozsahu. To by také umožnilo kalibraci metody v rozsahu více koncentračních řádů, což by usnadnilo výpočet poměru fosfolipidových tříd. Odezvové faktory jednotlivých fosfolipidů se mezi sebou velmi liší, což představuje problém pro stanovení poměru z ploch peaků.

V poslední době vyšlo několik tematických publikací, věnujících se separaci polárních lipidů. Separační podmínky se v těchto pracích od našeho uspořádání mírně liší, pravděpodobně také kvůli optimální separaci částečně odlišné skupiny analytů. Porovnávání naměřených výsledků má smysl pouze s publikacemi, které pro svoji práci také použily polární kolony.

Experimentálně zjištěné pořadí eluujících fosfolipidů se s dříve publikovanou literaturou obecně shoduje. Pro porovnání je nutné nahlížet do více publikací, jelikož fosfolipidy, které se vyskytují v membráně *Bacillus subtilis* (CL, PE, PA, PG, PS), nebyly doposud společně analyzovány jako skupina. Eluční pořadí CL, PE a PS se shoduje s publikací, ve které byly separovány analyty také pomocí NP-HPLC<sup>26</sup>, ale zbývající dva analyty tato práce nezahrnovala. PA i PG byly v jiné práci<sup>27</sup> separovány společně s PE; eluční pořadí PA a PG odpovídá naměřeným výsledkům, nicméně z retenčních časů uvedených v článku vyplývá, že dochází k překryvu s PE, a proto eluční pořadí tohoto analytu nemůže být spolehlivě porovnáno. Pořadí PE a PG, které jsou pro výzkum *Bacillus subtilis* nejdůležitější, nelze dost dobře porovnat se stávající literaturou. V pracích, které zároveň analyzují tyto dva analyty, jsou použity zcela jiné podmínky, a to pufrované mobilní fáze<sup>28</sup> a iontově-párová činidla<sup>29</sup>. V těchto publikacích eluuje PG dříve než PE, ale vzhledem k rozdílu ve složení mobilní fáze jsou rozdíly v elučním pořadí pochopitelné.

Publikace, věnující se separaci PG a PE, za podmínek srovnatelných s podmínkami v této práci (mobilní fáze bez methanolu, umožňující UV detekci atd.) obecně chybí. Separace fosfolipidů pomocí HPLC systému vyžaduje řešení ještě dalších problémů, které postupně vyplynuly v průběhu měření. Jejich řešení jsou popsány v následujících odstavcích.

Příčinou hlavního problému, doprovázejícího separaci, byla pravděpodobná sorpce fosfolipidů na koloně a jejich případná eluce během následujících analýz. Tento problém bylo nutno řešit promýváním kolony čistým propan-2-olem až do jejich úplné eluce. Po promytí bylo nutné vždy provést slepý pokus a tyto dva kroky značně prodloužily dobu identifikace jednotlivých fosfolipidových tříd a další analýzy. Během optimalizace podmínek měření pro tuto bakalářskou práci bylo nutné provést regeneraci kolony. Postup byl zvolen podle návodu v uživatelské příručce, jež byla dodána ke koloně a spočíval v jejím otočení proti směru toku mobilní fáze a následném promytím sérií rozpouštědel<sup>30</sup>.

Doba analýzy je 33 min, nicméně tento čas včetně ekvilibrace kolony nelze prozatím zkrátit. Analyty jsou zadržovány na koloně, eluují až po dosažení vrcholu gradientu v průběhu návratu složení mobilní fáze do počátečního stavu. Zkrácení či úprava gradientu by v tomto případě byla na úkor již hraničního chromatografického rozlišení.

Během všech analýz bylo zapotřebí používat rozpouštědla HPLC čistoty, a to i pro přípravu zásobních roztoků. V případě použití hexanu o čistotě p.a. nebylo možno detekovat žádné analyty, kvůli nízké citlivosti, způsobené vysokou absorbcí mobilní fáze. Propan-2-ol o čistotě p.a. sice detekci neznemožňoval, ale způsoboval šum zapříčiněný vysokou absorbcí pozadí.

Nízká rozpustnost kyseliny fosfatidové a fosfatidylserinu musela být řešena přidáním několika kapek vody a opakovanou sonikací v ultrazvukové lázni. Kyselina fosfatidová i přesto vykazovala velmi nízkou odezvu. Její příčinou by mohlo být zachycení špatně rozpuštěných částic standardu na fritě, která chrání kolonu před mechanickými nečistotami a látkami, jež se ireverzibilně váží na kolonu. Část vzorku by se tak na kolonu vůbec nedostala a tudíž by došlo ke snížení odezvy daného fosfolipidového standardu v chromatogramu. Tento problém byl ovšem zaznamenán pouze v případě kyseliny fosfatidové a i přes stejně špatnou rozpustnost fosfatidylserinu v mobilní fázi, jeho separaci obdobné problémy nedoprovázely.

Z pozorování během měření jednoznačně vyplývá, že vzorky je nejlepší připravovat vždy čerstvé, neboť mají tendenci se rychle srážet (PA, PS), což vyžaduje přidání další vody, čímž se snižuje koncentrace analytu a zvyšuje podíl vodné složky. Dochází tedy k nedefinovatelným změnám podmínek, znemožňujících spolehlivou kvantifikaci. Podobný problém nastává v případě vytěkání mobilní fáze z vialek se standardy. Podíl hexanu v rozpouštědle je 60 %, a tudíž nelze předpokládat, že koncentrace analytů v průběhu dní zůstane konstantní.

### 6. Závěr

Metoda pro zjištění poměru fosfolipidových tříd v vyskytujících se v membráně bakterie *B. subtilis* byla vyvinuta a otestována na příslušném vzorku. Doba analýzy 33 min i s nutností ekvibrace kolony a případným proplachování propan-2-olem představuje značné urychlení analýzy membránových lipidů, které se až doposud stanovují pomocí TLC, jež trvá několik dní.

HPLC metoda, vycházející z používaných TLC podmínek, byla optimalizována pro UV detekci a polární kolonu. Podmínky separace byly převzaty z literatury a upraveny pro novější typ kolony. Publikovaný dvoustupňový lineární gradient byl nahrazen nelineárním. Parametry křivky gradientu byly optimalizovány empiricky a pro analýzy byl vybrán gradient s nejúčinnější separací.

Analýza reálného vzorku umožnila při nástřiku 1  $\mu$ l detekci majoritních fosfolipidových tříd v membráně *B. subtilis*. Pro detekci minoritních PL tříd byl zapotřebí nástřik většího objemu, který se ovšem negativně odrazil na účinnosti separace. Objem nástřiku, umožňující detekci minoritních tříd, obsahuje příliš velké množství majoritních fosfolipidů, jejichž zóna se rozmývá a může docházet i k jejich sorpci na koloně. Nejzávažnějším problémem metody se tedy ukázal být nízký koncentrační rozsah. Závažnost tohoto nedostatku se projevuje při analýze vzorku s nedefinovaným množstvím fosfolipidů. S nízkým koncentračním rozsahem dále souvisí obtížnost kalibrace a zjištění odezvových faktorů jednotlivých fosfolipidových tříd.

Rozlišení odezev analytů, odpovídajících jednotlivým fosfolipidovým třídám, se pohybovalo v rozmezí 0,95-1,73. Nejnižší hodnota rozlišení sice ukazuje na částečně koelující peaky, nicméně pro účely kvantifikace je dostatečné. Koncentrace kardiolipinu je v reálném vzorku několikanásobně menší, než koncentrace fosfatidylethanolaminu, a tudíž je v tomto případě koeluce zanedbatelná.

Přestože se jedná o metodu NP-HPLC s vodným gradientem, opakovaná příprava mobilní fáze a zásobních roztoků prokázaly její robustnost. Retenční časy analytů se v průběhu měsíců a za použití průběžně připravovaných mobilních fází významně neměnily. Rovněž retenční časy fosfolipidů z bakteriální membrány a komerčně dodávaných standardů se shodovaly, i přestože se pravděpodobně liší složením

mastných kyselin. Metoda se tedy ukázala být univerzálně použitelná pro fosfolipidy různého původu.

Převzetí této metody by v budoucnosti mohlo ušetřit čas mikrobiologům z KGM a tím pádem přispět k urychlení zavedení surfaktinu, produkovaného kmenem *B. subtilis*, do průmyslu.

## 7. Literatura

- 1 Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala, R.; Kozlík, P.; Svobodová, J.; Pátek, M. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**, 2370-2378 (2013).
- 2 Mikulecká, J. (2013): Vývoj analytických metod pro stanovení fosforylovaných složek bakteriálních buněčných membrán. Univerzita Karlova, Katedra analytické chemie, diplomová práce, Praha.
- 3 Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Ralf, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. 2. vydání Ústí nad Labem, Espero Publishing 2005.
- 4 *Člověk, jeho smysly a svět*. M. Orel, V. Facová (Eds.). Praha, Grada Publishing 2010.
- 5 He, F. Q.; Wang, C. T.; Li, X. K.; Liu, X. Q.: HPLC analysis of mitochondrial membrane phospholipids in rice. *Journal of Analytical Chemistry* **62**:4, 369-372 (2007).
- 6 Fong, B.; Ma, L.; Norris, C.: Analysis of Phospholipids in Infant Formulas Using High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:4, 858-865 (2013).
- 7 Kosicek, M.; Hecimovic, S.: Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. *International Journal of Molecular Science* **14**:1, 1310-1322 (2013).
- 8 Han, X.; Holtzman, D. M.; McKeel Jr, D. W.: Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* **77**, 1168-1180 (2001).
- 9 Ginsberg, L.; Rafique, S.; Xuereb, J. H.; Rapoport, S. I.; Gershfeld, N. L.: Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Research* **698**:1-2, 223-226 (1995).
- 10 Houtkooper, R. H.; Rodenburg, R. J.; Thiels, C.; van Lenthe, H.; Stet, F.; Poll-The, B. T.; Stone, J. E.; Steward, C. G.; Wanders, R. J.; Smeitink, J.; Kulik, W.; Vaz, F. M: Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. *Analytical Biochemistry* **387**:2, 230-237 (2009).
- 11 Schlame, M.; Ren, M.: Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *Febs Letters* **580**:23, 5450-5455 (2006).
- 12 Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Puoci, F.; Cirillo, G.; Vinci, G.; Picci, N.: Determination of Phospholipids in Food Samples. *Food Reviews International* **28**:1, 1-46 (2012).

- 13 Seydlová, G. (2010): Mechanismus rezistence cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* k surfaktinu. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, dizertační práce, Praha.
- 14 Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Schürenberg, M.; Suckau, D.: A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical chemistry* **389**, 827-234 (2007).
- 15 Damnjanović, J.; Nakano, H.; Iwasaki, Y.: Simple and Efficient Profiling of Phospholipids in Phospholipase D-modified Soy Lecithin by HPLC with Charged Aerosol Detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **90**:7, 951-957 (2013).
- 16 Smith, M.; Jungalwala F. B.: Reversed-phase high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine: a simple method for determining relative hydrophobic interaction of various molecular species. *Journal of Lipid Research* **22**:4, 697-704 (1981).
- 17 Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **692**, 1-25 (2011).
- 18 Kalíková, K.; Kozlík, P.; Gilar, M.; Tesařová, E.: Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science* **36**:15, 2421-2429 (2013).
- 19 Rombaut, R.; Dewettinck, K.; Van Camp, J.: Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC–ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis* **20**:3-4, 308-312 (2007).
- 20 Avalli, A.; Contarini, G.: Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A* **1071**, 185-190 (2005).
- 21 Barceló-Coblijn, G.; Murphy, E. J.: An Improved Method for Separating Cardiolipin by HPLC. *Lipids* **43**, 971-976 (2008).
- 22 Bruch, J.; Gono, E.; Malkusch, W.; Rehn, B.: Improved method for quantitative analysis of lung surfactant phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids by high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* **231**, 193-204 (1994).
- 23 Xu, W.; Xu, X.; Zhou, G.; Wang, D.; Li, Ch.: Changes of intramuscular phospholipids and free fatty acids during the processing of Nanjing dry-cured duck. *Food Chemistry* **110**:2, 279–284 (2008).

24 Iwasaki, Y.; Masayama, A.; Mori, A.; Ikeda, Ch.; Nakano, H.: Composition analysis of positional isomers of phosphatidylinositol by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1316**:32, 6077–6080 (2009).

25 Seydlová, G.; Svobodová, J.: Development of Membrane Lipids in the Surfactin Producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica* **53**:4, 303–307 (2008).

26 Narvaez-Rivas, M.; Gallardo, E.; Rios, J. J.; Leon-Camacho, M.: A new high-performance liquid chromatographic method with evaporative light scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat. *Journal of Chromatography A* **1218**, 3453–3458 (2011).

27 Harrabi, S.; Herchi, W.; Kallel, H.; Mayer, P. M.; Boukhchina S.: Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of glycerophospholipids in corn oil. *Food Chemistry* **114**, 712–716 (2009).

28 Brouwers, J. F; Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phospholipids. Chromatography, ionization and quantification. *Biochimica et Biophysica Acta* **1811**, 763–775 (2011).

29 Dodbiba, E.; Xu, CH.; Payagala, T.; Wanigasekara, E.; Moonb, M. H.; Armstrong, Dd. W.: Use of ion pairing reagents for sensitive detection and separation of phospholipids in the positive ion mode LC-ESI-MS. *Analyst* **136**, 1586–1593 (2011).

30 *HPLC Column Protection Guide*. Version 0113, Phenomenex 2013.