

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Simona Šilhavská

ANALÝZA FOSFOLIPIDŮ METODOU KOMPREHENZIVNÍ
PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Analysis of phospholipids by comprehensive gas
chromatography

Diplomová práce

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

Praha 2017

Prohlášení

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

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

V Praze dne 1. května 2017.

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za jeho pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout a mým rodičům a blízkým za jejich všestrannou podporu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Gabriele Seydlové, PhD., Mgr. Martinu Stonovi, Ing. Václavu Bierhanzlovi a členům Katedry analytické chemie PřF UK za praktické rady a ochotnou pomoc při vypracování této diplomové práce.

Abstrakt:

Fosfolipidy jsou důležitou skupinou polárních lipidů tvořících hlavní složku buněčných membrán. Jejich zastoupení se může měnit v závislosti na mnoha faktorech okolního prostředí, ve kterém se buňka nachází. Stanovení membránových fosfolipidů je nepostradatelné v mnoha vědeckých, průmyslových a hospodářských odvětvích.

Cílem této práce bylo vyvinout separační metodu pro stanovení membránových fosfolipidů, pomocí které by bylo možné provést analýzu fosforylovaných částí fosfolipidů i mastných kyselin z jednoho vzorku. Pro stanovení byla zvolena komprehenzivní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC×GC-MS). Tato metoda umožňuje separaci celého vzorku na dvou sériově zapojených odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.

Součástí přípravy vzorku bylo rozštěpení vazby v molekule fosfolipidu pomocí enzymu fosfolipasa C, čímž došlo k uvolnění fosforylovaných polárních hlav. Tyto polární části bylo nutné před analýzou derivatizovat. Princip zvolené derivatizace spočíval v použití dvou různých silylačních činidel (hexamethyldisilazan a *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid) ve dvou krocích. Byly vybrány podmínky pro efektivní separaci silylderivátů fosforylovaných hlav pomocí GC×GC-MS využívající kryogenní modulátor. Jednotlivé silylderiváty byly identifikovány podle hmotnostních spekter z MS detektoru a byly vybrány jejich charakteristických intenzivní fragmenty.

Vyvinutá metoda byla otestována na reálných vzorcích membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*. Ve vzorcích byly identifikovány silylderiváty kyseliny fosforečné, fosfoglycerolu, fosfoethanolaminu a fosfoserinu.

Klíčová slova:

fosfolipidy, enzymatická hydrolyza, mastné kyseliny, derivatizace, komprehenzivní plynová chromatografie, biologický materiál

Abstract:

Phospholipids are an important group of polar lipids constituting the main component of cell membranes. Their proportion may vary depending on many factors of the surrounding environment in which the cell is located. Determination of membrane phospholipids is essential in many scientific, industrial and economic sectors.

The aim of this work has been to develop a separation method for determination of membrane phospholipids by which it was possible to analyze phosphorylated parts of phospholipids and fatty acids from one sample. Comprehensive gas chromatography with mass detection (GC×GC-MS) was chosen for the assay. This method allows the separation of the entire sample on two serially connected different columns, among which is the interface called modulator.

The preparation of the sample includes a cleavage of the phospholipid molecule by the enzyme phospholipase C, which released the phosphorylated polar headgroups. These polar parts had to be derivatized before analysis. The principle of the chosen derivatization consisted in the use of two different silylation agents (hexamethyldisilazane and *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) in two steps. Conditions were selected for efficient separation of the silyl derivatives of phosphorylated headgroups using GC×GC-MS using a cryogenic modulator. Individual silyl derivatives were identified by mass spectra from the MS detector and their characteristic intensive fragments were selected.

The developed method was tested on real samples of membrane lipids of *Bacillus subtilis*. Silyl derivatives of phosphoric acid, phosphoglycerol, phosphoethanolamine and phosphoserine were identified in the samples.

Keywords:

phospholipids, enzymatic hydrolysis, fatty acids, derivatization, comprehensive gas chromatography, biological samples

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Cytoplazmatická membrána	10
2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.3 Struktura fosfolipidu.....	11
2.4 Identifikace fosfolipidů.....	15
2.4.1 Silylace	17
2.5 Komprehenzivní plynová chromatografie	20
3 Experimentální část	23
3.1 Chemikálie.....	23
3.2 Příprava vzorků	24
3.3 Přístrojové vybavení	25
3.4 Podmínky analýzy	25
3.5 Vyhodnocení.....	26
4 Výsledky a diskuze.....	27
4.1 Podmínky silylace	27
4.1.2 Identifikace produktů silylace	31
4.2 GC×GC.....	34
4.2.1 Výběr pracovních podmínek	34
4.2.2 Fosfolipidy.....	38
4.2.3 Reálné vzorky	41
5 Závěr.....	45
6 Literatura	47

Seznam zkratk a symbolů

1D-GC - jednorozměrná plynová chromatografie

2D - dvourozměrný (prostor)

3D - třírozměrný (prostor)

a.u. - arbitrary unit

BSTFA - *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid

CE - kapilární elektroforéza

DOPE - Diolelylfosfatidyletanolamin

DOPG - Diolelylfosfatidylglycerol

DPPS - Dipalmitoylfosfatidylserin

FID - plamenově-ionizační detektor

GC - plynová chromatografie

GC×GC - komprehenzivní plynová chromatografie

GC×GC-MS - komprehenzivní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

HMDS - hexamethyldisilazan

LC - kapalinová chromatografie

MS - hmotnostní spektrometrie

m/z – poměr hmotnosti a náboje ionizované částice

PE - fosfoethanolamin

PG - fosfoglycerol

PS – fosfoserin

SIM – single iont monitoring

t - čas [min, s, ms,]

t_R - retenční čas [min]

TIC - total ion current

TLC - tenkovrstvá chromatografie

TMS - trimethylsilyl

TMS₃-P - tris(trimethylsilyl) fosfát

TMS₃-PE - tris(trimethylsilyl) fosfoethanolamin

TMS₄-PE - tetra(trimethylsilyl) fosfoethanolamin

TMS₄-PG - tetra(trimethylsilyl) fosfoglycerol

TMS₄-PS - tetra(trimethylsilyl) fosfoserin

1 Úvod

Fosfolipidy jsou nejvýznamnější skupinou polárních lipidů. Jejich molekuly mají amfifilní charakter, což určuje jejich chování ve vodném prostředí, kde tvoří micely a především lipidové dvojvrstvy - membrány, jejichž významnou složku tvoří v živých organismech. Povaha a složení membránových lipidů je základním předpokladem pro správnou stavbu a funkci cytoplazmatické membrány. Díky vlastnostem fosfolipidové dvojvrstvy a v ní přítomných bílkovin zajišťuje membrána důležitou funkci selektivní bariéry i esenciální složku fyziologie všech buněk. Reguluje tok metabolitů mezi vnějším prostředím a intracelulárním obsahem, jsou zde umístěny enzymy dýchacího řetězce, dochází zde k syntéze ATP atd. Přesné složení membrány odráží její funkci v organismu a často je i specifické pro druh buňky nebo příslušný organismus. Každá skupina fosfolipidů a jejich specifické poměry jsou charakteristické a mohou být diagnostickým znakem pro určité skupiny mikroorganismů. Jakékoliv změny v prostředí, kde se mikroorganismus nachází, jako je např. změna teploty, pH, osmolarity, přítomnost toxických látek, antibiotik aj. mohou vyvolat změnu poměru jejich zastoupení.¹

Cílem této práce je vyvinout takovou metodu pro stanovení membránových fosfolipidů, aby bylo možné provést analýzu fosforylovaných částí fosfolipidů, tzv. polárních „hlav“ i mastných kyselin pomocí jedné separační metody a pokud možno z jednoho vzorku. Součástí přípravy vzorku je rozštěpení vazby v molekule fosfolipidu pomocí enzymu fosfolipasa C, čímž dojde k uvolnění fosforylovaných polárních hlav. Je třeba optimalizovat postup derivatizace těchto polárních částí a jejich stanovení pomocí plynové chromatografie.

Tato práce se bude zabývat stanovením nejvíce se vyskytujících fosfolipidů v membráně bakterie *Bacillus subtilis*. Vyvinutá metoda bude otestována na reálném vzorku (izolát membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*).

Pro stanovení byla zvolena komprehenzivní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC×GC-MS). Tato metoda je vhodná pro analýzu složitých a komplexních vzorků. Umožňuje separaci celého vzorku na dvou sériově zapojených odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.

2 Teoretická část

2.1 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána poskytuje mechanickou ochranu, tepelnou a elektrickou izolaci buňky, a dále zajišťuje transport a komunikaci s vnějším prostředím. Nejdůležitější vlastností biologických membrán je selektivita jejich prostupnosti, která spočívá v tom, že jsou polopropustné (semipermeabilní) a propouští do buňky jen některé látky. Fosfolipidová dvojvrstva je nepropustná pro iontové a polární látky, naopak propustná pro vodu, nepolární a malé molekuly. Díky těmto vlastnostem, a také přítomným bílkovinám je možný selektivní a často regulovatelný transport látek po (pasivní transport) i proti (aktivní transport) jejich koncentračnímu gradientu.

Membrána obsahuje řadu proteinů, které se účastní klíčových buněčných procesů, jako je syntéza lipidů, buněčné dělení, přenos signálů, energetický metabolismus. Fosfolipidy jsou aktivní účastníci těchto procesů, kteří ovlivňují vlastnosti proteinů spojených s membránou.² Na membránové lipoproteiny jsou rovněž vázány enzymatické systémy katalyzující některé kroky metabolických drah jako je např. oxidativní fosforylace nebo fotosyntéza.

Cytoplazmatická membrána bakteriální buňky funguje jako senzor, pomocí kterého jsou jednotlivé signály přenášeny do buňky. Řada faktorů životního prostředí, jako jsou změny teploty, pH, osmotického a atmosférického tlaku, přítomnost škodlivých chemikálií, ultrafialové záření a vysušení jsou snímány na úrovni membrány, kde probíhá podstatná část adaptivních procesů. Membrána může být vlivem okolních změn významně pozměněna a její adaptace je klíčová pro adaptaci celé buňky. Mění se fyzikálně-chemické vlastnosti membrány a tím i její funkce. Může dojít např. k ovlivnění transportu látek přes membránu nebo k poruše buněčné signalizace.³⁻⁴ Fyzikální stav lipidové dvojvrstvy je tudíž rozhodující pro všechny fyziologické funkce.

Studium buněčných membrán je důležité také s ohledem na potenciální využití poznatků v lékařství a průmyslu, jako je studium biologicky aktivních molekul a léků, které se používají při léčbě bakteriálních infekcí. Znalost složení buněčné membrány může pomoci právě při výzkumu a syntéze membránově cílených léčiv, které mohou být selektivně využity proti mikroorganismům odolným vůči stávajícím antibiotikům a zároveň méně škodlivé pro léčený organismus.⁵⁻⁶

Bakterie *Bacillus subtilis* je schopna rychle se přizpůsobit ke změnám životního prostředí a podmínek. Tím se z této půdní bakterie stává dobrý model pro studium adaptačních vlastností.⁷ Cytoplazmatická membrána *B. subtilis* obsahuje proteiny (62 %), RNA (22 %) a lipidy (16 %). Z této lipidové frakce tvoří přes 75 % polární lipidy. Dále jsou přítomny neutrální lipidy a glykolipidy, každá skupina tvoří asi 10 % z celkové lipidové frakce. Nejvíce zastoupenými fosfolipidy, které byly identifikovány v cytoplazmatické membráně bakterie *Bacillus subtilis*, jsou: fosfatidylglycerol a fosfatidylethanolamin, které dohromady tvoří více než 80 % z celkového zastoupení polárních lipidů. Dále jsou v menší míře zastoupeny fosfatidylserin, kardiolipin (difosfatidylglycerol), kyselina fosfatidová a lysylfosfatidylglycerol.⁸

2.2 *Bacillus subtilis*

Bakterie *Bacillus subtilis* je typická gram-pozitivní tyčinka běžně se vyskytující v půdě. Je nepatogenní a velmi odolná vůči vlivům vnějších podmínek a má schopnost tvořit endospory. Tato bakterie se hojně využívá ve výzkumu i v průmyslu.⁹ *B. subtilis* je jedním z nejvíce studovaných a nejlépe charakterizovaných prokaryontních organismů používaných jako modelový organismus pro studium především gram-pozitivních bakterií v základním i aplikovaném výzkumu mikrobiologie. *Bacillus subtilis* je také producentem několika látek, sekundárních metabolitů, s potenciálem využití v průmyslu i lékařství. Příkladem je cyklický lipopeptid surfaktin produkovaný *B. subtilis* ATCC 21332 (divoký kmen *Bacillus subtilis* ze sbírky American Type Culture Collection studovaný na PřF UK).

Surfaktin je silně povrchově aktivní látka s antimikrobiální aktivitou. Působí na cytoplazmatické membrány ostatních bakterií tak, že membránu destabilizuje a porušuje – surfaktin se inkorporuje do membrány, tvoří v ní póry nebo ji až rozruší detergentním mechanismem.¹⁰ Díky tomu má potencionální využití ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu.¹¹⁻¹² Mechanismus rezistence produkční bakterie vůči vlastnímu toxickému produktu lze sledovat mimo jiné na změnách ve fosfolipidovém složení membrány.¹³

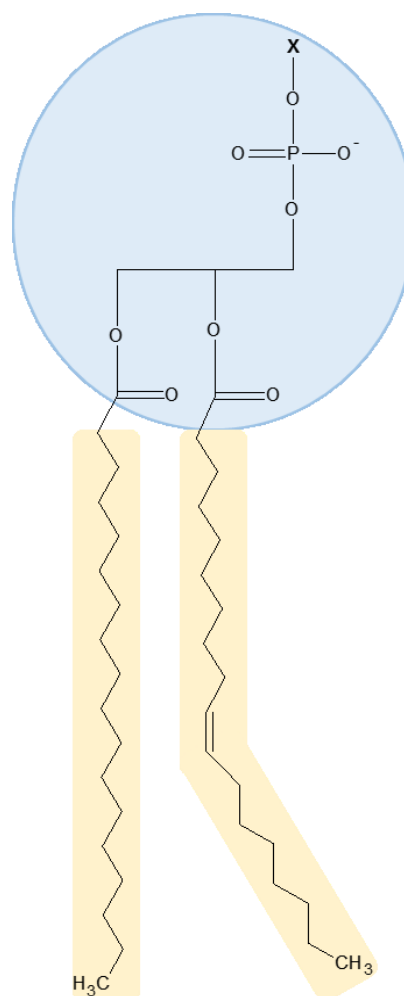
2.3 Struktura fosfolipidu

Základní strukturu fosfolipidu tvoří glycerolový skelet. Většina fosfolipidů má v poloze *sn-1* glycerolu navázaný zbytek nasycené mastné kyseliny, v poloze *sn-2* zbytek nenasyčené mastné kyseliny. V poloze *sn-3* je pak esterově vázána kyselina fosforečná. Tato základní struktura se nazývá kyselina fosfatidová a je prekurzorem syntézy dalších fosfoacylglycerolů a triacylglycerolů. Kyselina fosforečná může být esterifikována hydroxy skupinou nízkomolekulární organické látky, která pak tvoří tzv. polární „hlavu“ (X): např. serin, cholin, ethanolamin, glycerol, nebo inositol.

Fosfolipidy se označují jako amfipatické molekuly - tzn. že jeden konec této molekuly je nepolární; hydrofobní konce (mastné kyseliny) a druhý konec je hydrofilní; polární hlava (glycerol, kyselina fosforečná s příslušnou funkční skupinou) (Obr. 2.3.1).

Fosfolipidy mají ve vodném prostředí tendenci se samovolně organizovat do tzv. lipidové dvojvrstvy tak, že jejich polární hlavy jsou v kontaktu s vodou a hydrofobní konce jsou otočené k sobě, čímž je díky nekovalentním hydrofobním interakcím udržována soudržnost dvojvrstvy. Fosfolipidové dvojvrstvy poskytují potřebnou permeabilitu a fluiditu (tekutost) membrány.

Podíly jednotlivých druhů mastných kyselin se mohou měnit v závislosti na mnoha faktorech, jako je teplota prostředí a výživa. Délka a stupeň nasycenosti acylových řetězců a jejich vzájemný podíl má vliv na tloušťku, propustnost, tuhost a tekutost membrány. Fluidita membrány závisí především na složení lipidů a teplotě.¹⁴ Vlivem teploty na růst *B.subtilis* dochází ke změně

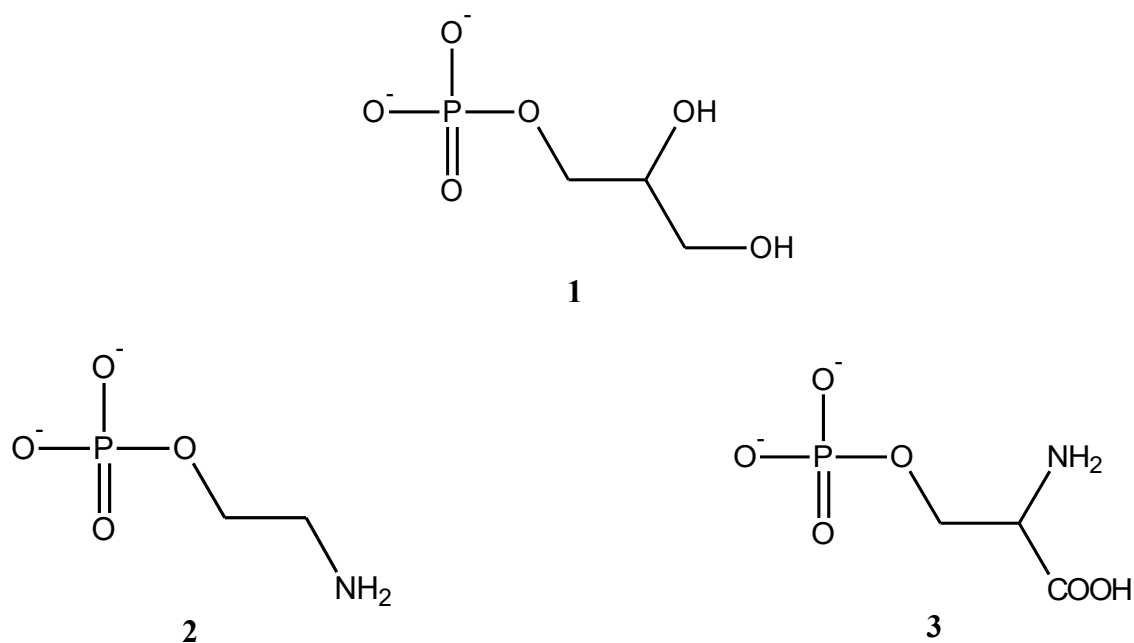


Obr. 2.3.1: Struktura fosfolipidu; modře polární hlava, žluté hydrofobní konce mastných kyselin X: serin, cholin, ethanolamin, glycerol, inositol

podílu nasycených a nenasycených acylových řetězců. Při vyšších teplotách se zvyšuje podíl nasycených mastných kyselin, naopak při nízkých teplotách se snižuje, a zvyšuje se podíl nenasycených mastných kyselin.¹⁵ Bylo zjištěno, že nasycené mastné kyseliny zajišťují větší tuhost membrány, zatímco přítomnost nenasycené mastné kyseliny zvyšuje její fluiditu. Vysoká tuhost činí membránu méně flexibilní a křehkou, zatímco nadměrná tekutost může vést až k lýzi buněčné membrány.¹⁶

Znalost složení lipidové membrány je také důležitá pro studium, charakterizaci a identifikaci bakterií. Složení lipidů se velmi liší mezi jednotlivými bakteriálními rody, a to jak v typech polárních hlav, tak i v délce a typu mastných kyselin.

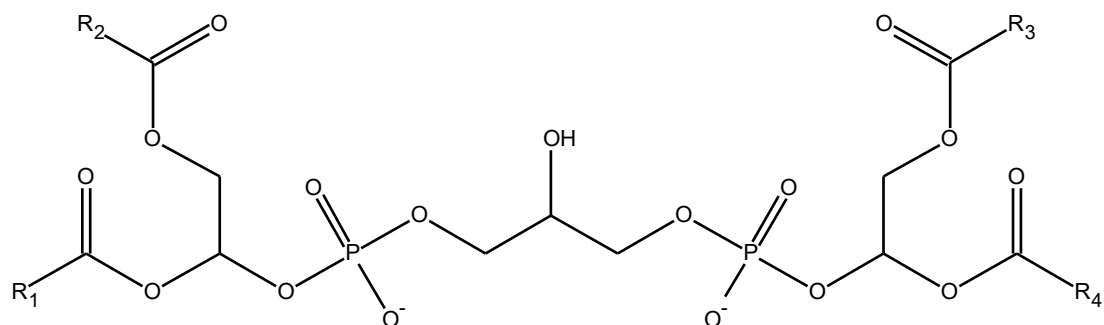
Mastné kyseliny přítomné v membráně *Bacillus subtilis* jsou většinou s lichým počtem atomů uhlíků a větveným řetězcem. Majoritní většinu tvoří větvené mastné kyseliny s 12 až 17 atomy uhlíku s methylovou skupinou v iso- nebo anteiso- pozici. Nenasycené mastné kyseliny se vyskytují v nízkých koncentracích. Mezi nejvíce zastoupené polární fosforylované hlavy v membráně bakterie *B. subtilis* patří fosfoglycerol, fosfoethanolamin a fosfoserin¹⁷ (Obr. 2.3.2), jimiž se bude zabývat i tato práce.



Obr. 2.3.2: Strukturní vzorce polárních hlav: fosfoglycerol (1), fosfoethanolamin (2) a fosfoserin (3)

Polární část fosfolipidu má vliv na další chemické vlastnosti membrány, jako je její povrchový náboj, a ovlivňuje specifické interakce s některými membránovými proteiny. Díky fosfátové skupině mají fosfolipidy při neutrálním pH nejméně jeden negativní náboj. Kromě tohoto záporného náboje mohou nést i další náboje. Fosfatidylethanolamin je kladně nabitý na dusíku aminoalkoholu, proto je jeho celkový náboj neutrální. Naproti tomu fosfatidylglycerol nese záporné náboje na kyslíkách a fosfatidylserin, který má jeden kladný a jeden záporný náboj na serinovém zbytku, jsou tedy díky fosfátovému zbytku celkově nabity záporně. Tyto vlastnosti jsou důležité pro jejich umístění a funkci v membráně. Podílejí se na tvorbě vodíkových můstků a elektrostatických vazeb, čímž ovlivňují stabilitu membrány.¹⁸⁻²⁰ Bakterie jsou schopny upravit jejich relativní zastoupení tak, aby ovlivnily propustnost membrány, jsou-li vystaveny organickým rozpouštědlům nebo jiným toxickým látkám z okolního prostředí.²¹

U bakterií byl také pozorován v různých nepříznivých podmínkách (vysoká salinita, alkalické pH) stresový fosfolipid kardiolipin (difosfatidylglycerol)²² (Obr. 2.3.3), který vzniká spojením glycerolu s dvěma fosfatidylovými zbytky nesoucími každý 2 acylové řetězce, tudíž nese 4 mastné kyseliny. Jeho molekula se tedy skládá ze záporně nabitých polárních skupin a velké hydrofobní oblasti, která zvyšuje strukturní pevnost membrány. Kardiolipin se také značně podílí na rezistenci membrány *Bacillus subtilis* vůči vlastnímu toxickému produktu surfaktinu. Tím, že tento fosfolipid nese dva negativní náboje, tak může bránit stejně nabitému surfaktinu interagovat s membránou. Byla prokázána snížená penetrace surfaktinu díky přítomnosti kardiolipinu v cytoplazmatické membráně.²³



Obr. 2.3.3: Strukturální vzorek kardiolipinu (R: mastné kyseliny)

2.4 Identifikace fosfolipidů

Složení fosfolipidů může být velmi rozmanité vzhledem k jejich odlišným koncovým polárním skupinám, různému stupni nasycenosti a délce řetězců mastných kyselin. Separace, identifikace a kvantifikace jsou tudíž náročné vzhledem k široké škále kombinací těchto sloučenin a malým rozdílům v jejich struktuře.

Analýza fosfolipidů má neustále rostoucí význam pro mnoho oborů jako je cytologie, mikrobiologie nebo biotechnologie.

Používanými metodami pro separaci fosfolipidů jsou kapalinová chromatografie (LC) nebo kapilární elektroforéza (CE). Jejich provedení ztěžuje fakt, že detekce fosfoesterů je komplikovaná, protože neabsorbují dostatečně v oblasti UV/VIS ani neemitují fluorescenční záření. Každá z metod má své nevýhody jako je nízká citlivost a vysoká mez detekce, které většinou souvisí s nízkou absorbcí fosfolipidů v UV/VIS spektru. Použití bezkontaktního vodivostního detektoru v případě CE se ukázalo jako ještě méně citlivé.²⁴ Hmotnostní detekce je problematická, protože fosfolipidy jako skupina nejsou chemickými individui, a tudíž nelze měřit v TIC (total ion current) režimu, protože nemají společný molekulový ion.²⁵

Použití obou metod je navíc ztíženo tím, že rozpustnost jednotlivých fosfolipidů je velmi rozdílná v závislosti na rozpouštědle. V případě kapalinová chromatografie je obtížné pracovat v reverzním módu, protože separaci určují především mastné-acylové řetězce. V případě normálního módu LC se fosfolipidy separují do tříd na základě polarit fosforylovaných hlav. Různé polarit a náboje na polárních hlavách jsou překážkou pro výběr elučního systému pro chromatografické dělení i pro účinnou ionizaci.²⁶

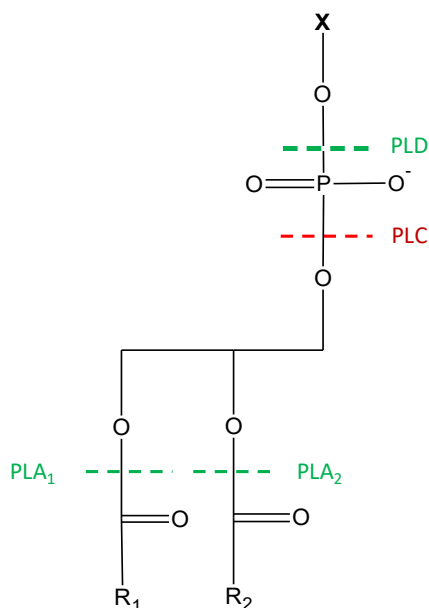
Fosfolipidy se těžko identifikují celé kvůli svým amfipatickým vlastnostem a velikosti molekuly, proto je vhodnější je rozštěpit na nepolární část (mastné kyseliny) a na polární fosforylované hlavy.

Nejpoužívanější metodou pro analýzu zastoupení polárních hlav fosfolipidů ve vzorku izolovaných lipidů je tenkovrstvá chromatografie (TLC). Při separaci na tenké vrstvě dojde k rozdělení lipidového extraktu na jednotlivé fosfolipidové třídy, které mohou být detekovány parami jódu reagujícími s lipofilními látkami za vzniku žlutohnědého zbarvení. Identifikace se pak provádí na základě retardačních faktorů, a následně jsou jednotlivé skvrny seškrábnuty, převedeny do zkumavky a

zmineralizovány. Kvantifikaci je možné provést stanovením anorganického fosfátu, např. spektrofotometricky, díky absorbanci fosfomolybdenové modře při 820 nm, která vzniká reakcí anorganického fosfátu s molybdenanem amonným. Hlavními nevýhodami této metody jsou časová náročnost a pracnost, nemožnost automatizace, vysoká spotřeba vzorku, nízká citlivost a omezená přesnost kvantifikace některých skupin.¹⁷

Mastné kyseliny mohou být hydrolyticky odštěpeny od glycerolu. Běžně se používá bazicky/kyselě katalyzovaná transesterifikace, která štěpí vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami, čímž vznikají např. v přítomnosti methanolu methylestery.²⁷ Nepochlání frakce mastných kyselin je extrahována a estery příslušných mastných kyselin jsou pak analyzovány pomocí plynové chromatografie (GC).²⁸ Tato metoda ovšem není vhodná při stanovení fosforylovaných částí hlav, protože dochází k odštěpení fosfátu od této skupiny, a tak je tato polární frakce nevyužita. Z tohoto důvodu byla snaha vyvinout jednodušší metodu pro stanovení fosforylovaných hlav fosfolipidů, která je zároveň používaná pro analýzu matných kyselin.

Pro selektivní oddělení celé fosforylované hlavy i s fosfátem může být využit enzym. V této práci byla k tomuto účelu využita fosfolipasa C. Fosfolipasy jsou hydrolytické enzymy, které štěpí chemické vazby v molekule fosfolipidu. Mají klíčovou roli v metabolismu fosfolipidů a v buněčné signalizaci.²⁹ Jsou hojně využívány v průmyslu kvůli šetrnosti k životnímu prostředí např. při zpracování rostlinných olejů, mléčných výrobků nebo v pekařství. Rozdělují se podle místa štěpení v molekule fosfolipidu na PLA₁, PLA₂, PLC, PLD (Obr. 2.4.1).³⁰ Stereoselektivní štěpení vazby mezi polární hlavou a glycerolem může být provedeno pomocí fosfolipasy C.³¹ Po hydrolytickém rozštěpení molekuly fosfolipidu se uvolní fosforylované polární hlavy, tudíž z jednoho vzorku vzniknou dvě frakce, které mohou být od sebe odděleny extrakcí, a každá z nich je využita pro další analýzu.



Obr. 2.4.1: Místa štěpení fosfolipidů jednotlivými fosfolipasami (R: mastné kyseliny, X: serin, ethanolamin, glycerol atd.)

2.4.1 Silylace

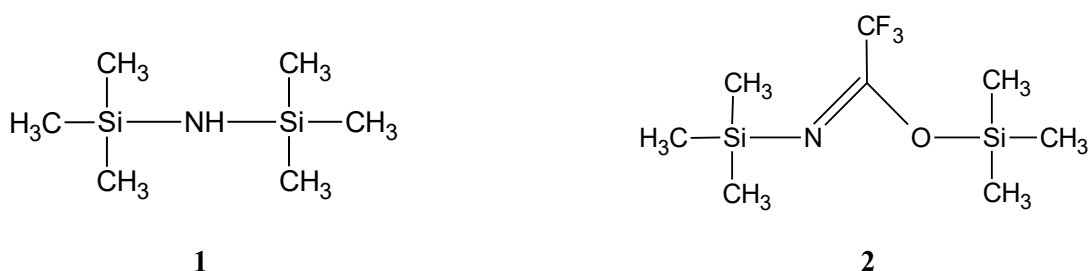
Polární hlavy fosfolipidů obsahují dané polární skupiny, tudíž nejsou dostatečně těkavé a teplotně stabilní při teplotách používaných v plynové chromatografii. Proto musí být tyto skupiny před analýzou derivatizovány.

Silylace je nejrozšířenější derivatizační postup využíváný při analýze vzorku pomocí GC. Principem reakce je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující polární skupinu s aktivním vodíkem (-OH, -COOH, -NH, -SH). Silyl deriváty se tvoří výměnou aktivního vodíku za alkylsilylovou skupinu. Nejčastější reakce jsou trimethylsilylační, kdy je aktivní vodík v polární skupině látky nahrazen trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Tyto trimethylsilyl (TMS) deriváty jsou méně polární než výchozí sloučeniny, mají vyhovující teplotní a chemickou stabilitu a vysokou těkavost vhodnou pro GC.³²

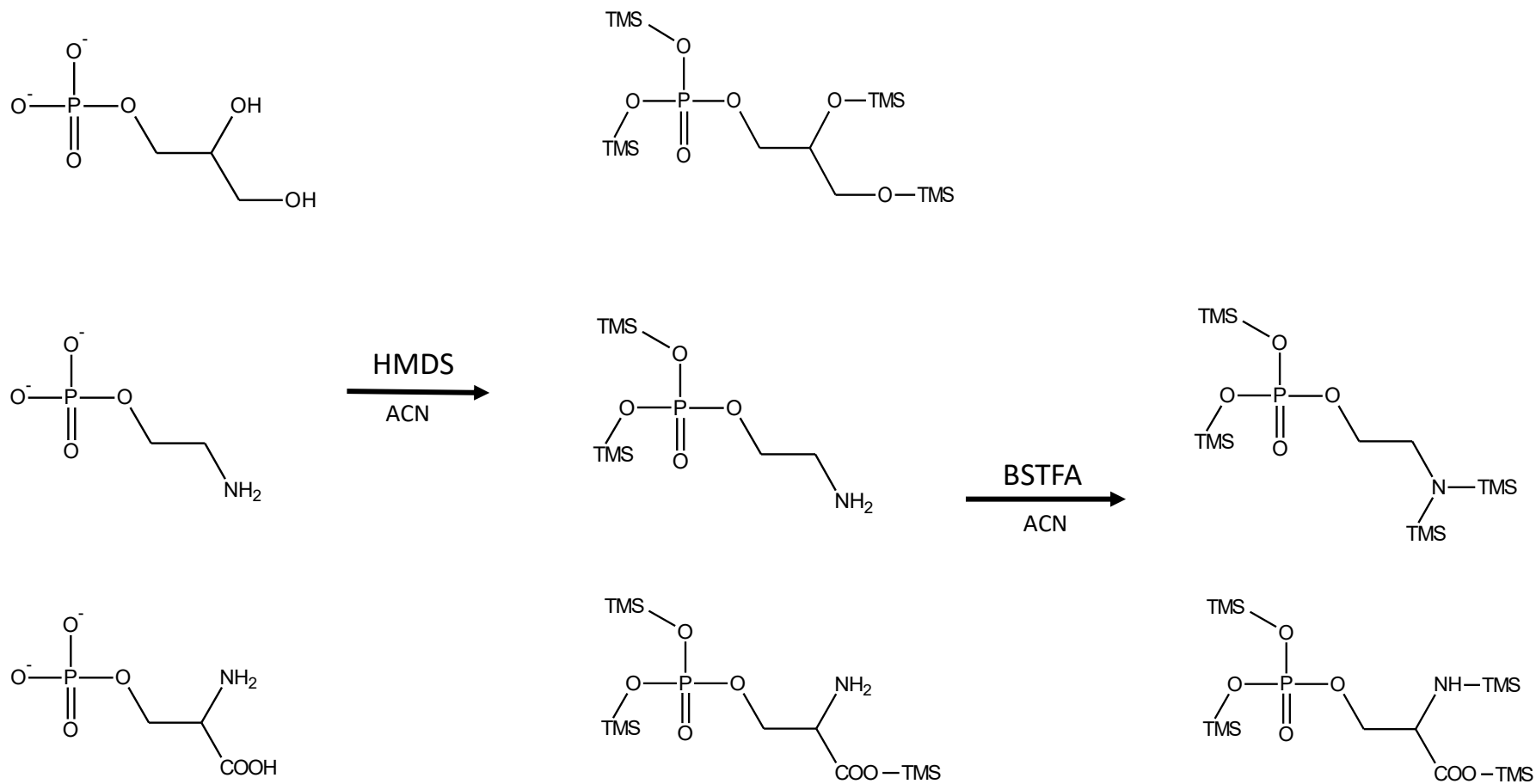
Ochota funkčních skupin tvořit TMS deriváty je následující: alkoholy > fenoly > organické kyseliny > aminy > amidy. Při použití většiny silylačních činidel je třeba reakční směs zahřát, aby byla derivatizace účinná. Reakční teplota a doba zahřívání jsou různé vzhledem k typu silylačního činidla a analytu.

Nevýhodou silylační činidel je jejich náchylnost k hydrolyze, při které vzniká hexamethyldisiloxan $[\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3]$. Z toho důvodu by analyzované vzorky měly obsahovat co nejméně vody, protože derivatizace vodných vzorků zahrnuje konkurenční reakci mezi vodou a silylačním činidlem. Pokud je v analyzovaném vzorku přítomna voda, je nutné přidat mnohonásobné množství silylačního činidla, které působením vody zhydrolyzuje a tím ji odstraní. Další molekuly silylačního činidla pak mohou s analyzovanými látkami přítomnými ve vzorku reagovat.

Vzhledem k tomu, že hydrolyzované polární hlavy obsahují skupiny s různou reaktivitou vůči silylaci, byl zvolen způsob derivatizace ve dvou krocích.³³ V prvním kroku je využito méně reaktivní (slabší) činidlo hexamethyldisilazan (HMDS) (Obr. 2.4.1.1) pro silylaci více reaktivních skupin (hydroxyl, karboxyl). Ve druhém kroku je pak použito reaktivnější činidlo *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid (BSTFA) (Obr. 2.4.1.1) pro silylaci méně reaktivních skupin jako jsou aminy (Obr. 2.4.1.2). Toto činidlo nemůže být použito samo v jednom kroku, protože reaguje příliš prudce s hydroxy skupinami a vytváří různé vedlejší produkty.³⁴



Obr. 2.4.1.1: Strukturální vzorce silylačních činidel: hexamethyldisilazan, HMDS (1), *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid, BSTFA (2)



Obr. 2.4.1.2: Schéma dvoustupňové silylace fosfátu, fosfoglycerolu, fosfoethanolaminu a fosfoserinu

2.5 Komprehenzivní plynová chromatografie

Komprehenzivní plynová chromatografie (GC×GC) umožňuje separaci celého vzorku na dvou různých kolonách s odlišnou stacionární fází. Dochází k rozdělení analytů na základě dvou různých mechanismů separace, a tudíž dva různé analyty by měly mít hodnoty retenčních časů v každé dimenzi vzájemně nezávislé (nekorelující). Tento jev se označuje jako ortogonalita.

První separace obvykle probíhá na delší nepolární koloně, na které jsou analyty separovány hlavně podle jejich bodu varu. Druhá kolona je obvykle kratší a středně až silně polární. Separace na druhé koloně probíhá v podstatě za izotermálních podmínek a mnohem rychleji než na první koloně. Vzhledem k tomu, že všechny koeluující analyty z první kolony mají blízký bod varu, při nadávkování do druhé kolony závisí jejich separace na interakci s polární stacionární fází (dělení dle polarity).

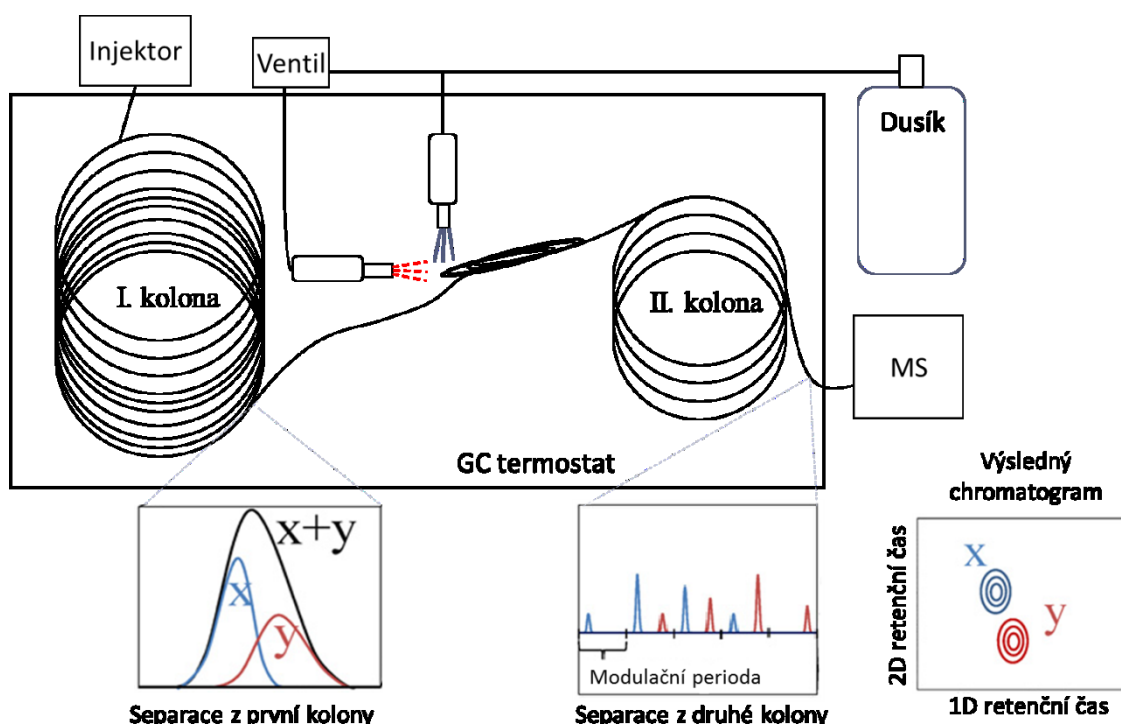
Nejdůležitější součástí GC×GC systému je modulátor, který spojuje obě kolony. Funkcí modulátoru je zachytit malou frakci analytu z první kolony a následně ho rychle nadávkovat do druhé kolony. Jeho funkcí je zajistit, aby analýza byla kontinuální a nedošlo ke znehodnocení separace dosažené na první koloně při dávkování vzorku na druhou kolonu. Tento čas dávkování spolu s časem separace na druhé koloně se nazývá modulační perioda a obvykle je v rozmezí 1-8 s. Retenční čas jakéhokoliv analytu na druhé koloně musí být menší než modulační perioda. Tudíž separace na druhé koloně musí být dokončena v rámci jedné modulační periody.³⁵

Modulátory se rozdělují podle toho, na jakém principu jsou založeny, do dvou základních skupin: termální a tlakové. Nejčastěji využívané termální modulátory jsou kryogenní pro jejich vysokou účinnost modulace (dávkování). Jejich hlavní předností je dosažení vysoké účinnosti systému díky schopnosti produkovat velmi úzké píky v chromatogramu (až 60 ms šířky píku v polovině výšky). Tyto modulátory využívají principu kryofokusace pomocí chladicího media, kterým je nejčastěji kapalný dusík. Levnější variantou je použití kapalného oxidu uhličitého, ovšem teplota kapalného CO₂ je přibližně -70 °C a není dostatečná k účinnému zachycení nejvíce těkavých látek.³⁶ K zachycení (vymražení) analytu dochází ve smyčce z kapiláry spojující obě kolony díky trvalému chlazení malého bodu této kapiláry tryskou s chladícím mediem. Následuje rychlé ohřátí tohoto bodu horkým pulsem pomocného plynu o vysoké teplotě

(350 °C), čímž je umožněno opětovné uvolnění analytu a tím dávkování do druhé kolony. Tento tzv. dvoutryskový (two-jets) systém byl využit také pro tuto práci (Obr. 2.5.1). Nevýhodou kryogenních modulátorů jsou vysoké pořizovací a provozní náklady kvůli velké spotřebě kryogenních plynů.³⁷

Druhou skupinou jsou modulátory tlakové, které jsou založené na přepínání toku mobilní fáze pomocí ventilů. Nedosahují tak vysoké účinnosti oproti kryogenním modulátorům, protože produkují širší píky. Naproti tomu jejich výhodou jsou nízké pořizovací a provozní náklady.³⁸

Výsledkem GC×GC separace je klasický chromatogram, který je nutné pro další vyhodnocení převést na konturový graf speciálním softwarem. Zde jsou analyty zobrazeny tak, že na ose x je retenční čas na první koloně v minutách, na ose y retenční čas na druhé koloně v sekundách a osa z představuje odezvu detektoru zobrazenou do vrstevnic. Výška píky je charakterizována vrstevnatým konturovým objektem (blobem), který po převedení do trojrozměrného prostoru představuje tvar kužele, jehož objem udává množství daného analytu.



Obr. 2.5.1: Schéma plynového chromatografu s kryogenním modulátorem a MS detekcí (upraveno podle Murray J.A.³⁹)

GC×GC nabízí mnoho výhod oproti běžné plynové chromatografii jako je obrovský vzrůst píkové kapacity, čehož se často využívá k analýzám komplexních směsí obsahující stovky i tisíce jednotlivých komponent. Další výhodou GC×GC systému je zvýšení intenzity signálu a tím i citlivosti detekce, protože důsledkem modulace dochází k rozdělení píku vycházejícího z první kolony na určitý počet velmi úzkých píků. Protože součet ploch úzkých píků se musí rovnat ploše klasického píku, je jejich výška o několik řádů vyšší.⁴⁰

Optimalizace GC×GC systému však vyžaduje odlišný a více komplexní přístup než u 1D-GC. Například teplota a průtok nosného plynu ovlivní separaci v obou kolonách odlišně. Dále musí být zahrnuty nové parametry, které musí být optimalizovány, jako je modulační perioda a teploty trysek modulátoru.⁴¹

Pro splnění podmínky optimální modulace by měly být píky v první dimenzi poněkud širší (2 až 5 s) tak, aby docházelo 3 – 4 krát k jejich modulaci. V důsledku modulace a tím velmi rychlé separace na druhé koloně jsou výsledkem separace velmi úzké píky o šířce 100 až 500 ms při základně. Proto pro správné zobrazení GC×GC chromatogramů systém vyžaduje rychlé detektory o frekvenci snímání alespoň 100 Hz. Vhodným detektorem je plamenově-ionizační detektor (FID), který dokáže sbírat data ve frekvencích 50 - 300 Hz. Jeho nevýhodou je nižší citlivost a skutečnost, že nedokáže poskytnout strukturní informace o analytech, tudíž jeho možnosti pro identifikaci jsou omezené. Naproti tomu hmotnostní spektrometr dokáže poskytnout kvalitativní a strukturní informace o analytech. Klasický kvadrupól však nemá tak rychlý sběr dat (20 - 100 Hz), a proto se musí zvolit buď užší rozsah měřených hodnot m/z či jiný analyzátor.⁴²

GC×GC je vhodná pro analýzu velmi komplexních vzorků, jako jsou petrochemické vzorky, benzín, ropa, a oleje, které obsahují velké množství nasycených i nenasycených uhlovodíků.⁴³ Tato technika se také hojně využívá v oblasti životního prostředí pro stanovení např. těkavých organických látek a polutantů v ovzduší, a je také možno ji využít pro analýzu biologických vzorků, kde je potřeba vysoké citlivosti a specifčnosti detekce.⁴⁴

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- K silylaci analytů byla použita činidla:
 - hexamethyldisilazan, HMDS (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
 - *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamid BSTFA (Supelco, Bellefonte, USA)
 - acetonitril (HPLC grade, Sigma Aldrich)
 - kyselina trifluoroctová (99,9 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)
- Standardy jednotlivých polárních hlav: fosfoglycerol (PG), fosfoethanolamin (PE), fosfoserin (PS), (čistota 85 %), (Sigma Aldrich)
- Fosfolipasa C (izolát z bakterie *Bacillus cereus*, 73 IU/mg) (Sigma Aldrich)
- Standardy jednotlivých fosfolipidů ve formě sodných solí:
Dipalmitoylfosfatidylserin (DPPS), Diolelylfosfatidylglycerol (DOPG),
Diolelylfosfatidyletanolamin (DOPE) (čistota > 99%) (Avanti Polar Lipids, Inc.,
Alabama, USA)
- Reálný vzorek: membránové lipidy bakterie *Bacillus subtilis* byly poskytnuty
RNDr. Gabrielou Seydlovou, Ph.D. z Katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK
- Pro přípravu methylesterů mastných kyselin byly použity:
 - derivatizační roztok – 5,4 g CH₃ONa (Fluka) - ve směsi 60 ml bezvodého metanolu se 40 ml benzenu (Lach-Ner) a 15 mg fenolftaleinu
 - bezvodý roztok HCl v methanolu
 - acetylchlorid (CH₃COCl) (Sigma Aldrich)
 - pentan (Sigma Aldrich), Heptan (Fluka)
- Dále byly použity: dusík (99,99 % Linde Technoplyn, Česká republika), uhličitán amonný (Lachema, ČR), kyselina mravenčí a hexan (Sigma Aldrich)
- Nosným plynem bylo helium (99,9992 %, Linde Technoplyn, Česká republika)
- Kapalný dusík pro kryofokusaci (Linde Technoplyn, Česká republika)

3.2 Příprava vzorků

- Byl připraven 1 mmol·l⁻¹ roztok uhličitanu amonného, jehož pH bylo upraveno ředěnou kyselinou mravenčí na 7,3.
- Pro přípravu standardů polárních hlav (PG, PE, PS) bylo vždy naváženo 10 mg standardu a rozpuštěno ve 200 µl 1 mmol·l⁻¹ roztoku uhličitanu amonného.
- **Sylilace**
Do kónické vialky (1,5 ml) bylo pipetováno 5 µl (0,25 mg) roztoku standardu (PG, PE, PS). Následně byla připravena směs HMDS a acetonitrilu (ACN) v poměru 1:1 a 400 µl této směsi bylo přidáno do vialky se vyorkem. Takto připravený vzorek byl umístěn do termostatu na 40 min při 90 °C bez uzávěru, aby se mohl během reakce uvolňovat amoniak. Nakonec bylo ke směsi přidáno 50 µl ACN a 50 µl BSTFA, a vzorek byl umístěn v termostatu při 75 °C na 60 min s uzávěrem.
- **Příprava fosfolipidů**
Fosfolipidy nebo reálný vzorek membránových lipidů v suchém stavu byly rozpuštěny v chloroformu. Chloroform byl odpařen pod proudem dusíku tak, že na stěnách vialky zůstal tenký film fosfolipidové frakce. 1 mg fosfolipázy C byl rozpuštěn v 1 ml 1 mmol·l⁻¹ roztoku uhličitanu amonného o pH 7,3. 100 µl toho roztoku fosfolipázy C bylo pipetováno do vialky s fosfolipidem. Hydrolýza probíhala 3 hodiny při teplotě 37 °C v ultrazvukové lázni, čímž se uvolnily fosforylované hlavy. Poté následovaly tři po sobě jdoucí extrakce 200 µl hexanu pro oddělení mastných kyselin. Spojené organické fáze hexanu byly odpařeny pod proudem dusíku. Polární část byla částečně zbavena přebytečné vody ohřátím pod proudem dusíku a silylována.
- **Příprava methylesterů mastných kyselin**
K odparku mastných kyselin bylo přidáno 200 µl derivatizačního roztoku CH₃ONa. Po 5 min byl roztok zneutralizován přidáním bezvodé HCl (do vymizení barvy fenolftaleinu). Následně bylo ke vzorku přidáno 10 µl CH₃COCl a reakční směs byla ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Poté následovaly tři po sobě jdoucí extrakce 200 µl pentanu. Spojené organické fáze pentanu byly odpařeny pod proudem dusíku a připravené methylestery byly rozpuštěny ve 100 µl heptanu.

3.3 Přístrojové vybavení

Byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) vybavený hmotnostním detektorem (kvadrupól QP2010 Plus). K dávkování do plynového chromatografu byl použit autosampler AOC-20i (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) se stříkačkou o objemu 10 μl (Hamilton, Reno, USA).

Pro první dimenzi byla vybrána nepolární separační kolona SLB-5ms (5% difenyl/ 95% dimethyl polysiloxan) délky 30 m, o vnitřním průměru 0,25 mm a 0,25 μm tloušťky filmu stacionární fáze (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Pro druhou dimenzi byla vybrána separační středně polární kolona BPX50 (50% fenyl polysilfenylen-siloxan) délky 3 m, o vnitřním průměru 0,1 mm a 0,1 μm tloušťky filmu stacionární fáze (SGE International Pty Ltd., Austrálie), k separaci byly využity 2 m této kolony. První metr kolony byl využit jako smyčka pro modulátor (nepřispíval k separaci).

Byl použit kryogenní modulátor ZX1 od firmy Zoex Europe (Nizozemsko) využívající kapalný dusík. Jeho součástí jsou 2 trysky, tzv. dvoutryskový (two-jets) systém; chladicí tryska vymrazuje bod smyčky na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí kapalného dusíku, a druhá horská tryska, která po dobu pulzu ohřeje tento bod horským proudem dusíku ($250\text{ }^{\circ}\text{C}$) a tím nadávkuje analyty do druhé kolony (viz Obr. 2.5.1).

3.4 Podmínky analýzy

Vstupní tlak na kolonu byl 520 kPa. Nosným plynem bylo helium (99,9992 %, Linde Technoplyn, Česká republika). Bylo vždy dávkováno 0,5 μl , split poměr dávkování se měnil v závislosti na typu analytu, teplota injektoru $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota transfer line do MS $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota iontového zdroje $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechna níže uvedená data byla naměřena za těchto podmínek.

V případě 1D-GC pracoval hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 58–500 m/z rychlostí 9000 m/z/s.

V případě GC×GC pracoval hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z rychlostí 10000 m/z/s. Pro analýzu mastných kyselin byl použit rozsah 50-350 m/z při stejné rychlosti.

Teplota kolon se řídila podle následujícího teplotního programu: počáteční teplota 100 °C byla zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C a poté nechána izotermálně 1 min. Doba analýzy byla 15 min.

Pro analýzu mastných kyselin byl teplotní program prodloužen na 250 °C.

Modulační perioda byla 3 s a doba pulzu 375 ms (horký proud).

3.5 Vyhodnocení

Chromatogramy byly zaznamenány programem GCMS Solution (ver 2.53, Shimadzu, Japonsko) a transformace a vizualizace 2D grafů programem GC Image 2.0 (Zoex, Houston, USA). Identifikace byla provedena pomocí těchto dvou programů zobrazením hmotnostních spekter analytů, a spektra byla porovnáována s knihovnou spekter NIST 08 Mass Spectral library (NIST USA, formát Shimadzu).

Program GCMS Solution pracuje se surovými daty 1D-GC×GC chromatogramu. V programu GC Image dochází k několikerému přeformátování dat (např. kompenzace nelinearity základní linie) a vytvoření 2D konturového chromatogramu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Podmínky silylace

Nejprve bylo potřeba optimalizovat podmínky silylace. Současná silylace polárních hlav je problematická vzhledem k odlišnosti jejich funkčních skupin, a tudíž rozdílné schopnosti tvořit silylové deriváty. Byl tedy zvolen postup silylace ve dvou krocích, vycházející z již předem navrhnutého postupu.⁴⁵ Použitím dvoustupňové silylace s hexamethyldisilazanem (HMDS) pro silylaci fosfoglycerolu (PG), a *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamidu (BSTFA) pro silylaci aminoskupin fosfoethanolaminu (PE) a fosfoserinu (PS), byly analytické odezvy během měření vyšší a byly vytvořeny pouze očekávané deriváty, než při použití každého činidla zvlášť.

Ukázalo se, že PG poskytuje plně silylované produkty i za mírných podmínek (70-80 °C, 20-30 min) za použití slabších silylačních činidel, jako je HMDS. Toto činidlo ale není dostatečně účinné pro silylaci PE a PS. Derivatizace aminoskupin vyžaduje účinnější silylační činidlo jakým je BSTFA.

V obou krocích silylace byly vyzkoušeny různé teploty a množství obou činidel dle doporučení výrobců činidel, různá doba jejich působení i katalyzátor kyselina trifluoroctová. Přidáním i malého množství (2 µl) kyseliny trifluoroctové do reakční směsi dochází k velmi bouřlivé reakci, tudíž je práce s ní velmi nepříjemná. Ukázalo se, že má minimální vliv na průběh a urychlení silylace, takže z konečného postupu byla vyloučena.

K analýze bylo vždy použito 5 µl zásobního roztoku standardů polárních hlav (PG, PE, PS), což odpovídalo 0,2 mg vzorku. Při použití většího množství vodného roztoku už nedocházelo k silylaci analytů, protože jsou silylační činidla náchylná k hydrolýze a probíhá konkurenční reakci mezi vodou a silylačním činidlem. Z toho důvodu je zároveň potřeba v prvním kroku použít nadbytek činidla. Protože HMDS je relativně laciné silanizační činidlo, bylo využito jeho nadbytku k odstranění vody z dávkovaného zásobního roztoku. Jeho přebytek po reakci s vodou slouží k silanizaci reaktivnějších skupin. Jako optimum bylo zvoleno 400 µl směsi HMDS a acetonitrilu (ACN) v poměru 1:1, aby došlo k lepšímu rozpuštění vzorku a jeho kontaktu s činidlem.

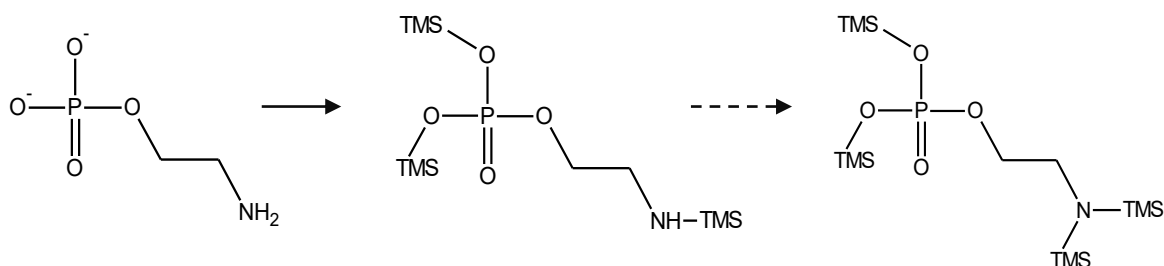
V prvním kroku je vialka otevřená, aby mohl unikat amoniak z reakční směsi. Dochází také k odpaření rozpouštědla a činidla, a tím k zakoncentrování vzorku.

V prvním kroku byly testovány teploty od 50 – 100 °C. Při nižších teplotách trvalo odpaření kapalné fáze vzorku více než 90 min a výtěžek silylace byl nízký, tudíž i odezvy během měření nižší. Při vyšších teplotách došlo k odpaření již za 30 - 40 min, a výtěžek silylace byl větší - odezvy během měření vyšší. Faktor teploty byl tedy v prvním kroku významnější než faktor času, proto byla zvolena teplota 90 °C po dobu 40 min.

V druhém kroku už bylo možné činidlo přidat k suchému vzorku, který je výhodnější rozpustit v malém množství rozpouštědla – 50 µl acetonitrilu. Poté již stačilo přidat 50 µl BSTFA. Při použití i dvojnásobného množství (100 µl) BSTFA nebyl pozorován žádný rozdíl. Pro silylaci ve druhém kroku byly testovány teploty 50 - 120 °C a různé časové intervaly. Ukázalo se, že při nižších teplotách probíhá reakce pomaleji, ale v rozmezí teplot 70 - 120 °C už nebyl rozdíl tak znatelný, a tudíž faktor času se ukázal jako významnější než faktor teploty. Reakce vykazuje maximum výtěžku; ze začátku posupně stoupá tvorba trimethylsilyl derivátů, poté se jejich koncentrace ustálí a po delší době (cca 90 - 120 min) převládá rozklad produktů a koncentrace silylderivátů klesá. Každý ze třech analytů vyžadoval různou optimální dobu pro vznik silylderivátů a ustálení jejich koncentrace ve druhém kroku. PG byl silylován již v prvním kroku za vzniku tetra(trimethylsilyl) fosfoglycerolu (TMS₄-PG). PS potřeboval alespoň 40 min ve druhém kroku pro vznik tetra(trimethylsilyl) fosfoserinu (TMS₄-PS).

V průběhu druhého kroku silylace PE vznikalo několik derivátů PE v závislosti na době působení BSTFA. Amin skupiny patří mezi skupiny málo ochotné tvořit TMS deriváty. PE může na své aminoskupině uvolnit dva vodíky, na jejichž místo se může navázat trimethylsilylová skupina –Si(CH₃)₃. Při silylaci amin skupiny PE mohou tedy vznikat dva deriváty. Převažoval vznik derivátu pouze s jednou trimethylsilylovou skupinou navázanou na dusík; tris(trimethylsilyl) fosfoethanolamin (TMS₃-PE), stejně tak jako při silylaci fosfoserinu, zřejmě ze sterických důvodů. Derivát obsahující na dusíku dvě skupiny –Si(CH₃)₃; tetra(trimethylsilyl) fosfoethanolamin (TMS₄-PE) vznikal obvykle pouze v malých koncentracích, tudíž silylace nebyla kompletní (Obr. 4.1.1). Byly zkoušeny různé způsoby (výše popsané) jak docílit větší účinnosti a zvýšení koncentrace tohoto derivátu TMS₄-PE a tak vyšší odezvy během měření; jako zvýšení teploty a doby působení silylačních činidel v obou krocích, nebo přidání

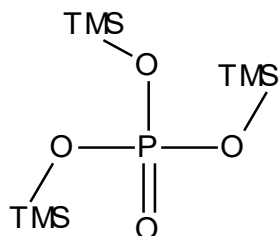
katalyzátoru kyseliny trifluoroctové. S delší dobou působení BSTFA (cca 90 min) ve druhém kroku vzrůstala koncentrace/odezva derivátu TMS₄-PE, ale jen do určité míry, kdy se koncentrace obou derivátů obvykle vyrovnaly, avšak výsledky nebyly reprodukovatelné. Navíc po tak dlouhé době klesala koncentrace/odezva ostatních TMS derivátů. Jako kompromis pro druhý krok silylace byla zvolena teplota 75 °C po dobu 60 min. Stabilita připravených vzorků silylderivátu byla obvykle 2-3 dny.



Obr. 4.1.1: Schéma neúplné silylace fosfoethanolaminu

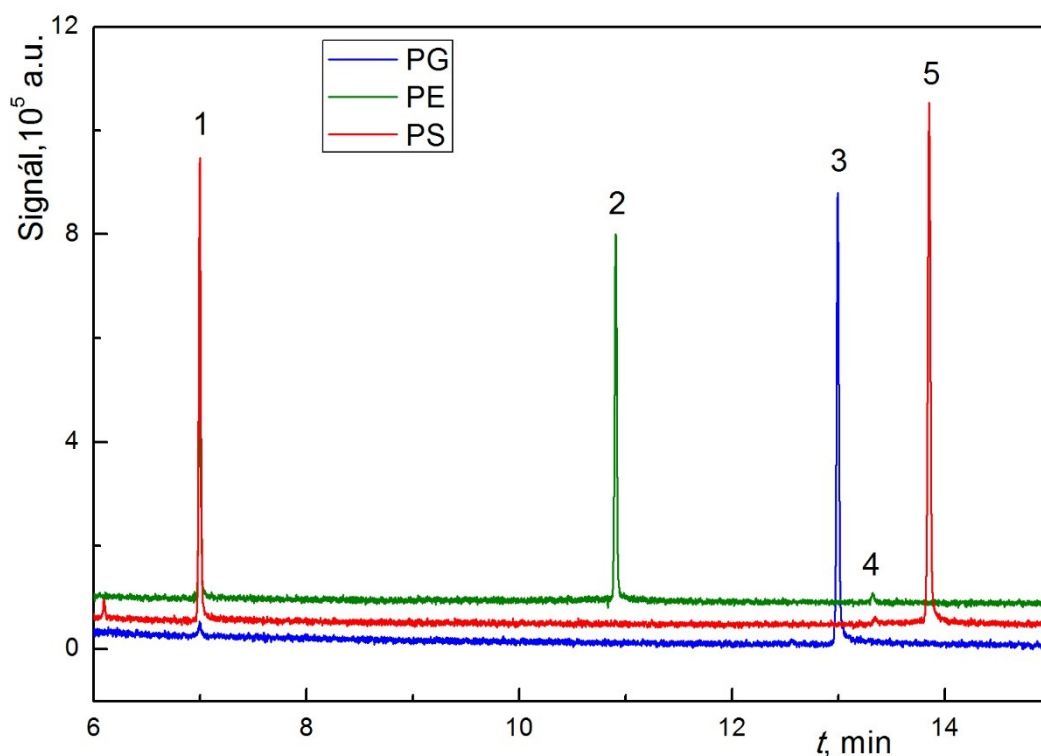
Standardy fosforylovaných hlav (PG, PS, PE – každý 0,2 mg) byly silylovány za výše uvedených optimálních podmínek a jednotlivé chromatogramy jejich silylderivátů naměřených při 1D-GC jsou zobrazeny na Obr. 4.1.3.

Čistota každého standardu polární hlavy je asi 85 %, tudíž kromě různých nečistot je zřejmě přítomna i kyselina fosforečná, jejíž silylderivát; tris(trimethylsilyl) fosfát (TMS₃-P) (Obr. 4.1.2) eluuje vždy kolem 7. minuty v případě separace každé polární hlavy. Je také možné, že tento silylderivát vzniká až při samotné silylaci odtržením od původní fosforylované hlavy.



Obr. 4.1.2: tris(trimethylsilyl) fosfát (TMS₃-P)

Na chromatogramu můžeme vidět píky obou derivátů fosfoethanolaminu. Tyto dva silylderiváty PE eluovaly v rozdílném retenčním čase, takže nebylo těžké je od sebe rozeznat. Intenzita píku TMS₄-PE je velmi nízká, ale částečný vznik tohoto silylderivátu zároveň snižuje koncentraci druhého derivátu TMS₃-PE, tudíž intenzita jeho píku je o něco nižší než ostatních dvou silylderivátů (TMS₄-PG a TMS₄-PS).



Obr. 4.1.3: TIC chromatogramy jednotlivých silylderivátů standardů fosforylovaných hlav: 1: TMS₃-P, 2: TMS₃-PE, 3: TMS₄-PG, 4: TMS₄-PE, 5: TMS₄-PS

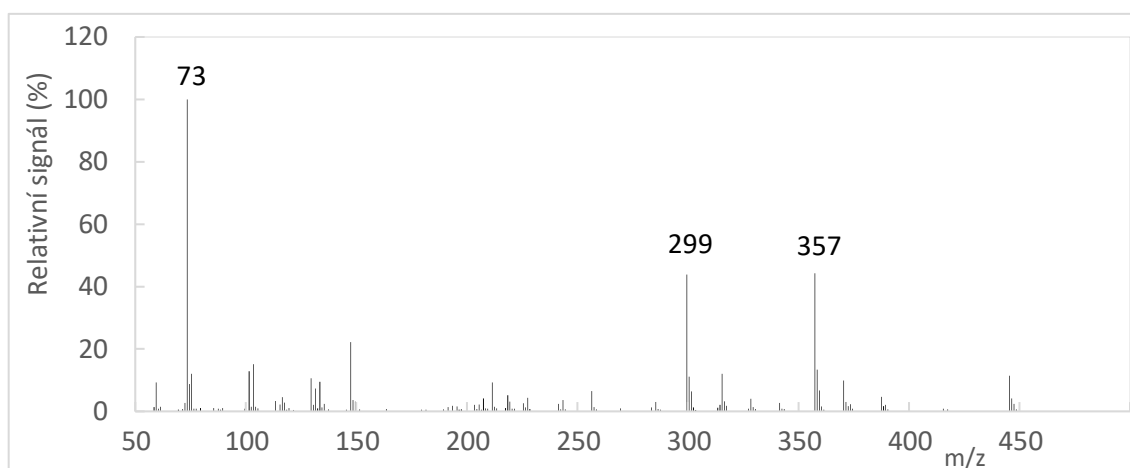
Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μ l, split (1:50), teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C - nechána izotermálně 1 min, MS: scan mód v rozsahu hmot 58–500 m/z

4.1.2 Identifikace produktů silylace

V případě 1D-GC pracoval hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 58–500 m/z rychlostí 9000 m/z/s. Identifikace byla provedena pomocí programu GCMS Solution zobrazením hmotnostních (MS) spekter analytů. Avšak tento program byl schopný identifikovat TMS deriváty fosforylovných hlav pouze při velmi vysoké intenzitě jejich píků. Jednotlivé TMS deriváty byly tedy identifikovány na základě jejich charakteristických intenzivních fragmentů v hmotnostních spektrech.

Všechna hmotnostní spektra analyzovaných TMS derivátů polárních hlav obsahovala vysoké intenzity fragmentů o m/z 73 a 299. Nejintenzivnější fragment o m/z 73 odpovídá jedné skupině $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Hodnota m/z 299 odpovídá fragmentu desmethyl-TMS₃-fosfátu.

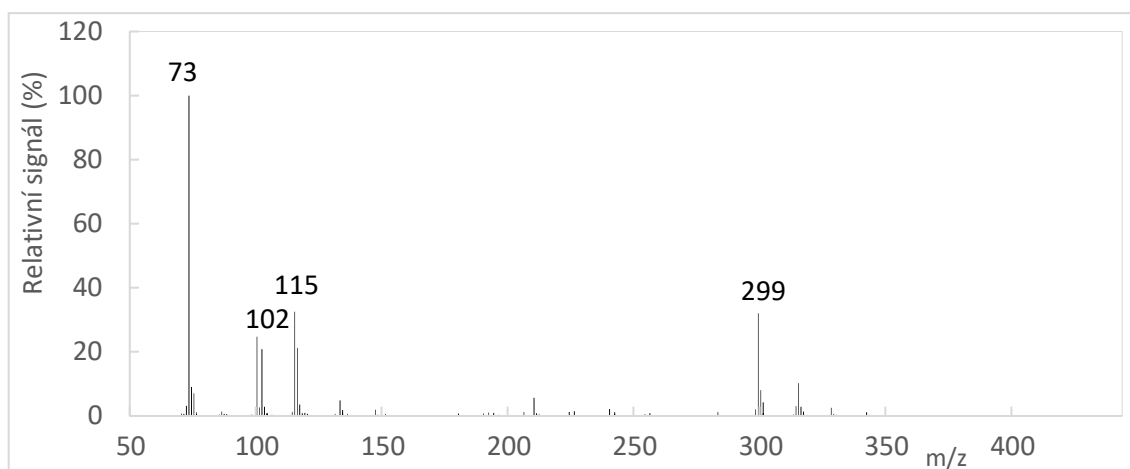
Pro MS spektrum TMS₄-PG byl charakteristický fragment o m/z 357, odpovídající tris(trimethylsilyl) ethylenglykolfosfátu, vznikajícímu odtržením skupiny $-\text{CH}_2\text{-O-TMS}$ (m/z 103) z molekuly TMS₄-PG (m/z 460).



Obr. 4.1.2.1: MS spektrum TMS₄-PG

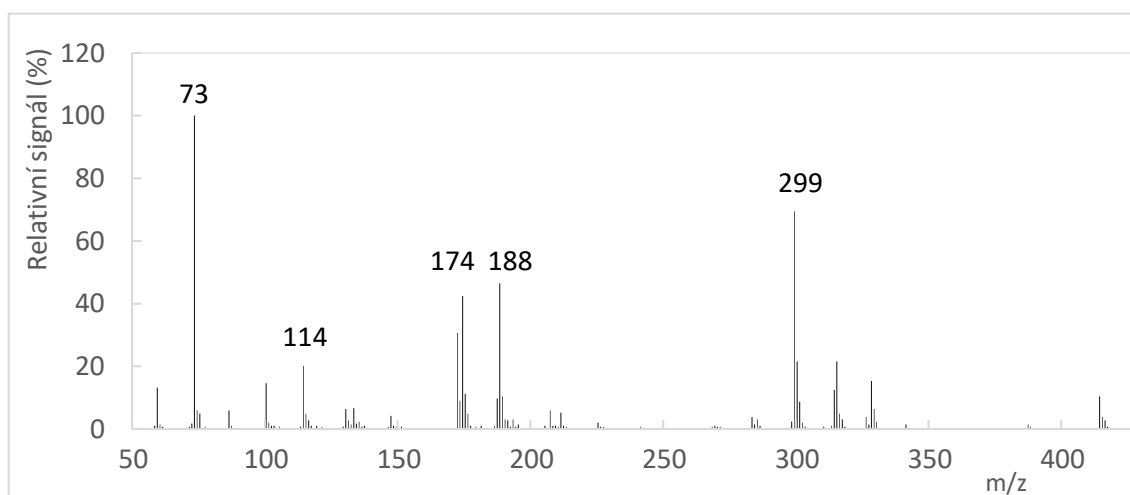
Hmotnostní spektra obou silylderivátů fosfoethanolaminu; TMS₃-PE a TMS₄-PE byla velmi podobná. Obě MS spektra obsahovala typické intenzivní fragmenty o m/z 73, 299 a 315 (tris(trimethylsilyl) fosfát). MS spektrum TMS₃-PE obsahuje intenzivní fragment o m/z 115, který by odpovídal (trimethylsilyl) ethylaminu. V MS spektru TMS₄-PE je stejný fragment, ale o m/z 114, zřejmě kvůli chybějícímu vodíku na aminoskupině po odtržení druhé TMS skupiny.

MS spektrum TMS₃-PE na rozdíl od TMS₄-PE obsahuje fragment o m/z 102 odpovídající -CH₂-NH-TMS, což by poukazovalo na přítomnost jedné TMS skupiny na aminoskupině.



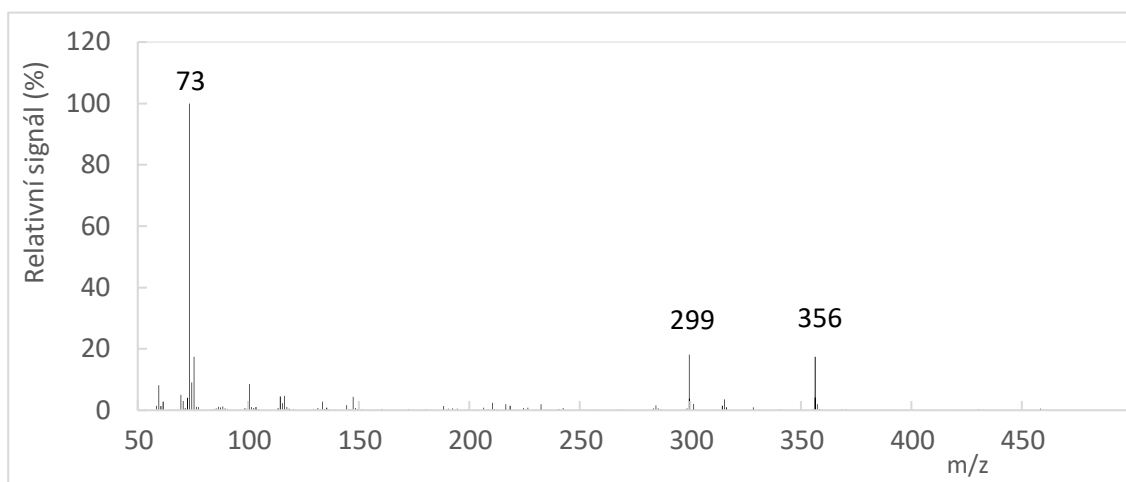
Obr. 4.1.2.2: MS spektrum TMS₃-PE

Hmotnostní spektrum TMS₄-PE obsahuje navíc intenzivní fragmenty o m/z 174 a 188 a samozřejmě fragmenty o vyšších hmotách vzhledem k molekulové hmotnosti (např. fragment o m/z 414 – odtržení metylu). Fragment o m/z 174 by odpovídal bis(trimethylsilyl) methylaminu, vznikajícímu odtržením skupiny bis(trimethylsilyl) methylfosfátu (m/z 256) z molekuly TMS₄-PE (m/z 430). Fragment o m/z 188 by odpovídal bis(trimethylsilyl) ethylaminu, vznikajícímu odtržením bis(trimethylsilyl) fosfátu (m/z 242) z molekuly TMS₄-PE (m/z 430). Je tedy zřejmé, že tento silylderivát PE obsahuje dvě TMS skupiny na dusíku.



Obr. 4.1.2.3: MS spektrum TMS₄-PE

Pro MS spektrum TMS₄-PS je charakteristický fragment o m/z 356, odpovídající zřejmě fragmentu tris(trimethylsilyl) ethanolaminfosfátu, vznikajícímu odtržením skupiny -COO-TMS (m/z 117) z molekuly TMS₄-PS (m/z 473).



Obr. 4.1.2.4: MS spektrum TMS₄-PS

Všechny získané údaje, které by měly pomoci k identifikaci jednotlivých silylderivátů fosforylovaných hlav, jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 4.1.2.1). Retenční časy byly určeny na základě výše uvedeného chromatogramu (Obr. 4.1.1).

Tab. 4.1.2.1: Souhrnné údaje silylderivátů fosforylovaných hlav

Analyt	t_r (min)	M_r	Charakteristické m/z
TMS ₄ -PG	13,0	460	73, 299, 357
TMS ₃ -PE	10,9	357	73, 102, 115, 299
TMS ₄ -PE	13,3	430	73, 174, 188, 299
TMS ₄ -PS	13,8	473	73, 299, 356

4.2 GC×GC

4.2.1 Výběr pracovních podmínek

Optimalizace GC×GC systému vyžaduje odlišný a více komplexní přístup než u 1D-GC, protože jednotlivé experimentální parametry jsou na sobě závislé (korelují) a vzájemně se ovlivňují. Dále musí být zahrnuty nové parametry, jako je modulační perioda, doba pulzu a teploty trysek, které musí být optimalizovány. Byly hledány optimální podmínky pro efektivní separaci fosfolipidů.

Obě kolony mají navzájem odlišné parametry, ale do parametrů GC systému lze zadat rozměry pouze jedné kolony. Bylo tedy nutno vypočítat rozměry hypotetické kolony, které po zadání do GC systému budou simulovat instalovanou soustavu obou kolon. Výsledné rozměry této hypotetické kolony jsou: délka: 147 m, průměr: 0,25 mm a tloušťka filmu: 0,25 μm . Za těchto podmínek je GC schopno nastavit správný tlak odpovídající zadané hodnotě lineární průtokové rychlosti nosného plynu.

Vstupní tlak v plynovém chromatografu určuje průtokovou rychlost mobilní fáze v obou kolonách. Teplota a průtok nosného plynu ovlivní separaci v obou kolonách odlišně. Z důvodů rozdílných vnitřních průměrů obou kolon nelze nastavit jedinou optimální průtokovou rychlost. Měla by tedy být kompromisem mezi optimy obou kolon. Vstupní tlak na kolonu byl testován v rozsahu 340 – 600 kPa a jako optimální byl zvolen tlak 520 kPa. Při nastavení vyššího tlaku měl systém problém s nastavením vyššího split poměru (1:100). Systém nestačí dodávat dostatečné množství helia do injektoru pro dosažení daného split poměru. V případě nižší lineární rychlosti docházelo zbytečně k prodloužení analýzy a k rozšiřování píků, a tím ke ztrátě separační účinnosti.

Průtoková rychlost mobilní fáze ovlivní i volbu délky modulační periody. Při vyšší průtokové rychlosti je nutné zvolit kratší modulační periodu, aby byla dodržena podmínka, že každý pík z první dimenze by měl být modulován alespoň třikrát. Čím bude modulační perioda kratší, tím větší bude počet pulzů v analýze.

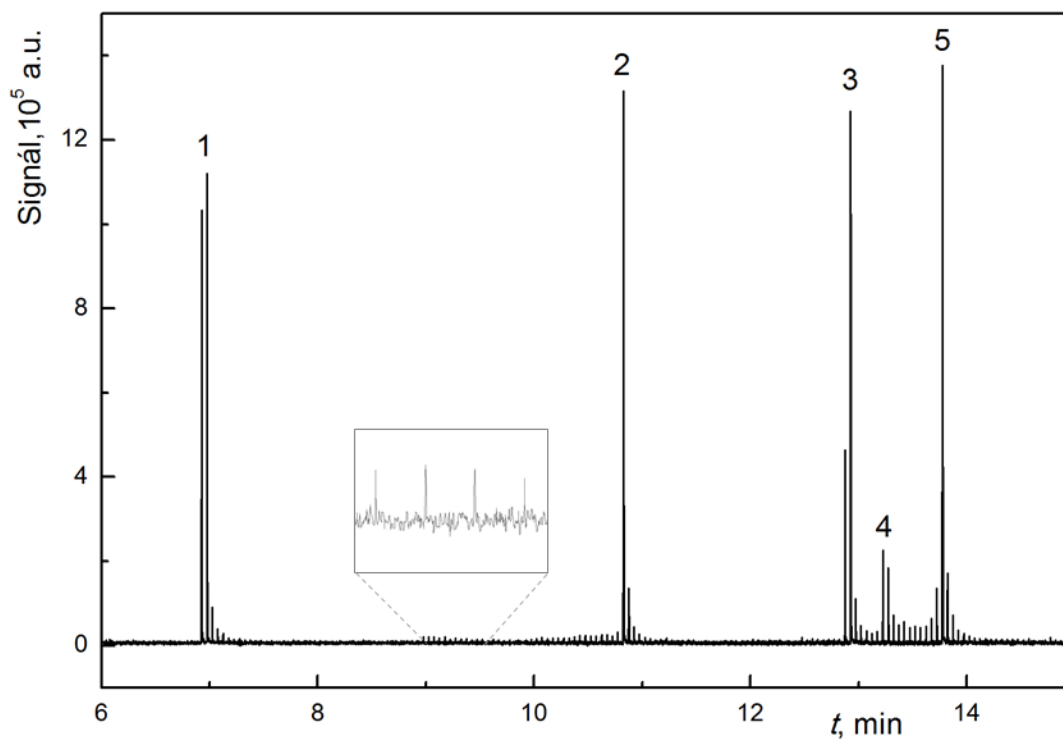
Pokud by byla modulační perioda příliš dlouhá (5 a více s) nedocházelo by k dostatečné modulaci některých píků. Zároveň by však modulační perioda měla být delší než retenční čas látek ve druhé koloně, jinak analyty nestihnou eluovat v rámci jedné modulační periody. Byly nalezeny optimální podmínky, při kterých je modulátor schopný modulovat píky; modulační perioda 3 s a doba pulzu 375 ms.

Bylo zvoleno dávkování 0,5 μ l a split poměr se měnil v závislosti na koncentraci analytů. Množství vzorku přicházejícího na MS detektor musí být zvoleno tak, aby bylo využito nejvyšší citlivosti detektoru a zároveň nesmělo být příliš vysoké, aby nedocházelo k jeho přetížení.

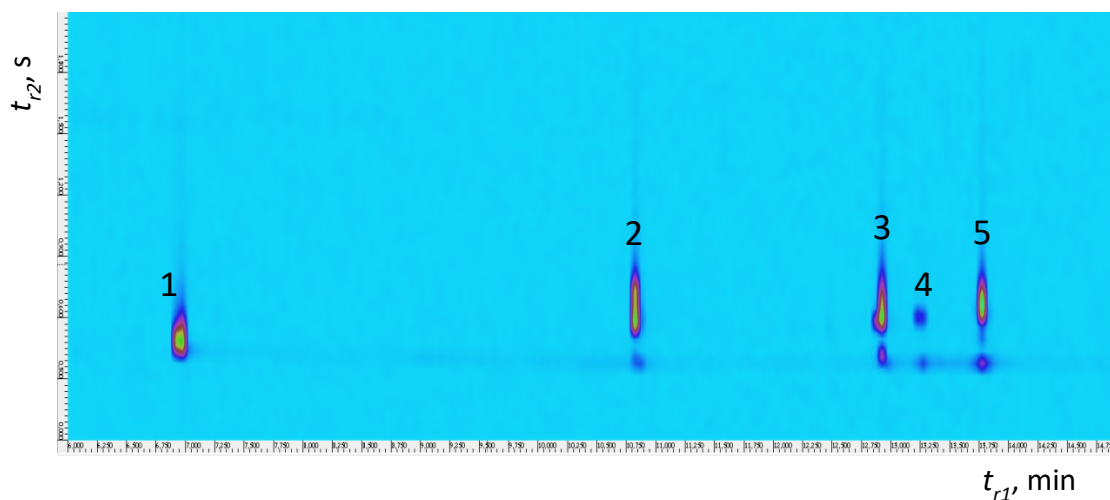
Pro správné zobrazení GC \times GC chromatogramů systém vyžaduje rychlý sběr dat, protože v důsledku modulace jsou výsledkem rychlé separace na druhé koloně velmi úzké píky o šířce 100 až 500 ms při základně. Z tohoto důvodu musel být zvolen užší rozsah měřených hodnot m/z, a tak v případě GC \times GC pracoval hmotnostní detektor ve scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z, aby byla rychlost sběru dat alespoň 10000 m/z/s. Co nejužší rozsah hmot byl zvolen na základě nejintenzivnějších charakteristických fragmentů silylderivátů fosforylovaných hlav (viz Tab. 4.1.2.1). Pro budoucí využití je také možné zvolit SIM mód pro jednotlivé charakteristické hmoty m/z. V této práci nebyl využit, protože bychom se mohli ochudit o ostatní píky z reálných vzorků.

Směs 3 standardů fosforylovaných hlav (PG, PE, PS – každý 0,2 mg) byla silylována za výše uvedených optimálních podmínek a chromatogramy jejich silylderivátů naměřených při GC \times GC jsou zobrazeny na Obr. 4.2.1.1.

Na obrázku (a) je 1D-GC \times GC chromatogram, na kterém jsou vidět velmi úzké modulované píky. Na výřezu je možné vidět pulzy modulátoru sloužící ke kontrole účinnosti modulace. Na druhém obrázku (b) je pak tento klasický chromatogram převeden pomocí programu GC Image na konturovaný chromatogram. Na ose x je retenční čas na první koloně v minutách a na ose y retenční čas na druhé koloně v sekundách. Výška píky je charakterizována vrstevnatým konturovým objektem (blobem) a jeho obsah udává množství daného analytu. Barva určuje intenzitu signálu tak, že světle modrá je signál roven nule a přes tmavě modrou, fialovou až ke žluté, kdy je signál největší. Další chromatogramy budou zobrazeny pouze pomocí tohoto konturovaného chromatogramu.



(a)



(b)

Obr. 4.2.1.1: Chromatogramy směsi silylderivátů standardů foforylovaných hlav

(a) 1D-GC×GC chromatogram, (b) kontrurovaný chromatogram; osa x představuje retenční čas 1. kolony [min], osa y 2. kolony [s]

1: TMS₃-P, 2: TMS₃-PE, 3: TMS₄-PG, 4: TMS₄-PE, 5: TMS₄-PS

Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μ l, split (1:50),

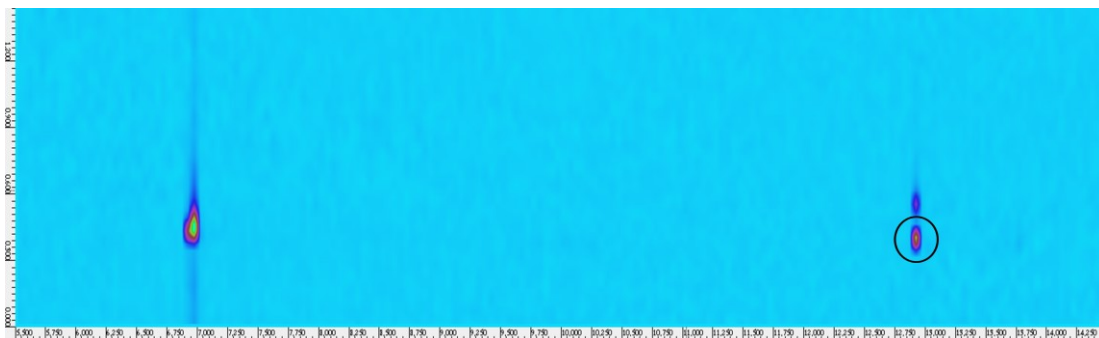
teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C -

nechána izotermálně 1 min, modulační perioda: 3 s, puls: 375 ms, teplota trysky = 250 °C

MS: scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z

Byl použit kryofokusační modulátor, který tvoří dvě trysky tzv. dvoutryskový (two-jets) systém. První tryska nepřetržitě vymrazuje malý bod kapiláry, čímž zachycuje analyty vycházející z první kolony. Touto tryskou proudí plynný dusík chlazený kapalným dusíkem na teplotu přibližně $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato teplota se nedá nijak ovlivnit nebo nastavit. Intenzita chlazení se dá regulovat jen průtokem chlazeného plynného dusíku. Druhou tryskou proudí plynný horký dusík, který na malý okamžik – doba pulzu, ohřeje ochlazený bod kapiláry, čímž zplyní a nadávkuje analyty do druhé kolony. Teplota této trysky se dá počítačově nastavit a pohybuje se v rozmezí od teploty termostatu kolony až do $500\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pod blobem každého ze silylderivátů je možné vidět další malý blob (Obr. 4.2.1.1). Všechny tyto malé bloby mají stejné hmotnostní spektrum s intenzivními fragmenty o m/z 299 a 314. Toto MS spektrum je úplně stejné jako MS spektrum blobu č. 1, které odpovídá tris(trimethylsilyl) fosfátu ($\text{TMS}_3\text{-P}$). Vlivem horkého proudu dusíku v modulátoru zřejmě dochází k odtržení silylovaného fosfátu od zbytku molekuly a následně k jeho separaci na druhé koloně. Pokud by k tomuto jevu docházelo již v injektoru, objevil by se zřejmě blob fosfátu přesně na pozici fosfátu, který již byl ve vzorku. Vzhledem k přítomnosti blobu volného fosfátu v chromatogramu nelze tento rozklad v injektoru zcela vyloučit. Tento jev nelze rozeznat v klasické 1D-GC. Na obrázku (Obr. 4.2.1.2) je možné vidět, jak byl tento blob velký (v černém kroužku) na úkor silyl derivátu fosfoglycerolu ($\text{TMS}_4\text{-PG}$) při nastavení teploty druhé trysky na $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vlivem snižování teploty horkého proudu docházelo ke zmenšení plochy tohoto blobu. Teplota trysky byla snížena až na $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, při kterých už byly tyto bloby malé. Další snižování teploty už by mohlo vést k nedostatečně účinnému ohřátí kapiláry a nadávkování do druhé kolony.



Obr. 4.2.1.2: Konturovaný chromatogram PG

Podmínky analýzy: viz Obr. 4.2.1.1, teplota trysky = $400\text{ }^{\circ}\text{C}$

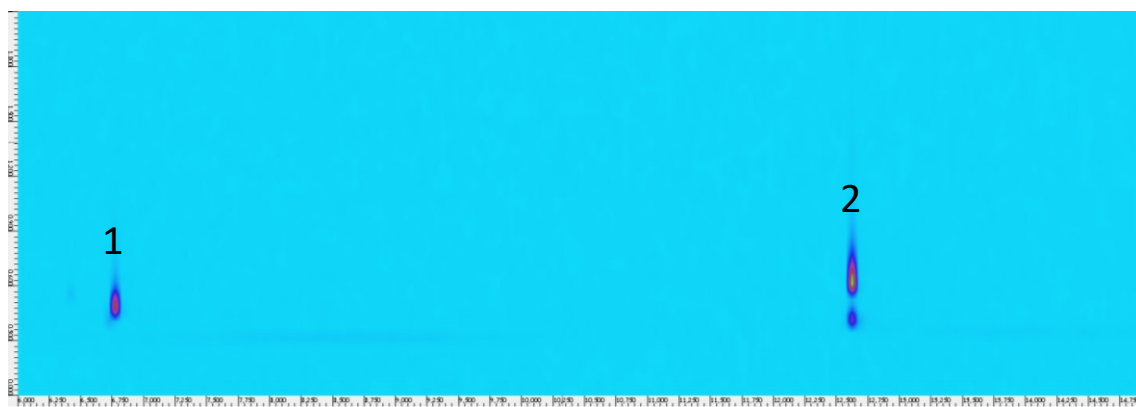
4.2.2 Fosfolipidy

Pro hydrolytické štěpení fosfolipidů byly zvoleny podmínky dle doporučení výrobce použitého enzymu fosfolipasy C. 1 mg suchého enzym byl rozpuštěn v roztoku uhličitanu amonného o doporučeném pH 7,3 a teplota během inkubace byla udržována při 37 °C. Pro rozpouštění a působení enzymů jsou obvykle využívány běžné biochemické pufrů jako např. Tris pufr, který byl také doporučen výrobcem použité fosfolipasy. Tyto běžně používané pufrů však nejsou vhodné při následné silylaci a analýze pomocí GC. Při použití Tris pufru by došlo k silylaci jeho aminoskupin, a tím spotřebě silylačních činidel, a jeho nežádoucí pík by se zároveň objevoval v chromatogramu. Z těchto důvodů byl pro tento účel zvolen 1 mmol·l⁻¹ roztok uhličitanu amonného, jehož pH může být upraveno na požadovaných 7,3.

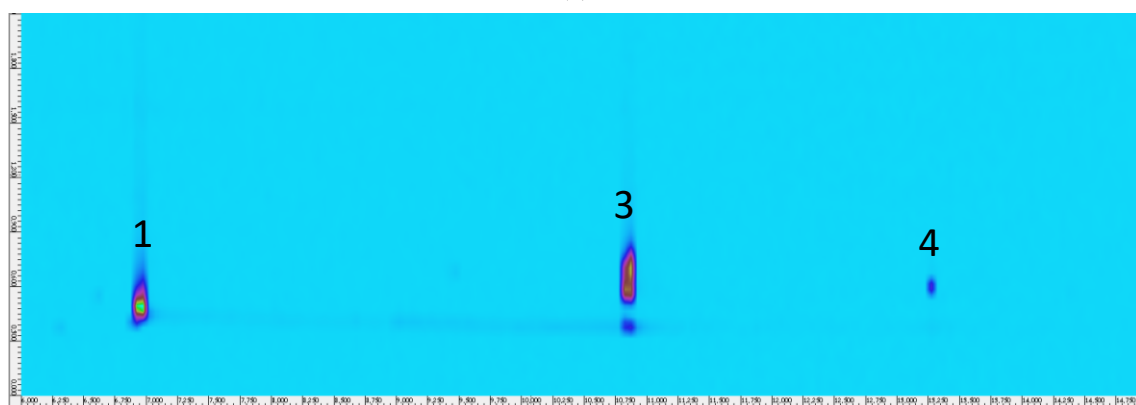
Působení fosfolipasy bylo nejdříve testováno na každém fosfolipidu zvlášť. Vždy bylo použito 0,5 mg daného fosfolipidu v roztoku chloroformu, který byl odpařen dusíkem tak, aby byl fosfolipid rozprostřen po stranách celé vialky v tenké vrstvičce. Enzym tak mohl mít velkou plochu pro kontakt s fosfolipidem. Hydrolýza probíhala alespoň 3 hodiny ve vialce ponořené v ultrazvukové lázni, která udržovala teplotu na požadovaných 37 °C a vzorek zároveň mohl být míchán díky sonifikaci. Poté následovaly tři po sobě jdoucí extrakce 200 µl hexanu pro oddělení mastných kyselin. Spojené organické fáze hexanu byly odpařeny pod proudem dusíku. Polární část byla částečně zbavena přebytečné vody ohřátím pod proudem dusíku a silylována. Podařilo se pomocí fosfolipasy C rozdělit každý ze tří fosfolipidů: Diolelylfosfatidylglycerol (DOPG), Diolelylfosfatidyletanolamin (DOPE), Dipalmitoylfosfatidylserin (DPPS) a následně silylovat jejich fosforylované hlavy (Obr. 4.2.2.1).

Dále byla za stejných podmínek připravena směs všech tří fosfolipidů (každý 0,2 mg). Po hydrolýze byla nepolární frakce s mastnými kyselinami (připojené na glycerol) extrahována a polární frakce byla derivatizována za výše uvedených podmínek. Podařilo se oddělit a silylovat všechny 3 fosforylované hlavy (Obr. 4.2.2.2).

Mastné kyseliny byly esterifikovány a jejich příslušné methylestery separovány. Byly identifikovány 2 estery mastných kyselin: palmitové a olejové. Na konturovaném chromatogramu (Obr. 4.2.2.3) je podle zbarvení blobů patrné, že vzorek obsahoval větší podíl kyseliny olejové vzhledem k použitým fosfolipidům.



(a)



(b)



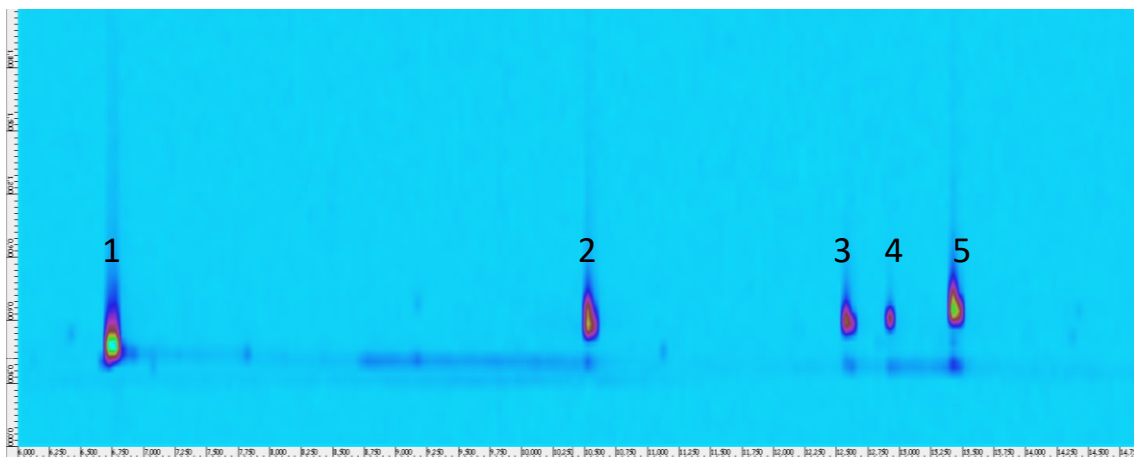
(c)

Obr. 4.2.2.1: Konturované chromatogramy silylderivátů polárních hlav jednotlivých standardů fosfolipidů: (a) Diolelylfosfatidylglycerol (DOPG), (b) Diolelylfosfatidyletanolamin (DOPE), (c) Dipalmitoylfosfatidylserin (DPPS)

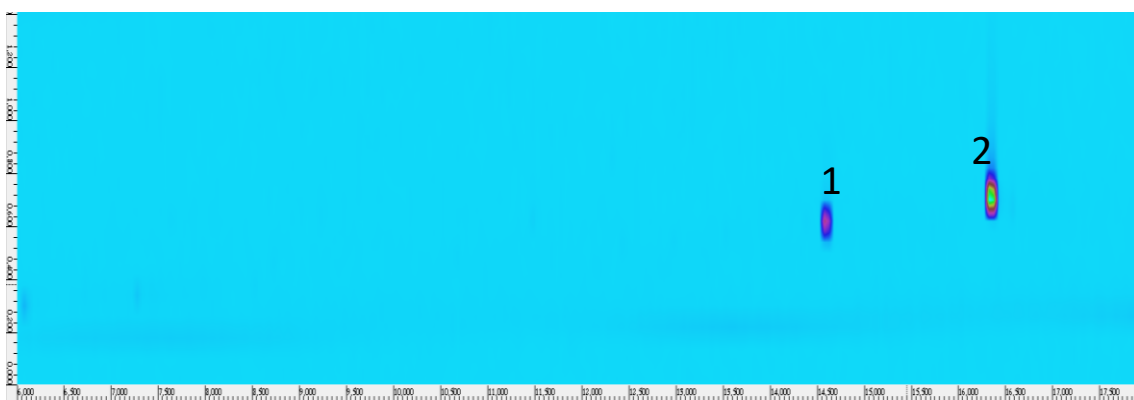
osa x představuje retenční čas 1. kolony [min], osa y 2. kolony [s]

1: TMS₃-P, 2: TMS₄-PG, 3: TMS₃-PE, 4: TMS₄-PE, 5: TMS₄-PS

Podmínky analýzy: stejné jako Obr.: 4.2.1.1, dávkováno 0,5 μ l, split (1:50)



Obr. 4.2.2.2: Konturovaný chromatogram silylderivátů polárních hlav ze směsi standardů fosfolipidů: 1: TMS₃-P, 2: TMS₃-PE, 3: TMS₄-PG, 4: TMS₄-PE, 5: TMS₄-PS
 Podmínky analýzy: stejné jako Obr.: 4.2.1.1, dávkováno 0,5 μl, split (1:20)



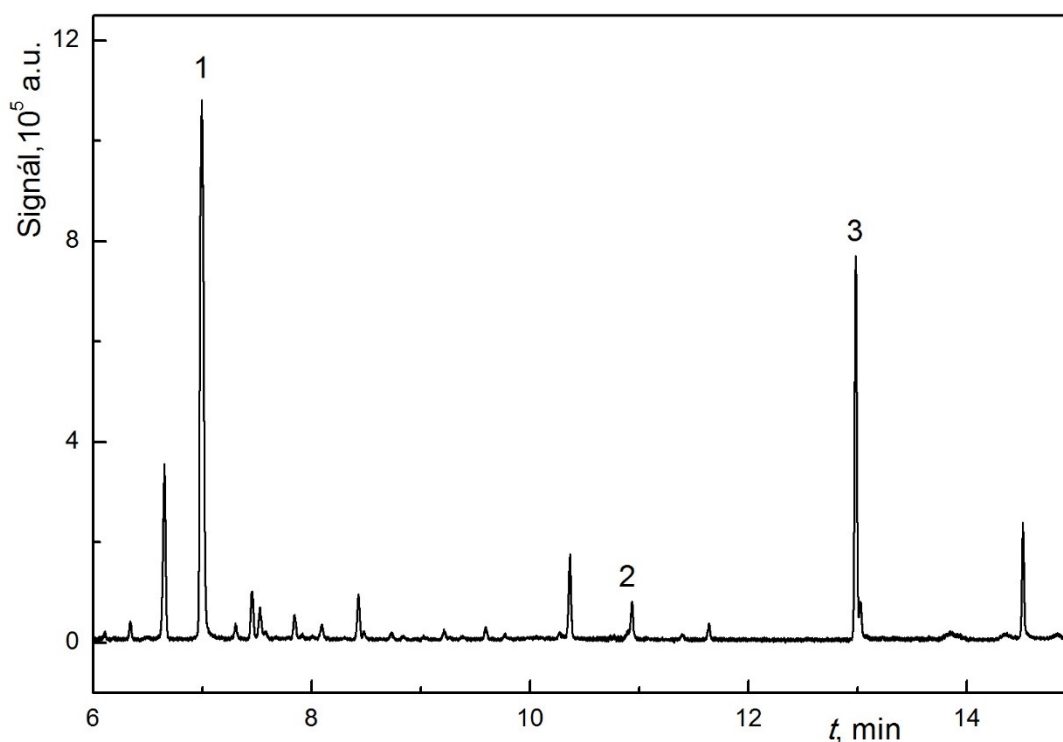
Obr. 4.2.2.3: Konturovaný chromatogram methylesterů mastných kyselin ze směsi standardů fosfolipidů (DOPG, DOPE, DPPS); 1: kys. palmitová, 2: kys. olejová
 Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μl, split (1:80),
 teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 250 °C - nechána izotermálně 1 min, modulační perioda: 3 s, puls: 375 ms
 MS: scan mod v rozsahu hmot rozsah 50-350 m/z

4.2.3 Reálné vzorky

Vyvinutá metoda byla otestována na dvou reálných vzorcích membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*. Postup přípravy vzorků pro analýzu byl stejný jako v případě standardů fosfolipidů (kapitola 4.2.2) – po hydrolýze byla nepolární frakce extrahována a polární frakce byla derivatizována za vybraných podmínek.

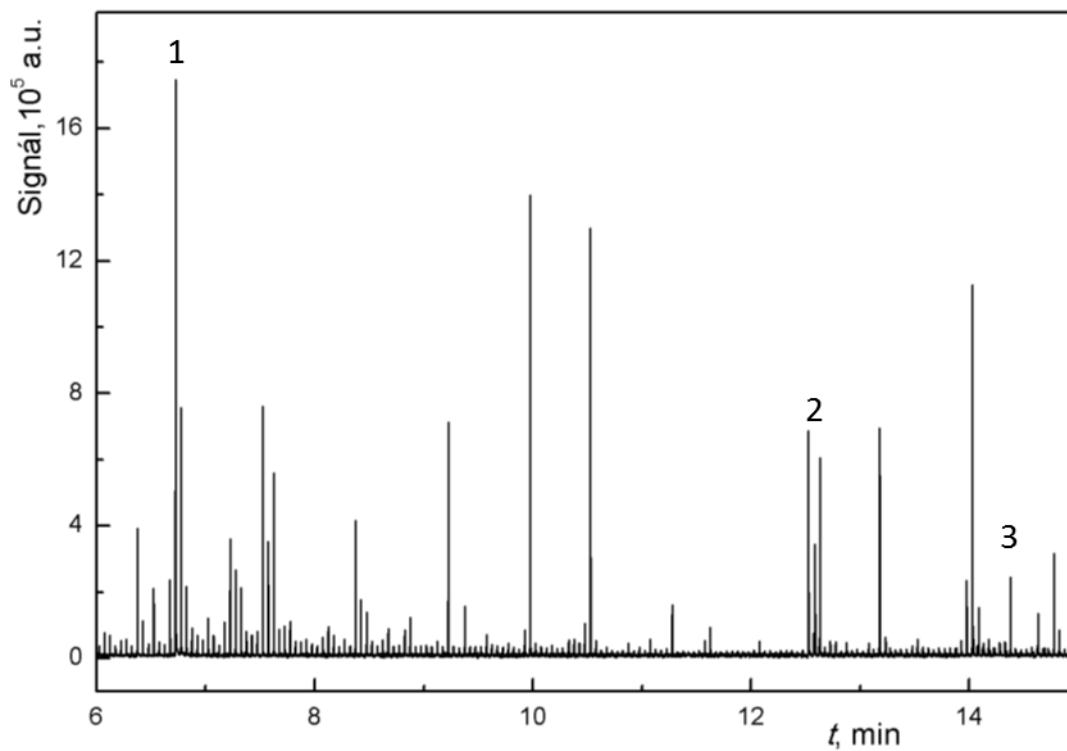
První vzorek byl naměřen v klasické 1D-GC (Obr. 4.2.3.1), protože po testování podmínek GC×GC a měření fosfolipidů už nezbyl kapalný dusík pro kryofokusaci. V tomto vzorku se podařilo identifikovat silylderiváty kyseliny fosforečné, fosfoethanolaminu a fosfoglycerolu.

Druhý vzorek bylo možné připravit a analyzovat až po dodání dalšího kapalného dusíku. Pro porovnání je uveden i 1D-GC×GC chromatogram (Obr. 4.2.3.2).

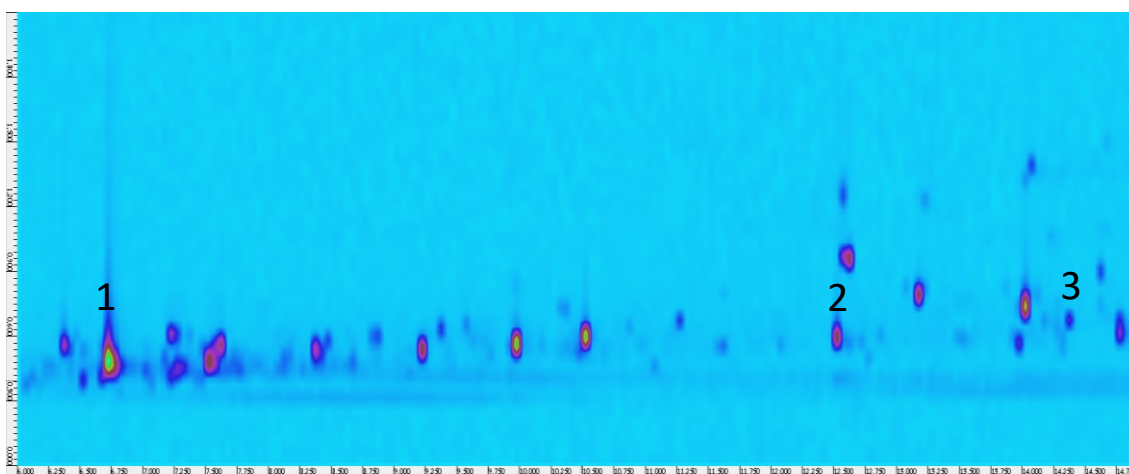


Obr. 4.2.3.1: 1D-GC chromatogram polárních částí vzorku membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*: 1: TMS₃-P, 2: TMS₃-PE, 3: TMS₄-PG

Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μ l, split (1:10),
teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 250 °C -
nechána izotermálně 1 min



(a)



(b)

Obr. 4.2.3.2: Chromatogramy polárních částí vzorku membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*: (a) 1D-GC×GC chromatogram, (b) kontrurovaný chromatogram

1: TMS₃-P, 2: TMS₄-PG, 3: TMS₄-PS

Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μ l, split (1:10),

teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C - nechána izotermálně 1 min, modulační perioda: 3 s, puls: 375 ms, teplota trysky = 250 °C

MS: scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z

V druhém vzorku se podařilo identifikovat silylderiváty kyseliny fosforečné, fosfoglycerolu a fosfoserinu. Vzhledem k tomu, že pracoval hmotnostní detektor v úzkém rozsahu hmot m/z , nebylo možné najisto identifikovat ostatní píky ve vzorku.

Výhodou GC×GC systému je zvýšení intenzity signálu a tím i citlivosti detekce, protože důsledkem modulace dochází k rozdělení píku vycházejícího z první kolony na určitý počet velmi úzkých píků v závislosti na nastavené době modulační periody.

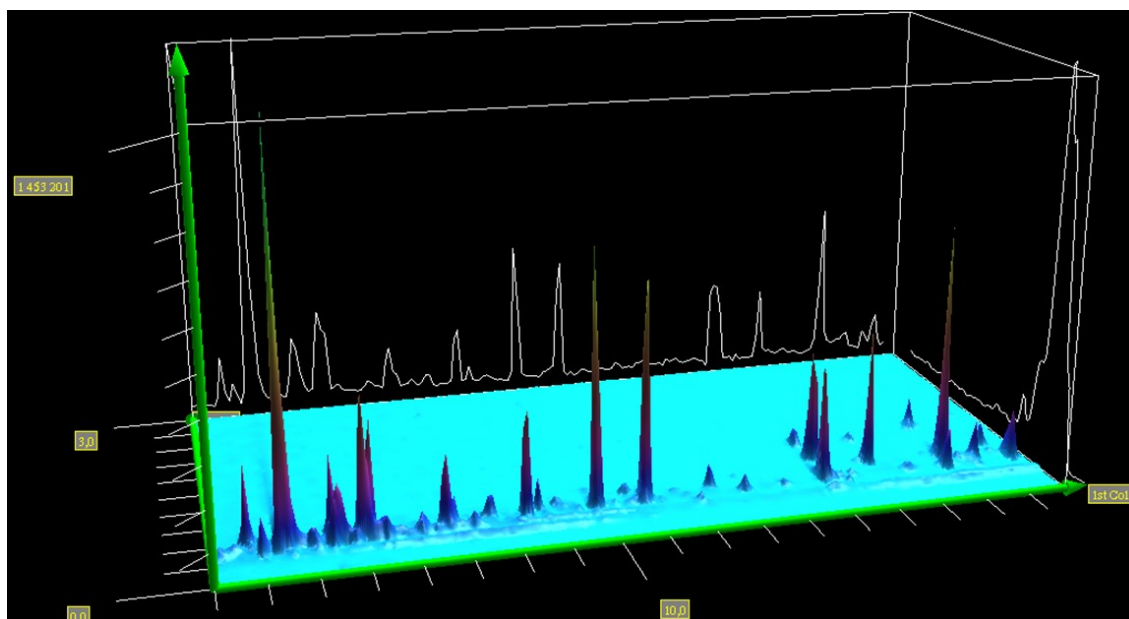
Vzhledem k tomu, že v první dimenzi byla použita nepolární kolona, tak se látky separovaly především podle jejich bodu varu. Čím více byla látka těkavější, tím méně byla na první koloně zadržována a tím kratší byl její retenční čas v první dimenzi. Na ose x je tedy možné vidět seřazení látek podle stoupajícího bodu varu.

V druhé dimenzi byla použita středně polární kolona a látky se separovaly především dle jejich polarit. Čím více byla látka polární, tím více byla zadržována na druhé koloně a tím delší byl její retenční čas v druhé dimenzi. Na ose y by bylo možné vidět řazení analytů dle jejich polarit. Vzhledem k použití středně polární stacionární fáze (50% fenyl polysilfenylen-siloxan) není separace na druhé koloně tak zřetelná. Z toho důvodu bylo také možné zvolit kratší modulační periodu. Pro separaci v této dimenzi by bylo možné použít více polární kolonu např. s polyethylenglykolovou stacionární fází, aby docházelo k účinnější separaci v druhé dimenzi. Výběr kolon byl ale omezen, protože dávkované analyty byly rozpuštěny v silylačním činidle, které by mohlo reagovat s polyethylenglykolovou stacionární fází. Dalším argumentem pro volbu středně polární fáze je její vysoká maximální pracovní teplota (350 °C oproti polyethylenglykolové fázi: max 280 °C).

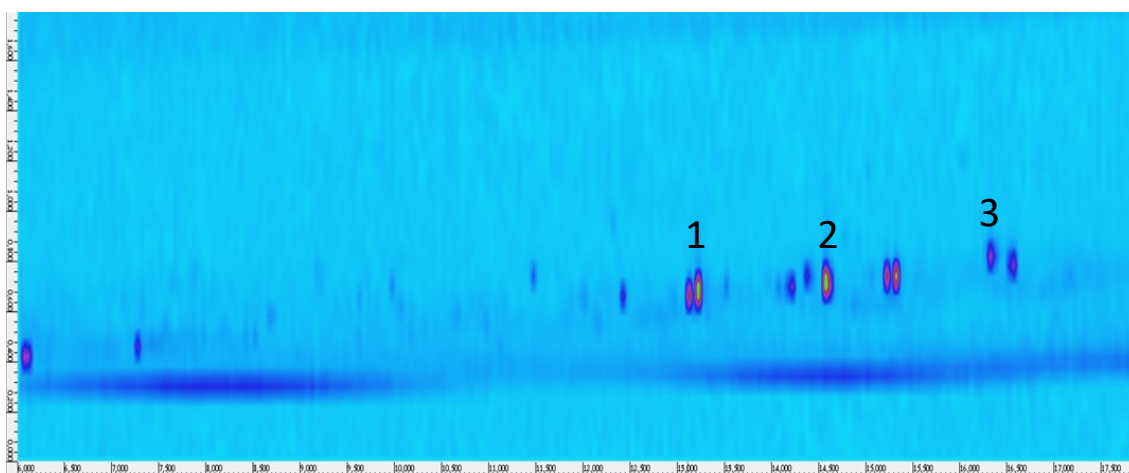
Pro názornost byl konturový chromatogram polárních částí vzorku (Obr. 4.2.3.2) převeden do 3D modelu (obrázek 4.2.3.3), kdy retenční časy na kolonách jsou opět na osách x a y . Na ose z je pak intenzita signálu. Z blobů konturového grafu se stanou kužely, jejichž objem udává množství daného analytu. Tato 3D zobrazení slouží většinou pouze pro názornou ilustraci. Na stěnách pomyslného kvádrů u 3D grafu je patrná projekce kuželů do příslušné separační dimenze, a tím je znázorněno, jak by vypadaly separace v případě analýz pouze na první nebo druhé koloně.

Nepolární frakce mastných kyselin byla ze vzorku membránových lipidů extrahována a následně esterifikována. Příslušné methylestery mastných kyselin byly separovány pomocí GC×GC a identifikovány pomocí MS spekter (Obr. 4.2.3.4).

Většinou se jednalo o větvené nasycené mastné kyseliny s 12 až 17 atomy uhlíku s methylovou skupinou. Nebylo možné u každého píku s jistotou určit počet uhlíku a pozici methylu mastné kyseliny.



Obr. 4.2.3.3: 3D GC×GC chromatogram polárních částí vzorku membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*



Obr. 4.2.3.4: Konturovaný chromatogram methylesterů mastných kyselin ze vzorku membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*: 1: kys. 12-methyl tetradekanová
2: kys. palmitová, 3: kys. olejová

Podmínky analýzy: vstupní tlak na kolonu: 520 kPa, dávkováno 0,5 μ l, split (1:80),
teplotní program: počáteční teplota 100 °C zvyšována rychlostí 10 °C/min na 250 °C - nechána
izotermálně 1 min, modulační perioda: 3 s, puls: 375 ms
MS: scan mod v rozsahu hmot rozsah 50-350 m/z

5 Závěr

- Byly vybrány optimální podmínky pro dvoustupňovou silylaci fosforylovaných hlav (fosfolipidů membrány bakterie *Bacillus subtilis*): fosfoglycerol (PG), fosfoethanolamin (PE) a fosfoserin (PS):
 - 1. krok: 400 μ l směsi HMDS:ACN (1:1) po dobu 40 min při 90 °C
 - 2. krok: 50 μ l ACN, poté 50 μ l BSTFA po dobu 60 min při 75 °C.
- Jednotlivé trimethylsilylderiváty fosforylovaných hlav: TMS₄-PG, TMS₄-PS, TMS₃-PE a TMS₄-PE byly identifikovány podle hmotnostních spekter z MS detektoru a byly vybrány jejich charakteristických intenzivní fragmenty.
- Byly vybrány podmínky pro efektivní separaci těchto silylderivátů pomocí komprehenzivní plynové chromatografie s kryogenním modulátorem:
 - Tlakové: vstupní tlak na kolonu byl 520 kPa
 - Teplotní: počáteční teplota 100 °C byla zvyšována rychlostí 10 °C/min na 240 °C a poté nechána izotermálně 1 min.
 - Teplota horké trysky modulátoru byla 250 °C
 - Modulační perioda byla 3 s a doba pulzu 375 ms
 - Hmotnostní detektor pracoval ve scan modu v rozsahu hmot 170-360 m/z rychlostí 10000 m/z/s.
- Ukázalo se, že kryogenní modulátorem není úplně vhodný pro separaci silylderivátů fosforylovaných hlav vzhledem k popsanému pozorovanému efektu, kdy dochází odtržení silylovaného fosfátu od zbytku molekuly při použití vysoké teploty horké trysky modulátoru. Bylo by možné použít např. tlakový pulzní modulátor.
- Součástí přípravy vzorku fosfolipidů bylo rozštěpení vazby v molekule fosfolipidu pomocí enzymu fosfolipáza C, čímž došlo k uvolnění fosforylovaných polárních hlav. Podařilo se pomocí fosfolipasy C rozdělit každý ze tří fosfolipidů: Diolelylfosfatidylglycerol (DOPG), Diolelylfosfatidyletanolamin (DOPE), Dipalmitoylfosfatidylserin (DPPS) a následně silylovat jejich fosforylované hlavy.

- Vyvinutá separační metoda pro stanovení membránových fosfolipidů, pomocí které je možné provést analýzu fosforylovaných částí i mastných kyselin z jednoho vzorku, byla otestována na dvou reálných vzorcích (izoláty membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis*).
 - V prvním vzorku se podařilo identifikovat silylderiváty kyseliny fosforečné, fosfoethanolaminu a fosfoglycerolu.
 - V druhém vzorku byly identifikovány silylderiváty kyseliny fosforečné, fosfoglycerolu a fosfoserinu.
 - Ve druhém vzorku převažovaly větvené nasycené mastné kyseliny s methylovou skupinou. Podařilo se identifikovat kyseliny: 12-methyl tetradekanovou, palmitovou a olejovou.

- Další výzkum bude zaměřen na stanovení a kvantifikaci fosforylovaných částí fosfolipidů v uvedené bakterii. Kvantifikace bude obtížná vzhledem k odlišnosti funkčních skupin polárních hlav, a tím různé optimální době pro vznik silylderivátů a ustálení jejich koncentrace během silylace.

- Optimalizovaná metoda může být využita také pro studie dalších druhů mikroorganismů.

6 Literatura

1. Mrozik, A.; Piotrowska-Seget, Z.; Łabużek, S., Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Polish Journal of Environmental Studies* **2004**, *13* (5), 487-494.
2. Huijbregts, R. P.; de Kroon, A. I.; de Kruijff, B., Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1469* (1), 43-61.
3. Los, D. A.; Murata, N., Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *1666* (1-2), 142–157.
4. T.J. Denich, L. A. B., H. Lee, J.T. Trevors, Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *52* (2), 149–182.
5. Teixeira, V.; Feio, M. J.; Bastos, M., Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **2012**, *51* (2), 149–177.
6. Yu, W.-B.; Ye, B.-C., High-level iron mitigates fusaricidin-induced membrane damage and reduces membrane fluidity leading to enhanced drug resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Basic Microbiol.* **2016**, *56* (5), 502–509.
7. Buescher, J. M.; Liebermeister, W.; Jules, M.; Uhr, M.; Muntel, J.; Botella, E.; al., e., Global Network Reorganization During Dynamic Adaptations of *Bacillus subtilis* Metabolism. *Science* **2012**, *335* (6072), 1099-1103.
8. Seydlová, G.; Svobodová, J., Development of Membrane Lipids in the Surfactin Producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* **2008**, *53* (4), 303–307.
9. Liu, Y.; Li, J.; Du, G.; JianChen; Liu, L., Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnology Advances* **2017**, *35* (1), 20–30.
10. Heerklotz, H.; Seelig, J., Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* **2007**, *36* (4-5), 305-14.
11. Seydlová, G.; Svobodová, J., Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.* **2008**, *3* (2), 123-133.
12. Rodrigues, L.; Banat, I. M.; Teixeira, J.; Oliveira, R. r., Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *57* (4), 609–618.
13. Uttlová, P.; Pinkas, D.; Bechyňková, O.; Fišer, R.; Svobodová, J.; Seydlová, G., *Bacillus subtilis* alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* **2016**, *1858* (12), 2965-2971.

14. Cronan, J. E., BACTERIALMEMBRANE LIPIDS: Where Do We Stand? *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 203-224.
15. Cybulski, L. E.; Albanesi, D.; Mansilla, M. C.; Altabe, S.; Aguilar, P. S.; Mendoza, D. d., Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Molecular Microbiology* **2002**, *45* (5), 1379–1388.
16. Hac-Wydro, K.; Wydro, P., The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *150* (1), 66-81.
17. Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; Ston, M.; Ferenczy, V.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Katora, P.; Seydlová, G., Direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography, and gas chromatography of *Bacillus subtilis* phospholipids. *Monatsh Chem* **2016**, *147* (8), 1385–1391.
18. Buescher, J. M.; Liebermeister, W.; Jules, M.; Uhr, M.; Muntel, et al., Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science* **2012**, *335* (6072), 1099-103.
19. Murzyn, K.; Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M., Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (2), 1091–1103.
20. Wydro, P.; Witkowska, K., The interactions between phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamines in model bacterial membranes: The effect of the acyl chain length and saturation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *72* (1), 32-39.
21. Zhao, W.; Róg, T.; Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I.; Karttunen, M., Role of phosphatidylglycerols in the stability of bacterial membranes. *Biochimie* **2008**, *90* (6), 930-938.
22. Romantsov, T.; Guan, Z.; Wood, J. M., Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimimica et Biophysica Acta* **2009**, *1788* (10), 2092-100.
23. 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* **2013**, *1828* (11), 2370–2378.
24. Bierhanzl, V. M.; Riesova, M.; Taraba, L.; Cabala, R.; Seydlova, G., Analysis of phosphate and phosphate containing headgroups enzymatically cleaved from phospholipids of *Bacillus subtilis* by capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (23), 7215-20.
25. Pulfer, M.; Murphy, R. C., Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Reviews* **2003**, *22* (5), 332-64.

26. Kima, J.; Hoppel, C. L., Comprehensive approach to the quantitative analysis of mitochondrial phospholipids by HPLC–MS. *Journal of Chromatography B* **2013**, *912*, 105–114.
27. Renata Takabayashi Sato, P. H. F. S., Adilson David da Silva, Marcone Augusto Leal de Oliveira, Fast GC–FID method for monitoring acidic and basic catalytic transesterification reactions in vegetable oils to methyl ester biodiesel preparation. *Quimica Nova* **2016**, *39* (3), 352-355.
28. Seppänen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R., Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *465* (1-2), 39-62.
29. Dennis, E. A., Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. *Journal of Lipid Research* **2015**, *56* (7), 1245-1247.
30. Maria, L. D.; Vind, J.; Oxenbøll, K. M.; Svendsen, A.; Patkar, S., Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *74* (2), 290–300.
31. Lyu, Y.; Ye, L.; Xu, J.; Yang, X.; Chen, W.; Yu, H., Recent research progress with phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biotechnology Letters* **2016**, *38* (1), 23–31.
32. Koek, M. M.; Muilwijk, B.; Werf, M. v. d.; Hankemeier, T., Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (4), 1272-1281.
33. Podolec, P.; Szabó, A. H.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Górová, R.; Višňovský, J.; Gnipová, A.; Horváth, A.; Bierhanzel, V.; Hložek, T.; Čabala, R., Direct silylation of *Trypanosoma brucei* metabolites in aqueous samples and their GC–MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B* **2014**, *967*, 134-138.
34. Schummer, C.; Delhomme, O.; Appenzeller, B. M. R.; Wennig, R.; Millet, M., Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* **2009**, *77* (4), 1473–1482.
35. Peter Quinto Tranchida, G. P., Paola Dugo, Luigi Mondello, Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30* (9), 1437–1461.
36. Begnaud, F.; Debonneville, C.; Probst, J.-P.; Chaintreau, A.; Morrison, P. D.; Adcock, J. L.; Marriott, P. J., Effects of variation in modulator temperature during cryogenic modulation in comprehensive twodimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science* **2009**, *32* (18), 3144–3151.

37. Pursch, M.; Eckerle, P.; Biel, J.; Streck, R.; Cortes, H.; Sunc, K.; Winniford, B., Comprehensive two-dimensional gas chromatography using liquid nitrogen modulation: set-up and applications. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1019* (1-2), 43–51.
38. Semard, C. G., J. Bourdet, N. Bord, V. Livadaris, Comparative study of differential flow and cryogenic modulators comprehensive two-dimensional gas chromatography systems for the detailed analysis of light cycle oil. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (21), 3146–3152.
39. Murray, J. A., Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1261*, 58-68.
40. Leonid M. Blumberg, F. D., Matthew S. Klee, Pat Sandra, Comparison of one-dimensional and comprehensive two-dimensional separations by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1188* (1), 2-16.
41. Ahmed Mostafa, M. E., Tadeusz Górecki, Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1255*, 35-55.
42. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G., Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review. *Mass Spectrometry Reviews* **2008**, *27* (2), 101-24.
43. Silva, R. S. F.; Aguiar, H. G. M.; Rangel, M. D.; Azevedo, D. A.; Neto, F. R. A., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time of flight mass spectrometry applied to biomarker analysis of oils from Colombia. *Fuel* **2011**, *90* (8), 2694–2699.
44. Izadmanesh, Y.; Garreta-Lara, E.; Ghasemi, J. B.; Lacorte, S.; Matamoros, V.; Tauler, R., Chemometric analysis of comprehensive two dimensional gas chromatography-mass spectrometry metabolomics data. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1488*, 113-125.
45. Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; Ston, M.; Kubinec, R.; Szabó, A. H.; Podolec, P., Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate. *Journal of separation science* **2015**, *38* (1), 67-72.