

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Ing. Václav Bierhanzl

Analýza biologicky aktivních látek moderními separačními metodami
Analysis of biologically active substances by modern separation methods

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 13.4.2018

Podpis

Abstrakt

Disertační práce se věnuje stanovení fosfolipidů a jejich polárních částí metodami plynové a kapalinové chromatografie, kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. Fosfolipidy jsou nejvýznamnějšími polárními lipidy a dělí se do tříd podle fosforylované funkční skupiny. Fosfolipidy jsou zastoupeny v buněčných membránách, a právě zastoupení fosfolipidových tříd či jeho změny slouží ke sledování vlivu vnějších podmínek na buňky.

V současnosti se pro analýzu zastoupení fosfolipidových tříd používá TLC, jež pro svou časovou náročnost nevyhovuje potřebám pro výzkum např. mikrobů. Předkládaný soubor článků se zabývá klasifikací fosfolipidů, které produkuje kmen bakterie *Bacillus subtilis*, vybraný jako producent surfaktinu, potenciálního antibiotika s detergentními účinky. Publikované metody tak mohou být využity při výzkumu optimálních podmínek kultivace. Jelikož mohou mastné kyseliny fosfolipidových molekul ovlivňovat stanovení poměru fosfolipidových tříd, bylo nutno vyvinout metody pro stanovení odštěpených fosforylovaných částí (polárních hlavic). Byly vyvinuty metody kapilární elektroforézy a plynové chromatografie. Podmínky plynové chromatografie byly následně optimalizovány pro souběžné stanovení s mastnými kyselinami.

Další část práce se zabývá alternativním přístupem, představujícím přímý nástřik intaktních lipidů na hmotnostní spektrometr bez enzymatického štěpení a separace. Princip postupu je založen na tom, že signály odpovídající jednotlivým identifikovaným fosfolipidům lze sčítat do skupin, odpovídajících příslušným fosfolipidovým třídám. Výsledné poměry zastoupení mezi jednotlivými třídami byly porovnány s konvenčními postupy. Ze srovnání vyplývá, že tuto metodu lze použít především pro sledování změn v poměrném zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd v dlouhodobém trendu

Klíčová slova: Fosfolipidy, CE, HPLC, GC, MS

Abstract

The thesis is dedicated to the phospholipids and their polar headgroups analysis by gas chromatography, capillary electrophoresis and mass spectrometry. Phospholipids are the most important polar lipids and they are classified into phospholipid classes according to their phosphorylated groups. Phospholipids can be found in cell membranes and the changes in their ratio are monitored to research the impact of external conditions on cells.

Actually thin layer chromatography is still used for phospholipid class ratio analyses. It is not suitable for microbiological research due to its time demandingness. The presented compendium of papers engaged in phospholipid classification is targeted on *Bacillus subtilis* strain, which produces potential antibiotics with detergent effect – surfactin. Published methods can be used for research of optimal conditions for producing microbe cultivation. Because non-polar parts of the phospholipid molecule (fatty acids) can affect the analysis methods on spliced polar headgroups have to be designed. Capillary electrophoresis and gas chromatography methods were developed and the latter one was further optimized for simultaneous analysis with fatty acids.

Additional part deals with an alternative approach which consists in direct injection on mass spectrometer of intact phospholipids without enzymatic cleavage neither separation. Principle is based on fact that intensities corresponding with individual phospholipid fragments, which are identified to phospholipid class, can be summed to groups relevant to phospholipid classes. Calculated ratio was compared with traditional procedures. This shows that the method can be suitable for monitoring of changes in phospholipid composition in long-time trend.

Keywords: Phospholipids, CE, HPLC, GC, MS

Poděkování

Tato práce vznikla během mého doktorského studia na Katedře analytické chemie PřF UK mezi léty 2010-2016 jako kompendium vědeckých článků spolu s nepublikovanými výsledky týkajícími se vývoje metodiky stanovení poměrného zastoupení fosfolipidových tříd.

Zde připojuji poděkování svému školiteli doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr., RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. z Katedry Genetiky a Mikrobiologie, svým kolegům na fakultě, svým rodičům a v neposlední řadě spoluautorům následujících publikací, na nichž je má disertační práce založena:

Bierhanzl, V. M., Riesová, M., Taraba, L., Čabala, R., Seydlová, G.:

Analysis of phosphate containing headgroups and phosphate cleaved by regioselective enzyme from glycerolphospholipids of *Bacillus subtilis* by capillary electrophoresis.

Analytical and Bioanalytical Chemistry **407**:23, 7215-7220 (2015);

DOI:10.1007/s00216-015-8885-x; Impact Factor: 3.578

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Ston, M., Kubinec, R., Hengerics Szabó, A., Podolec P.:

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

Journal of Separation Science **38**:1, 67–72 (2015);

DOI: 10.1002/jssc.201400657; Impact Factor: 2.594

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Bursová, M., Ston, M., Seydlová, G.:

Simultaneous analysis of polar and nonpolar components of cell membranes phospholipids by GC-MS.

Chemical Papers **70**:10, 1309-1315 (2016);

DOI:10.1515/chempap-2016-0073; Impact Factor: 1.468

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Ston, M., Kotora, P., Ferenczy, V., Blaško, J., Kubinec, R., Seydlová, G.:

Comparison of direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography and gas chromatography in analysis of phospholipids.

Chemical Monthly **147**:1, 1385-1391 (2016);

DOI:10.1007/s00706-016-1734-6; Impact Factor: 1.222

Obsah	
Abstrakt.....	3
Seznam publikací.....	6
Obsah.....	7
Seznam zkratk a symbolů.....	8
1 Úvod	10
2 Teoretická část.....	12
2.1 Vlastnosti a struktura fosfolipidů.....	12
2.2 Význam fosfolipidů	14
2.3 Možnosti analýzy fosfolipidů	15
2.3.1 Kapilární elektroforeza.....	16
2.3.2 Plynová chromatografie	18
2.3.3 Kapalinová chromatografie	18
2.3.4 Hmotnostní spektrometrie.....	20
3 Výsledky a diskuse	22
3.1 Kapilární elektroforesa	22
3.2 Plynová chromatografie	25
3.3 Kapalinová chromatografie	30
3.4 Hmotnostní spektrometrie.....	31
4 Závěr.....	34
5 Použitá literatura	36

Seznam zkratek a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
HMDS	hexamethyldisilazan
CHES	<i>N</i> -cyklohexyl-2-aminoethansulfonová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray ionisation)
ELSD	detekce pomocí rozptylu světla a odpaření rozpouštědla (Electron Light Scattering Detector)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
MALDI	ionizace a desorpce laserem za přítomnosti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)
MALDI-TOF	MALDI s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (Micelar Electrokinnetic Chromatography)
MES	2-(<i>N</i> -morfolin)ethansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	kapalinová chromatografie na <i>normální</i> fázi
PL	fosfolipid(y)

TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
UPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
UV	ultrafialové (spektrum světla)
UV-VIS	ultrafialové a viditelné spektrum světla

1 Úvod

Tato disertační práce je součástí výzkumu zaměřeného na produkční vlastnosti bakterie *Bacillus subtilis*, jež je na PŘF UK kultivována za účelem produkce surfaktinu, lipopeptidu s detergenčními účinky s potenciálem široce účinného antibiotického léčiva [1].

Stanovení optimálních růstových a produkčních podmínek pro kultivaci mikrobů je komplikované [2], neboť pro hodnocení vhodnosti těchto podmínek je nutno vycházet z nepřímých životních projevů mikroorganismů. Jednou z charakteristických odpovědí bakterií na změny v životním prostředí jsou změny ve složení cytoplazmatické membrány [3]. Buněčné membrány ohraničují buňku i její jednotlivé orgány, zajišťují ochranu vnitřního prostoru před vnějšími vlivy, látkovou výměnu a buněčnou komunikaci, a proto jejich reakce na změny v okolním prostředí zahrnuje množství projevů, které nelze dost dobře sledovat jednotlivě.

Hlavní stavební látkou buněčných membrán jsou fosfolipidy. Z chemického hlediska se jedná o amfifilní látky, tvořené dvěma mastnými acylovými řetězci a polární hlavicí. Zatímco analýza mastných kyselin se dlouhodobě provádí pomocí GC-MS [4], instrumentální analýza polárních hlavic, která by se celosvětově prosadila, doposud chybí. Stále se používá časově náročný a nepřiliš selektivní způsob stanovení, který v sobě zahrnuje separaci na TLC [5], vyškrabání jednotlivých zón, jejich následná derivatizace a spektrofotometrické stanovení koncentrace vzniklého komplexu. Zdaleka největší nevýhodou tohoto přístupu je čas. K výsledku analýzy to od odebrání mikrobiologického vzorku trvá necelý týden, nehledě na nutnost plánovat analýzu na první dny pracovního týdne při jednosměnném provozu. Tyto a další nevýhody (náročnost na materiál, pracovní sílu) vedly k potřebě vývoje rychlé, instrumentální, spolehlivé, jednoduché a nenáročné metody pro potřeby

biologického pracoviště, kterou by mohl být stávající postup nahrazen. Jelikož se fosfolipidy podle své polární hlavice dělí do příslušných tříd, je pro biotechnologický výzkum nejdůležitější jejich vzájemný poměr, jehož znalost umožňuje mimo jiné sledování trendů a adaptace na prostředí. Proto je u vyvíjené metody kladen důraz na rozlišení, reprodukovatelnost a jednoduchost kvantifikace.

Cílem této práce je vyvinout metodu, která by co nejlépe vyhovovala požadavkům mikrobiologické laboratoře a následná validace vyvinuté metody, jež by umožnila převzetí metody případnými dalšími pracovišti. Dalším cílem je popis chování samostatných polárních hlavic jako skupiny analytů, které nebylo z tohoto úhlu pohledu podrobněji zkoumáno, který by napomohl budoucím změnám ve vyvinutých metodách v případě požadavků konkrétní laboratoře. Publikace uvedené v přílohách #1-4 se věnují těmto cílům s ohledem na složení membránových lipidů různých kulturních kmenů bakterie *Bacillus subtilis*. Analytické metody, jimiž se tyto publikace zabývají, představují různé přístupy k stanovení poměru jednotlivých fosfolipidových tříd.

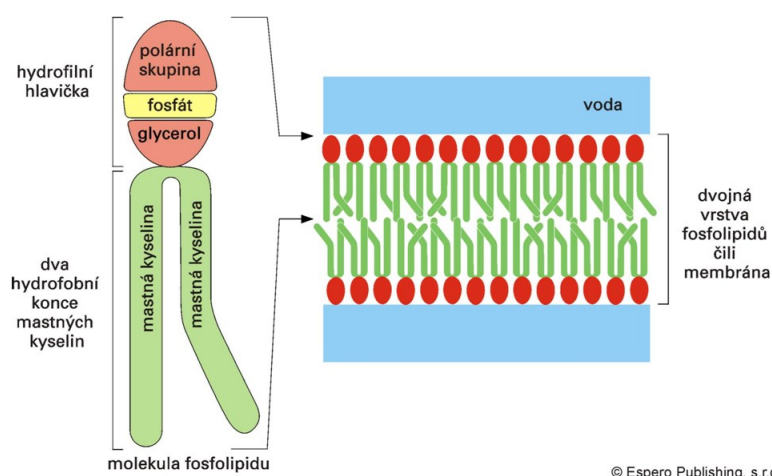
2 Teoretická část

2.1 Vlastnosti a struktura fosfolipidů

Fosfolipidy (PL) jsou souhrnnou skupinou polárních lipidů, jež obsahují ve své molekulové struktuře jeden či více atomů fosforu. Z chemického hlediska se jedná o estery L-glycerolu s kyselinou fosforečnou, případně jejím esterem a mastnými kyselinami. Mastná kyselina na prvním uhlíku je zpravidla nasycená, zatímco mastná kyselina na prostředním uhlíku bývá často nenasycená, nicméně výjimky existují. Kyselina fosforečná (fosfoester) je však vždy vázána na třetím uhlíku. Jelikož fosfolipid je na rozdíl od glycerolu látkou opticky aktivní, je možné pozice na glycerolovém řetězci ve fosfolipidech pro usnadnění orientace číslovat uhlíky *sn*-1 až *sn*-3. Fosfolipidy tvoří celkem různorodou skupinu chemických látek, která se dále dělí na jednotlivé fosfolipidové třídy podle fosfoesterů, navázaných na glycerolový skelet. V současné době se uvažuje necelá desítka fosfolipidových tříd, mezi nejznámější patří fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, kyselina fosfatidová a kardiolipin (difosfatidylglycerol) [6]. Mimo tyto základní třídy existují ještě lysofosfolipidy, případně molekuly, jež se nedají jednoznačně zařadit do výše zmíněných tříd (např. lysylfosfatidylglycerol).

Fosfolipidové třídy tedy zahrnují chemické látky se stejnou polární hlavicí, ale s různými mastnými kyselinami. Zastoupení mastných kyselin v molekule má významný vliv na fyzikální vlastnosti a právě podle fyzikálních vlastností byla historicky definována frakce polárních lipidů, ve které tvoří fosfolipidy hlavní podíl. Ačkoli se PL extrahují z biologických vzorků společně s lipidy a dalšími lipofilními látkami, jejich chování není čistě hydrofobní, nýbrž amfifilní. Ve vodném prostředí tvoří nepravé roztoky, které v závislosti na koncentraci PL mohou mít různou podobu. Při nižší koncentraci tvoří PL

ve vodě micely, útvary tvořené fosfolipidovými molekulami orientovanými polárními hlavicemi směrem k rozpouštědлу (tj. ven z micely) a mastnými řetězci k sobě navzájem dovnitř micely [7]. Podobné chování je pro polární lipidy typické, nicméně počet molekul v micelle a s tím související kritická micelární koncentrace se pro různé chemické látky mírně liší. Dalším útvarem tvořeným fosfolipidy je liposom. Tvoří jej řádově větší množství molekul než micelu, též jeho vnitřní uspořádání je jiné. Směrem k rozpouštědлу se tváří stejně jako micela, ale jeho vnitřní část není tvořena mastnými řetězci, nýbrž polárními hlavicemi jiných fosfolipidových molekul. Obojí fosfolipidy jsou k sobě orientovány mastnými řetězci, jež vytvářejí hydrofobní bariéru mezi vnitřkem liposomu, který může obsahovat nějakou polární látku, a okolním prostředím. Složení vnější a vnitřní části hranice smíšeného liposomu není identické, možnost překlápění fosfolipidových molekul mezi vnější a vnitřní částí samovolně neprobíhá a je spíš ojedinělé. V případě, že útvar podobný liposomu dosahuje takových rozměrů, že jeho povrch vykazuje vlastnosti planárního útvaru, se hovoří o lipidické dvojvrstvě [8]. Lipidickými dvojvrstvami jsou membrány buněk i jednotlivých organel, avšak tyto obsahují mimo lipidů také proteiny a mnoho dalších látek, sloužících mimo jiné k zabránění rozpadu dvojvrstvy na menší útvary (Obr. 1.).



Obr. 1. Náčrt obecné struktury fosfolipidu a fosfolipidové dvojvrstvy [9]

2.2 Význam fosfolipidů

Fosfolipidy jsou součástí všech živých organismů, vyskytují se v buňkách, kde tvoří nejdůležitější stavební prvek cytoplazmatické membrány i membrán jednotlivých organel. Fosfolipidové složení výrazně ovlivňuje fyzikální vlastnosti cytoplazmatické membrány, jako jsou její fluidita, permeabilita, tlaková a teplotní stabilita [10]. Tyto vlastnosti jsou určující pro schopnost buňky existovat v jejím přirozeném či aktuálním prostředí, a tudíž reakce buňky na změny prostředí jsou obvykle vyjádřeny právě změnami ve složení její cytoplazmatické membrány. Pomocí těchto změn lze nepřímo sledovat vliv vnějšího prostředí na růstové či produkční vlastnosti buněk, čehož se využívá v mikrobiologickém a biotechnologickém výzkumu [3].

Mimo buněčných membrán se fosfolipidy vyskytují také v surových potravinářských olejích a tucích. I tyto fosfolipidy jsou membránového původu a vzhledem ke svým vlastnostem se extrahují společně s triacylglyceroly. Z hlediska potravinářského průmyslu se jedná o nežádoucí látky, které je nutno odstraňovat. Jejich amfifilní vlastnosti zvyšují aktivitu vody v olejích, čímž snižují odolnost produktu vůči mikrobiální degradaci. Díky těmto vlastnostem je naopak možno použít fosfolipidy jako emulgátory [11]. Jelikož je celosvětová poptávka po potravinářských emulgátorech vysoká a fosfolipidy tvoří pouze odpadní surovinu, jejich produkce není dostačující, a proto je nutno látky s podobnými vlastnostmi vyrábět synteticky [12], případně modifikací přírodních lipidů. Paradoxně jsou fosfolipidy nutričně celkem hodnotnou složkou potravy a i přes schopnost člověka syntetizovat fosfolipidy pro tvorbu buněk, našly v podobě lecitinu uplatnění jako potravní doplňky.

2.3 Možnosti analýzy fosfolipidů

Tradiční metodou, jež se v mikrobiologickém výzkumu stále používá, je tenkovrstvá chromatografie s následnou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí. V tomto uspořádání se fosfolipidy separují podle svých polárních hlavíc na tenké vrstvě s polární stacionární fází. Rozdělené zóny frakcí analytů je nutno vyškrabat z tenké destičky a stanovit v nich obsah fosforu. Ten se provádí pomocí reakce s molybdenanem amonným $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$, následované filtrací a změření absorbance přímo úměrné koncentraci vzniklé fosfomolybdenové modři [5]. Tento analytický postup má řadu nevýhod, jež vyplývají především z použití sledu jednotlivých operací se vzorkem, které nelze automatizovat na rozdíl od instrumentálních metod. Nutnost vyškrabávání skvrn se negativně projevuje v případě jejich částečného překryvu, kdy nejde jednoduše rozdělit skvrny do dvou frakcí, na rozdíl od peaků v chromatogramu. Nelze přehlédnout ani potřebu připravovat tenké vrstvy ručně, jelikož ty komerčně dodávané ne vždy vyhovují požadavkům na reprodukovatelnost výsledků. Největší nevýhodou je ale časová a personální náročnost. Vyvíjení TLC, schnutí destičky a derivatizace trvá zpravidla několik dní. Pro procesní analýzy a průběžné monitorování výzkumu je tedy tradiční postup vcelku nevhodný, zejména proto, že neumožňuje analýzu *on-line*.

Instrumentálních metod byla k analýzám fosfolipidů použita celá řada. A to jak chromatografických [13], elektromigračních [14], tak i spektrometrických bez předchozí separace (NMR, MS) [15,16]. Jelikož biologické membrány, především u bakterií, často neobsahují všechny fosfolipidové třídy, různá pracoviště používají instrumentální metody optimalizované dle specifikace konkrétních mikrobů. Z těchto důvodů, a také pro chemickou různorodost, se dosud neprosadila univerzální instrumentální metoda, která by byla přijímána napříč výzkumnými laboratořemi, a tudíž umožnila snadné porovnávání

výsledků mezi sebou. Protože mnoho běžně zkoumaných mikrobů tvoří pouze některé polární hlavice, pro potřeby výzkumných laboratoří postačují metody umožňující stanovit pouze k nim náležící fosfolipidové třídy. Pro potřeby sledování některých biotechnologických procesů často dostačuje sledovat pouze poměr mezi nejhojněji zastoupenými fosfolipidovými třídami. Ještě jednodušší variantou předchozího přístupu je stanovení podílu jedné fosfolipidové třídy ve frakci fosfolipidů či polárních lipidů. Potřeba univerzální a robustní metody, jíž by bylo lze stanovit poměrné zastoupení fosfolipidových tříd, je vnímána s různou intenzitou. Do budoucna by tato metoda mohla být perspektivní nástroj pro identifikaci mikrobiálních rodů a druhů, podobně jako např. Gramovo barvení, protože tvorba určitých tříd či její potlačení je pro některé rody a druhy charakteristická.

V současné době je nepříliš rozšířeným přístupem analýza samotných polárních hlavic [17]. Analýza fosfolipidových tříd v dnešní době spočívá téměř výhradně ve stanovování intaktních fosfolipidů s tím, že vliv acylových řetězců v molekule se zanedbává. Tento předpoklad může v konkrétních aplikacích obstát, ale při použití některých technik se vliv délky a tvaru acylových řetězců projeví a znemožní spolehlivou identifikaci. Analýza polárních hlavic, odštěpených z glycerolového řetězce by tomuto vlivu zamezila, navíc lze předpokládat budoucí vývoj metod, jež by umožnily souběžné stanovení polárních hlavic i mastných acylů během jedné analýzy.

2.3.1 Kapilární elektroforéza

Protože jsou fosfolipidy ve svém nativním stavu amfifilními látkami, je pro jejich analýzu vhodnější kapilární elektroforéza v nevodném prostředí [18], případně micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC) [19] spíše než klasická kapilární zónová elektroforéza. Fosfolipidy téměř neabsorbují

v UV ani ve viditelné oblasti záření, tudíž se pro jejich spektrofotometrickou detekci používalo nepřímé stanovení [20]. Dalšími metodami detekce byla fluorescence [21] a hmotnostní spektrometrie [22], jež je výhodná pro spojení s nevodnou elektroforézou.

Pro analýzu intaktních fosfolipidů představuje největší problém vliv acylových řetězců na separaci [23], který znemožňuje stanovit elektroforetické mobility pro příslušné fosfolipidové třídy. Je nápadné, že práce, zabývající se elektroforézou fosfolipidů v nevodném prostředí, experimentují s fosfolipidy s definovaným acylovým složením [24], případně porovnávají fosfolipidové třídy s identickými acyly [25]. Tímto problémem analýza pomocí MEKC, dle publikovaných prací, nejspíš tolik netrpí [26,27], minimálně se o těchto problémech práce o MEKC separacích nezmiňují [28,29]. Nicméně velkou nevýhodou v tomto uspořádání je krajně obtížné použití spektrofotometrické či vodivostní detekce.

Analýza samotných polárních hlavic pomocí kapilární zónové elektroforezy, případně MEKC [30] není příliš častá. Většina prací na toto téma se zabývá stanovením pouze jednoho z fosfoesterů. Nejběžněji se stanovuje fosfoserin, případně fosfoethanolamin [31] a to v rámci analýzy aminokyselin. Mimo toho byla kapilární elektroforéza použita k separaci různých isomerů fosfoinositolu [32], nicméně práce zabývající se dalšími fosfoestery, případně touto skupinou jako celkem dosud chyběly. Jelikož ani fosfoestery příliš neabsorbují v ultrafialové ani ve viditelné oblasti, byla k detekci používána fluorescence [33], a to jak pomocnými derivatizačními činidly [34], jež jsou sice vhodná pro aminokyseliny, avšak nepoužitelná pro další fosfoestery, tak laserem indukovaná fluorescence [35,36] a nepřímé spektrofotometrické stanovení [37].

2.3.2 Plynová chromatografie

Plynovou chromatografií se standardně stanovuje acylové složení PL. Intaktní fosfolipidy se vzhledem k své molekulové hmotnosti a malé těkavosti pomocí GC běžně nestanovují. Jelikož se PL mezi sebou liší v acylovém složení, tak by ani nebylo dost dobře možné stanovovat pomocí GC fosfolipidové třídy, protože by molekuly PL s různými acyly eluovaly v různých časech. Stanovení fosfoesterů, polárních hlavic odštěpených od fosfolipidového řetězce, vyžaduje pro GC analýzu vhodná derivatizační činidla [38,39], jež se naváží na hydroxylové a aminové skupiny, znemožní ionizaci molekul, vytváření vodíkových můstků a zvýší těkavost analytů.

V praxi se, podobně jako v analýze kapilární elektroforézou (kap. 2.3.1 Kapilární elektroforéza), stanovovaly fosfoestery obsahující dusík, a sice jak v rámci souboru aminokyselin [40,41], tak samostatně [42]. Tyto práce, věnující se stanovení aminokyselin pomocí GC pochází z doby, kdy se MS detekce postupně rozšiřovala, a tak je možné dohledat MS spektra analytů [43], jež se nenachází v komerčních databázích. Zároveň byly vyzkoušeny různé postupy derivatizace, a to alkylace [44] a silylace [45]. Pro derivatizaci celého souboru fosfoesterů, jejichž reaktivita se silylačními činidly je různá, bylo nutno použít silylaci dvoustupňovou, jež využívá sledu slabšího a silnějšího silylačního činidla [46].

2.3.3 Kapalinová chromatografie

Fosfolipidy jako amfifilní tedy i polární látky lze analyzovat pomocí HPLC. Publikované práce se až na výjimky [47, 48] týkají pouze intaktních fosfolipidů, případně lipidů obecně. Vzhledem k absenci chromoforních i elektroaktivních skupin v PL, není možné použít spektrofotometrický detektor. Tato skutečnost klade velké nároky na instrumentální vybavenost pracoviště, primárně se

pracuje s hmotnostně spektrometrickým detektorem [49], méně často s ESLD detektorem [50, 51]. Mimo těchto náročných detektorů je možné PL vhodně derivatizovat a použít fluorescenční detektor [47]. Co se týče uspořádání vlastního HPLC, dnes se preferuje především HILIC mód, případně klasická NP, reversní fáze není pro fosfolipidy příliš vhodná, acylové složení jednotlivých PL by mohlo ovlivnit separaci. Jelikož jsou PL polární látky a mají poměrně vysoké retenční časy [52], preferuje se téměř výhradně gradientová eluce i při separaci v UPLC [53]. Volba mobilní fáze je určena nejen módem (HILIC vs. NP), ale také použitým extrakčním činidlem. Základem je buďto methanol nebo acetonitril, tedy celkem polární rozpouštědlo, v rámci gradientu se polarita ještě zvyšuje podílem vody. Pufry ani kyseliny či zásady se zpravidla nepoužívají.

Fosfolipidy se v reálných vzorcích analyzují buďto přímo, a v tom případě je nutno zohlednit vliv matrice (neutrálních lipidů aj.) při volbě mobilní fáze, anebo je možné PL prekoncentrovat pomocí extrakce na pevné fázi [54].

Nejčastěji používané MS detektory používají jako ionizační techniku elektrosprej, čímž je umožněno sledovat i případné acylové složení jednotlivých PL [55]. Spolu s databázemi naměřených látek je to vsuktu účinný nástroj, ale jeho nevýhoda spočívá v obtížné dostupnosti pro pracoviště, které se na práci s HPLC-MS vyloženě nespécializuje, a v komplikovanosti naměřených spekter, kdy je cílem měření pouze zastoupení jednotlivých tříd, nikoliv stanovení jednotlivých molekul. Metoda, která by byla vhodná pro takto jednoduchá, dala by se říci až screeningová stanovení, např. využívající jednoduché derivatizace pro detekci klasickým spektrofotometrickým detektorem, chybí. Stejně tak chybí metody, které by se zabývaly mimo intaktních lipidů hydrolyzovanými polárními hlavami PL jako skupinou analytů, aby bylo možné takto postupovat skutečně univerzálně bez ohledu na jejich acylové složení.

2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se pro analýzu fosfolipidů nepoužívá pouze jako detekční systém u instrumentální separace, nýbrž i v přímém nástřiku bez separace [56], případně pro *off-line* identifikaci fosfolipidů po TLC analýze [57,58]. V těchto případech se používají výhradně měkké ionizační techniky, aby nedocházelo k destrukci molekulového iontu. Zdaleka nejpoužívanější ionizační technikou je ionizace a desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Tato technika se používá většinou spolu s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF). Hlavní předností tohoto uspořádání je velké rozlišení, jež umožňuje velmi přesné stanovení molekulové hmotnosti molekulového iontu, již se využívá pro identifikaci především vysokomolekulárních látek [59].

V mikrobiologii se pomocí MALDI-TOF klasifikují bakteriální proteiny, čehož se používá k potvrzení rodové a druhové příslušnosti mikrobů [60]. Pro zvýšení správnosti identifikace lze použít MALDI-TOF také k analýzám mikrobiálních lipidů. Schopnost tvořit určité fosfolipidové třídy a mastné kyseliny je geneticky daná, a tudíž jejich přítomnost může být jedním z určujících faktorů druhové příslušnosti bakterií. Nicméně molekulární hmotnost (fosfo)lipidů je řádově nižší než proteinů, a proto jsou matrice používané pro MALDI analýzu proteinů pro analýzu lipidů poněkud méně vhodné. Pro analýzu takto nízkomolekulárních látek byla vyvinuta vysoce bazická matrice tzv. protonová houba [61], 1,8-bis(dimethylamino)naftalen.

Klasifikace lipidů (pomocí MALDI) našla uplatnění i v dalších biologických oborech. Patří mezi ně identifikace pylových zrn [62] a samozřejmě olejnin a olejů [63]. I zde se samozřejmě jako v případě mikrobů jedná o jednu z mnoha analýz sloužících k zařazení biologického materiálu pod správný rod a druh [64].

Největší nevýhodou MALDI-TOF je obtížná kvantifikace, jež prakticky vylučuje stanovení poměru jednotlivých fosfolipidů. Dalším, specifickým problémem, který MALDI sdílí obecně s metodami přímého nástřiku MS je analýza jednotlivých chemických látek, jež by vyžadovala více či méně složité výpočty pro určení poměru jednotlivých fosfolipidových tříd.

3 Výsledky a diskuse

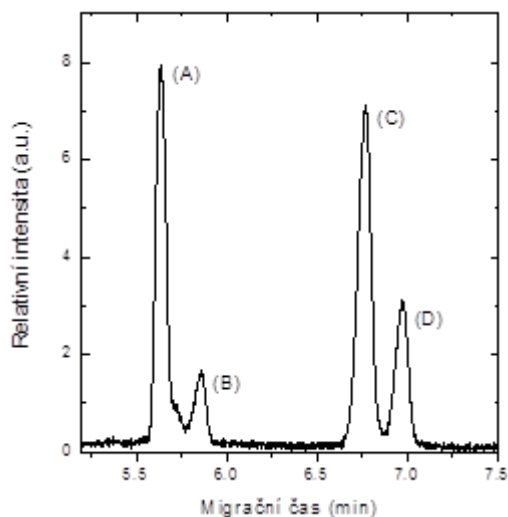
3.1 Kapilární elektroforéza

Fosforylované hlavice polárních lipidů obsahují mimo organické části také disociovatelné hydroxylové skupiny, a tudíž se ve všech případech jedná o anionty. Po odštěpení z glycerolového skeletu mohou mít jednotlivé polární hlavice, v závislosti na pH, celkový (efektivní) náboj mezi 1+ a 3-. Tyto skutečnosti umožňují separaci jednotlivých fosfolipidů v elektrickém poli pomocí kapilární zónové elektroforézy.

Intaktní fosfolipidy jsou amfifilní látky, mimo fosforylované hlavice obsahují ještě dva mastné acyly, a proto je jejich rozpustnost v polárních rozpouštědlech velmi omezená. Navíc jsou fosforylované hlavice tvořeny chemicky nesusoudnými deriváty kyseliny fosforečné, čímž se volba rozpouštědla a následně separačního elektrolytu ještě zužuje. Z těchto důvodů se fosfolipidy separují pomocí elektroforézy v nevodném prostředí. Separační elektrolyt (acetonitril:propan-2-ol, 3:2 *v:v*; 60 mmol/l octan amonný, 0,3 % kyselina octová) byl zvolen dle dříve publikované literatury [28]. Směsi organických rozpouštědel, jež se běžně používají k extrakci fosfolipidů, nejsou pro přípravu nevodného separačního elektrolytu vhodná. Folchovo činidlo (směs chloroform-methanol) se neslučuje s UV detekcí; zatímco směs hexan-propan-2-ol zase není vhodná pro rozpouštění iontových látek (kyselin, solí).

Přestože byly úspěšně separovány standardy fosfolipidů, které odpovídaly jednotlivým fosfolipidovým třídám (podmínky viz Obr. 2.), pro měření většiny reálných vzorků nelze toto uspořádání použít. Standardy fosfolipidů se většinou dodávají s definovaným složením mastných kyselin, a tudíž migrační časy odpovídají pouze fosfolipidům s tímto složením mastných kyselin. Naproti tomu fosfolipidy z biologických vzorků obsahují řádově desítky druhů mastných kyselin, které se navíc mohou vyskytovat nerovnoměrně zastoupené

napříč fosfolipidovými třídami. Z výsledků (Obr. 2.) vyplývá, že délka hydrofobního řetězce výrazně ovlivňuje elektroforetickou mobilitu. Proto není možné porovnávat migrační časy fosfolipidů stejné třídy, jež se v acylovém složení liší, ani není možné zdárně separovat směsi intaktních fosfolipidů, které obsahují různé mastné řetězce.

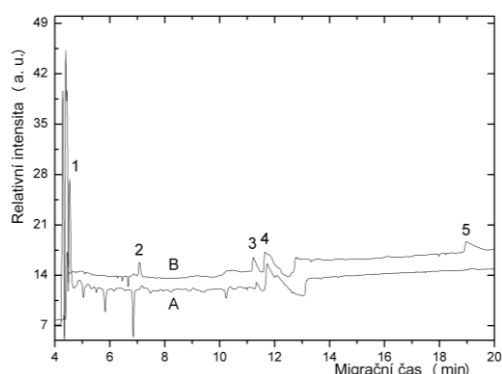


Obr. 2 Elektroferogram membránových lipidů (A; B) s přidavkem standardů fosfatidylglycerolu (C) a fosfatidylethanolaminu (D). Separační elektrolyt: acetonitril:propan-2-ol, 3:2 (v:v); 0,3 % kyselina octová; 60 mmol.l^{-1} octan amonný, spektrofotometrická detekce při 205 nm.

Právě nemožnost určit elektroforetickou mobilitu pro jednotlivé fosfolipidové třídy (nezávisle na acylovém složení) vedla k analýze samotných polárních hlavic, tedy fosfoesterů. Polární hlavice se získají z intaktních fosfolipidů štěpením fosfolipasou C, regioselektivním enzymem, který hydrolyzuje vazbu mezi glycerolovým skeletem a fosfátem (polární hlavici). Na rozdíl od separace intaktních lipidů se v případě separace polárních hlavic použily elektrolyty vodné, a sice v intervalu pH 4 až 11,5. Protože fosfát je jedním z analytů (odštěpuje se z kyseliny fosfatidové), nebylo možné používat fosfátové pufrы, nicméně žádná další omezení pro výběr elektrolytů nejsou známa. V průběhu experimentů se ukázalo jako nutné používat elektrolyty s konstantní iontovou silou, aby nedocházelo k posuvům migračních časů. Proto

je nezbytné používat pufrы s definovanou kyselou i zásaditou složkou a pH dále neupravovat.

Pro volbu separačního elektrolytu se přihlíželo k dostatečnému rozlišení mezi jednotlivými analyty. Ukázalo se, že pro rozlišení je klíčové, aby byly analyty co nejvíce deprotonované, a tedy aby se jejich mobility co možná nejvíce lišily. Kyselé elektrolyty formiát a acetát (pH < 4) se ukázaly jako nevhodné pro separaci, neboť nebyly schopné zajistit ani reprodukovatelný elektroosmotický tok. Citrátový pufr (pH 6), nejspíš pro pH blízké neutrálnímu, zase fosforylované hlavice téměř nerozpouští. V zásaditém pH naopak byly separace mnohem účinnější. Mimo pH 8 (MES) a pH 9 (tetraboritan disodný), se jako optimální ukázalo pH 10 (CHES+Li⁺). Použitím tohoto elektrolytu se dvěma definovanými složkami se dosáhlo dostatečného rozlišení analytů (přes 1,5) i uspokojivé opakovatelnosti měření. Posledním úskalím této separace je nesymetrický tvar peaků (Obr. 3), jež se navíc zhoršuje s migračním časem. Nicméně rozdílnost mobilit mezi analyty, respektive rozdíl mezi mobilitou nejpomalejšího analytu a aniontu tvořícího separační elektrolyt je příliš vysoká, a tudíž nejde tento nedostatek dost dobře odstranit. Další zvýšení pH (až na 11,5), čímž by se dosáhlo úplné deprotonizace analytů, postrádá smysl, protože by se rozdíly mezi elektroforetickými mobilitami naopak snižovaly, a to by bylo ke škodě separace.



Obr. 3 Elektroferogram hydrolyzátu lyzátu bakteriální membrány (A) a ekvimolární směsi standardů fosfoesterů (B); elektroosmotický tok (1), fosfoethanolamin (2), fosfoserin (3), fosfoglycerol (4), fosfát (5); UV detekce při 205 nm

Separační elektrolyt CHES-Li (pH 10) byl tedy optimalizován [65], následně validován a použit pro analýzu vzorku membránových lipidů bakterie *Bacillus subtilis* (Obr. 3). Všechny fosforylované hlavice, odpovídající fosfolipidovým třídám, byly ve vzorku určeny. Poměrné zastoupení fosfolipidových tříd zhruba odpovídá poměru příslušných intaktních fosfolipidů dříve měřených pomocí TLC [66]. Pouze koncentrace fosfoethanolaminu vyšla nižší než bylo očekáváno; fosfatidylethanolamin je druhým nejvíce zastoupeným fosfolipidem ve vzorku. Takto nízká naměřená koncentrace může být způsobena rozkladem fosfoethanolaminu. Jelikož byly oba vzorky izolovány stejným způsobem, je nepravděpodobné, že by došlo ke ztrátě během tohoto procesu. Případný rozklad fosfoethanolaminu během enzymového štěpení nelze potvrdit, mimo jiné i proto, že dodaná fosfolipasa C má definovanou pouze katalytickou aktivitu, ale ne už čistotu či (regio)selektivitu.

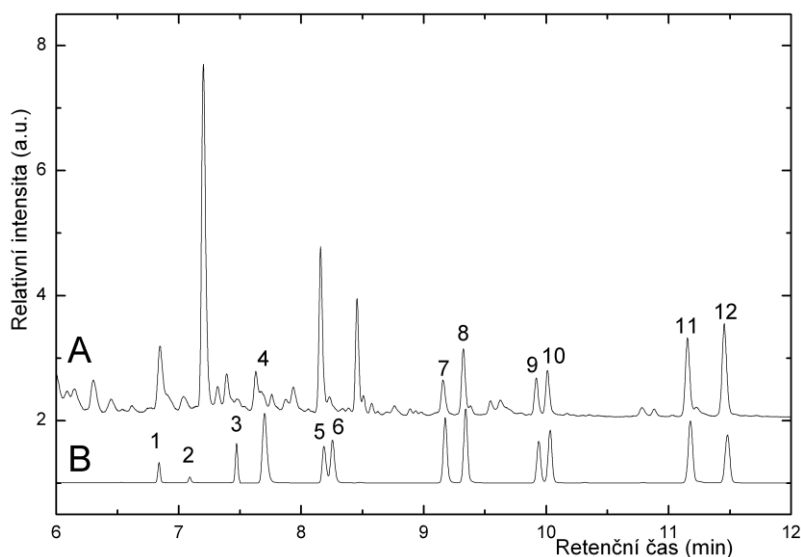
Pro stanovení poměru jednotlivých fosfolipidových tříd pomocí kapilární elektroforézy je za současné situace nejdůležitějším krokem odštěpení fosforylovaných hlavic z glycerolového skeletu, jež musí probíhat regioselektivně, tedy aby nedošlo k destrukci samotných polárních hlavic. Klíčovým faktorem je tedy použití enzymaticky čisté, regioselektivní fosfolipasy C s dostatečnou enzymovou aktivitou. Takto enzymaticky štěpené vzorky již není třeba dále derivatizovat či jinak upravovat pro analýzu.

3.2 Plynová chromatografie

Fosforylované hlavice lze pomocí plynové chromatografie vzhledem k jejich iontovému charakteru stanovit pouze ve formě derivátů. Jako použitá derivatizační metoda byla zvolena trimethylsilylace, vycházející z postupu pro silylaci sacharidů [67], jež byla následně optimalizována.

Jelikož fosforylované hlavice obsahují funkční skupiny s různou reaktivitou, bylo nutné použít dvoustupňovou silylaci. Nejprve se použije slabší silylační činidlo (HMDS) pro silylaci reaktivnějších (zejm. hydroxylových) skupin, tento krok se provádí při nižší teplotě a v delším časovém úseku a následně se použije reaktivnější činidlo (BSTFA) pro silylaci především aminových skupin, které s HMDS nereagují. Použití pouze silnějšího činidla není vhodné, neboť reakce by probíhala příliš bouřlivě, dochází ke srážení produktu a tím k obtížně reprodukovatelným výsledkům.

Pomocí chromatografického programu EzGC 2.2 (Restek), byla optimalizována vlastní separace trimethylsilylderivátů, aby se zkrátila separační doba při zachování dostatečného rozlišení 1,5. Do optimalizace byly dále zahrnuty retenční časy trimethylsilylderivátů mastných kyselin, jež se pomocí GC tradičně stanovují, aby bylo možné analyzovat mastné kyseliny spolu s polárními hlavici během jedné analýzy, čímž by se výrazně zjednodušilo studium fosfolipidů a uspořil čas. Deriváty všech polárních hlavice eluují před deriváty mastných kyselin vyskytujících se v membránových lipidech sledovaného bakteriálního kmene *Bacillus subtilis*, a proto je možné použít takto optimalizovanou metodu také pro analýzu (parametry viz Obr. 4) trimethylsilylovaných polárních hlavice.



Obr. 4 SIM chromatogramy trimethylsilylovaných polárních hlavic a mastných kyselin derivatizovaných fosfolipidů z membrány bakterie (A) a směsi standardů (B): fosfoglycerol (1), fosfoethanolamin (2), fosfoserin (3), myristát (4), 13-methylmyristát (5), 12-methylmyristát (6), palmitoleát (7), palmitát (8), 15-methylpalmitát (9), 14-methylpalmitát (10), Oleát (11), Stearát (12); Teplotní program: počáteční teplota 150 °C (1 min), 14 °C.min⁻¹ do 250 °C; MS detekce při m/z 55, 73, 75, 117, 129, 174, 188, 299, 356, 357, EI 70 eV

Optimalizace derivatizačního postupu byla provedena pomocí statistického programu MINITAB 16, a to ve dvou krocích. V první fázi byly zjištěny derivatizační parametry, které mají statisticky významný vliv na velikost odezev analytů. K tomuto jednoduchému *screeningu* se použilo schema o 16ti experimentech, kde byly určeny jednotlivé parametry derivatizace počítačovým programem. Pro vyhodnocení výsledků se přihlíželo k součtu odezev fosfoglycerolu, fosfoethanolaminu a fosfoserinu, nejkritičtějších analytů s řádově menšími relativními odezvami než derivatizovaný fosfát a mastné kyseliny. Alternativně by bylo možné přihlížet pouze k velikosti odezvy pouze jednoho analytu, nicméně v případě derivatizovaných fosfoesterů by tento postup nebyl výhodný, protože význam žádného z těchto analytů není o tolik menší, aby jeho upozadění při optimalizaci dávalo smysl.

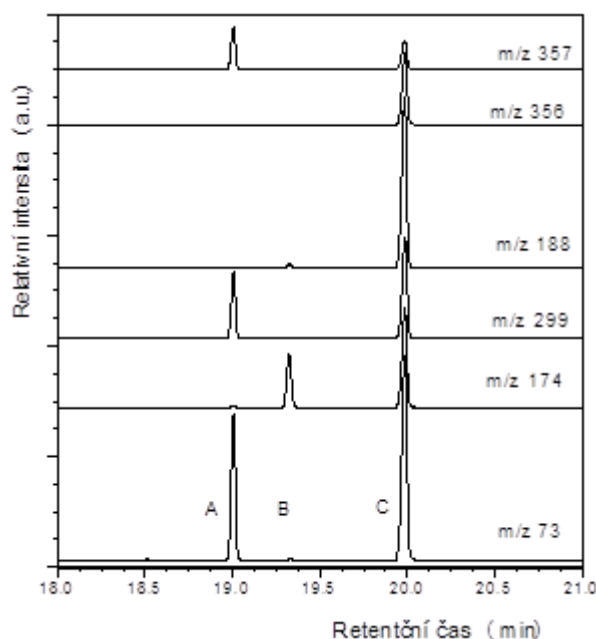
V dalším kroku byly statisticky zjišťovány optimální hodnoty derivatizačních parametrů pomocí *modelování*. Toto statistické schema zahrnuje dalších 14

experimentů. Pro analýzu reálného vzorku byly nakonec zvoleny parametry optimalizované pro trojici fosfoesterů (viz Tab. 1).

Tab. 1 Parametry silylace

Parametr	Hodnota
Poměr HMDS/ACN	1:1
Objem směsi HMDS/ACN (μl)	200
Objem kyseliny trifluoroctové (μl)	2,5
Teplota prvního stupně derivatizace ($^{\circ}\text{C}$)	100
Doba prvního stupně derivatizace (min)	60
Objem BSTFA (μl)	40
Teplota druhého stupně derivatizace ($^{\circ}\text{C}$)	100
Doba druhého stupně derivatizace (min)	15

Identifikace silylovaných analytů byla provedena srovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů standardů s knihovnou spekter NIST 2011 a s literaturou [43]. Takto získané retenční časy byly následně použity k výpočtu retenčních indexů. Pro analýzu v SIM modu byly pro každý analyt zvoleny charakteristické m/z fragmenty, které slouží i jako doplňující kvalifikační parametr spolu s retenčními indexy (Obr. 5). Stejně tak byly vybrány charakteristické m/z fragmenty pro silylované mastné kyseliny, především pro typické složky membrány bakterie *Bacillus subtilis* - mastné kyseliny s větveným řetězcem či lichým počtem uhlíků [68].



Obr. 5 Chromatogram trimethylsilylovaných polárních hlavíc: fosfoglycerolu (A), fosfoethanolaminu (B) a fosfoferinu (C) s příslušnými intenzitami pro vybrané m/z fragmenty. Měřeno na koloně DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); 2,5 μ L objem nástříku vzorku; teplota nástříku 250 $^{\circ}$ C, split poměr 1:250, teplotní program: 60 $^{\circ}$ C, 2 min, následně 9 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$ do 250 $^{\circ}$ C, posléze 5 min.

Pomocí GC-MS lze analyzovat nižší koncentrace analytů než v případě kapilární elektroforézy (viz kapitola 3.1 Kapilární elektroforéza). Navíc derivatizace, především reakce s BSTFA, ještě více zdůrazňuje potřebu dostatečně aktivního a regiosektivního enzymu, aby nedošlo k degradaci některého z analytů. Ve výše zmíněné kapitole (3.1 Kapilární elektroforéza) je diskutována možnost rozkladu jednoho z analytů během odštepění polární hlavice od glycerolového skeletu vinou nedostatečně čistého – regiosektivního enzymu. V případě, že by použitý enzym skutečně nebyl dostatečně regiosektivní, došlo by pravděpodobně k ovlivnění GC-MS analýzy. Tento jev je umocněn derivatizačním krokem.

Hlavní výhodou GC-MS metodiky zůstává možnost souběžné analýzy složení mastných kyselin i polárních hlavíc. Další výhodou představuje možnost porovnání hmotnostních spekter s databázemi, kterou lze využít i pro identifikaci mastných kyselin, k nimž nejsou k dispozici standardy. Ovšem

využití těchto možností vyžaduje vyšší pořizovací i provozní náklady na instrumentaci a programové vybavení.

3.3 Kapalinová chromatografie

I když se fosfolipidy dodnes analyzují pomocí TLC, převedení analogických podmínek [68] do uspořádání HPLC se příliš neosvědčilo. Hlavní problém představuje různá rozpustnost fosfolipidů, čímž je velmi omezena volba mobilní fáze. Dalším problémem je nízká absorbance v UV-VIS oblasti a s tím související vysoký detekční limit fosfolipidů (>0,3 mg/ml), který umožňuje stanovit pouze 1-2 majoritní složky.

Oba tyto problémy HPLC-UV by zdánlivě mohlo vyřešit spojení LC-MS (více v následující kapitole 3.4), nicméně toto uspořádání (použita methanolická mobilní fáze na bázi Folchova činidla [69]) k snížení meze detekce nevedlo. Použití kvadrupólového MS se pro identifikaci fosfolipidových tříd z důvodu nízkého rozlišení příliš nehodí, protože proměnlivé zastoupení mastných kyselin ve PL vede k rozdílným molekulovým hmotnostem v rámci jedné třídy. Nelze tedy přesně určit specifickou m/z pro příslušnou fosfolipidovou třídu, neboť se jedná o směs fosfolipidů, lišících se složením mastných kyselin, a tedy i molekulovou hmotností. Řešením by mohlo být měření v intervalu cca 500-800 m/z , ovšem pro potřeby analýzy bakteriálního lyofilizátu citlivost tohoto postupu stanovení nedostačuje.

Příčiny nevhodnosti použití HPLC pro analýzu fosfolipidů jsou nízká citlivost detekce, a to jak v UV oblasti, tak při měření jednotlivých m/z iontů v LC-MS spojení. Analogicky k výsledkům nevodné kapilární elektroforézy (3.1 Kapilární elektroforéza) lze předpokládat, že by vliv mastných kyselin ve fosfolipidových molekulách mohl mít nějaký vliv na separaci. V tomto případě by bylo možné porovnávat pouze retenční časy fosfolipidů se stejným složením

mastných kyselin. V případě reálných vzorků by bylo nutné počítat s detekčním limitem pro každý jednotlivý fosfolipid namísto fosfolipidové třídy, čímž by se stanovení poměrného zastoupení fosfolipidových tříd ještě více komplikovalo.

3.4 Hmotnostní spektrometrie

Analýza směsi membránových lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie byla nejprve zrealizována v uspořádání MALDI-TOF, nicméně dosažené výsledky, se ukázaly jako nereprodukovatelné. Zejména nerovnoměrná spolukrystalizace fosfolipidů a matrice, spolu s omezenými možnostmi kvantifikace, znemožňují zavedení MALDI-TOF jako rutinní metody pro stanovení poměru fosfolipidových tříd.

Další krok spočíval ve spojení LC-MS, nicméně jednotlivé fosfolipidové třídy jsou směsí chemických látek, a proto nelze určit jediné charakteristické m/z pro tyto příslušné třídy. Je tedy nutné provádět MS analýzy v určitém intervalu m/z , čímž v případě použití kvadrupólu, klesá výrazně citlivost metody, a to do té míry, že ji pro analýzu mikrobiálních lipidů o sumární koncentraci 0,1-1 mg/ml nelze použít.

Stanovení poměru fosfolipidových tříd pomocí LC-MS ztěžuje především skutečnost, že v chromatogramech nelze identifikovat fosfolipidy dle jejich m/z hodnot bez předchozí znalosti složení vzorku na úrovni zastoupení jednotlivých mastných kyselin v příslušných fosfolipidových třídách. Z tohoto důvodu, a také především kvůli předpokládané vyšší citlivosti, bylo přistoupeno k metodě přímého nástřiku vzorku na hmotnostní spektrometr.

Tab. 2 Zastoupení jednotlivých fosfolipidů v rámci fosfolipidových tříd lyofilizátu bakterie *Bacillus subtilis*.Měřeno AT 1200 MM-ESI-APCI (61100 Quadrupole LC/MS); objem nástřiku 5 μL ; průtok 5 ml/min; teplota nosného plynu (N_2) 300 $^\circ\text{C}$, teplota degaseru 200 $^\circ\text{C}$; napětí 2000 V; proud 2 μA .

Mastné kyseliny	Zastoupení (%)	Fosfolipidová třída			
		PA	PG	PS	PE
C14 x C14	0,9	0,9	-	-	-
C15 x C15	16,1	-	16,1	-	-
C15 x C16	9,3	-	9,3	-	-
C15 x C16:1	3,3	-	-	3,3	-
C15 x C17	27,0	2,6	21,8	2,6	-
C15 x C18	1,8	-	1,8	-	-
C15 x C18:1	6,1	-	6,1	-	-
C16 x C 16:1	7,3	-	4,7	-	2,6
C16 x C18:1	8,4	4,0	2,2	0,9	1,3
C16:1 x C18:1	3,2	3,2	-	-	-
C17 x C17	6,6	-	-	-	6,6
C18 x C18:1	7,3	2,6	3,0	-	1,7
C18:1 x C18:1	2,5	2,5	-	-	-

Použitý mutovaný kmen *Bacillus subtilis* SDB206 [70] může tvořit teoreticky stovku fosfolipidů, jejichž molární hmotnost se nachází v intervalu od 591 (kyselina dimyristoyl-fosfatidová) do 790 (distearoyl-fosfoserin) m/z . Vzhledem k nerovnoměrnému zastoupení především mastných kyselin byly detekovány fragmenty odpovídající 23 fosfolipidům (Tab. 2). Ostatní fosfolipidy mikrob buďto netvoří, případně tvoří v zanedbatelném množství. Pomocí chromatografie ani hmotnostní spektrometrie nelze toto bezpečně zjistit. Navíc přímá MS analýza je semikvantitativní a kalibrace by vyžadovala standardy všech 23 detekovaných fosfolipidů, které však nejsou dostupné. MS analýza potvrdila dominantní zastoupení fosfatidylglycerolu i podíl fosfoserinu, nižší zastoupení fosfoethanolaminu, než by odpovídalo výsledkům metod popsaných v předchozích kapitolách, což je možno přičítat diskriminaci dusíkatých látek oproti anionickým fosfolipidům. Jelikož se polární hlavice mezi sebou liší v molárních hmotnostech o jiné hodnoty, než mastné kyseliny, záměnu individuálního fosfolipidu za jiný, klasifikovaný do jiné třídy a lišící se

mastnými kyselinami, tak aby se rozdílly v molekulových hmotnostech vzájemně kompenzovaly, lze vyloučit. Nejvýhodnější je tedy toto uspořádání zejména pro sledování dlouhodobých trendů, a také pro vyhodnocování dopadů vnějších vlivů na změny ve složení biomembrán [71]. V optimálním případě lze provést prvotní analýzy složení pomocí chromatografických metod, zejména při analýzách známého vzorku, kde tedy je možno předem určit které m/z fragmenty má smysl sledovat. V ideálním případě lze při znalosti složení mastných kyselin i polárních hlavic vypočítat molekulové hmotnosti fosfolipidů odpovídajících všem jejich teoreticky možným kombinacím.

Nevýhoda této metody spočívá především v obtížné kvantifikovatelnosti analytů. Aby bylo možné porovnávat odezvy jednotlivých fragmentů, bylo by třeba pořízení standardů s identickým složením mastných kyselin jednotlivých fosfolipidů, a to je nad možnosti většiny laboratoří. Dále je nutné používat poměrně drahé vybavení, jehož provozní náklady také nejsou zanedbatelné, zatímco výsledná data jsou odpovídají spíše jednoduššímu *screeningu* než stanovení. Hlavní výhodou této metody představuje velmi jednoduchá a robustní příprava vzorků a zanedbatelná náročnost na chemikálie, a tedy šetrnost k životnímu prostředí.

4 Závěr

- Byly vyvinuty rychlé, citlivé, spolehlivé a robustní metody pro stanovení fosfoglycerolu, fosfoethanolaminu, fosfoserinu a fosfátu pomocí kapilární elektroforézy a plynové chromatografie.
- Tyto metody jsou vhodné pro zjišťování zastoupení fosfolipidových tříd v membráně produkčního kmene *Bacillus subtilis*. Metody lze použít také pro matrice, které obsahují podobné fosfolipidové složení.
- Metoda GC-MS byla dále optimalizována, za účelem snížení doby analýzy a spotřeby rozpouštědel. V rámci optimalizace byly parametry úspěšně testovány pro souběžné stanovení polárních hlavic spolu s mastnými kyselinami.
- Souběžná analýza polárních a nepolárních částí fosfolipidových molekul vede k úspoře času a navíc nevyžaduje dvojí vzorkování. Tudiž není potřeba dělit vzorek pro dva analytické postupy, případně lze snížit počet paralelních stanovení.
- Analýza intaktních fosfolipidů pomocí elektroforezy není vhodná, protože délka mastných acylů ovlivňuje mobilitu.
- Kapalinovou chromatografií stanovovat intaktní lipidy lze, nicméně bez použití MS detekce nelze separovat v prostředí, jež absorbuje záření okolo 200 nm. Rozpouštědla, jež při této vlnové délce absorbují, není možné použít pro přípravu mobilních fází, a to včetně rozpouštědel nižší čistoty. Při UV detekci je nízký koncentrační rozsah, zapříčiněný pravděpodobně i velkou absorbancí pozadí. Analýza je tudíž celkem komplikovaná.

- Intaktní fosfolipidy lze stanovovat přímou hmotnostní spektrometrií. Pro tyto účely není příliš vhodná MALDI-TOF ionizace, jelikož spolukrystalizace těchto látek nemusí probíhat rovnoměrně a analýza celého terčíku by byla časově náročná. Kombinovaná APCI+ESI je pro tyto účely vhodnější, i když je pravděpodobné, že odezvy dusíkatých fosfolipidů jsou obecně nižší.
- Metoda přímého nástriku na MS dokáže rozlišit desítky jednotlivých fosfolipidů, jejichž zařazení do příslušné třídy je jednoznačné.
- Sice nelze metodou přímého nástriku zjistit přesnou koncentraci, ale v porovnání s konvenčními metodami je patrná poměrná preference anionických fosfolipidů oproti dusíkatým.
- Metoda přímého nástriku na MS je nejvhodnější pro dlouhodobé sledování trendů, kde lze vybrat charakteristické zástupce pro každou třídu a hodnotit změny v jejich poměrném zastoupení, případně sledovat pouze majoritní fosfolipidy pro každou třídu.

5 Použitá literatura

1. Seydlová, G.; Čabala, R.; Svobodová, J.: Surfactin - Novel Solutions for Global Issues In: S. Olsztyńska (Ed.), Rijeka: InTech, 2011, p. 305-330.
2. Vestal, R. J.; Whita, D.C.: *BioScience* **39**, 535 (1989).
3. Fišar, Z.: *Klin Farmakol Farm* **18**, 198 (2004).
4. Glass, R. L.: *Lipids* **6**, 919 (1971).
5. ČSN EN ISO 6878: 2005 Jakost vod - Stanovení fosforu - Spektrofotometrická metoda s molybdenanem amonným.
6. Fang, J.; Barcelona, M. J.; Nogi, Y.; Kato, C.: *Deep-Sea Res. Pt. I* **47**, 1173 (2000).
7. Nováková, K.: *Chem. Listí* **109**, 116 (2015).
8. Nováková, K.; Navrátil, T.; Šestáková, I.; Mareček, V.; Chýlková, J.: *Chem. Listí* **108**, 219 (2014).
9. Espero Publishing s r. o.: Dostupné z URL:
<http://www.mojechemie.cz/images/Fosfolipidova_membrana.png>
[cit 7.4.2018].
10. Boumann, H. A.; Stroeve, P.; Longo, M. L.; Poolman, B.; Kuiper, J. M.; Hopmans, E. C.; Jetten, M. S.M.; Sinninghe Damsté, J. S.; Schouten, S.: *BBA Biomembr.* **1788**, 1452 (2009).
11. van Nieuwenhuyzen, W.; Tomás, M. C.: *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **110**, 472 (2008).
12. Zhang, Y. C.; Dery, M.; Zhang, S.; Steichen, D.: *J. Surfactants Deterg.* **7**, 211 (2004).
13. Restuccia D.; Spizzirri U. G.; Puoci F.; Cirillo G.; Vinci G.; Picci N.: *Food. Rev. Int.* **28**, 1 (2012).
14. Jun, J. X.; Packer, N. H.; Gooley, A. A.; Williams, K. L.: *J. Chromatogr. A* **808**, 23 (1998).
15. Schiller, J.; Arnold, K.: *Med Sci Monit* **8**, 205 (2002).
16. Petković, M.; Schiller, J.; Müller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Arnhold, J.: *Anal. Biochem.* **289**, 202 (2001).
17. Wang, Y.; Krull, I. S.; Liu, C.; Orr J. D.: *J. Chromatogr. B* **793**, 3 (2003).
18. Raith, K.; Wolf, R.; Wagner, J.; Neubert, R. H. H.: *J. Chromatogr. A* **802**, 185 (1998).
19. Szücs, R.; Verleysen, K.; Duchateau, G. S. M. J. E.; Sandra, P.; Vandeginste, B. G. M.: *J. Chromatogr. A* **738**, 25 (1996).
20. Gao, F.; Dong, J.; Li, W.; Wang, T.; Liao, H.; Liao, Y. P.; Liu, H. W.: *J. Chromatogr. A* **1130**, 259 (2006).
21. Zhang, L.; Hu, S.; Cook, L.; Dovichi, N. J.: *Electrophoresis* **23**, 3071 (2002).
22. Montealegre, C.; Sanchez-Hernandez, L.; Crego, A. L.; Marina, M. L.: *J. Agric. Food. Chem.* **61**, 1823 (2013).

23. Haddadian, F.; Shamsi, S. A.; Schaeper, A. P.; Danielson, N. D.:
J. Chromatogr. Sci. **36**, 395 (1998).
24. Gao, F.; Zhang, Z.; Fu, X.; Li, W.; Wang, T.; Liu, H.:
Electrophoresis **28**, 1418 (2007).
25. Jang, R.; Kim, K. H.; Zaidi, S. A.; Cheong, W. J.; Moon, M. H.:
Electrophoresis **32**, 2167 (2011).
26. Verleysen, K.; Sandra, P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **20**, 337 (1997).
27. Ingvaridsen, L.; Michaelsen, S.; Soresen, H.:
J. Am. Oil. Chem. Soc. **71**, 183 (1994).
28. Guo, B. Y.; Wen, B.; Shan, X. Q.; Zhang, S. Z.; Lin, J. M.:
J. Chromatogr. A **1074**, 205 (2005).
29. Zhang, L.; Krylov, S. N.; Hu, S.; Dovichi, N. J.: *J. Chromatogr. A*
894, 129 (2000).
30. Liu, X.; Hu, Y.-Q.; Ma, L.; Lu, Y. T.: *J. Chromatogr. A* **1049**, 237 (2004).
31. Robert, F.; Bert, L.; Parrot, S.; Denoroy, L.; Stoppini, L.; Renaud, B.:
J. Chromatogr. A **817**, 195 (1998).
32. Wang, K.; Jiang, D.; Sims, C. E.; Allbritton, N. L.:
J. Chromatogr. B **907**, 79 (2012).
33. Zhang, L. Y.; Sun, M. X.: *J. Chromatogr. B* **859**, 30 (2007).
34. Fu, N. N.; Wang, H.; Zhang, H. S.: *Electrophoresis* **32**, 712 (2011).
35. Liu, X.; Hu, Y.-Q.; Ma, L.; Lu, Y. T.: *J. Chromatogr. A* **1049**, 237 (2004).
36. Fadden, P.; Haystead, T. A. J.: *Anal. Biochem.* **225**, 81 (1995).
37. Liu, X.; Ma, L.; Lu, Y. T.: *Anal. Chim. Acta* **512**, 297 (2004).
38. Kataoka, H.; Ueno, Y.; Makita, M.: *Agric. Biol. Chem.* **55**, 158 (1991).
39. Kataoka, H.; Nakai, K.; Ueno, Y.; Makita, M.:
Biosci. Biotech. Biochem. **56**, 1300 (1992).
40. Chen, J.-L.; Tang, H.-Q.; Hu, J.-D.; Fan, J.; Hong, J.; Gu, J.-Z.:
J. Gastroenterol. **16**, 5874 (2010).
41. Erdemoğlu, M.; Kuyumcuoglu, U.; Guzel, A. I.; Celik, Y.; Kale, E.:
Braz. J. Med. Biol. Res. **44**, 725 (2011).
42. Palumbo, A. M.; Tepe, J. J.; Reid, G. E.: *J. Proteome Res.* **7**, 771 (2008).
43. Shieh, J.-J.; Desiderio, D. M.: *Anal. Lett.* **10**, 831 (1977).
44. Kataoka, H.; Nakai, K.; Makita, M.: *J. Chromatogr. B.* **615**, 136 (1993).
45. Yon, C.; Han, J.-S.: *Exp. Mol. Med.* **32**, 243 (2000).
46. Podolec, P.; Hengerics Szabó, A.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Górová, R.;
Višňovský, J.; Gnipová, A.; Horváth, A.; Bierhanzl, V.; Hložek, T.; Čabala, R.:
J. Chromatogr. B **967**, 134 (2014).
47. Deng, Y.-H.; Li, R.-J.; Zhang, H.-S.; Du, X.-L.; Wang H.:
Anal. Chim. Acta **601**, 118 (2007).
48. Gobert, A.; Rivet, J.-M.; Billiras, R.; Parsons, F.; Millan M. J.:
J. Neurosci. Methods **202**, 143 (2011).

49. Brouwers, J. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 763 (2011).
50. Conforti, F. D.; Harris, C. H.; Rinehart J. T.: *J. Chromatogr.* **645**, 83 (1993).
51. Narváez-Rivas, M.; Gallardo, E.; Ríos, J. J.; León-Camacho, M.:
J. Chromatogr. A **1218**, 3453 (2011).
52. Sato, Y.; Nakamura, T.; Aoshima, K.; Oda Y.: *Anal. Chem.* **82**, 9858 (2010).
53. Rabagny, Y.; Herrmann, W.; Geisel, J.; Kirsch, S. H.; Obeid R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 891 (2011).
54. Suchocka, Z.; Gronostajska, D.; Suchocki, P.; Pachecka, J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 859 (2003).
55. Min, H. K.; Kong, G.; Moon, M. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1273 (2010).
56. Postle, A. D.; Wilton, D. C.; Hunt, A. N.; Attard, G. S.:
Prog. Lipid Res **46**, 200 (2007).
57. Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Schürenberg, M.; Suckau, D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 827 (2007).
58. Sommerer, D.; Süß, R.; Hammerschmidt, S.; Wirtz, H.; Arnold, K.; Schiller, J.:
J. Pharm. Biomed. Anal. **35**, 199 (2004).
59. Fuchs, B.: *J. Chromatogr. A* **62**, 1259 (2012).
60. Seng, P.; Drancourt, M.; Gouriet, F.; La Scola, B.; Fournier, P.-E.; Rolain, J. M.; Raoult D.: *Clin. Infect Dis.* **49**, 543 (2009).
61. Shroff, R.; Svatos, A.: *Anal. Chem.* **81**, 7954 (2009).
62. Liang, M.; Zhang, P.; Shu X.; Liu, C.; Shu, J.:
Int. J. Mass Spectrom. **334**, 13 (2013).
63. Calvano, C. D.; De Ceglie, C.; D'Accolti, L.; Zambonin, C. G.: *Food. Chem.* **134**, 1192 (2012).
64. Shu, X.; Li, Y.; Liang, M.; Yang, B.; Liu, C.; Wang, Y.; Shu J.: *Int. J. Mass Spectrom.* **321**, 71 (2012).
65. Bierhanzl, V. M.; Riesová, M.; Taraba, L.; Čabala, R.; Seydlová, G.: *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 7215 (2015).
66. Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala, R.; Kozlík, P.; Svobodová, J.; Pátek, M.:
BBA Biomembr. **1828**, 2370 (2013).
67. Podolec, P.; Szabó, A.H.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Górová, R.; Višňovský, J.; Gnipová, A.; Horváth, A.; Bierhanzl, V.; Hložek, T.; Čabala, R.; *J. Chromatogr. B* **967**, 134 (2014).
68. Seydlová, G.; Svobodová, J.: *Folia Microbiol.* **53**, 303 (2008).
69. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, S. G. H.: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
70. Kawai, F.; Shoda, M.; Harashima, R.; Sadaie, Y.; Hara, H.; Matsumoto, K.:
J. Bacteriol. **186**, 1475 (2004).
71. Bierhanzl, V. M.; Čabala, R.; Ston, M.; Katora, P.; Ferenczy, V.; Blaško, J.; Kubinec, R.; Seydlová, G.: *Monaths. Chem.* **147**, 1385 (2016).

Seznam příloh:

Příloha #1:

Bierhanzl, V. M., Riesová, M., Taraba, L., Čabala, R., Seydlová, G.:

Analysis of phosphate containing headgroups and phosphate cleaved by regioselective enzyme from glycerolphospholipids of *Bacillus subtilis* by capillary electrophoresis.

Analytical and Bioanalytical Chemistry **407**:23, 7215-7220 (2015)

Příloha #2:

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Ston, M., Kubinec, R., Hengerics Szabó, A., Podolec P.:

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

Journal of Separation Science **38**:1, 67–72 (2015)

Příloha #3:

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Bursová, M., Ston, M., Seydlová, G.:

Simultaneous analysis of polar and nonpolar components of cell membranes phospholipids by GC-MS.

Chemical Papers **70**:10, 1309-1315 (2016)

Příloha #4:

Bierhanzl, V. M., Čabala, R., Ston, M., Katora, P., Ferenczy, V., Blaško, J., Kubinec, R., Seydlová, G.:

Comparison of direct injection mass spectrometry, thin layer chromatography and gas chromatography in analysis of phospholipids.

Chemical Monthly **147**:1, 1385-1391 (2016)

