

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ
CHROMATOGRAFIE LIPIDŮ A JEJICH
IDENTIFIKACE POMOCÍ HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIE**

**HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF
LIPIDS AND THEIR IDENTIFICATION BY MASS
SPECTROMETRY**

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. a RNDr. Jany Sobotníkové, Ph.D. – školitele (konzultanta), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitele RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště školitele RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.).

V Praze dne.....

.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení, velikou ochotu a cenné rady a připomínky při vypracovávání této diplomové práce.

Můj dík patří i celému kolektivu skupiny Hmotnostní spektrometrie za pomoc, praktické rady a vytvoření přátelské atmosféry.

RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. bych ráda poděkovala za vstřícnost a cenné připomínky k diplomové práci.

Také bych ráda poděkovala svým rodičům a Zdeňkovi za jejich všestrannou podporu během celého studia.

Tato diplomová práce vznikla za podpory následujících finančních zdrojů:

Grantu GA ČR č. 203/09/0139

Výzkumného záměru Z4 055 0506

Výzkumného záměru MSM 0021620857

Předmětová hesla

Izolace a separace rostlinných lipidů

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC)

Hmotnostní detekce galaktolipidů

Klíčová slova

Monogalaktosyldiacylglyceroly (MGDG)

Digalaktosyldiacylglyceroly (DGDG)

NUCLEOSIL[®] C₁₈

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Lipidy	10
2.2	Monogalaktosyldiacylglyceroly, digalaktosyldiacylglyceroly	11
2.3	Výskyt a biosyntéza MGDG a DGDG	12
2.4	Biologické účinky galaktolipidů	13
2.5	Izolace lipidů	14
2.6	Separace MGDG a DGDG v systému RP-HPLC	16
2.7	Hmotnostní spektrometrie MGDG a DGDG	17
2.8	Určování struktury MGDG a DGDG pomocí hmotnostní spektrometrie	19
2.9	Určování složení MGDG a DGDG jinými technikami	20
2.10	Vyhodnocení HPLC separací DGDG	20
2.11	Cíl diplomové práce	22
3	Experimentální část	23
3.1	Použité chemikálie	23
3.2	Použitý materiál	24
3.3	Studované rostliny	24
3.4	Přístroje a zařízení	24
3.4.1	Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem	24
3.4.2	Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem	25
3.4.3	Další přístroje	25
3.5	Pracovní postupy	26
3.5.1	Extrakce lipidů z rostlinného materiálu	26
3.5.2	Oddělování pigmentů a lipidů	27
3.5.3	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	27

3.5.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	28
3.5.5	Měření MGDG a DGDG přímým vstupem, měření amonných aduktů	29
3.5.6	Měření mrtvého času	29
3.5.7	Transesterifikace DGDG	29
4	Výsledky a diskuse	31
4.1	Extrakce lipidů z rostlinného materiálu	31
4.2	Oddělování pigmentů a lipidů	31
4.3	Preparativní tenkovrstvá chromatografie MGDG a DGDG	32
4.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie DGDG s hmotnostní detekcí	36
4.4.1	Separace DGDG v systému acetonitril/voda	36
4.4.2	Separace DGDG v systému methanol/voda	40
4.4.3	Separace DGDG v systému ethanol/voda a propan-2-ol/voda	44
4.4.4	Separace DGDG v systému acetonitril/methanol/voda	45
4.4.5	Měření mrtvého času	47
4.5	Hmotnostní spektra DGDG	47
4.6	Fragmentace amonných aduktů DGDG	50
4.7	Vyhodnocení HPLC/MS analýz studovaných DGDG	51
4.8	Analýza mastných kyselin po transesterifikaci	56
4.9	Porovnání výsledných separací DGDG s publikacemi	56
5	Závěr	58
6	Literatura	59
7	Přílohy	65

Seznam zkratek

2D TLC	dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie
a	pološířka v 10 % výšky píku přilehlá k těžišti píku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
A_s	faktor asymetrie
b	pološířka v 10 % výšky píku odlehlá od těžiště píku
b_g	strmost gradientu
BHT	butylovaný hydroxytoluen, 2,6-di- <i>terc</i> -butyl-4-methylfenol
CID	kolizemi indukovaná disociace
CN:DB	poměr celkového počtu uhlíků a celkového počtu dvojných vazeb v acylech lipidu
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
ECN	počet ekvivalentů uhlíků („Equivalent Carbon Number“)
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ionizace urychlenými atomy
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
M/D	počet oddělených MGDG/počet oddělených DGDG
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
MGMG	monogalaktosylmonoacylglycerol
MS/MS	několikanásobná hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
R_F	retardační faktor
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
R_s	rozlišení

SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
t'_R	redukovaný retenční čas
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t_M	mrtvý čas kolony
t_R	retenční čas
w	šířka píku při základně
$w_{10\%}$	šířka píku v 10 % výšky

1 Úvod

Lipidy tvoří spolu s proteiny a sacharidy základní stavební jednotky živé hmoty. Biologické membrány jsou tvořeny lipidy, energie v buňkách a celých organismech je také mimo jiné uchovávána ve formě lipidů, signalizace mezi buňkami je zprostředkovávána molekulami na bázi lipidů. Jedná se tedy o přírodní látky nezbytné pro život [1].

V rámci rostlinné říše mají velký význam galaktolipidy. Lipidy této třídy utváří strukturu rostlinných membrán. Kromě stavební funkce v membránách jsou tyto lipidy přímou součástí fotosyntetického aparátu [2]. V současné době vzrůstá zájem o tyto lipidy zejména díky jejich protinádorovým a protizánětlivým účinkům [3-12].

Cílem této práce je izolace galaktolipidů, konkrétně monogalaktosyldiacylglycerolů (MGDG) a digalaktosyldiacylglycerolů (DGDG) z rostlinného materiálu a jejich následná separace a identifikace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS). V rámci reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) je hlavním cílem práce dosažení separace co největšího počtu galaktolipidů z rostlinného extraktu. V rámci hmotnostní spektrometrie je hlavním cílem práce optimalizace podmínek detekce MGDG a DGDG s využitím elektrospreje a 3D iontové pasti.

2 Teoretická část

2.1 Lipidy

Obecně jsou za lipidy považovány všechny přírodní nepolární sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v jiných nepolárních rozpouštědlech [13]. Lipidy se dají také definovat jako mastné kyseliny a jejich deriváty, které s nimi mají spojitost z hlediska biosyntézy nebo funkce [14]. Další definice lipidy charakterizuje jako malé hydrofobní nebo amfipatické molekuly, které zcela nebo částečně vznikají kondenzací z thioesterů a nebo z isoprenu [15].

Z uvedených definic je zřejmé, že lipidy jsou velice komplexní skupinou přírodních látek. V biologických systémech zajišťují nespočet funkcí a jsou proto nezbytné pro existenci živé hmoty.

Lipidy se podle názvosloví IUPAC dělí na osm skupin [15]:

1. Mastné kyseliny
2. Glycerolipidy
3. Glycerofosfolipidy
4. Sfingolipidy
5. Steroly
6. Prenoly
7. Sacharolipidy
8. Polyketidy

Z hlediska složení lze lipidy rozdělit do tří skupin [1]:

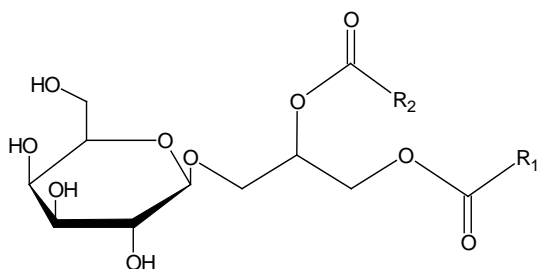
1. Jednoduché nebo neutrální lipidy – jsou složené z jedné nebo dvou různých tříd lipidů.
2. Komplexní lipidy – obsahují nejčastěji tři různé složky, do této skupiny jsou zahrnovány studované galaktolipidy složené z glycerolu, mastných kyselin a galaktosy.
3. Proteolipidy – jedná se o sloučeniny proteinů a mastných kyselin.

2.2 Monogalaktosyldiacylglyceroly, digalaktosyldiacylglyceroly

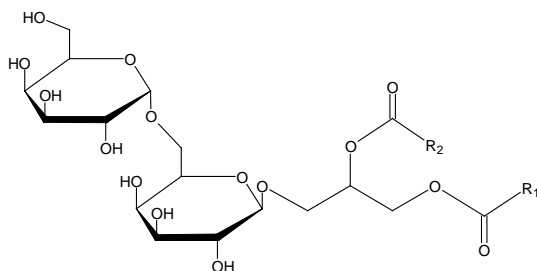
Jedná se o komplexní lipidy, které jsou dle nejnovějšího názvosloví IUPAC zahrnovány do skupiny glycerolipidů. Podle dřívějšího názvosloví [16, 17] byly MGDG a DGDG zahrnovány do skupiny glykolipidů a tato skupina byla dále rozdělena na [18]:

- Glykoglycerolipidy – součástí této skupiny byly i MGDG a DGDG
- Glykofosfatidylinositoly
- Glykosfingolipidy

Molekuly MGDG a DGDG jsou složeny z galaktosy, glycerolu a dvou mastných kyselin, vázaných v poloze *sn-1* a *sn-2* na glycerolu. U DGDG je spojení dvou galaktos zprostředkováno *O*-glykosidickou vazbou. Nejběžnější je spojení (1→6), kdy galaktosa spojená s glycerolem je v anomerické formě β a druhá galaktosa je v anomerické formě α . Na **obr. 1** je uvedena struktura 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*- β -D-galaktopyranosyl-*sn*-glycerolu (MGDG). Na **obr. 2** je uvedena struktura 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-(6'-*O*- α -D-galaktopyranosyl- β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerolu (DGDG). V těchto stereoisomerních strukturách se MGDG a DGDG vyskytují nejčastěji [2].



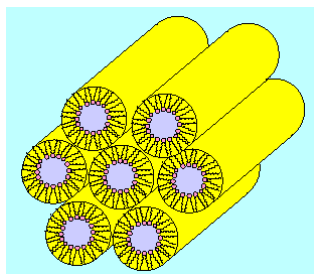
Obr. 1: 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*- β -D-galaktopyranosyl-*sn*-glycerol (MGDG).



Obr. 2: 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-(6'-*O*- α -D-galaktopyranosyl- β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerol (DGDG).

2.3 Výskyt a biosyntéza MGDG a DGDG

MGDG a DGDG lze nalézt v rostlinách, řasách, bakteriích a jako minoritní složky se vyskytují i v některých živočišných tkáních [19, 20]. Ve fotosyntetizujících částech rostlin tvoří až 75 % všech lipidů, přičemž MGDG tvoří z tohoto podílu přibližně 50 %. Důvodem vysokého zastoupení MGDG a DGDG v rostlinných membránách je pravděpodobně nedostatek fosforu v živinách rostlin a dále strukturní spojitost MGDG s fotosyntetickým aparátem rostlin [21]. MGDG jsou takzvané lipidy netvořící dvojvrstvu. Samovolně vytváří šestiúhelníkové fáze typu H_{II} . Struktura této fáze je uvedena na **obr. 3**. Základem jsou dlouhé řady molekul MGDG, které tvoří tzv. pruty. Vnitřní část jednotlivých prutů je hydrofilní (tvořená molekulami galaktos), zatímco vně směřují hydrofobní řetězce mastných kyselin. Pokud jsou v kontaktu se světlosběrným komplexem thylakoidních membrán (jak je tomu přirozeně v rostlinách), MGDG dvojvrstvu tvoří. Bylo zjištěno, že tento proteinový komplex vytváří MGDG strukturu podobnou lešení, čímž jsou MGDG nuceny dvojvrstvu utvářet. DGDG patří mezi lipidy tvořící dvojvrstvu. Důvodem je přítomnost druhé galaktosy, která zvětší polární část molekuly a možnost vzniku jiných struktur je tímto omezena [22].



Obr. 3: Hexagonální struktura typu H_{II} u MGDG [22].

Biosyntéza MGDG a DGDG může probíhat dvěma hlavními způsoby. U prvního způsobu probíhá biosyntéza pouze v chloroplastech. Vznikající galaktolipidy jsou charakteristické přítomností šestnácti uhlíkaté nenasycené mastné kyseliny se třemi dvojnými vazbami (16:3) v poloze *sn*-2 na glycerolu u molekul MGDG, nejčastěji se jedná o *cis,cis,cis*-hexadeka-7,10,13-trienovou kyselinu. Tento typ biosyntézy je označován jako prokaryotický. Druhý způsob biosyntézy je označován jako eukaryotický. Biosyntéza probíhá v tomto případě nejen v chloroplastech, ale i

v endoplazmatickém retikulu. Rostliny využívající eukaryotický způsob biosyntézy se vyznačují přítomností osmnácti uhlíkaté nenasycené mastné kyseliny se třemi dvojnými vazbami (18:3) v poloze *sn-2* na glycerolu u MGDG, nejčastěji se jedná o α -linolenovou kyselinu, tzn. *cis,cis,cis*-oktadeka-9,12,15-trienovou kyselinu. Typ biosyntézy je určován podle složení MGDG, protože jsou syntetizovány jako první a přiřazení k typu biosyntézy je podle nich přesnější. Podle přítomnosti charakteristických mastných kyselin se rostliny dělí na takzvané 16:3 a 18:3 rostliny [23-26]. Typ biosyntézy souvisí s evolučním vývojem rostlin, vyšší rostliny využívají eukaryotický způsob biosyntézy [27].

2.4 Biologické účinky galaktolipidů

MGDG a DGDG mají podle řady studií hlavně protinádorové a protizánětlivé účinky. V dostupných publikacích byly tyto účinky testovány „in vitro“ (inhibiční schopnosti vůči viru Epstein-Barrové, inhibice růstu nádorových buněk různých orgánů), případně „in vivo“ na myších. Skutečné působení galaktolipidů na lidský organismus je proto v současné době zatím diskutabilní.

Protinádorové účinky MGDG a DGDG jsou dány hlavně jejich schopností inhibovat savčí DNA polymerázy. Touto inhibicí je znemožněno bujení nádorových buněk. Bylo zjištěno, že ještě větší inhibiční účinky mají tyto látky ve formě monoacylderivátů – hlavně monogalaktosylmonoacylglyceroly (MGMG). MGMG jsou dokonce schopné vyvolat apoptózu, čímž je docíleno nejenom zastavení nádorového bujení, ale i postupná programovaná smrt nádorových buněk [6]. Díky této schopnosti by mohly být tyto látky používány pro výrobu nových chemoterapeutik [10]. Inhibiční schopnosti daného galaktolipidu jsou závislé na obsahu mastných kyselin. V publikacích jsou jako galaktolipidy s inhibičními schopnostmi vůči DNA polymerázám uváděny nejčastěji látky, které obsahují různé osmnácti uhlíkaté nenasycené mastné kyseliny [3-10].

Protizánětlivé účinky MGDG a DGDG jsou dány hlavně jejich schopností inhibovat enzymy cyklooxygenázy [11]. Tato inhibiční schopnost opět souvisí s protinádorovými účinky MGDG a DGDG, protože cyklooxygenázy katalyzují vznik prostaglandinů, které podporují nádorové bujení [12].

2.5 Izolace lipidů

K izolaci lipidů jsou nejčastěji využívány extrakční směsi obsahující chloroform a methanol v různém poměru. Dvěma nejznámějšími postupy extrakce jsou Folchova metoda [28] a metoda podle Bligha a Dyera [29], které byly původně vyvinuty pro extrakce lipidů z živočišných tkání. Nenasycené mastné kyseliny v MGDG a DGDG mohou podléhat oxidaci [30, 31]. Proto je vhodné do extrakčních směsí přidávat butylovaný hydroxytoluen (BHT), který má silné antioxidační účinky [32]. K inaktivaci lipas, které přispívají k rozkladu extrahovaných lipidů je vhodné použít v prvním extrakčním kroku propan-2-ol [33].

Dalším krokem izolace je oddělení jednotlivých tříd lipidů. K tomuto účelu je využívána tenkovrstvá chromatografie (TLC), HPLC a extrakce (mikroextrakce) tuhou fází (SPE, SPME).

a) *Tenkovrstvá chromatografie MGDG a DGDG*

Jako stacionární fáze je v tenkovrstvé chromatografii MGDG a DGDG využíván silikagel. V mobilních fázích se nejčastěji používá methanol, chloroform, aceton, voda, kyselina octová a anorganické soli. V **tabulce 1** jsou uvedeny příklady složení mobilních fází využívaných při dělení galaktolipidů. Mnoho dalších mobilních fází je možno nalézt například v publikaci J.C. Touchstona [34]. Vizualizaci oddělených analytů je možné provést destruktivními a nedestruktivními činidly. Mezi destruktivní způsoby vizualizace patří například postřík kyselinou sírovou, ethanolickým roztokem kyseliny fosfomolybdenové, případně roztokem 1-naftolu v kyselině sírové. Postřík činidlem je následován spalováním, které skvrnu ještě více zviditelní [35]. Naopak nedestruktivním způsobem lze galaktolipidy vizualizovat například pomocí 0,05% roztoku primulinu v acetonu (w/v) [36], 0,2% roztoku anthronu (9,10-dihydro-9-oxoanthracen) v benzenu [37], nebo 0,2% methanolickým roztokem 8-anilinu-4-naftol-sulfonové kyseliny (w/v) [38]. Zóny analytů jsou pozorovány pod UV lampou.

TLC separace se nejčastěji provádí vyvíjením destičky pouze v jedné mobilní fázi – jednoduchá tenkovrstvá chromatografie, ve dvou mobilních fázích – 2D TLC, nebo pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC).

Tabulka 1: Příklady mobilních fází používaných v TLC separacích MGDG a DGDG

složení mobilní fáze:	citace
chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v)	[39]
aceton:k.octová:voda* (100:2:1, v/v/v)	
methylacetát:propan-2-ol:chloroform:methanol:0,25% chlorid draselný (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v)	[40]
chloroform:aceton:methanol:k.mravenčí:voda (25:10:5:5:2, v/v/v/v/v)	[41]
aceton:benzen:k.mravenčí:voda* (200:30:3:8, v/v/v/v)	
aceton:benzen:voda (91:30:8, v/v/v)	[37]

* Možno použít mobilní fáze buď samostatně, nebo v uvedeném pořadí u 2D TLC

b) *Vysokoučinná kapalinová chromatografie pro izolaci MGDG a DGDG*

Pro izolace MGDG a DGDG je využívána separace v systému NP-HPLC. Vždy se jedná o gradientové eluce a dochází k oddělení šesti až osmnácti tříd lipidů včetně MGDG a DGDG [42-45].

c) *Extrakce (mikroextrakce) tuhou fází u MGDG a DGDG*

Tento způsob oddělování galaktolipidů z komplexního extraktu lipidů se v literatuře objevuje méně často. Jako stacionární fáze je využíván silikagel (SPE), případně chemicky vázané oktadecylové či oktylové fáze a aminopropylové fáze (SPME). Při použití silikagelu mohou být galaktolipidy eluovány acetonem, nebo směsí aceton:methanol (9:1, v/v) [46]. Při použití aminopropylových stacionárních fází jsou MGDG eluovány směsí chloroform:propan-2-ol (2:1, v/v), případně směsí chloroform:methanol (2:1, v/v) a DGDG směsí hexan:ethylacetát (85:15, v/v) [47, 48].

Oddělení pigmentů a lipidů kolonovou chromatografií na silikagelu

K oddělení pigmentů od lipidů lze použít kolonovou chromatografii na aktivovaném silikagelu. Po nanesení vzorku jsou pigmenty z kolony eluovány směsí chloroform:aceton (4:1, v/v). Lipidy jsou následně eluovány směsí chloroform:methanol (1:1, v/v) [49].

2.6 Separace MGDG a DGDG v systému RP-HPLC

Separace jednotlivých MGDG a DGDG se provádí v systému RP-HPLC. Nejčastěji jsou využívány isokratické mobilní fáze methanolu či acetonitrilu s vodou. Kolony se používají silikagelové s chemicky vázanými fázemi (C₈, C₁₈). Vzhledem ke struktuře MGDG a DGDG je v tomto uspořádání rychlejší eluce DGDG, které mají oproti MGDG polárnější charakter. V **tabulce 2** je uvedeno několik příkladů separačních systémů pro MGDG a DGDG.

Tabulka 2: Příklady separačních systémů pro MGDG a DGDG

extrakt	kolona	složení mobilní fáze	M/D*	citace
špenát setý	LiChrosorb RP-18	methanol:voda (95:5, v/v)	5/6	[50]
pšeničná mouka	UltrasphereODS	methanol:voda:acetonitril (90,5:7:2,5, v/v/v)	5/4	[51]
hrách setý	μ-Bondapak C ₁₈	gradientová eluce ^{a)}	3/1	[52]
huseníček rolní	Microsorb-RP	methanol:voda (96:4, v/v)	10/7	[53]
povijnice batátová	Hypersil BDS C18	methanol:voda:acetonitril (82,5:15:2,5, v/v/v)	14/12	[54]
avokádo americké	Polaris Si-A	gradientová eluce ^{b)}	10/12	[55]
pšeničný lepek	Hypercarb ¹⁾	methanol:toluen:THF ²⁾ :chloroform _{THCOOH} ³⁾ (64,3:21,5:13,7:0,5, v/v/v/v)	-/9	[33]

* M/D počet oddělených MGDG a počet oddělených DGDG

1) jedná se o uhlíkovou kolonu

2) tetrahydrofuran

3) do mobilní fáze byl přidáván 0,1% triethylamin v k. mravenčí

Tabulka 3: Průběh gradientů uvedených v tabulce 2

gradientová eluce ^{a)} [52]	
<i>t</i> [min]	složení mobilní fáze
0	voda:acetonitril (95:5, v/v)
8	voda:acetonitril (35:65, v/v)
15	voda:acetonitril (5:95, v/v)
25	voda:acetonitril (5:95, v/v)

gradientová eluce ^{b)} [55]	
<i>t</i> [min]	složení mobilní fáze
0	chloroform:methanol:hydroxid amonný (30%) (80:19,5:0,5, v/v/v)
10	chloroform:methanol:voda:hydroxid amonný (30%) (60:34:5,5:0,5, v/v/v/v)
25	chloroform:methanol:voda:hydroxid amonný (30%) (60:34:5,5:0,5, v/v/v/v)
30	chloroform:methanol:hydroxid amonný (30%) (80:19,5:0,5, v/v/v)

I přesto, že se HPLC analýzám MGDG a DGDG věnovala řada autorů, optimální podmínky pro jejich chromatografickou separaci dosud nebyly nalezeny. Publikované metody se vyznačují nedostatečnou separační účinností, což vede k detekci jen několika majoritních komponent v komplexních směsích MGDG a DGDG. Cílem této diplomové práce je proto nalézt takové chromatografické podmínky, kdy bude možné vzájemně oddělit co možná nejvíce složek směsi a tak získat mnohem podrobnější přehled o jejich zastoupení.

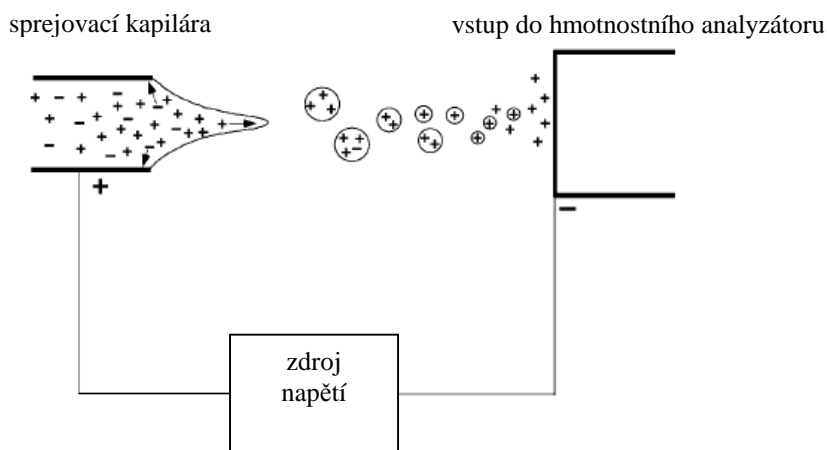
2.7 Hmotnostní spektrometrie MGDG a DGDG

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladně nebo záporně nabitě ionty. Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vakuový systém [56].

Podle množství dodané energie se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé. Při použití měkkých ionizačních technik je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a většinou nedochází k fragmentaci molekuly. Mezi měkké ionizační

techniky se řadí ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotonionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a ionizace urychlenými atomy (FAB). Při použití tvrdých ionizačních technik se přebytek energie projeví rozsáhlou fragmentací primárně vzniklého iontu. Příkladem tvrdé ionizační techniky je elektronová ionizace (EI) [57].

V rámci této práce byla k ionizaci MGDG a DGDG používána ESI. Při ESI ionizaci se u MGDG a DGDG nejčastěji využívá měření v kladném módu, kdy je na sprejovací kapiláru vloženo kladné napětí. Na **obr. 4** je uvedeno schéma ESI při měření v kladném módu. Analyt rozpuštěný v mobilní fázi prochází kapilárou, na jejíž konec je vloženo vysoké napětí v řádech kilovoltů. Po průchodu kapilárou vznikají velmi drobné kapičky kapalné fáze s vysokou hustotou povrchového náboje. Kapičky jsou proudem inertního plynu (nejčastěji dusíku) rychle vysušeny a ionty analytu přecházejí mechanismem iontového vypařování přímo do plynné fáze [56, 58].



Obr. 4: Schéma principu ionizace elektrosprejemem v kladném módu [58].

Jako hmotnostní analyzátor byla při této práci využívána kvadrupólová iontová past. Výhodou iontové pasti je možnost provádět MS/MS experimenty v rámci jednoho analyzátoru. Iontová past se skládá ze vstupní a výstupní kruhové elektrody a prstencové středové elektrody. Krajní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu se přivádí vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Činnost iontové pasti má dvě fáze. První fází je plnění pasti. Druhou fází je vypuzování iontů z pasti podle rostoucího m/z . Tohoto jevu je docíleno zvyšováním amplitudy střídavého napětí na středové elektrodě. Při MS/MS experimentech dochází k fragmentaci látek analytů

kolizně indukovanou disociací (CID), tzn. ionty zachycené v pasti jsou změnou amplitudy vysokofrekvenčního napětí urychleny a srážejí se s molekulami helia, dochází k fragmentaci [56, 59, 60].

Při měření MS/MS experimentů je možné využít závislý sken (dependentní sken). Jedná se o metodu, kdy hmotnostní spektrometr zaznamenává kromě hlavního skenu (většinou se jedná o plný sken) i další sken (nebo i více skenů). Záznam dat závislého skenu je ovlivněn nastavenými parametry, například minimální hodnotou impulzů pro fragmentace iontů, nebo počtem nejintenzivnějších iontů ve spektru, které mají být zachyceny v pasti a fragmentovány.

Fragmentace analytů je možné docílit také nastavením iontové optiky hmotnostního spektrometru – fragmentace ve zdroji, kdy do hmotnostního analyzátoru (iontové pasti) vstupují již fragmentované analyty. V tomto případě nelze provádět selektivní fragmentaci, fragmentovány jsou i nečistoty a další rušivé látky ze vzorku [60]. Pro detekci iontů se nejčastěji používají elektronové násobiče a fotonásobiče [61].

2.8 Určování struktury MGDG a DGDG pomocí hmotnostní spektrometrie

MGDG a DGDG tvoří při ionizaci elektrosprejem v kladném módu adukty se sodnými ionty $[M+Na]^+$. Při MS/MS těchto aduktů vznikají primárně fragmenty odštěpováním galaktosy $[M+Na-162]^+$ a fragmenty odpovídající odštěpování jednotlivých mastných kyselin vázaných v poloze *sn-1* a *sn-2* na glycerolu, tedy $[M+Na-R_1COOH]^+$ a $[M+Na-R_2COOH]^+$, přičemž ve fragmentačních spektrech by intenzivnější fragment měl odpovídat odštěpení mastné kyseliny z polohy *sn-1* na glycerolu [62]. Z fragmentačních spekter lze také určit polohu dvojných vazeb mastných kyselin, díky neutrálním ztrátám C_nH_{2n} a C_nH_{2n+2} , vznikajícím štěpením řetězců mastných kyselin [54, 63].

Polohu dvojných vazeb je možné určit i s využitím ionizace FAB a následnou MS/MS analýzou. V tomto případě je ve fragmentačních spektrech intenzivnější fragment odpovídající odštěpení mastné kyseliny z polohy *sn-2* [51, 64, 65].

Využití ionizace elektrosprejem v záporném módu není příliš běžné. Galaktolipidy tvoří deprotonované molekuly $[M-H]^-$, případně adukty s chloridovými ionty $[M+Cl]^-$.

Využitím fragmentace ve zdroji je možné určit mastné kyseliny jednotlivých galaktolipidů [66].

2.9 Určování složení MGDG a DGDG jinými technikami

K určení složení mastných kyselin MGDG a DGDG se nejčastěji využívá transesterifikace a následně plynově-chromatografická analýza. Při transesterifikaci vznikají estery mastných kyselin (nejčastěji methylestery), které jsou dále analyzovány [67-69]. Nevýhodou tohoto typu analýzy je nemožnost určit polohy analyzovaných mastných kyselin v původním vzorku (*sn-1* a *sn-2* poloha na glycerolu). Pro tyto účely je možné využít selektivní štěpení lipázami. Mastné kyseliny jsou selektivně odštěpovány z polohy *sn-1* na glycerolu. Vznikající lysogalaktolipidy mohou být dále analyzovány [51, 62, 70].

Využitím selektivních enzymů galaktosidáz lze určit typ galaktosidické vazby v MGDG a DGDG, α -galaktosidázy štěpí α galaktosidické vazby a β -galaktosidázy štěpí β galaktosidické vazby. Ke stejnému účelu je možné použít i polarimetrické měření [71].

2.10 Vyhodnocení HPLC separací DGDG

Mezi parametry charakterizující retenční chování separovaných látek se řadí retenční čas a redukovaný retenční čas. Retenční čas (t_R) je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně (u analytu, který není na koloně zadržován, se tento čas nazývá mrtvým časem kolony t_M) a redukovaný retenční čas (t'_R) je celkový čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi, jak je zřejmé z rovnice (1) [72].

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1)$$

kde t'_R je redukovaný retenční čas [min], t_R je retenční čas analytu [min], t_M je mrtvý čas kolony [min].

Další charakteristikou v HPLC separacích je asymetrie píku. Asymetrie píku se měří v 5 % nebo 10 % výšky píku. U Gaussovského píku je hodnota faktoru asymetrie rovna jedné. Faktor asymetrie větší než jedna odpovídá rozmytým píkům [73]. Asymetrie píku patří mezi charakteristiky kolony, podává informace o interakcích analytů se silikagelem. V této práci byla asymetrie píku vypočítána pro vybrané lipidy a slouží k doplnění informací o změně retenčního chování studovaných DGDG v různých

systemech gradientové eluce. Faktory asymetrie píku byly určeny z rekonstruovaných chromatogramů. Faktor asymetrie píku (A_s) v 10 % výšky píku počítáme podle vztahu (2).

$$A_s = (b/a)_{10\%} \quad (2)$$

kde A_s je asymetrický faktor, b je pološířka v 10 % výšky píku odlehlá od těžiště píku [mm], a je pološířka v 10 % výšky píku přilehlá k těžišti píku [mm].

Důležitým parametrem při hodnocení výsledné separace je také rozlišení píků analytů R_s . V této práci bylo rozlišení vypočítáno pro tři vybrané lipidy ($R_{1,2}$ a $R_{2,3}$). Píky jsou dostatečně oddělené, pokud je hodnota $R_s > 1,5$. Rozlišení počítáme podle vztahu uvedeném v rovnici (3) [74].

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R,j} - t_{R,i})}{(w_i - w_j)} \quad (3)$$

kde R_s je rozlišení, $t_{R,j}$ je retenční čas j-tého analytu [min], $t_{R,i}$ je retenční čas i-tého analytu [min], w_i je šířka píku při základně i-tého analytu [min] a w_j je šířka píku při základně j-tého analytu.

Při HPLC separacích neutrálních lipidů, např. triacylglycerolů, byla zjištěna souvislost s retencí daného analytu a počtem uhlíků a dvojných vazeb v molekulách vázaných mastných kyselin. Toto chování je vyjádřeno vztahem pro výpočet počtu ekvivalentů uhlíků (ECN – „Equivalent Carbon Number“). ECN vypočítáme podle vztahu (4) [40, 75].

$$ECN = CN - 2DB \quad (4)$$

kde ECN je počet ekvivalentů uhlíků, CN je celkový počet uhlíků v acylech lipidů a DB je celkový počet dvojných vazeb v acylech lipidů.

Molekuly MGDG a DGDG obsahují ve své struktuře dvě mastné kyseliny a zároveň polární cukry (**obr. 1, obr. 2**, str. 11). Pokud by se jednalo pouze o diacylglyceroly bez polárních funkčních skupin, retenční chování by odpovídalo hodnotám ECN. V této diplomové práci bylo studováno, jak polární cukerné zbytky ovlivní retenční chování, tj. zda budou MGDG a DGDG eluovat ve shodě s ECN či nikoliv.

2.11 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce je izolovat MGDG a DGDG z rostlinného materiálu, nalézt co nejvhodnější podmínky pro jejich chromatografickou separaci, popsat jejich retenční chování a optimalizovat podmínky pro jejich hmotnostně spektrometrickou detekci.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol (BHT) – čistý
Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (vanilin) – $\geq 98\%$,
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Aceton – p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- Acetonitril – Chromasolv[®] pro HPLC, gradient grade,
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Deionovaná voda – Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)
- Ethylacetát – čistý, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Hexan – SupraSolv[®] pro plynovou chromatografii, Merck (Darmstadt, Německo)
- Hydroxid sodný – p.a., Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný – p.a., Lachema (Brno, ČR)
- Acetylchlorid – $\geq 98\%$, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Chloroform – p.a. stabilizovaný 1% ethylalkoholu, Penta (Chrudim, ČR)
- Jodid draselný – p.a., Lachema (Brno, ČR)
- Kyselina mravenčí – 98%, Lachema (Brno, ČR)
- Kyselina octová – 99%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Kyselina sírová – 96%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Methanol – HPLC super gradient, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Mravenčan amonný – p.a., Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Natrium-2-[2-(4-aminofenyl)-1,3-benzothiazol-6-yl]-6-methyl-1,3-benzothiazol-7-sulfonát (primulin) – 50 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Octan amonný – $>99\%$, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Octan sodný – p.a., Lachema (Brno, ČR)
- Propan-2-ol – Lichrosolv[®] pro HPLC, gradient grade, Merck (Darmstadt, Německo)
- Síran hořečnatý bezvodý – $\geq 98\%$, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Standard DGDG – 95%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), kat.č. D4651

- Standard MGDG – 95%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), kat.č. G9523
- Uhličitan stříbrný – 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.2 Použitý materiál

- Silikagel pro kolonovou chromatografii a filtrace⁴⁾ – velikost částic: 30-60 µm, aktivace 25 hodin při 120 °C, desaktivace 12 % vody, Merck (Darmstadt, Německo)
- Silikagel pro TLC – Silikagel 60G, Merck (Darmstadt, Německo)
- Extrahovaná vata – Soxhletova extrakce 10 hodin směsí chloroform:methanol (1:1, v/v)
- Vyžíhaný síran hořečnatý – 12 hodin při 140 °C

3.3 Studované rostliny

- Tis červený (*Taxus baccata*), čeleď tisovité
- Blahovičnick kulatoplodý (*Eucalyptus globulus*), čeleď myrtovité
- Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), čeleď hluchavkovité

3.4 Přístroje a zařízení

3.4.1 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem

Separace a detekce MGDG a DGDG byla prováděna na kapalinovém chromatografu složeném z čerpadla SpectraSYSTEM[®] P4000 (Thermo Fischer Scientific, USA), vybaveného odplyňovacím zařízením a automatického dávkovače SpectraSYSTEM[®] AS3000 (Thermo Fischer Scientific, USA). Nastříkováno bylo 5 µl vzorku. Kolona byla temperována v termostatu RT04 (Labio, ČR). K detekci byl použit hmotnostní spektrometr LCQ Fleet s elektrosprejem a 3D iontovou pastí (Thermo Fischer Scientific, USA). Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program Xcalibur, verze 2.0.7 (Thermo Fischer Scientific, USA).

⁴⁾ Tento silikagel byl přidáván při filtraci vzorku přes extrahovanou vatu, cca 1 g.

Pro separaci MGDG a DGDG byla použita kolona NUCLEOSIL[®] C₁₈ (Macherey-Nagel, Německo) vybavená předkolonou Phenomenex C₁₈ (Phenomenex, USA). Základní fyzikálně chemické vlastnosti kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈ jsou uvedeny v **tabulce 4** [76].

Tabulka 4: Základní fyzikálně chemické vlastnosti kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈

vázaná fáze	oktadecyl
endcapping	ano
nosič	silikagel
tvar částic	kulovitý
velikost pórů [Å]	120
délka kolony [cm]	25
vnitřní průměr [mm]	2
průměr částic [μm]	5

3.4.2 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

Pro analýzu methylesterů mastných kyselin získaných transesterifikací DGDG (kapitola 3.5.7, str. 29) byl použit plynový chromatograf Agilent 6890N spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975B s iontovým zdrojem pro elektronovou ionizaci a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Agilent Technologies, USA), vybavený kapilární kolonou Zebron ZB-5-HT (Phenomenex, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 250 μm a tloušťce filmu 0,25 μm. Nastřikován byl 1 μl vzorku pomocí automatického dávkovače Agilent 7683B (Agilent Technologies, USA). Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program Data Analysis (Agilent Technologies, USA).

3.4.3 Další přístroje

- analytické váhy – Mettler-Toledo AB204-S (Greifensee, Švýcarsko)
- pH metr – HI 9321 HANNA Instruments (Rhode Island, USA)
- vakuová odparka – PC 2001 Vario, Vacuumbrand (Wertheim, Německo)
- vodní lázeň – Laborota 4000, Heidolph Instruments (Kelheim, Německo)

3.5 Pracovní postupy

3.5.1 Extrakce lipidů z rostlinného materiálu

Lipidy byly extrahovány postupem vycházejícím z návodu uvedeného na webových stránkách Kansaské univerzity [77]. Izolace byla provedena z 15,6 g čerstvých listů blahovičnicku, 15,6 g čerstvých jehliček tisu a 5,2 g čerstvých listů meduňky. Listy blahovičnicku a meduňky byly natrhány. Jehličky tisu byly nastříhány. Extrakce byla prováděna v Erlenmeyerově baňce. K připraveným listům (jehličkám) bylo přidáno 5 ml 0,01% roztoku BHT v propan-2-olu (w/v). Následovalo zahřívání na vodní lázni při 75 °C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 15 ml chloroformu⁵⁾ a 6 ml deionizované vody. Následovalo třepání jednu hodinu na třepačce. Získaný extrakt byl Pasteurovou pipetou převeden do čisté Erlenmeyerovy baňky. Do extrakční baňky (s listy, jehličkami) byly přidány 4 ml směsi chloroform:methanol (2:1, v/v). Následovalo třepání 30 minut. Získaný extrakt byl přidán do Erlenmeyerovy baňky s extraktem po prvním třepání. Postup s přidavkem 4 ml směsi chloroform:methanol (2:1, v/v) a následným 30 minutovým třepáním a odebráním extraktu byl opakován šestkrát.

Ke spojenému extraktu byly přidány 3 ml roztoku chloridu draselného ve vodě (1 mol/l). Extrakt byl promíchán na Vortexu. Po pěti minutách stání byla Pasteurovou pipetou odsáta horní vrstva. Ke zbylému extraktu byly přidány 3 ml deionizované vody a extrakt byl promíchán na Vortexu. Po pěti minutách stání byla odsáta horní vrstva. Takto získaný extrakt byl umístěn do lednice (5 °C).

Po 24 hodinách stání byla odstraněna nově vytvořená horní vrstva. Ke zbylému extraktu byl přidán vyžíhaný síran hořečnatý a po promíchání na Vortexu byl získaný extrakt přefiltrován ve skleněné kolonce se silikagelem (velikost částic: 30–60 μm) a extrahovanou vatou. Finální extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce (172 mbar, 40 °C). Byly získány cca 4 ml extraktů blahovičnicku, tisu a meduňky. Extrakty byly skladovány v mrazáku (-25 °C).

⁵⁾ Během extrakce byl vždy používán destilovaný chloroform stabilizovaný 1 % ethanolu.

3.5.2 Oddělování pigmentů a lipidů

Oddělování pigmentů a lipidů bylo provedeno postupem využívajícím kolonovou chromatografii na aktivovaném silikagelu [49], 10 g silikagelu (velikost částic: 30-60 μm) bylo smícháno s 200 ml deionizované vody a pH bylo upraveno pomocí NaOH (1 mol/l) na hodnotu 8. Takto upravený silikagel byl čtyřikrát promyt 200 ml deionizované vody. Během každého promývání byla voda odlévána po 20 minutách stání. Následně byl silikagel sušen (110 °C, 20 hodin). Vysušený silikagel byl skladován v exsikátoru. Před použitím byl navážený silikagel (0,7 g) aktivován 2 hodiny při 110 °C.

Dělení pigmentů a lipidů bylo prováděno ve skleněné kolonce s vnitřním průměrem 7 mm. Aktivovaný silikagel byl suspendován ve 3 ml studeného chloroformu (5 °C) a převeden do skleněné kolonky s extrahovanou vatou. Poté byl silikagel promyt 2,8 ml chloroformu. Na takto připravenou kolonku byl nadávkován 1 ml extraktu blahovičnicku, tisu nebo meduňky. Pigmenty byly z kolonky eluovány 13,8 ml směsí chloroform:aceton (4:1, v/v). Lipidy byly eluovány 13,8 ml směsí chloroform:methanol⁶⁾ (1:1, v/v). Přečištěné lipidy byly zakoncentrovány na vakuové odparce (172 mbar, 40 °C). Vzorky lipidů byly uchovávány v mrazáku (-25 °C).

3.5.3 Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Pro preparativní TLC byly používány skleněné destičky (36 x 76 mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck) a 12 % sádry. Destičky byly před použitím předmyty směsí chloroform:methanol (2:1, v/v). Poté byly aktivovány jednu hodinu při 110 °C. K vyvíjení byla použita mobilní fáze chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v) [39]. Vizualizace byla prováděna buď destruktivním způsobem postřikem 0,01% vanilinem v kyselině sírové (w/v) a následným spalováním, nebo nedestruktivním způsobem postřikem 0,05% roztokem primulinu v acetonu (w/v) s následnou vizualizací pod UV lampou při 366 nm. MGDG a DGDG byly ze silikagelu, získaného izolací zón MGDG a DGDG z TLC desek, vymývány ve skleněné kolonce s extrahovanou vatou směsí

⁶⁾ Všechna použitá rozpouštědla obsahovala 50 μg BHT/ml. Byl používán destilovaný chloroform stabilizovaný 1 % ethanolu.

chloroform:methanol (2:1, v/v). Následně byly zakoncentrovány na vakuové odparce (172 mbar, 40 °C), případně pod proudem argonu.

Vzorky DGDG pro HPLC analýzy byly odpařeny do konstantní hmotnosti a následně rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (2:1, v/v). Koncentrace vzorku DGDG z tisu byla 1,14 mg/ml, DGDG z blahovičnicku 1,30 mg/ml a DGDG z meduňky 0,65 mg/ml. Vzorky byly uchovávány v mrazáku (-25 °C).

3.5.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Kolona NUCLEOSIL[®] C₁₈ byla umístěna v termostatu (30 °C). Před měřením byla promývána 30 minut čistým methanolem a 20 minut mobilní fází odpovídající složení na začátku dané analýzy. Mezi analýzami byla kolona promývána 15 minut čistým methanolem. Pro měření s hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet byla používána metoda s parametry uvedenými v **tabulce 5**. Výsledné analýzy byly prováděny v režimu závislého skenu. Nastavení závislého skenu hmotnostního spektrometru je uvedeno v **tabulce 6**.

Tabulka 5: Nastavení hmotnostního spektrometru LCQ Fleet

napětí na sprejovací kapiláře [kV]	4,5
teplota kapiláry [°C]	275
napětí na tubusové čočce [V]	79,9
napětí na kapiláře [V]	4,4
průtok nosného plynu [AU]	35,0
průtok zmlžovacího plynu [AU]	5,0
rozsah spektra [<i>m/z</i>]	150-2000

Tabulka 6: Nastavení závislého skenu hmotnostního spektrometru LCQ Fleet

minimální signál [impulzy]	100
počet iontů vybraných pro fragmentaci	1
typ aktivace	CID
izolační šířka [<i>m/z</i>]	1,0
normalizovaná kolizní energie [%]	30

3.5.5 Měření MGDG a DGDG přímým vstupem, měření amonných aduktů DGDG

Přítomnost MGDG a DGDG ve frakcích získaných TLC izolací (kapitola 3.5.3, str. 27) byla ověřena z hmotnostních spekter. Dávkovány byly 2 μl vzorku. Mobilní fáze byla složena ze 65 % acetonitrilu a 35 % vody (v/v).

Při měření fragmentačních spekter amonných aduktů DGDG byl vzorek 1(a):1(b) (v/v) kontinuálně zaváděn do hmotnostního spektrometru ze stříkačky o objemu 100 μl , průtok byl 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. (a) byl vzorek DGDG ze standardu (0,60 mg/ml), (b) byla směs methanol:mravenčan amonný (10 mmol/l vodný roztok) v poměru 1:1 (v/v). Data byla sbírána jednu minutu. Nastavení hmotnostního spektrometru bylo shodné s parametry uvedenými v tabulce 5 a 6. Normalizovaná kolizní energie pro amonné adukty byla 26 %.

3.5.6 Měření mrtvého času

Mrtvý čas kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈ byl změřen nástřikem vodného roztoku jodidu draselného (1 mmol/l). Nástřikováno bylo 5 μl roztoku. Složení mobilní fáze na začátku analýzy odpovídalo 65 % acetonitrilu a 35 % vody (v/v), přírůstek acetonitrilu odpovídal 0,7 %/min. Průtok mobilní fáze byl 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Měření bylo provedeno třikrát.

3.5.7 Transesterifikace DGDG

Transesterifikace byla provedena postupem vycházejícím z publikace K. Stránského [67]. Pro transesterifikace bylo použito 0,24 mg vzorku DGDG z tisu a 0,80 mg vzorku DGDG z blahovičnicku. Vzorek DGDG z tisu byl ve skleněné ampuli smíchán se 106 μl směsi chloroform:methanol (3:2, v/v). Poté bylo přidáno 14 μl acetylchloridu. Ampule byla zatavena. Následovalo zahřívání na vodní lázni při 70 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidáván uhličitan stříbrný do neutrální reakce na pH papírek. Vzniklé methylestery byly v zatavené ampuli skladovány v mrazáku (-25 °C). U DGDG z blahovičnicku byl postup analogický. Transesterifikace DGDG z meduňky nebyla pro nedostatek vzorku provedena.

Methylestery mastných kyselin DGDG byly analyzovány pomocí GC/MS (kapitola 3.4.2, str. 25). Při analýze methylesterů mastných kyselin DGDG z tisu byl použit dělicí poměr 1:1, u methylesterů mastných kyselin DGDG z blahovičnicku byl použit dělicí poměr 3:1. Dávkován byl 1 μ l vzorku. Teplota injektoru byla 220 °C. Jako mobilní fáze bylo použito helium o průtoku 1 ml/min.

Počáteční teplota pece s kolonou Zebron ZB-5-HT byla 40 °C. Tato teplota byla udržována po dobu jedné minuty, poté byla zvyšována rychlostí 50 °C/min na teplotu 140 °C. Od teploty 140 °C do 320 °C se zvyšovala rychlostí 3 °C/min. Teplota 320 °C byla udržována dalších pět minut. Doba analýzy byla 68 minut.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Extrakce lipidů z rostlinného materiálu

Ze surových rostlinných extraktů, které byly získány postupem uvedeným v kapitole 3.5.1 (str. 26) byly preparativní TLC izolovány frakce MGDG a DGDG (kapitola 3.5.3, str. 27). Jejich přítomnost ve frakcích byla ověřena z hmotnostních spekter. Hmotnostní spektra frakcí byla charakteristická vysokou odezvou u m/z , které neodpovídaly požadovaným MGDG a DGDG. Požadované MGDG a DGDG byly viditelné v šumu. Získané vzorky MGDG a DGDG byly vizuálně nažloutlé, proto byla provedena izolace pigmentů, které eluují při zvolených podmínkách v čele TLC desky, jak je vidět na **obr. 5** (str.33). Z hmotnostních spekter frakce pigmentů bylo zjištěno, že nežádoucí ionty identifikované v hmotnostních spektrech frakcí MGDG a DGDG mají původ právě v pigmentech a dalších nečistotách se sudým m/z .

Frakce MGDG a DGDG získané TLC izolací surových rostlinných extraktů nebyly vhodné pro další separace v HPLC. Ze surového rostlinného extraktu bylo nutné nejprve odstranit pigmenty a následně provést TLC izolaci MGDG a DGDG.

4.2 Oddělování pigmentů a lipidů

Pro oddělení pigmentů a lipidů ze surového rostlinného extraktu byl použit upravený postup vycházející z publikace CH.A. Bratta [49] a využívající kolonovou chromatografii na aktivovaném silikagelu. Postupem uvedeným v kapitole 3.5.2 (str.27) se podařilo oddělit pigmenty od DGDG. MGDG byly detekovány v přečištěných extraktech pouze u vzorku blahovičnicku. Ve vzorcích tisu a meduňky byly MGDG detekovány ve frakci pigmentů, MGDG eluovaly spolu s pigmenty. Přečištěné extrakty se u tisu a meduňky jeví jako bezbarvé, zatímco u blahovičnicku zůstal extrakt i po kolonové chromatografii mírně nažloutlý.

Použitý extrakční postup byl upraven. Cílem bylo získat alespoň extrakt s co nejmenším obsahem pigmentů, který by obsahoval i MGDG. V publikaci [49] je uvedeno, že eluce pigmentů i lipidů by měla být prováděna desetinásobkem objemu silikagelu na koloně. V našem případě byl objem silikagelu 1,38 ml. Eluce pigmentů by tedy měla být provedena 13,8 ml směsí chloroform:aceton (4:1, v/v). Při dalším pokusu

byl postup při oddělování pigmentů a lipidů stejný kromě fáze, použité pro eluci pigmentů. V tomto kroku bylo k eluci použito pouze 2,5 ml směsi chloroform:aceton (4:1, v/v). Tento objem odpovídal vizuálně odbarvení silikagelu s 1 ml extraktu tisu (meduňky) z jasně zelené barvy na světle žlutou barvu. Zbytek extraktu byl ze silikagelu eluován směsí určenou k eluci lipidů (13,8 ml směsi chloroform:methanol 1:1, v/v).

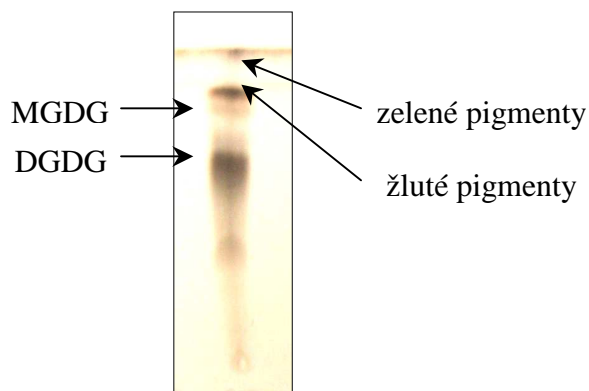
Ani po úpravě postupu nebyly MGDG v přečištěných extraktech tisu a meduňky detekovány. Při použití 2,5 ml směsi na eluci barviv nebyla kolonka se silikagelem promyta ani dvěma objemy silikagelu a již došlo k eluci MGDG s pigmenty. Důvodem může být méně polární charakter molekul MGDG oproti DGDG, čímž může docházet k eluci MGDG již při použití směsi chloroform:aceton (4:1, v/v), která je určená k eluci pigmentů. Naopak DGDG mají díky přítomnosti druhé galaktosy v molekule polárnější charakter, takže jejich oddělení od pigmentů je snazší.

Pro oddělení pigmentů a lipidů byly vyzkoušeny i další směsi chloroformu a acetonu k eluci pigmentů (2,5 ml 4:2; 4:3; 1:4, v/v). Na kolonku byl dávkován extrakt pigmentů z tisu a ani v tomto případě se nepodařilo MGDG oddělit.

4.3 Preparativní tenkovrstvá chromatografie MGDG a DGDG

Pro TLC izolace MGDG a DGDG bylo testováno několik mobilních fází. Jako testovací vzorek byl zprvu používán surový extrakt tisu (kapitola 3.5.1, str. 26). Snahou bylo najít mobilní fázi, ve které by se lépe podařilo oddělit pigmenty a MGDG, u kterých se nepodařilo kolonovou chromatografií na silikagelu odstranit pigmenty ani částečně. Identifikace izolovaných MGDG a DGDG byla prováděna z hmotnostních spekter.

Testovanou mobilní fází byla nejprve směs chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v) [39], která se v publikacích objevuje nejčastěji. V této mobilní fázi eluují pigmenty v čele. V těsné blízkosti za pigmenty eluují MGDG a jejich kontaminace pigmenty je tedy výraznější než u DGDG. Samotná separace MGDG a DGDG je v této mobilní fázi dostatečná, jak je vidět na **obr. 5**. Hodnoty retardačních faktorů R_F pro jednotlivé skvrny jsou uvedeny v **tabulce 7**.



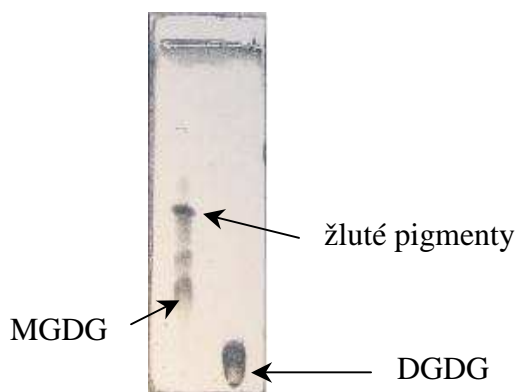
Obr. 5: TLC deska po separaci MGDG a DGDG ze surového extraktu tisu; mobilní fáze: chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v); vizualizace: 0,01% vanilin v k. sírové (w/v), spalování.

Tabulka 7: Hodnoty R_F skvrn zelených pigmentů, žlutých pigmentů, MGDG a DGDG při TLC izolaci v mobilní fázi o složení chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v)

skvrna	R_F
zelené pigmenty	1,0
žluté pigmenty	0,8
MGDG	0,7
DGDG	0,5

Dále byly testovány mobilní fáze obsahující chloroform a methanol. Jako testovací vzorek byly používány již izolované frakce MGDG a DGDG z tisu. Bylo zjištěno, že zvýšením podílu methanolu a snížením podílu chloroformu v mobilní fázi dojde k posunu zón MGDG a DGDG do čela. Naopak zvýšením podílu chloroformu a snížením podílu methanolu dochází k dělení zóny MGDG a u zóny DGDG dochází k výraznému rozmývání. Při použití směsi složené z chloroformu a methanolu v poměru 19:1 (v/v) lze frakci MGDG, izolovanou nejprve v mobilní fázi chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v), rozdělit ještě na dalších pět zón.

Mobilní fáze o složení chloroform:methanol (19:1, v/v) byla použita k přečištění frakce MGDG z tisu, získanou v prvním kroku TLC izolace v mobilní fázi chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v). Zóna DGDG zůstává v této mobilní fázi na startu, jak je vidět na **obr. 6**. V **tabulce 8** jsou uvedeny hodnoty R_F skvrn žlutých pigmentů a MGDG.



Obr. 6: TLC deska izolace MGDG a DGDG z tisu; mobilní fáze: chloroform:methanol (19:1, v/v); vizualizace: 0,01% vanilin v k. sírové (w/v); spalování.

Tabulka 8: Hodnoty R_F skvrn žlutých pigmentů a MGDG při TLC izolaci v mobilní fázi o složení chloroform:methanol (19:1, v/v)

skvrna	R_F
žluté pigmenty	0,5
MGDG	0,3

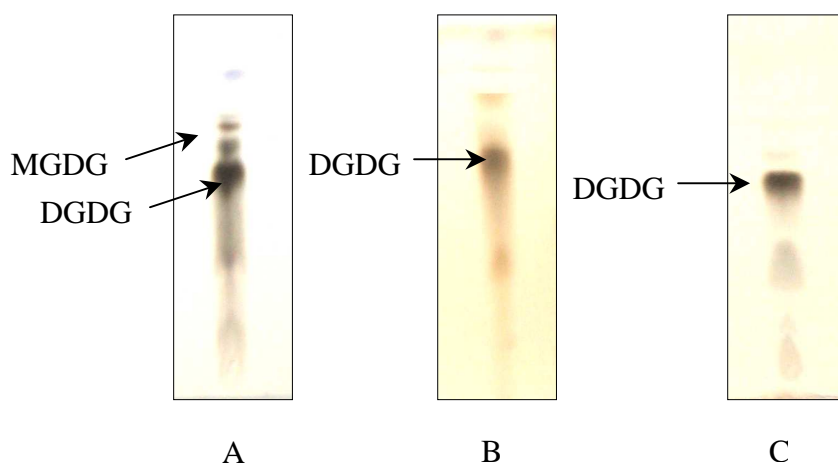
Při identifikaci pěti frakcí získaných TLC izolací frakce MGDG z tisu v mobilní fázi chloroform:methanol (19:1, v/v) bylo zjištěno, že nečistoty se sudým m/z eluují v této mobilní fázi ve všech skvrnách. Pigmenty se od MGDG podařilo oddělit, ale ve vzorcích zůstali nečistoty se sudým m/z .

S cílem zlepšit TLC izolace byly testovány i další mobilní fáze. V mobilních fázích obsahujících aceton nedocházelo k dostatečné separaci. Zóny analytů nebyly odděleny a na TLC desce byla viditelná pouze jedna rozmytá skvrna. Toto chování bylo pozorováno v mobilních fázích o složení aceton:k.octová:voda (100:2:1, v/v/v) [39], 100 % aceton, aceton:k.octová:hexan (100:2:1, v/v/v).

Lepší separace bylo dosaženo v mobilní fázi o složení ethylacetát:propan-2-ol:chloroform:methanol:0,25% KCl (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v) [40]. V tomto případě byly na TLC desce viditelné tři částečně rozmyté skvrny.

Pro zlepšení separace byly zkušeny kombinace testovaných mobilních fází ve 2D TLC uspořádání, ani v tomto případě se nepodařilo separace zlepšit. Použitím testovaných mobilních fází se nepodařilo TLC izolací oddělit pigmenty a další nežádoucí látky od MGDG.

Vzorky DGDG pro HPLC analýzy byly izolovány v mobilní fázi o složení chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v) [39]. Na **obr. 7** jsou vidět výsledné TLC desky po separaci přečištěných lipidů blahovičnicku, tisu a meduňky. U blahovičnicku byla zjištěna přítomnost MGDG ve skvrně 2 ($R_F = 0,7$) a DGDG ve skvrně 4 ($R_F = 0,5$). U tisu byly DGDG nalezeny ve skvrně 3 ($R_F = 0,5$) a u meduňky ve skvrně 2 ($R_F = 0,5$).



Obr. 7: TLC desky po separaci MGDG a DGDG z přečištěných lipidů blahovičnicku (A), tisu (B) a meduňky (C); mobilní fáze: chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v); vizualizace: 0,01% vanilin v k. sírové (w/v), spalování.

TLC izolací přečištěných lipidů blahovičnicku, tisu a meduňky v mobilní fázi o složení chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v) [39] byly získány vzorky DGDG. Vzorek MGDG byl získán pouze z blahovičnicku. Separční podmínky TLC se nepodařilo optimalizovat pro izolace MGDG ze surových extraktů. I za použití 2D TLC zůstaly ve frakci MGDG nečistoty. HPLC separací této frakce MGDG bylo možné identifikovat pouze nejintenzivnější MGDG. Podmínky izolace MGDG bude nutné dále optimalizovat.

4.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie DGDG s hmotnostní detekcí

4.4.1 Separace DGDG v systému acetonitril/voda

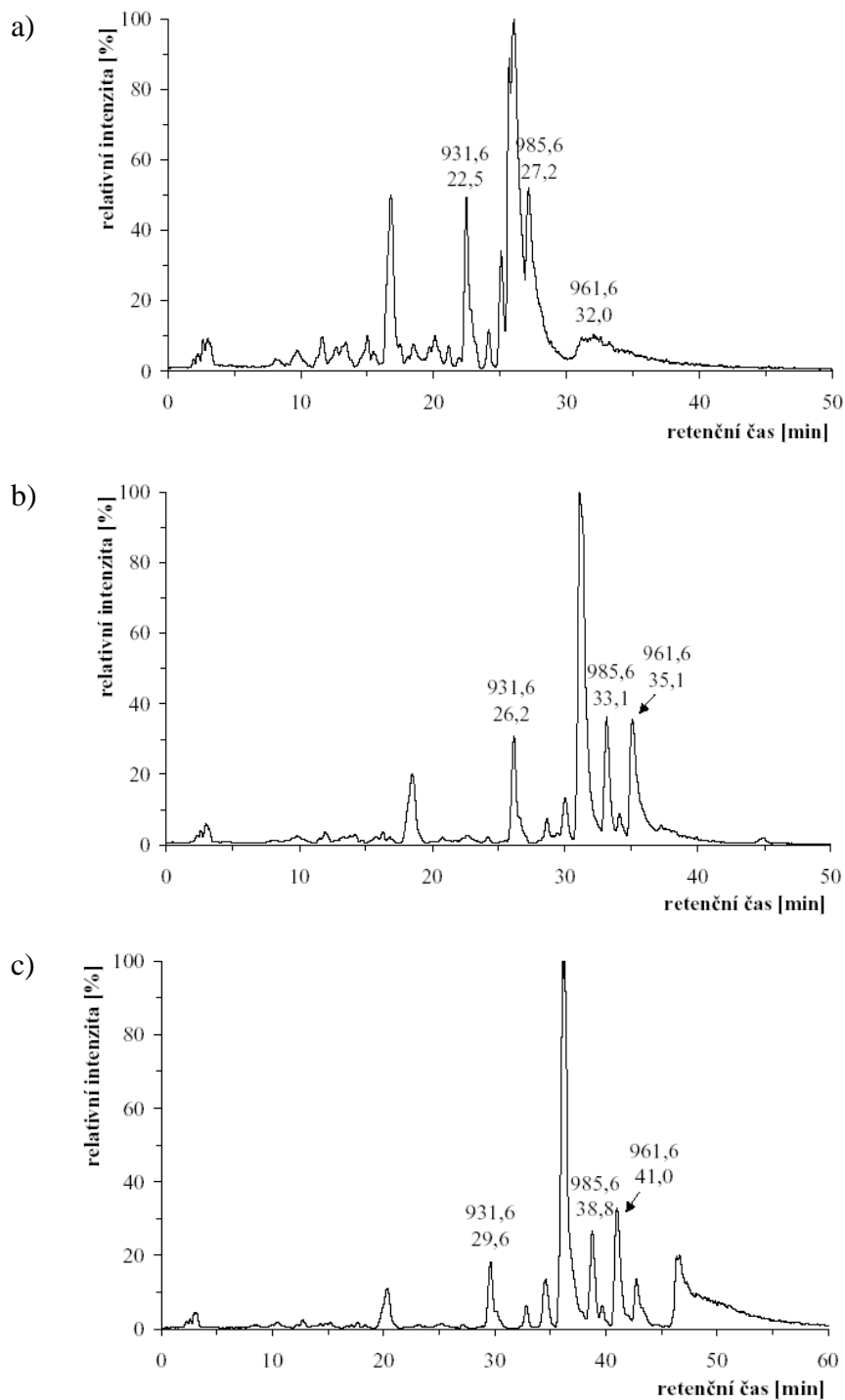
Nejprve byly testovány mobilní fáze obsahující acetonitril a vodu. Bylo navrženo několik lineárních gradientů, které se lišily svojí strmostí (b_g), tj. rychlostí přírůstku koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi (**tabulka 9**). Počáteční složení mobilní fáze bylo navrženo na základě předběžných experimentů (65 % acetonitril, 35 % voda). Jako stacionární fáze byl použit NUCLEOSIL[®] C₁₈. Podmínky měření jsou uvedeny v kapitole 3.4.1 (str. 24).

Tabulka 9: Přehled testovaných gradientů acetonitrilu

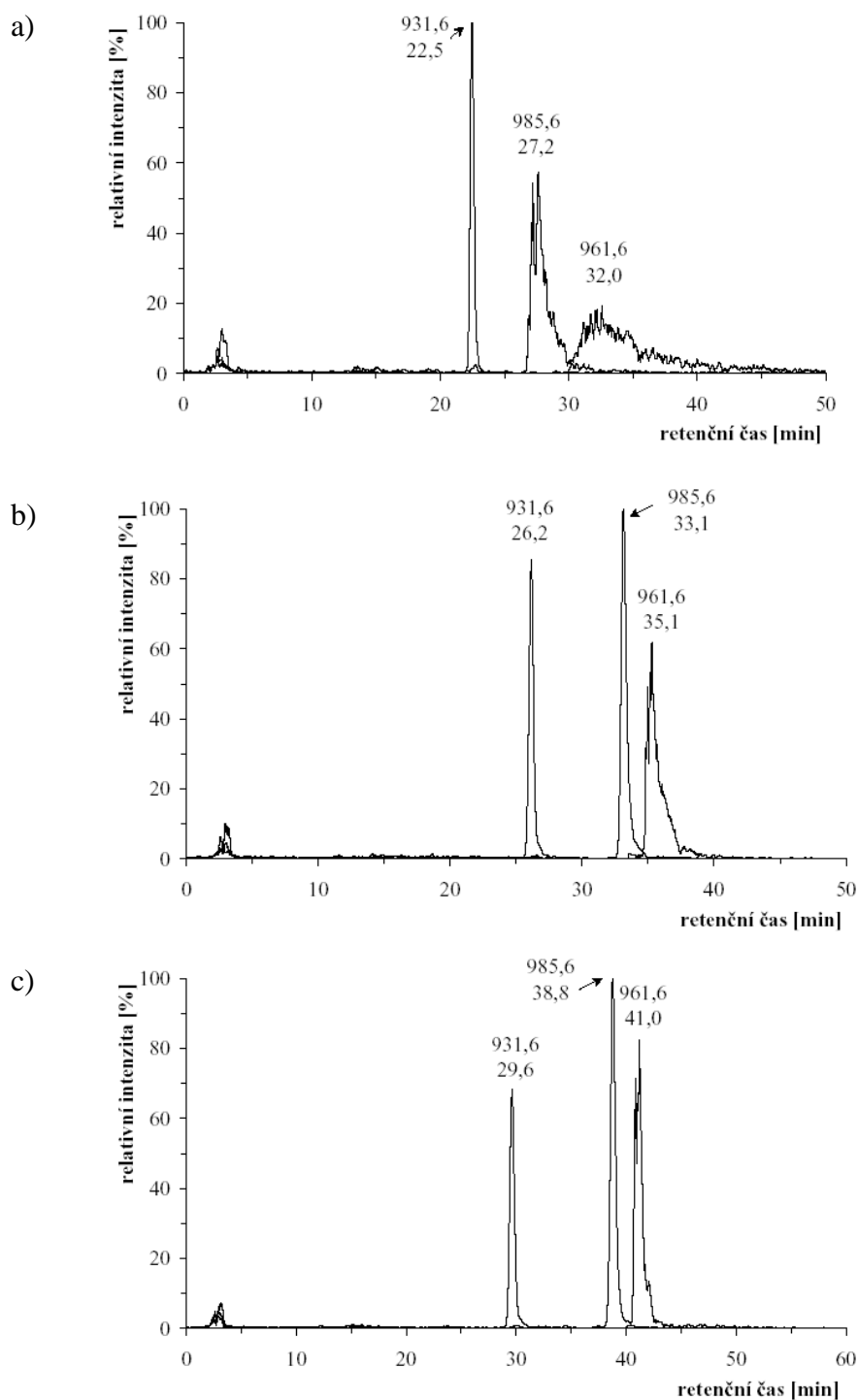
číslo gradientu	t [min]	acetonitril [%]	voda [%]	b_g [%/min]
1	0	65	35	1,8
	20	100	0	
	50	100	0	
2	0	65	35	1,2
	30	100	0	
	50	100	0	
3	0	65	35	0,9
	40	100	0	
	60	100	0	

K testování těchto chromatografických podmínek byl použit vzorek DGDG z tisu (1,14 mg/ml). Na **obr. 8** jsou uvedeny „basepeak“⁷⁾ chromatogramy za použití gradientů 1-3 a na **obr. 9** jsou uvedeny rekonstruované „basepeak“ chromatogramy pro tři vybrané lipidy, DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 [M+Na]⁺); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 [M+Na]⁺) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 [M+Na]⁺).

⁷⁾ „Basepeak“ chromatogram je chromatogram rekonstruovaný z nejintenzivnějších signálů v každém MS skenu.



Obr. 8: „Basepeak“ chromatogramy DGDG z tisu (1,14 mg/ml); složení mobilní fáze odpovídá: a) gradientu 1, b) gradientu 2, c) gradientu 3 (**tabulka 9**, str. 36); nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu: 5,0 AU; rozsah spektra: 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulsů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.



Obr.9: Rekonstruované „basepeak“ chromatogramy pro tři vybrané lipidy. DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[M+Na]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[M+Na]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$). Složení mobilní fáze odpovídá: a) gradientu 1, b) gradientu 2, c) gradientu 3 (**tabulka 9**, str. 36), nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.

Ze záznamů je patrné, že strmost gradientu ovlivňuje vzájemnou separaci píků. Podrobnější analýza ukázala, že strmost gradientu má také vliv na počet látek, které z kolony eluují. U gradientu s pomalejším přírůstkem acetonitrilu v mobilní fázi (gradient 3) bylo v chromatogramu zjištěno větší množství píků než u gradientů rychlých (gradienty 1 a 2). Navíc ani 100 % obsah acetonitrilu v mobilní fázi nezaručil eluci všech DGDG z kolony. Některé DGDG zůstaly na koloně zadržovány, což vedlo k málo reprodukovatelným záznamům při opakovaných nástřicích. V **tabulce 10** je uvedeno vyhodnocení charakteristik vybraných analytů pro gradient 1-3. Hodnocena byla šířka píků, tvar píků (faktor asymetrie) a rozlišení mezi vybranými dvojicemi analytů (1-DGDG 16:3, 18:3; 2-DGDG 18:3, 20:4; 3-DGDG 18:3, 18:2).

Tabulka 10: Vyhodnocení chromatografických charakteristik analytů pro gradienty 1–3, t_R je retenční čas analytu, t'_R je redukovaný retenční čas analytu, $w_{10\%}$ je šířka píku analytu v 10 % výšky, $A_s(10\%)$ je faktor asymetrie v 10 % výšky píku, R_s je rozlišení píků analytů

gradient 1	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	22,5	20,4	0,7	2,0	$R_{1,2} = 2,0$
985,6	2	27,2	25,1	3,0	4,2	
961,6	3	32,0	29,9	10,7	4,8	$R_{2,3} = 0,7$
gradient 2	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	26,2	24,1	0,8	2,0	$R_{1,2} = 3,6$
985,6	2	33,1	31,0	1,0	3,0	
961,6	3	35,1	33,0	2,5	4,0	$R_{2,3} = 0,8$
gradient 3	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	29,6	27,5	0,8	2,0	$R_{1,2} = 5,6$
985,6	2	38,8	36,7	1,2	3,0	
961,6	3	41,0	38,9	1,8	3,0	$R_{2,3} = 1,1$

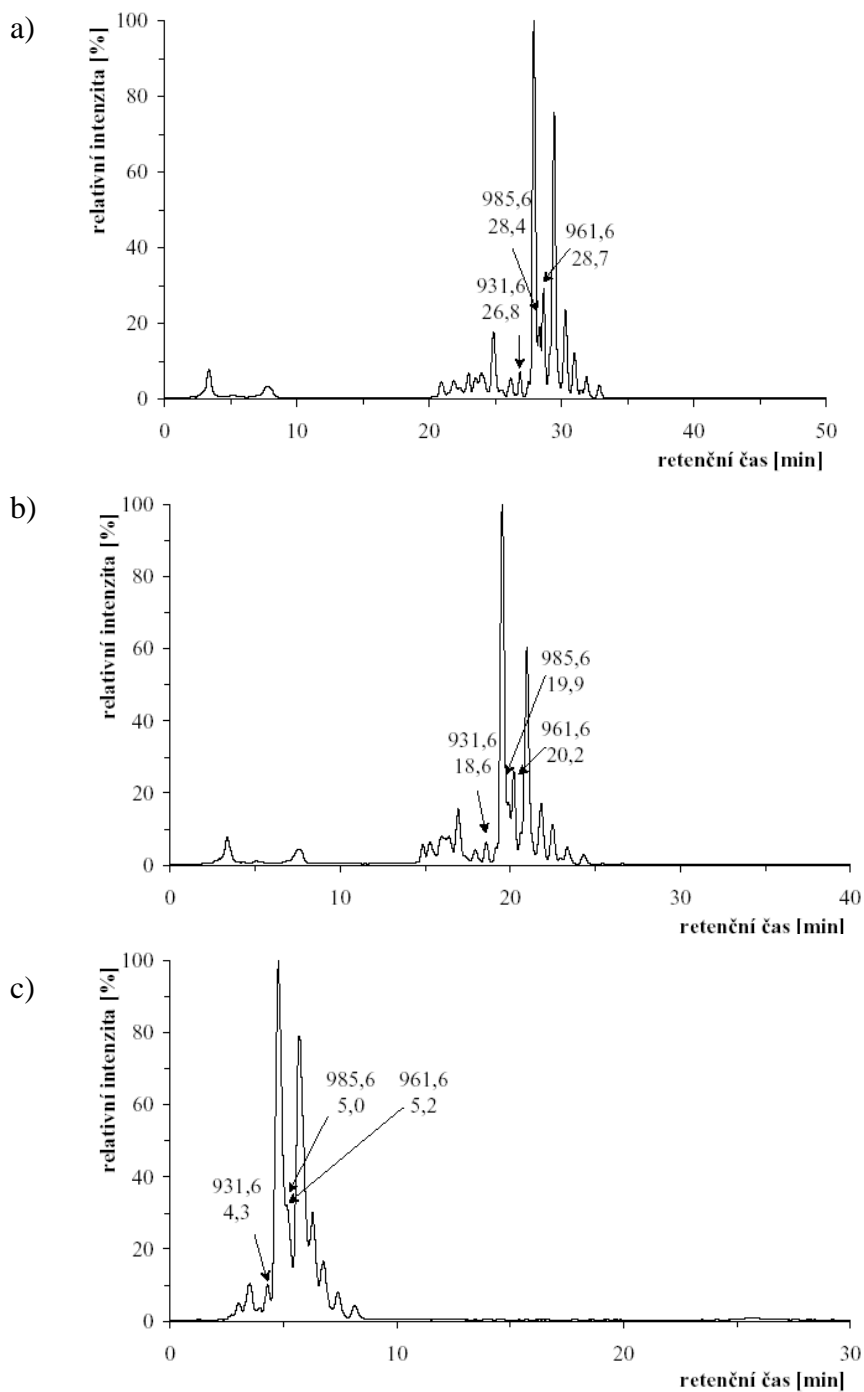
Z uvedených parametrů je zřejmé, že retenční chování analytu číslo 1 – DGDG 18:3, 16:3 (m/z 931,6 $[M+Na]^+$) bylo změnou gradientu ovlivněno výrazně méně, než u dalších dvou analytů (DGDG – 18:3, 20:4 o m/z 985,6 $[M+Na]^+$ a DGDG – 18:3, 18:2 o m/z 961,6 $[M+Na]^+$). U pomalejšího gradientu acetonitrilu (gradient 3) došlo oproti rychlejšímu gradientu (gradient 1) ke zvýšené retenci všech analytů a následně ke zlepšení výsledných separací. Bylo dosaženo zmenšení šířky píků, snížení faktoru asymetrie a lepšího rozlišení. K eluci všech DGDG došlo až při použití čistého methanolu, proto byly dále testovány mobilní fáze obsahující methanol.

4.4.2 Separace DGDG v systému methanol/voda

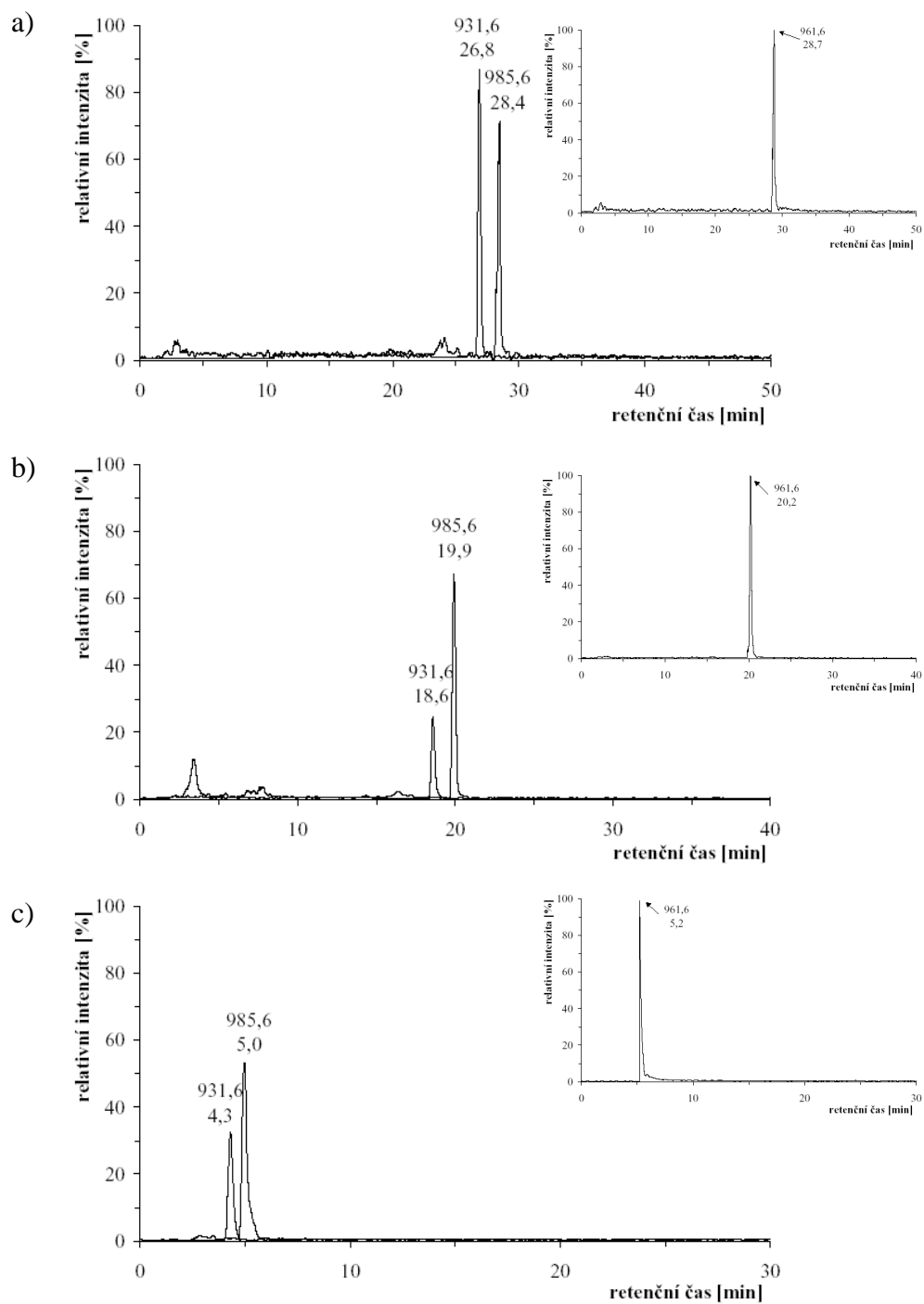
Pro studium retenčního chování DGDG v systému methanol/voda byl použit gradient 1 (**tabulka 11**), vycházející z gradientu acetonitrilu. Z chromatogramů na **obr. 10** je zřejmé, že k úplné eluci DGDG dochází až když mobilní fáze obsahuje 100 % methanolu, což bylo potvrzeno i gradientem 2 (**tabulka 11** a **obr. 10 b**). V mobilní fázi obsahující pouze 100 % methanolu (mobilní fáze 3) došlo k eluci všech DGDG do sedmé minuty. Na **obr. 10** jsou uvedeny „basepeak“ chromatogramy za použití mobilních fází 1-3 a na **obr. 11** jsou uvedeny rekonstruované „basepeak“ chromatogramy pro tři vybrané lipidy, DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[M+Na]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[M+Na]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$).

Tabulka 11: Přehled testovaných mobilních fází methanolu

mobilní fáze	t [min]	methanol [%]	voda [%]	b_g [%/min]
1	0	65	35	1,8
	20	100	0	
	50	100	0	
2	0	65	35	3,5
	10	100	0	
	40	100	0	
3	0	100	0	–
	30	100	0	



Obr. 10: „Basepeak“ chromatogramy DGDG z tisu (1,14 mg/ml); složení mobilní fáze odpovídá: a) mobilní fázi 1, b) mobilní fázi 2, c) mobilní fázi 3 (**tabulka 11**, str. 40); nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra: 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.



Obr. 11: Rekonstruované „basepeak“ chromatogramy pro tři vybrané lipidy. DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[M+Na]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[M+Na]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$). Složení mobilní fáze odpovídá: a) mobilní fázi 1, b) mobilní fázi 2, c) mobilní fázi 3 (**tabulka 11**, str. 40); nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.

Z chromatogramů je zřejmé, že v systému methanol/voda dochází k úplné eluci analytů až když obsah methanolu stoupne na 100 %. U gradientu 1 byla voda přítomna v mobilní fázi do 20. minuty analýzy, analyty eluují po 20. minutě. U gradientu 2 byla v mobilní fázi voda přítomna do 10. minuty, analyty eluují od 15. minuty. U mobilní fáze číslo 3 (čistého methanolu) je eluce DGDG velmi rychlá. Methanol vykazuje při použití kolony NUCLEOSIL® C₁₈ velkou eluční sílu pro studované DGDG. Je tedy i vhodným rozpouštědlem pro promývání kolony mezi analýzami. V **tabulce 12** jsou uvedeny chromatografické charakteristiky vybraných DGDG.

Tabulka 12: Vyhodnocení chromatografických charakteristik analytů pro gradienty 1–3, t_R je retenční čas analytu, t'_R je redukovaný retenční čas analytu, $w_{10\%}$ je šířka píku analytu v 10 % výšky, $A_s(10\%)$ je faktor asymetrie v 10 % výšky píku, R_s je rozlišení píků analytů

mobilní fáze 1	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	26,8	24,7	0,5	1,0	$R_{1,2} = 1,8$
985,6	2	28,4	26,3	0,5	1,6	
961,6	3	28,7	26,6	0,8	2,0	$R_{2,3} = 0,3$
mobilní fáze 2	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	18,6	16,5	0,6	2,0	$R_{1,2} = 1,6$
985,6	2	19,9	17,8	0,6	2,0	
961,6	3	20,2	18,1	0,6	2,0	$R_{2,3} = 0,2$
mobilní fáze 3	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	4,3	2,2	0,6	1,5	$R_{1,2} = 0,8$
985,6	2	5,0	2,9	0,7	1,7	
961,6	3	5,2	3,1	0,4	2,0	$R_{2,3} = 0,2$

Z uvedených charakteristik vyplývá, že DGDG eluují v systému methanol/voda ve stejném pořadí jako v systému acetonitril/voda (kapitola 4.4.1, str. 39). Při použití čistého methanolu jsou DGDG na koloně zadržovány minimálně a eluují do 7. minuty.

4.4.3 Separace DGDG v systému ethanol/voda a propan-2-ol/voda

Dále bylo testováno retenční chování DGDG v systému ethanol/voda a propan-2-ol/voda s předpokladem větší eluční síly pro studované analyty. V systému ethanol/voda a propan-2-ol/voda docházelo při používaných podmínkách HPLC k překročení tlakového limitu kolony. Tento jev byl výraznější v systému propan-2-ol/voda. V systému ethanol/voda byl testován obdobný gradient jako v systémech acetonitril/voda a methanol/voda.

Tedy: 0. minuta65 % ethanolu 35 % vody

20. minuta100 % ethanolu

50. minuta100 % ethanolu

Z důvodu vysokého tlaku na koloně byl použit nižší průtok mobilní fáze (130 $\mu\text{l}/\text{min}$). V **tabulce 13** je uvedeno porovnání retenčního chování vybraných lipidů, DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), v systému methanol/voda a ethanol/voda.

Tabulka 13: Porovnání retenčního chování vybraných DGDG v systému

1-methanol/voda a 2-ethanol/voda, t_R je retenční čas analytu, $w_{10\%}$ je šířka píku analytu v 10 % výšky, $A_s(10\%)$ je faktor asymetrie v 10 % výšky píku, R_s je rozlišení píků analytů

1	číslo analytu	t_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	26,8	0,5	1,0	$R_{1,2} = 1,8$
985,6	2	28,4	0,5	1,6	
961,6	3	28,7	0,8	2,0	$R_{2,3} = 0,3$
2	číslo analytu	t_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	26,3	0,8	1,0	$R_{1,2} = 2,0$
985,6	2	28,6	1,0	1,2	
961,6	3	28,9	1,0	1,0	$R_{2,3} = 0,2$

Pozn. Redukovaný retenční čas (t'_R) nebyl vypočítán, protože mrtvý čas kolony byl určen pouze pro průtok mobilní fáze 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Porovnáním retenčních časů vybraných analytů lze konstatovat, že ethanol má silnější eluční vlastnosti než methanol. Analýza v systému ethanol/voda byla měřena za sníženého průtoku (130 $\mu\text{l}/\text{min}$), výsledné retenční časy jsou však prakticky shodné. Ethanol má větší eluční sílu pro studované analyty, ale při jeho použití dochází k překročení tlakového limitu kolony. Proto byly dále testovány mobilní fáze obsahující pouze acetonitril, methanol a vodu.

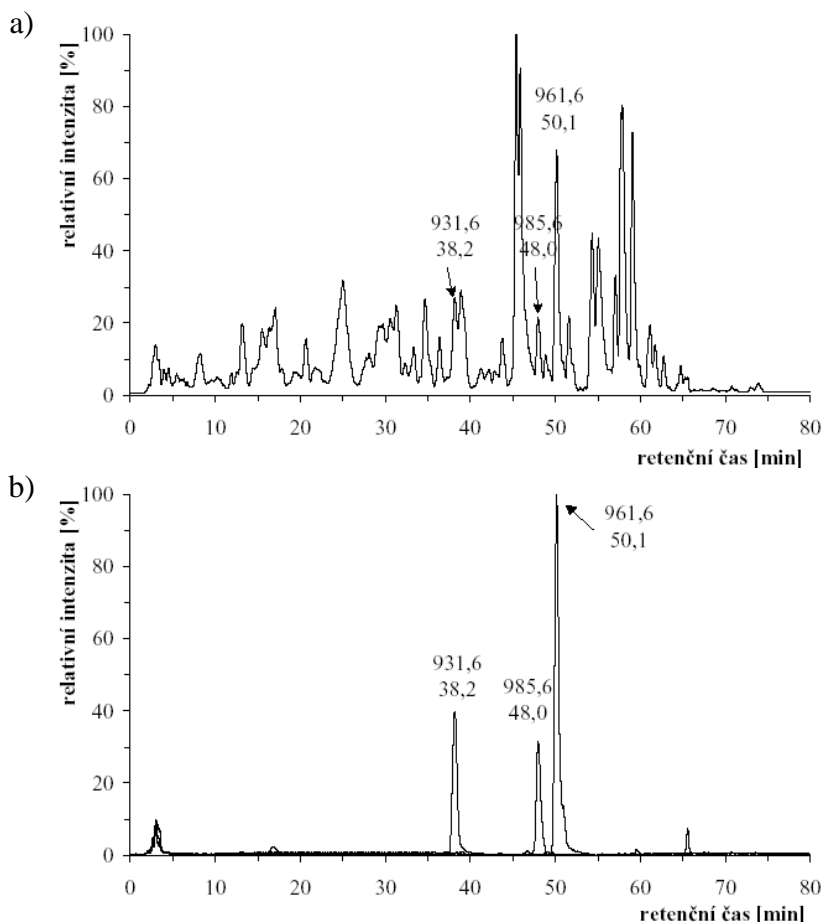
4.4.4 Separace DGDG v systému acetonitril/methanol/voda

Pro dosažení co nejlepší separace studovaných DGDG byl vytvořen gradient složený z acetonitrilu, methanolu a vody. V rámci tohoto separačního systému byla provedena řada experimentů, při nichž bylo optimalizováno složení mobilní fáze. Z těchto experimentů vyplývá, že methanol musí být zapojen do gradientu na konci analýzy a jeho přírůstek musí být rychlý. Pomalý přírůstek methanolu způsobuje rozmývání píků. Zároveň je vhodné přidávat methanol v malém množství do gradientu už od začátku analýzy. Ve výsledném gradientu byl acetonitril zapojen od začátku analýzy s přírůstkem 0,7 %/min. Od 50. minuty byl do gradientu zapojen ve větší míře methanol s přírůstkem 8 %/min. Průběh výsledného gradientu pro separaci DGDG v systému acetonitril/methanol/voda je uveden v **tabulce 14**.

Tabulka 14: Gradient pro separaci DGDG v systému acetonitril/methanol/voda.

t [min]	acetonitril [%]	voda [%]	methanol [%]
0	65	35	0
50	80	0	20
60	0	0	100
80	0	0	100

S využitím tohoto gradientu byly analyzovány všechny vzorky DGDG (tis, blahovičnick a meduňka). Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.7 (str. 51) a přílohách A a B. Na **obr. 12** je uveden „basepeak“ chromatogram DGDG z tisu za použití ternárního gradientu acetonitrilu/methanolu/vody a rekonstruovaný „basepeak“ chromatogram pro tři vybrané lipidy, DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Vyhodnocení charakteristik pro vybrané píky je uvedeno v **tabulce 15**.



Obr. 12: a) „Basepeak“ chromatogram DGDG z tisů (1,14 mg/ml), b) Rekonstruovaný „basepeak“ chromatogram pro tři vybrané lipidy. DGDG 16:3, 18:3 (m/z 931,6 $[M+Na]^+$); DGDG 18:3, 20:4 (m/z 985,6 $[M+Na]^+$) a DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$). Složení mobilní fáze odpovídá ternárnímu gradientu acetonitrilu/methanolu/vody (tabulka 14, str. 45); nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra: 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.

Ternární gradient acetonitrilu/methanolu/vody má nejlepší separační vlastnosti v rámci systémů mobilních fází studovaných v této diplomové práci. Studované DGDG eluují v tomto gradientu téměř po celou dobu analýzy (4.–62. minuta) a dochází k separaci velkého počtu DGDG. V binárních systémech acetonitril/voda a methanol/voda jsou separace méně účinné.

Tabulka 15: Vyhodnocení chromatografických charakteristik vybraných DGDG pro ternární gradient acetonitrilu/methanolu/vody (tabulka 14, str. 45), t_R je retenční čas analytu, t'_R je redukovaný retenční čas analytu, $w_{10\%}$ je šířka píku analytu v 10 % výšky, $A_s(10\%)$ je faktor asymetrie v 10 % výšky píku, R_s je rozlišení píků analytů

$[M+Na]^+$	číslo analytu	t_R [min]	t'_R [min]	$w_{10\%}$ [min]	$A_s(10\%)$	R_s
931,6	1	38,2	36,1	1,2	2,0	$R_{1,2} = 4,9$
985,6	2	48,0	45,9	1,2	2,0	
961,6	3	50,1	48,0	1,6	3,0	$R_{2,3} = 0,8$

Z rekonstruovaných chromatogramů je zřejmé, že píky analytů zůstávají podobně nesymetrické, jako v ostatních testovaných gradientech a mobilních fázích. Hodnota faktoru asymetrie v 10 % výšky píku byla při separacích DGDG na koloně NUCLEOSIL[®] C₁₈ větší než jedna. Studované DGDG pravděpodobně interagují se silanolovými skupinami stacionární fáze kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈.

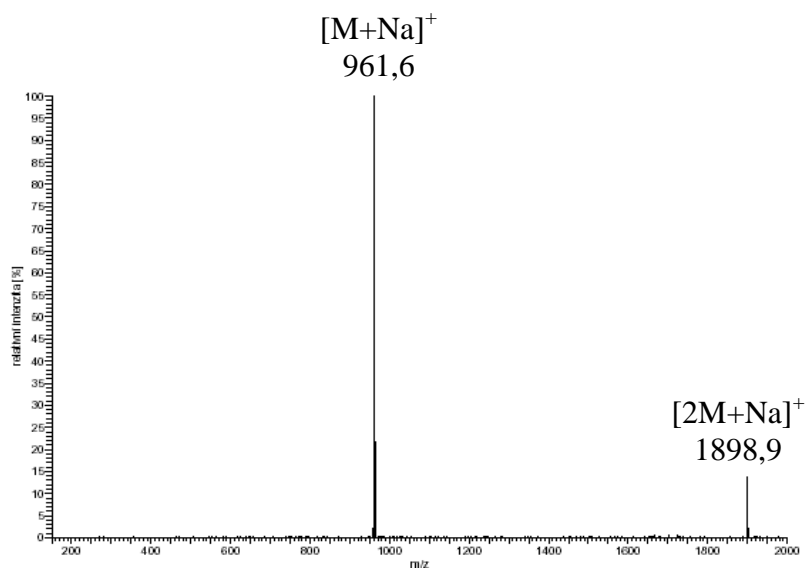
4.4.5 Měření mrtvého času

Postupem uvedeným v kapitole 3.5.6 (str. 29) bylo provedeno měření mrtvého času kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈. Použitý vodný roztok jodidu draselného (1 mmol/l) tvořil za podmínek separace, tzn. počáteční složení mobilní fáze 65 % acetonitril a 35 % voda, hlavní klastrové ionty typu $[KI(CH_3CN)_nH]^+$ a $[KI(HI)_2(CH_3CN)_nH]^+$. Podle těchto klastrových iontů byl identifikován pík odpovídající t_M . Mrtvý čas kolony NUCLEOSIL[®] C₁₈ je při průtoku mobilní fáze 200 μ l/min $2,10 \pm 0,01$ minuty.

4.5 Hmotnostní spektra DGDG

Ve shodě s publikacemi [52, 54, 62] byly za podmínek měření, uvedených v kapitole kapitola 3.5.5 (str. 29) identifikovány v hmotnostních spektrech sodné adukty DGDG, tedy $[M+Na]^+$. Příklad hmotnostního spektra DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$) je uveden na **obr. 13**.

Kromě aduktu $[M+Na]^+$ je ve spektru viditelný i adukt o m/z 1898,9, který odpovídá dimeru, tedy $[2M+Na]^+$. Vznik dimerů je možné ovlivnit nastavením iontového zdroje a koncentrací vzorku.



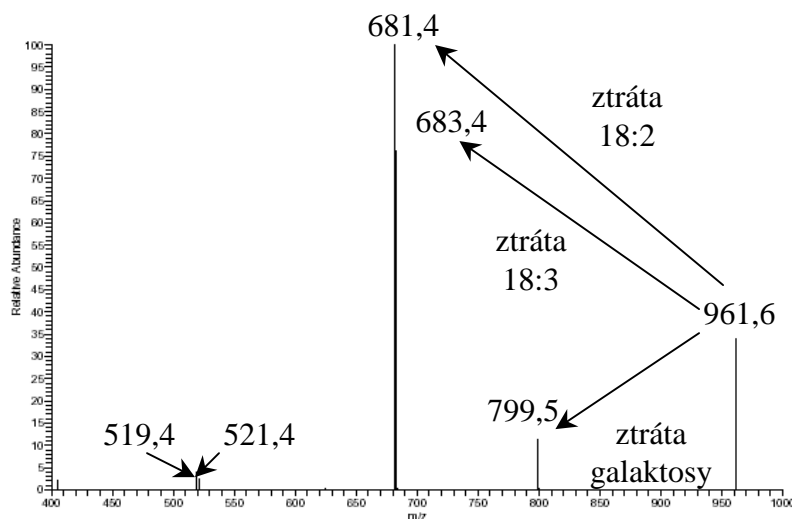
Obr. 13: Hmotnostní spektrum DGDG (18:3, 18:2 m/z 961,6 $[M+Na]^+$); vzorek DGDG tis (1,14 mg/ml); nástřik vzorku: 2 μ l; složení mobilní fáze: 65 % acetonitril, 35 % voda; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra: 150-2000 m/z .

Pro identifikaci DGDG, které se vzájemně liší obsahem mastných kyselin byla použita kolizemi indukovaná fragmentace (CID) ve 3D iontové pasti (kapitola 2.7., str. 18). Fragmentace DGDG separovaných v HPLC byly prováděny v režimu závislého skenu pouze u nejintenzivnějšího iontu ve spektru. Při optimalizaci nastavení závislého skenu byla testována i fragmentace dvou nejintenzivnějších iontů ve spektru a fragmentace s vyloučením izotopických píků. V obou případech byla výsledná hmotnostní spektra nepřehledná a složení mastných kyselin DGDG nebylo možné z těchto spekter jednoznačně identifikovat. Hlavním důvodem je pravděpodobně nízká koncentrace analytů.

Fragmentace analytů je možné provádět také v iontovém zdroji (kapitola 2.7, str. 19). V tomto případě vstupují do hmotnostního analyzátoru již fragmenty analytů. Fragmentace ve zdroji se u studovaných vzorků DGDG neosvědčila, výsledná

hmotnostní spektra byla nepřehledná. Příčinou je pravděpodobně komplexnost vzorků studovaných DGDG.

Ve fragmentačních spektrech sodných aduktů DGDG získaných fragmentací nejintenzivnějšího iontu ve spektru s využitím závislého skenu byly ve shodě s publikacemi [52, 54, 64] viditelné fragmenty odpovídající odštěpení galaktosy $[M+Na-162]^+$ a fragmenty odpovídající odštěpení jednotlivých mastných kyselin, $[M+Na-R_1COOH]^+$ a $[M+Na-R_2COOH]^+$. Navíc byly ve fragmentačních spektrech DGDG za uvedených podmínek měření (kapitola 3.5.4, str. 28) viditelné fragmenty odpovídající sodným aduktům s jednou molekulou galaktosy a jednou mastnou kyselinou. Fragmentační hmotnostní spektrum DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$) je uvedeno na **obr. 14**.

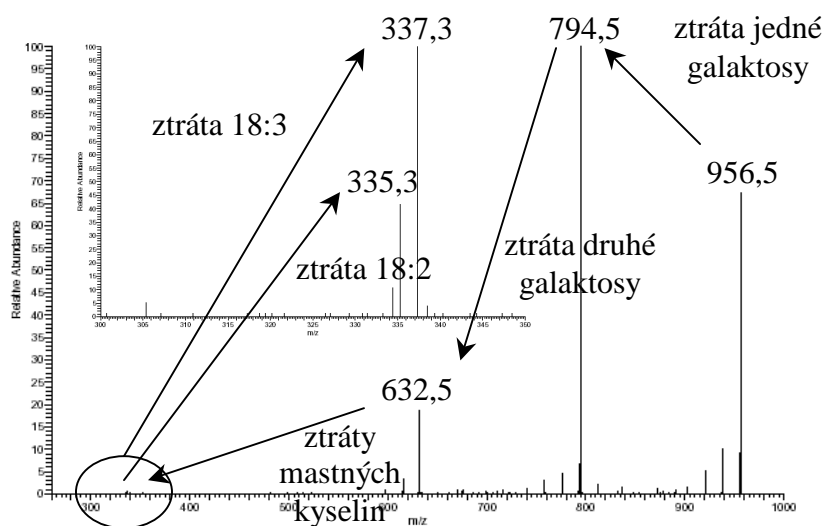


Obr. 14: Fragmentační hmotnostní spektrum DGDG (18:3, 18:2 m/z 961,6 $[M+Na]^+$); vzorek DGDG tis (1,14 mg/ml); nástřik vzorku: 2 μ l; složení mobilní fáze: 65 % acetonitril, 35 % voda; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu: 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení MS/MS: typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %.

Ve fragmentačním hmotnostním spektru DGDG 18:3, 18:2 (m/z 961,6 $[M+Na]^+$) bylo identifikováno pět hlavních fragmentů. Fragment o m/z 799,5 odpovídá ztrátě galaktosy, fragmenty o m/z 683,4 a 681,4 odpovídají ztrátám mastných kyselin, tedy 18:3 a 18:2. Fragmenty o m/z 519,4 a 521,4 odpovídají ztrátám jedné galaktosy a jedné mastné kyseliny.

4.6 Fragmentace amonných aduktů DGDG

Pro zjištění rozdílů mezi fragmentacemi sodných a amonných aduktů byla měřena i fragmentační spektra amonných aduktů DGDG. Studované DGDG vytvářejí amonné adukty $[M+NH_4]^+$ po přidavku amonných iontů do mobilní fáze. Ve fragmentačních hmotnostních spektrech amonných aduktů DGDG byly identifikovány jiné typy fragmentů, než u aduktů sodných (kapitola 4.5, str. 47). V publikaci D. Paccettiho [55] jsou ve fragmentačních spektrech amonných aduktů DGDG viditelné pouze protonované fragmenty s lichou hodnotou m/z . Měřením amonných aduktů DGDG na hmotnostním spektrometru LCQ Fleet byly ve fragmentačních spektrech viditelné fragmenty s amonnými ionty (sudá hodnota m/z) a protonované fragmenty (lichá hodnota m/z). Fragmentační hmotnostní spektrum DGDG 18:3, 18:2 (m/z 956,5 $[M+NH_4]^+$) je uvedeno na **obr. 15**.



Obr. 15: Fragmentační hmotnostní spektrum DGDG (18:3, 18:2 m/z 956,5 $[M+NH_4]^+$); měření: vzorek 1(a):1(b) (v/v) byl kontinuálně zaváděn do hmotnostního spektrometru ze stříkačky o objemu 100 μ l, průtok byl 3 μ l/min; (a) byl vzorek DGDG standard (0,60 mg/ml); (b) byla směs methanol:vodný roztok mravenčanu amonného (10 mmol/l) 1:1 (v/v); sběr dat byl prováděn jednu minutu; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV, teplota kapiláry: 275 $^{\circ}$ C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení MS/MS: typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 26 %.

Ve fragmentačním hmotnostním spektru amonného aduktu DGDG (18:3, 18:2 m/z 956,5 $[M+NH_4]^+$) byly identifikovány čtyři hlavní fragmenty, přičemž amonné fragmenty odpovídají ztrátám galaktos (m/z 794,5 a 632,5) a protonované fragmenty odpovídají ztrátám mastných kyselin (m/z 335,3 a 337,3).

4.7 Vyhodnocení HPLC/MS analýz studovaných DGDG z tisu blahovičnicku a meduňky

Separace DGDG byla provedena v systému RP-HPLC na silikagelové koloně s chemicky vázanou oktadecylovou stacionární fází NUCLEOSIL[®] C₁₈ a s využitím lineárního gradientu v systému acetonitril/methanol/voda:

- 0. minuta65 % acetonitril, 35 % voda
- 50. minuta80 % acetonitril, 20 % methanol
- 60. minuta100 % methanol
- 80. minuta100 % methanol.

Nastříkováno bylo 5 μ l vzorku, průtok mobilní fáze byl 200 μ l/min a kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Identifikace DGDG hmotnostní spektrometrií byla provedena měřením fragmentačních spekter sodných aduktů. Fragmentován byl nejintenzivnější iont v daném skenu za uvedených podmínek hmotnostní detekce: napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Závislý sken hmotnostního spektrometru byl nastaven pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu v daném skenu, jehož intenzita signálu dosáhne hodnoty alespoň sta impulzů. Ionty byly fragmentovány kolizně indukovanou fragmentací (CID) s použitím normalizované kolizní energie 30 %. Izolační šířka byla nastavena na hodnotu 1,0 m/z .

Ve vzorku DGDG z tisu (1,14 mg/ml) bylo identifikováno 64 DGDG ve 49 pících. Ve vzorku DGDG z blahovičnicku (1,30 mg/ml) bylo identifikováno 57 DGDG ve 40 pících (**příloha A**). Ve vzorku DGDG z meduňky (0,65 mg/ml) bylo identifikováno 35 DGDG ve 25 pících (**příloha B**).

Všechny DGDG se nepodařilo vzájemně oddělit. Důvodem je velká komplexnost analyzovaných vzorků, kde je pravděpodobná přítomnost různých izomerů DGDG.

Na přítomnost izomerů lze usuzovat z píků, u kterých je viditelné částečné dělení DGDG a v jejichž fragmentačních spektrech jsou identifikovány stejné mastné kyseliny. Intenzita fragmentů, které odpovídají odštěpovaným mastným kyselinám, je u některých analytů stejná (intenzivnější je vždy fragment odpovídající odštěpení stejné mastné kyseliny) a u některých analytů je intenzita odlišná. V **tabulce 16** je uvedeno vyhodnocení HPLC/MS analýzy pro DGDG z tisu. Na **obr. 16** (str. 54) je uveden výsledný „basepeak“ chromatogram.

Tabulka 16: Vyhodnocení HPLC/MS analýzy pro DGDG z tisu,

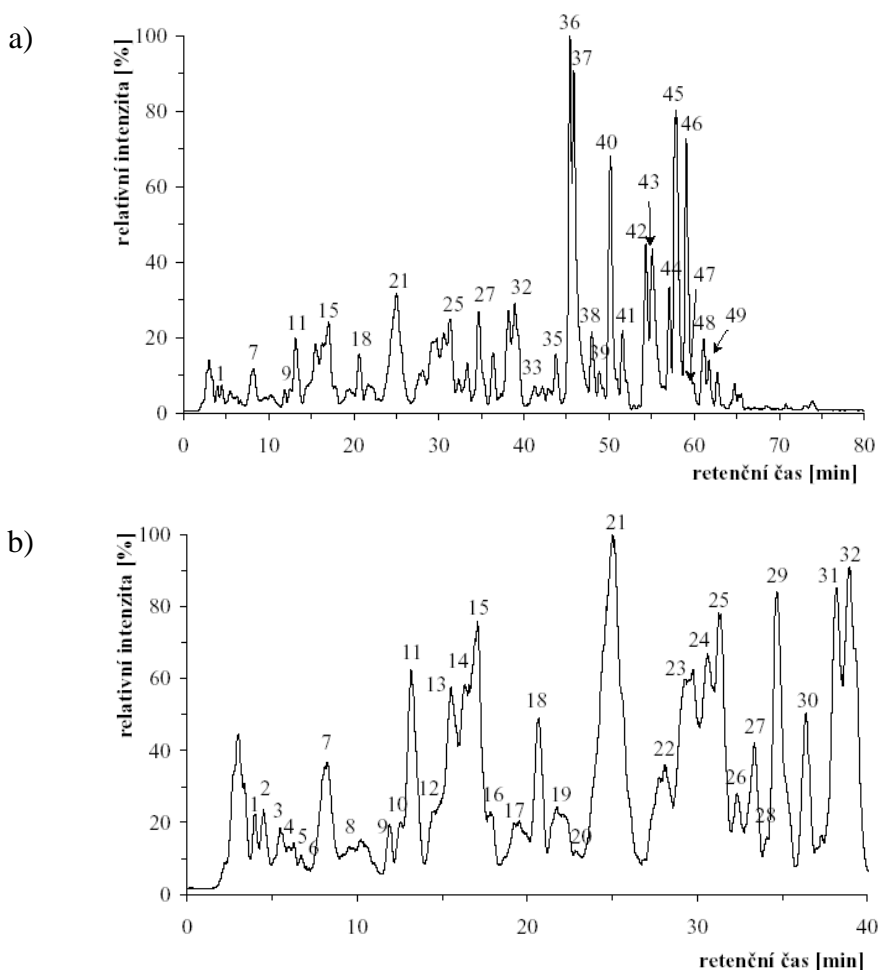
t_R je retenční čas analytu, t'_R je redukovaný retenční čas analytu, $[M+Na]^+$ je hodnota m/z sodného aduktu DGDG, M je molekulová hmotnost DGDG, CN:DB je poměr celkového počtu uhlíků a celkového počtu dvojných vazeb v acylech lipidu, ECN je počet ekvivalentů uhlíků

t_R [min]	t'_R [min]	$[M+Na]^+$	M [g/mol]	Mastné kyseliny		CN:DB	ECN	Číslo píku
3,9	1,8	937,6	914,6	14:2	20:1	34:3	28	1
4,5	2,4	1023,6	1000,6	20:1	20:1	40:2	36	2
4,7	2,6	935,6	912,6	14:2	20:2	34:4	26	2
5,4	3,3	1021,6	998,6	20:1	20:2	40:3	34	3
5,9	3,8	1007,6	984,6	19:2	20:1	39:3	33	4
6,3	4,2	909,6*	886,6*	14:0*	18:3	32:3	26	5
6,6	4,5	909,6*	886,6*	14:0	18:3*	32:3	26	5
6,8	4,7	941,6*	918,6*	17:5*	18:3	35:8	19	6
7,1	5,0	941,6*	918,6*	17:5	18:3*	35:8	19	6
8,2	6,1	853,6	830,6	10:0	18:3	28:3	22	7
9,8	7,7	921,6	898,6	15:1	18:3	33:4	25	8
11,9	9,8	887,6	864,6	14:0	16:0	30:0	30	9
12,5	10,4	893,6	870,6	13:1	18:3	31:4	23	10
13,1	11,0	905,6	882,6	14:2	18:3	32:5	22	11
14,4	12,3	991,6*	968,6*	18:3	20:1*	38:4	30	12
15,5	13,4	991,6*	968,6*	18:3	20:1*	38:4	30	13
16,2	14,1	991,6*	968,6*	18:3	20:1*	38:4	30	14
17,0	14,9	991,6*	968,6*	18:3	20:1*	38:4	30	15
17,8	15,7	991,6*	968,6*	18:3*	20:1	38:4	30	16
18,5	16,4	899,6	876,6	15:1	16:0	31:1	29	17
19,6	17,5	933,6*	910,6*	16:2	18:3*	34:5	24	17
19,6	17,5	857,6	834,6	12:1	16:0	28:1	26	17
20,8	18,7	989,6*	966,6*	18:3	20:2*	38:5	28	18
21,7	19,6	989,6*	966,6*	18:3*	20:2	38:5	28	19
22,1	20,0	989,6*	966,6*	18:3	20:2*	38:5	28	19
22,9	20,8	989,6*	966,6*	18:3*	20:2	38:5	28	20

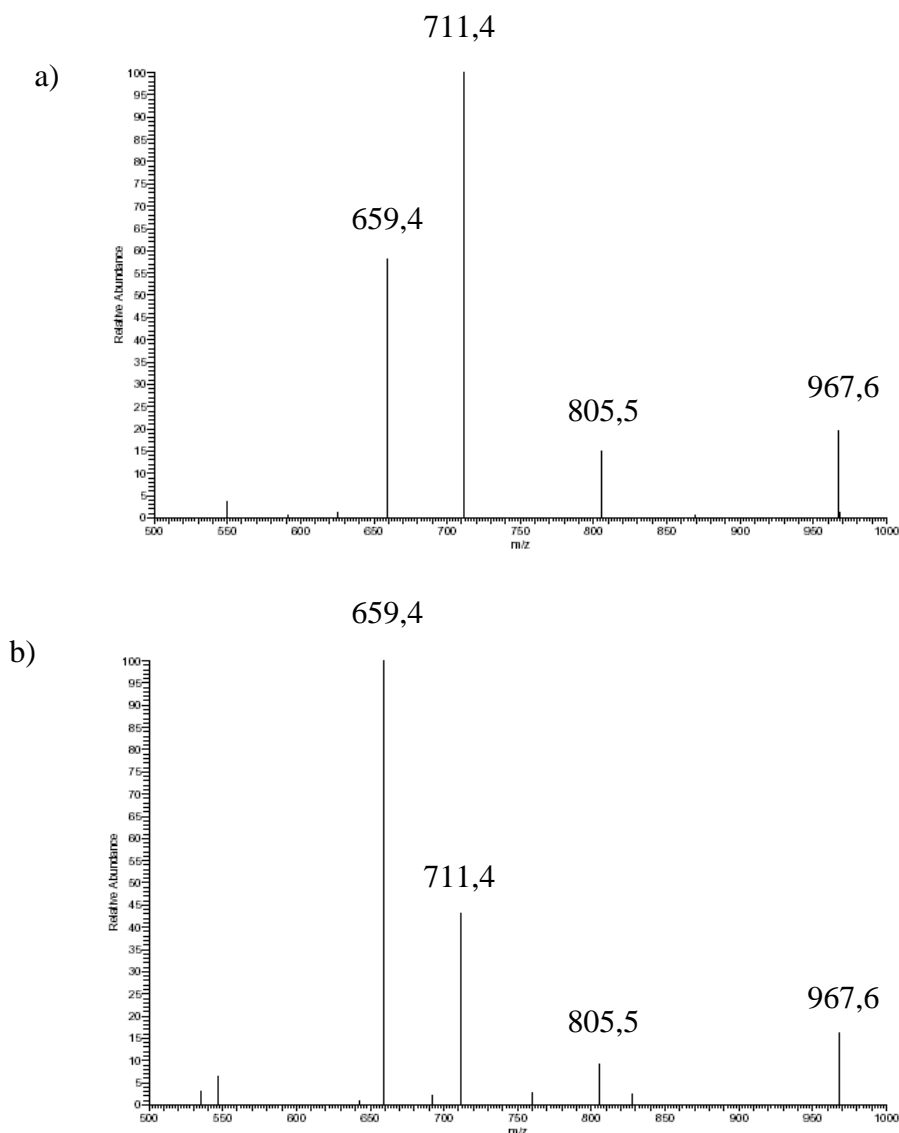
t_R [min]	t'_R [min]	$[M+Na]^+$	M [g/mol]	Mastné kyseliny		CN:DB	ECN	Číslo píku
25,0	22,9	975,6*	952,6*	18:3	19:2*	37:5	27	21
25,6	23,5	883,6	860,6	14:2	16:0	30:2	26	21
28,2	26,1	969,6*	946,6*	16:0*	20:1	36:1	34	22
29,5	27,4	969,6*	946,6*	16:0*	20:1	36:1	34	23
30,6	28,5	969,6*	946,6*	16:0*	20:1	36:1	34	24
31,3	29,2	969,6*	946,6*	16:0*	20:1	36:1	34	25
32,3	30,2	975,6*	952,6*	18:3	19:2*	37:5	27	26
33,3	31,2	967,6*	944,6*	16:0	20:2*	36:2	32	27
34,0	31,9	911,6	888,6	16:0	16:2	32:2	28	28
34,7	32,6	967,6*	944,6*	16:0*	20:2	36:2	32	29
35,3	33,2	967,6*	944,6*	16:0	20:2*	36:2	32	29
36,4	34,3	967,6*	944,6*	16:0*	20:2	36:2	32	30
38,2	36,1	931,6	908,6	16:3	18:3	34:6	22	31
39,0	36,9	953,6*	930,6*	16:0*	19:2	35:2	31	32
40,7	38,6	951,6*	928,6*	16:0	19:3*	35:3	29	33
41,2	39,1	951,6*	928,6*	16:0*	19:3	35:3	29	33
42,2	40,1	951,6*	928,6*	16:0*	19:3	35:3	29	34
43,7	41,6	933,6*	910,6*	16:2	18:3*	34:5	24	35
43,7	41,6	933,6	910,6	16:3	18:2	34:5	24	35
44,3	42,2	953,6*	930,6*	16:0	19:2*	35:2	31	35
45,4	43,3	959,6*	936,6*	18:3	18:3	36:6	24	36
45,8	43,7	959,6*	936,6*	18:3	18:3	36:6	24	37
48,0	45,9	985,6	962,6	18:3	20:4	38:7	24	38
48,9	46,8	935,6	912,6	16:1	18:3	34:4	26	39
48,9	46,8	935,6	912,6	16:2	18:2	34:4	26	39
50,1	48,0	961,6	938,6	18:2	18:3	36:5	26	40
51,6	49,5	987,6	964,6	18:3	20:3	38:6	26	41
52,1	50,0	987,6	964,6	18:2	20:4	38:6	26	41
54,2	52,1	963,6	940,6	18:2	18:2	36:4	28	42
54,3	52,2	937,6*	914,6*	16:0	18:3*	34:3	28	42
55,0	52,9	937,6*	914,6*	16:0*	18:3	34:3	28	43
57,0	54,9	951,6	928,6	17:0	18:3	35:3	29	44
57,8	55,7	939,6*	916,6*	16:0	18:2*	34:2	30	45
57,8	55,7	939,6*	916,6*	16:0*	18:2	34:2	30	45
59,1	57,0	965,6	942,6	18:3	18:0	36:3	30	46
60,0	57,9	953,6	930,6	17:0	18:2	35:2	31	47
61,1	59,0	941,6	918,6	16:0	18:1	34:1	32	48
61,7	59,6	967,6	944,6	18:2	18:0	36:2	32	49

* jsou označeny pravděpodobné izomery, stejnou značkou je označena i mastná kyselina, jejíž fragment má ve spektru vyšší intenzitu

Dělení pravděpodobných izomerů je lépe viditelné na zvětšeném chromatogramu DGDG z tisu pro 0.-40. minutu (**obr. 16, b**). U DGDG (18:3, 20:1 m/z 991,6 $[M+Na]^+$), které eluují od 14.-17. minuty, byl ve spektru vždy intenzivnější fragment, odpovídající odštěpení mastné kyseliny 20:1. Naopak u DGDG (16:0, 20:2 m/z 967,6 $[M+Na]^+$) byl ve 33. minutě intenzivnější fragment, odpovídající odštěpení kyseliny 20:2. Ve 34. minutě byl ve spektru intenzivnější fragment, odpovídající odštěpení kyseliny 16:0 (**obr. 17, str. 55**).



Obr. 16: a) Celkový „basepeak“ chromatogram DGDG z tisu (1,14 mg/ml); b) „Basepeak“ chromatogram DGDG z tisu pro 0.-40. minutu; složení mobilní fáze: 0. minuta...65 % acetonitril, 35 % voda; 50. minuta...80 % acetonitril, 20 % methanol; 60. minuta...100 % methanol; 80. minuta...100 % methanol; nástřik vzorku: 5 μ l; kolona: NUCLEOSIL[®] C₁₈; průtok mobilní fáze: 200 μ l/min; termostat: 30 °C; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV; teplota kapiláry: 275 °C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení závislého skenu pro fragmentaci nejintenzivnějšího iontu ve spektru – minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %. Identifikace píků: dle **tabulky 16** vyhodnocení HPLC/MS analýzy pro DGDG z tisu str. 52.



Obr. 17: Fragmentační hmotnostní spektra DGDG (16:0, 20:2 m/z 967,6 $[M+Na]^+$) z tišu; a) 967,6 z 27. píku (33. minuta); b) 967,6 z 29. píku (34. minuta); nástřik vzorku: 5 μ l; složení mobilní fáze: 65 % acetonitril, 35 % voda; podmínky hmotnostní detekce – napětí na sprejovací kapiláře: 4,5 kV, teplota kapiláry: 275 $^{\circ}$ C; napětí na tubusové čočce: 79,9 V; napětí na kapiláře: 4,4 V; průtok nosného plynu: 35,0 AU; průtok zmlžovacího plynu 5,0 AU; rozsah spektra 150-2000 m/z . Nastavení MS/MS: minimální počet impulzů: 100; typ fragmentace: CID; izolační šířka: 1,0 m/z ; normalizovaná kolizní energie: 30 %. Identifikace fragmentů: m/z 805,5 – odštěpení galaktosy z DGDG, m/z 711,4 – odštěpení mastné kyseliny 16:0, m/z 659,4 – odštěpení mastné kyseliny 20:2.

Retenční chování DGDG bylo hodnoceno také ve vztahu k ECN (kapitola 2.10, str.21). Vyhodnocením ECN u studovaných analytů je zřejmé, že u DGDG eluce neprobíhá podle tohoto pravidla. Zajímavé je však retenční pořadí od cca 45. minuty, kdy DGDG eluují dle ECN. V té době v mobilní fázi převažuje nebo je přítomen pouze

methanol. Retence DGDG v systému RP-HPLC tedy probíhá jiným mechanismem, než u neutrálních lipidů. Důvodem je pravděpodobně přítomnost galaktos ve studovaných DGDG.

Porovnáním identifikovaných DGDG u blahovičnicku, tisu a meduňky lze konstatovat, že všechny tyto rostliny obsahují v molekulách DGDG převážně osmnácti uhlíkatou nenasycenou mastnou kyselinu se třemi dvojnými vazbami (18:3). Tento fakt potvrzuje, že blahovičník, tis i meduňka patří mezi vyšší rostliny, využívající eukaryotický způsob biosyntézy galaktolipidů. Dále je zřejmé, že ve vzorku DGDG z meduňky, bylo oproti tisu a blahovičnicku identifikováno více DGDG s kratšími mastnými kyselinami (**příloha B**). Ve všech vzorcích DGDG byly identifikovány i neobvyklé mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků. Během celé HPLC/MS analýzy byly v hmotnostních spektrech viditelné podle hodnoty m/z dva až tři další potenciální analyty. Podmínky separace a identifikace DGDG bude nutné ještě dále optimalizovat.

4.8 Analýza mastných kyselin po transesterifikaci

Podle publikace K. Stránského [67] byla provedena transesterifikace vzorku DGDG z tisu a blahovičnicku. Ve hmotnostních spektrech byly identifikovány methylestery mastných kyselin, které se shodovaly s mastnými kyselinami, identifikovanými HPLC/MS analýzou DGDG. V GC chromatogramu bylo identifikováno několik píků, které odpovídaly mastným kyselinám se stejnou molekulovou hmotností. Tento jev potvrzuje předpoklad přítomnosti různých izomerů mastných kyselin a potažmo přítomnost různých izomerů ve studovaných DGDG. V transesterifikační směsi byla identifikována i permethylovaná galaktosa, což potvrzuje přítomnost galaktolipidů ve vzorku.

4.9 Porovnání výsledných separací DGDG s publikacemi

V rámci této práce byla za zvolených podmínek a s využitím gradientu v systému acetonitril/methanol/voda (**tabulka 14**, str.45) provedena separace DGDG standardu pšeničné mouky (0,60 mg/ml). Bylo detekováno 22 různých DGDG v 19 píčích. Složení mastných kyselin DGDG se shoduje s publikacemi [33, 51, 62], navíc bylo nově identifikováno 13 dalších DGDG (**příloha C**), jejichž součástí jsou i předpokládané izomery. V uvedených publikacích bylo identifikováno pět odlišných DGDG, což

potvrzuje nutnost další optimalizace HPLC/MS analýzy, protože m/z odpovídající potenciálním DGDG, které nebyly identifikovány z fragmentačních spekter, jsou v hmotnostních spektrech viditelné. Dle publikací bylo HPLC/MS analýzou standardu DGDG zatím odděleno maximálně 11 různých DGDG. Tato data potvrzují výborné separační schopnosti optimalizovaného gradientu acetonitrilu/methanolu/vody (**tabulka 14**, str. 45) s využitím stacionární fáze NUCLEOSIL[®] C₁₈ a ve spojení s hmotnostní detekcí a využitím elektrospreje a 3D iontové pasti.

5 Závěr

Vzorky galaktolipidů, vhodné pro HPLC/MS analýzy, se podařilo získat pouze u DGDG. Izolace MGDG bude nutné dále optimalizovat. DGDG byly izolovány z listů blahovičnicku a meduňky a z jehliček tisu. Pro HPLC/MS experimenty byly DGDG zbaveny pigmentů postupem využívajícím kolonovou chromatografii na aktivovaném silikagelu. TLC izolace DGDG byly provedeny na aktivovaných TLC deskách se silikagelem, mobilní fází chloroform:methanol:voda (65:25:4, v/v/v).

HPLC separace byly prováděny na koloně NUCLEOSIL[®] C₁₈ za podmínek specifikovaných v kapitole 3.5.4, str. 28. Nejlepších separací bylo dosaženo za podmínek gradientové eluce v systému acetonitril/methanol/voda, přičemž na začátku analýzy byla mobilní fáze složena ze 65 % acetonitrilu a 35 % vody. Na konci analýzy obsahovala mobilní fáze pouze methanol, který zajistil eluci všech DGDG z kolony. Analýzou DGDG z tisu bylo identifikováno 64 DGDG ve 49 pících. Ve vzorku DGDG z blahovičnicku bylo identifikováno 57 DGDG ve 40 pících. Ve vzorku DGDG z meduňky bylo identifikováno 35 DGDG ve 25 pících. Rovněž byla pozorována separace izomerů, jejichž přítomnost ve vzorcích byla potvrzena transesterifikací vzorků DGDG a následnou GC/MS analýzou. Dobré separační schopnosti navrženého gradientu byly dále potvrzeny analýzou standardu DGDG z pšeničné mouky. Ve srovnání s jinými publikacemi, využívajícími stejný standard DGDG, bylo separováno a identifikováno více DGDG.

V publikacích dosud převažují pro separace MGDG a DGDG isokratické mobilní fáze, nejčastěji využívající acetonitril nebo methanol a vodu. Využití ternárního systému acetonitril/methanol/voda za podmínek gradientové eluce, spolu se stacionární fází NUCLEOSIL[®] C₁₈, představuje významné zlepšení v oblasti studia digalaktosyl-diacylglycerolů (DGDG).

6 Literatura

- [1] <<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/desc0004.htm#top>> [cit. 5.1. 2009]
- [2] <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/mg_dgdg/index.htm> [cit. 5.1. 2009]
- [3] Morimoto, T.; Nagatsu, A.; Murakami, N.; Sakakibara, J.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A.: Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella Vulgaris*. *Phytochemistry* **40**:5, 1433-1437 (1995).
- [4] Murakami, A.; Nakamura, Y.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H.: Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a Traditional Herb in Thailand, Potently Inhibit the Tumor-Promoting Activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate in mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2779-2783 (1995).
- [5] Tokuda, H.; Nishino, H.; Shirahashi, H.; Murakami, N.; Nagatsu, A.; Sakakibara, J.: Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted mouse skin papilloma by digalactosyl diacylglycerols from the fresh water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Cancer Letters* **104**, 91-95 (1996).
- [6] Murakami, Ch.; Kumagai, T.; Hadai, T.; Kanekazui, U.; Nakawai, S.; Kamisukii, S.; Maedai, N.; Xui, X.; Yoshida, H.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K.; Mizushina, Y.: Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases. *Biochemical Pharmacology* **65**, 259-267 (2003).
- [7] Nagatsu, A.; Watanabe, M.; Ikemoto, K.; Hashimoto, M.; Murakami, N.; Sakakibara, J.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A.; Yazawa, K.: Synthesis and structure-anti-tumor-promoting activity relationship of monogalactosyl diacylglycerols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **4**:13, 1619-1622 (1994).
- [8] Iijima, H.; Musumi, K.; Hada, T.; Maeda, N.; Yonezawa, Y.; Yoshida, H.; Mizushina, Y.: Inhibitory Effect of Monogalactosyldiacylglycerol, Extracted from Spinach Using Supercritical CO₂, on Mammalian DNA Polymerase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1627-1632 (2006).
- [9] Maeda, N.; Hada, T.; Yoshida, H.; Mizushina, Y.: Inhibitory Effect on Replicative DNA Polymerases, Human Cancer Cell Proliferation, and In Vivo Anti-Tumor Activity by Glycolipids from Spinach. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 955-967 (2007).
- [10] Maeda, N.; Kokai, Y.; Ohtani, S.; Sahara, H.; Hada, T.; Ishimaru, Ch.; Kuriyama, I.; Yonezawa, Y.; Iijima, H.; Yoshida, H.; Sato, N.; Mizushina, Y.: Anti-Tumor Effects of the Glycolipids Fraction from Spinach which Inhibited DNA Polymerase Activity. *Nutrition and Cancer* **57**:2, 216-223 (2007).
- [11] Jayaprakasam, B.; Zhang, Y., Nair, M. G.: Tumor Cell Proliferation and Cyklooxigenase Enzyme Inhibitory Compounds in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6939-6943 (2004).

- [12] Larsen, E.; Kharazmi, A.; Christensen, L.P.; Christensen, S.B.: An Antiinflammatory Galactolipids from Rose Hip (*Rosa canina*) that Inhibits Chemotaxis of Human Peripheral Blood Neutrophils in Vitro. *Journal of Natural Products* 66, 994-995 (2003).
- [13] Hudeček, J.; Tichá, M.; Barthová, J.; Stiborová, M.; Krajhanzl, A.; Sofrová, D.; Entlicher, G.; Hladík, J.; Novák, F.: *Biochemie: základní kurz*, 3. vyd. Praha, Karolinum 1999, s. 157.
- [14] < <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/whatlip/index.htm> > [cit. 5.1. 2009]
- [15] Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass, Ch.K.; Merrill Jr., A.H.; Murphy, R.C.; Raetz, Ch.R.H.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; van Nieuwenhze, M.S.; White, S.H.; Witztum, J.L.; Dennis, E.A.: A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46, 839-861 (2005).
- [16] Hoffmann-Ostenhof, O.; Cohn, W.E.; Braunstein, A.E.; Dixon, H.B.F.; Horecker, B.L.; Jakoby, W.B.; Karlson, P.; Klyne, W.; Liébecq, C.; Webb, E.C.: The Nomenclature of Lipids. *Journal of Lipid Research* 19, 114-128 (1978).
- [17] Hoffmann-Ostenhof, O.; Cohn, W.E.; Braunstein, A.E.; Fruton, J.S.; Keil, B.; Klyne, W.; Liébecq, C.; Malnström, B.G.; Schwyzer, R.; Slater, E.C.; Tamiya, N.: The Nomenclature of Lipids. *Journal of Lipid Research* 8, 523-528 (1967).
- [18] Chester, M.A.: Nomenclature of glycolipids (IUPAC Recommendations 1997). *Pure and Applied Chemistry* 69:12, 2475-2487 (1997).
- [19] Hölzl, G.; Dörmann, P.: Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* 46, 225-243 (2007).
- [20] Thompson Jr, G.A.: Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302, 17-45 (1996).
- [21] Dörmann, P.; Benning, Ch.: Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* 7:3, 112-118 (2002).
- [22] Lee, A.G.: Membrane lipids, It's only a phase. *Current Biology* 10:10, 377-380 (2000).
- [23] Heemsherk, J.W.M.; Storz, T.; Schmidt, R.R.; Heinz, E.: Biosynthesis of Digalactosyldiacylglycerol in Plastids from 16:3 and 18:3 Plants, *Plant Physiology* 93, 1286-1294 (1990).
- [24] Maréchal, E.; Block, M.A.; Dorne, A.-J.; Douce, R.; Joyard, J.: Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiologica Plantarum* 100, 65-77 (1997).
- [25] Heinz, E.; Roughan, P.G.: Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiology* 72, 273-279 (1983).
- [26] Wise, R.R.; Hooper, J.K.: *The Structure and Function of Plastids*. Springer 2006, s. 335-353.
- [27] Mongrand, S.; Bessoule, J.J.; Cabantous, F.; Cassagne, C.: The C_{16:3}/C_{18:3} Fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49:4, 1049-1064 (1998).
- [28] Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509 (1957).
- [29] < <http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/extract2/> > [cit. 5.1. 2009]

- [30] Yamauchi, R.; Kojima, M.; Isogai, M.; Kato, K.; Ueno, Y.: Chlorophyll-sensitized Photooxidation Products of Spinach Galactolipids. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**:11, 2815-2820 (1982).
- [31] Yamauchi, R.; Kojima, M.; Kato, K.; Ueno, Y.: Autoxidation Products of Polyunsaturated Galactolipids. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**:11, 2625-2630 (1983).
- [32] Duan, S.; Weng, X.C.; Dong, X.W.; Liu, Y.P.; Li, H.P.; Jin, J.R.: Antioxidant properties of butylatedhydroxytoluene refluxed in ferric chloride solution. *Food Chemistry* **61**:1/2, 101-105 (1998).
- [33] Deschamps, F.S.; Gaudin, K.; Baillet, A.; Chaminade, P.: Wheat digalactosyldiacylglycerol molecular species profiling using porous graphitic carbon stationary phase. *Journal of Separation Science* **27**, 1313-1322 (2004).
- [34] Touchstone, J.C.: Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B* **671**, 169-195 (1995).
- [35] <<http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/tlc/index.htm>> [cit. 5.1. 2009]
- [36] White, T.; Bursten, S.; Federighi, D.; Lewis, R.A.; Nudelman, E.: High-Resolution Separation and Quantification of Neutral Lipid and Phospholipid Species in Mammalian Cells and Sera by Multi-One-Dimensional Thin-Layer Chromatography. *Analytical Biochemistry* **258**, 109-117 (1998).
- [37] Khotimchenko, S.V.: Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*, *Chemistry of Natural Compounds* **41**:3, 285-288 (2005).
- [38] Mělo, N.; Tavares, R.M.; Morais, F.; Barroso, J.G.; Pais, M.S.S.: Lipid composition of thylakoid membranes from leaves and regreened spathes of *Zantedeschia Aethiopica*. *Phytochemistry* **40**:5, 1367-1371 (1995).
- [39] Gardner, H.W.: Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin-layer chromatography. *Journal of Lipid Research* **9**, 139-141 (1968).
- [40] Christie, W.W.: *Lipid Analysis (Isolation, Separation, Identification and structural analysis of lipids)*, 3. vydání. The Oily Press 2003, s. 146, s. 310.
- [41] Dembitsky, V.M.; Pechenkina-Shubina, E.E.; Rozentsvet, O.A.: Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. *Phytochemistry* **30**:7, 2279-2283 (1991).
- [42] Conforti, F. D.; Harris, C.H.; Rinehart, J.T.: High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography* **645**, 83-88 (1993).
- [43] Christie, W.W.; Urwin, R.A.: Separation of lipid Classes from Plant Tissues by High Performance Liquid Chromatography on Chemically Bonded Stationary Phases. *Journal of High Resolution Chromatography* **18**, 97-100 (1995).
- [44] Christie, W.W.; Gill, S.; Nordbäck, J.; Itabashi, Y.; Sanda, S.; Slabas, A.R.: New Procedures for Rapid Screening of Leaf Lipid Components from *Arabidopsis*. *Phytochemical Analysis* **9**, 53-57 (1998).

- [45] Nordbäck, J.; Lundberg, E.; Christie, W.W.: Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection, *Marine Chemistry* 60, 165-175 (1998).
- [46] <http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/spe_alm/index.htm> [cit. 5.1. 2009]
- [47] Przybylski, P.; Eskin, N.A.M.: Two simplified approaches to the analysis of cereal lipids. *Food Chemistry* 51, 231-235 (1994).
- [48] Kaluzny, M.A.; Duncan, L.A.; Merritt, M.V.; Epps, D.E.: Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using phase columns. *Journal of Lipid Research* 26, 135-140 (1985).
- [49] Bratt, Ch.E.; Åkerlund, H.-E.: Isolation of pigment-free bulk lipids from thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1165, 288-290 (1993).
- [50] Yamauchi, R.; Kojima, M.; Isogai, M.; Kato, K.; Ueno, Y.: Separation and purification of molecular species of galactolipids by high performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 46:11, 2847-2849 (1982).
- [51] Kim, Y.H.; Gil, J.H.; Hong, J.; Yoo, J.S.: Tandem mass spectrometric analysis of fatty acyl groups of galactolipid molecular species from wheat flour. *Microchemical Journal* 68, 143-155 (2001).
- [52] Yao, H.; Shi, Y.; Gao, R.; Zhang, G.; Zhang, R.; Zheng, C.; Xu, B.: Isolation of lipids from photosystem I complex and its characterization with high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 837, 101-107 (2006).
- [53] Norman, H.A.; St. John, J.B.: Differential effects of a substituted pyridazinone, BASF 13-338 on pathways of monogalactosyldiacylglycerol synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 85, 684-688 (1987).
- [54] Napolitano, A.; Carbone, V.; Saggese, P.; Takagaki, K.; Pizza, C.: Novel galactolipids from the leaves of *Ipomoea batatas* L.: Characterization by liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10289-10297 (2007).
- [55] Pacetti, D.; Boselli, E.; Lucci, P.; Frega, N.G.: Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A* 1150, 241-251 (2007).
- [56] Štulík, K.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J.: *Analytické separační metody*. Praha Karolinum 2005, s. 210, 215, 217.
- [57] Hoffmann, E.; Stroobant, V.: *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3. vydání. Wiley 2007.
- [58] Han, X.; Gross, R.W.: Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass Spectrometry Reviews* 24, 367-412 (2005).

- [59] Kluge, H.-J.; Bollen, G.: Ion traps – recent applications and developments. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **70**, 473-481, (1992).
- [60] <http://holcapek.upce.cz/teaching/MS04_Hmotnostni_analyzatory.pdf> [cit. 30.3. 2009]
- [61] <http://www.muji-web.cz/MC230P43/files/04_MC230P43_2009.pdf> [cit. 20.4. 2009]
- [62] Guella, G.; Frassanito, R.; Mancini, I.: A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **17**, 1982-1994 (2003).
- [63] Jensen, N.J.; Tomer, K.B.; Gross, M.L.: Gas-phase ion decomposition occurring remote to a charge site. *Journal of American Chemical Society* **107**:7, 1863-1868 (1985).
- [64] Kim, Y.H.; Yoo, J.S.; Kim, M.S.: Structural characterization of sulfoquinovosyl, monogalactosyl and digalactosyl diacylglycerols by FAB-CID-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 968-977 (1997).
- [65] Kim, Y.H.; Choi, J.-S.; Yoo, J.S.; Park, Y.-M.; Kim, M. S.: Structural identification of glycerolipid molecular species isolated from cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 using fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **267**, 260-270 (1999).
- [66] Gil, J. H.; Hong, J.; Choe, J.Ch.; Kim, Y.H.: Analysis of Fatty acyl groups of Diacyl Galactolipid Molecular Species by HPLC/ESI-MS with In-source Fragmentation. *Bulletin of Korean Chemical Society* **24**:8, 1163-1168 (2003).
- [67] Stránský, K.; Jursík, T.: Simple Quantitative Transesterification of Lipids 1. Introduction. *Lipid – Fett* **98**:2, 65-71 (1996).
- [68] Garcés, R.; Mancha, M.: One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. *Analytical Biochemistry* **211**, 139-143 (1993).
- [69] Eder, K.: Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B* **671**, 113-131 (1995).
- [70] Mongrand, S.; Bessoule, J.-J.; Cassagne, C.: A re-examination *in vivo* of the phosphatidylcholine-galactolipid metabolic relationship during plant lipid biosynthesis. *Biochemical Journal* **327**, 853-858 (1997).
- [71] Carter, H.E.; McCluer, R.H.; Slifer, E.D.: Lipids of Wheat Flour. I. Characterisation of Galactosylglycerol Components. *Journal of American Chemical Society* **78**:15, 3735-3738 (1956).
- [72] <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> [cit. 17.4. 2009]
- [73] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2003, s. 152.
- [74] Snyder, L.R.; Dolan, J.W.: *High-Performance Gradient Elution The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. Wiley 2007, s. 39.
- [75] Christie, W.W.: *Advances in Lipid Methodology – Four*, The Oily Press 1997, s. 209.
- [76] <<http://www.macherey-nagel.com/tabid/6128/default.aspx>> [cit. 25.3. 2009]

[77] <<http://www.k-state.edu/lipid/lipidomics/leaf-extraction.html>> [cit. 9.10. 2008]