

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Timotej Strmeň

**STRUKTURNÍ ANALÝZA PŘÍRODNÍCH LÁTEK S VĚTVENÝMI
ALIFATICKÝMI ŘETĚZCI POMOCÍ HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIE**

Structural analysis of natural products with branched aliphatic
chains by mass spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultant práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2016

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu GAČR P206/12/0750.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Josefa Cvačky Ph.D., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 13. května 2016

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se zabývá analýzou mastných alkoholů pomocí hmotnostní spektrometrie. Teoretická část shrnuje základní poznatky o mastných alkoholech, jejich výskytu, vlastnostech, analýze a využití. Experimentální část se zabývá hledáním vhodného derivatizačního činidla pro mastné alkoholy, které by umožnilo jejich detekci měkkými ionizačními technikami a zároveň jejich strukturní analýzu z fragmentačních spekter připravených derivátů. Hlavním cílem strukturní analýzy je lokalizace methylového větvení v řetězci mastných alkoholů.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, derivatizace, mastné alkoholy, methylové větvení

ABSTRACT

The diploma thesis focuses on analysis of fatty alcohols with mass spectrometry. Theoretical part describes distribution, main properties, usage and analytical methods for analysis of fatty alcohols. Experimental work focuses on the search for a proper derivatisation procedure for fatty alcohols, which would enable their detection with soft ionisation techniques of mass spectrometry, as well as their structural analysis. The main aim of the structural analysis is to find the methyl branching in the fragmentation spectra of derivatives of the fatty alcohols.

Key words: mass spectrometry, derivatisation, fatty alcohols, methyl branching

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Josefovi Cvačkovi PhD. a kolegovi RNDr. Vladimírovi Vrkoslavovi PhD. za množství cenných rad při mé práci na diplomové práci. Dál bych chtěl poděkovat všem vědeckým i servisním pracovníkům, že mě naučili zacházet s jednotlivými hmotnostními spektrometry a následně umožnili na nich měřit (Ing. Kvetoslava Kertisová na lineární iontové pasti/orbitrapu, Mgr. Eva Háková na LCQ Fleet a Mgr. Martin Hubálek PhD. na Synaptu, Mgr. Kateřina Nováková na MALDI a Mgr. Eva Slabá na Q-TOFu).

OBSAH

1. Úvod	9
2. Teoretická část	9
2.1. Typy alkoholů a jejich výskyt v přírodě	9
2.1.1. Úvod	9
2.1.2. Výskyt alkoholů s nerozvětveným nasyceným řetězcem	9
2.1.3. Výskyt alkoholů se složitějším řetězcem	10
2.1.3.1. Alkoholy, které produkují bakterie	10
2.1.3.2. Alkoholy, které produkují archaea	11
2.1.3.3. Alkoholy, které produkují houby a rostliny	11
2.1.3.3.1. Mastné alkoholy	11
2.1.3.3.2. Terpenické alkoholy	12
2.1.3.3.3. Polyprenoly	12
2.1.3.3.4. Cyklické terpenické alkoholy a steroly	12
2.1.3.4. Alkoholy, které produkují živočichové	13
2.1.3.5. Alkoholy fosilního původu	14
2.2. Syntéza a biosyntéza alkoholů	14
2.2.1. Chemická syntéza alkoholů	14
2.2.1.1. Fischer Tropschova Syntéza	14
2.2.1.2. Hydrogenace	14
2.2.1.3. Laboratorní syntéza terpenických alkoholů	15
2.2.2. Biosyntéza alkoholů	15
2.2.2.1. Mastné alkoholy	15
2.2.2.2. Terpenoidy	16
2.2.2.3. Steroly	18
2.3. Vlastnosti mastných alkoholů a jejich derivátů	18
2.3.1. Obecné vlastnosti	18
2.3.2. Reaktivita	19
2.3.2.1. Reaktivita hydroxylové skupiny	19
2.3.2.2. Reaktivita uhlíkového řetězce	19
2.3.3. Biologická aktivita	19
2.3.3.1. Mastné alkoholy	19
2.3.3.2. Terpenické alkoholy	19
2.4. Využití mastných, terpenických alkoholů a sterolů	20
2.5. Analýza mastných a terpenických alkoholů	20
2.5.1. Separační metody	20
2.5.2. Spektrometrické metody	21
2.5.2.1. Spektroskopické metody	21
2.5.2.2. Hmotnostní spektrometrie	21
2.5.2.2.1. Analýza mastných alkoholů obecně	21
2.5.2.2.2. Analýza větvených mastných alkoholů	25
3. Cíl práce	26

4. Experimentální část	27
4.1. Použité chemikálie	27
4.2. Použité materiály	28
4.3. Přírodní materiály	28
4.4. Přístroje a zařízení	28
4.5. Pracovní postupy syntéz derivátů mastných alkoholů	29
4.5.1. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes kyslík	29
4.5.1.1. Derivatizace 2-fluor- <i>N</i> -methylpyridinium- <i>p</i> -toluensulfonátem	29
4.5.1.2. Derivatizace kyselinou nikotinovou a methyljodidem	29
4.5.1.3. Derivatizace betainaldehydem	30
4.5.1.4. Derivatizace kyselinou 2,5-dihydroxybenzoovou a kyselinou 5-nitro-2-hydroxybenzoovou	30
4.5.2. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes dusík	31
4.5.2.1. Derivatizace pyridinem	31
4.5.2.2. Derivatizace 4-jodpyridinem	31
4.5.2.3. Derivatizace isochinolinem	32
4.5.2.4. Derivatizace triethylaminem	32
4.5.2.5. Derivatizace pyrrolidin-2-onem	32
4.5.3. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes fosfor	33
4.5.3.1. Derivatizace trifenylofosfinem	33
4.6. Pracovní postupy při izolaci mastných alkoholů z voskových esterů z včelího vosku a jejich následné derivatisace	33
4.6.1. Isolace voskových esterů z včelího vosku tenkovrstevnou chromatografií	33
4.6.1.1. Analytická tenkovrstvá chromatografie	33
4.6.1.2. Preparativní tenkovrstvá chromatografie	34
4.6.2. Transesterifikace voskových esterů na mastné alkoholy a methylestery mastných kyselin	34
4.6.3. Isolace mastných alkoholů ze směsi po transesterifikaci tenkovrstvou chromatografií	34
4.6.3.1. Analytická tenkovrstvá chromatografie	34
4.6.3.2. Preparativní tenkovrstvá chromatografie	35
4.6.4. Derivatizace mastných alkoholů z voskových esterů včelího vosku pyrrolidin-2-onem	35
4.7. Měření derivátů alkoholů na hmotnostních spektrometrech	35
4.7.1. Měření spekter na spektrometru LCQ Fleet	35
4.7.2. Měření spekter na spektrometru LTQ Orbitrap XL	36
4.7.3. Měření spekter na spektrometru Synapt G2	36
4.7.4. Analýzy vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	37
5. Výsledky a diskuze	38
5.1. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů spojených s derivatizačním činidlem přes kyslík	38
5.1.1. Spektra derivátů alkoholů po reakci s 2-fluor- <i>N</i> -methylpyridinium- <i>p</i> -toluensulfonátem	38
5.1.2. Spektra derivátů alkoholů po reakci s kyselinou nikotinovou a methyljodidem	39

5.1.3. Spektra derivátů alkoholů po reakci s betainaldehydem	40
5.1.4. Spektra derivátů po reakci s kyselinou 5-nitro-2-hydroxybenzoovou; nebo 2,5-dihydroxybenzoovou	41
5.1.5. Shrnutí k spektrům derivátů alkoholů vázaných přes kyslík	44
5.2. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů obsahujících dusík	44
5.2.1. Spektra derivátů alkoholů po reakci s pyridinem	44
5.2.2. Spektra derivátů alkoholů po reakci s 4-jodpyridinem	46
5.2.3. Spektra derivátů alkoholů po reakci s isochinolinem	47
5.2.4. Spektra derivátů alkoholů po reakci s triethylaminem	48
5.2.5. Spektra derivátů alkoholů po reakci s pyrrolidin-2-onem	48
5.2.5.1. Analýza zdrojem APCI	48
5.2.5.2. Analýza pomocí plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie	52
5.2.6. Shrnutí k derivátům mastných alkoholů obsahujících dusík	53
5.3. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů obsahující fosfor	54
5.3.1. Derivatizace trifenylofosfínem	54
5.3.2. Shrnutí k derivátům mastných alkoholů obsahujících fosfor	54
5.4. Isolace mastných alkoholů z voskových esterů včelího vosku	55
5.4.1. Isolace voskových esterů z včelího vosku	55
5.4.2. Transesterifikace voskových esterů	56
5.4.3. Isolace mastných alkoholů	57
5.4.4. Derivatizace alkoholů z voskových esterů včelího vosku a jejich analýza	58
5.4.5. Shrnutí k derivatizaci mastných alkoholů izolovaných z voskových esterů včelího vosku	60
6. Závěr práce	61
7. Literatura	62

Seznam zkratek a symbolů

2-FMPS – 2-fluor-N-methylpyridinium-*p*-toluensulfonát

APCI – chemická ionizace za atmosferického tlaku

ATP – adenosintrifosfát

CI-MS – hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací

CID – kolizně indukovaná disociace

CoA – koenzym A

DCC – dicyklohexylkarbodiimid

DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová

DMAP - dimethylaminopyridin

EI-MS – hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací

ESI – elektrosprejová ionizace

GC – plynová chromatografie

HCD – vysokoenergetická kolizní disociace

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MALDI – matrix assisted laser desorption ionisation

NADP – Nikotinamid adenin dinukleotidfosfát

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotidfosfát protonovaný

NHB – kyselina 5-nitro-2-hydroxybenzoová

PMA – kyselina fosfomolybdenová

TEA – triethylamin

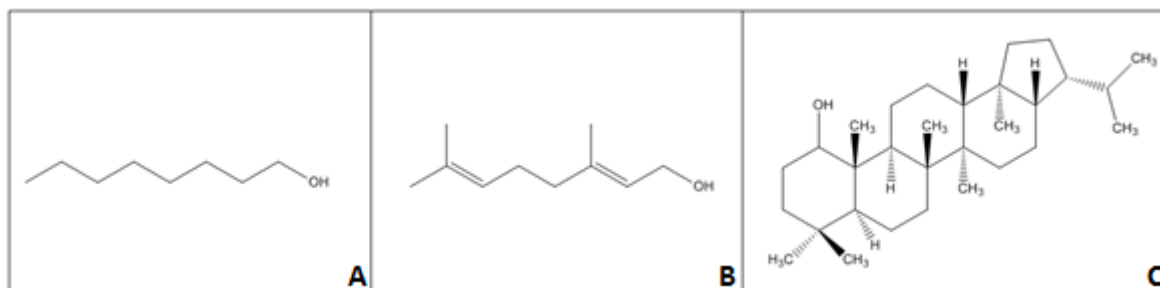
TLC – tenkovrstevná kapalinová chromatografie

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné světlo

1. Úvod

Vyšší alkoholy lze podle biologické syntézy rozdělit na mastné, terpenické a steroidní alkoholy. Tato práce se zabývá alkoholy s acyklickým uhlíkovým řetězcem (obr. 1.1).



Obr. 1.1: Strukturální vzorce vybraných alkoholů: mastný alkohol oktanol (A), terpenický alkohol geraniol (B) a steroidní alkohol hopan-1-ol (C)

2. Teoretická část

2.1. Typy alkoholů a jejich výskyt v přírodě

2.1.1. Úvod

Pojem mastné alkoholy se nejčastěji používá pro primární alkoholy s lineárním řetězcem, který může být nasycený nebo nenasycený, lineární nebo rozvětvený a obsahuje nejméně 8 uhlíků. Mezi mastné alkoholy však patří i alkoholy s cykly, a mohou to být také alkoholy sekundární a terciární¹.

Terpenické alkoholy s acyklickým řetězcem lze nazvat podskupinou mastných alkoholů. Zároveň patří do kategorie isoprenoidů, což jsou látky, jejichž základní stavební jednotkou je isopren².

2.1.2. Výskyt alkoholů s nerozvětveným nasyceným řetězcem

Lineární mastné alkoholy se vyskytují v rostlinné i živočišné říši, přičemž několik příkladů výskytu je uvedených v tabulce 2.1.

Tab. 2.1: Přehled názvosloví a výskytu primárních mastných alkoholů (C₈ – C₃₀)

Počet C	Primární mastný alkohol		Významný výskyt (volný nebo ve formě esteru) ^{1,3,4,5,6,7,8,9}
	Systematický název	Triviální název	
8	1-oktanol	kaprylylalkohol	pomerančový olej
9	1-nonanol	pelargylalkohol	pomerančový olej
10	1-dekanol	kaprylalkohol	maz volavky
11	1-undekanol	-	
12	1-dodekanol	laurylalkohol	olej z květů lípy (max. 3,8%)

13	1-tridekanol	-	
14	1-tetradekanol	myristylalkohol	plankton <i>Euphausia</i> , skořicový olej
15	1-pentadekanol	-	
16	1-hexadekanol	cetylalkohol	sasanky rodu <i>Metridium</i> , lidský maz z vlasů
17	1-heptadekanol	margarylalkohol	
18	1-oktadekanol	stearylalkohol	lidský maz z vlasů
19	1-nonadekanol	-	kukuřiční extrakt
20	1-eikosanol	arachidylalkohol	olej jojoba
21	1-henikosanol	-	
22	1-dokosanol	behenylalkohol	růže, slunečnice, olej jojoba
23	1-trikosanol	-	
24	1-tetrakosanol	lignocerylalkohol	růže, slunečnice
25	1-pentakosanol	-	
26	1-hexakosanol	cerylalkohol	hrášek, jablka, slunečnice
27	1-heptakosanol	-	
28	1-oktakosanol	montanylalkohol	grep, cukrová třtina
29	1-nonakosanol	-	
30	1-triakontanol	myrisylalkohol	včelí vosk

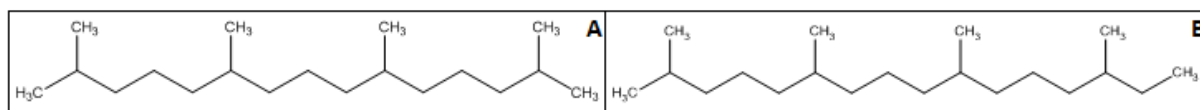
Alkoholy s řetězcí delšími než 30 uhlíků jsou přítomny převážně v rostlinných a živočišných voscích ve formě esteru (převážně se jedná o alkoholy C₃₁ až C₃₅)^{1,10}

2.1.3. Výskyt alkoholů se složitějším řetězcem

2.1.3.1. Alkoholy, které produkuje bakterie

Bakterie jsou schopny syntetizovat mastné alkoholy s lineárním řetězcem a řetězcem větveným v poloze *iso* a *anteiso*. Tyto alkoholy mohou mít sudý i lichý počet uhlíků v řetězci. Obvykle se počet uhlíků v těchto alkoholech pohybuje od 9 do 20. Z nich bakterie syntetizují vosky, které uchovávají v cytoplazmě ve formě inkluzí a které slouží jako zdroj energie - například pro bakterie rodu *Acinetobacter*¹.

Mastné alkoholy vznikají i jako intermediáty metabolismu větvených alkanů aktinobakteriemi. Například pristan a fytan (obr. 2.1) se oxidují přes pristanol a dihydrofytol až na příslušné kyseliny, případně může jejich biotransformace probíhat na jiné produkty¹¹.



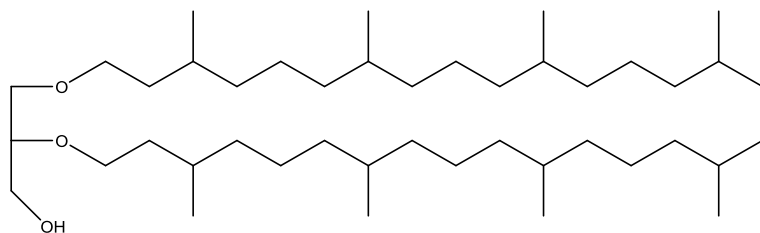
Obr. 2.1: Strukturní vzorec pristanu (A) a fytanu (B)

Sekundární alkoholy byly nalezeny v bakterii *Mycobacterium xenopi*, jednalo se o 2-oktadekanol, 2-nonadekanol, 2-eikosanol, 2-heneikosanol, 2-dokosanol, 2-trikosanol a 2-tetrakosanol¹².

Bakterie také syntetizují terpenoidy. Z alkoholů se jedná o alkoholy s cyklickým řetězcem, a to například 2-methylisoborneol z cyanobakterii a avermitilol ze *Streptomyces avermitilis*¹³. Z laktobacilů byly izolovány baktoprenoly (polyprenoly podobné betulaprenolům, pro více informací viz podkapitolu 2.1.3.3.3)¹⁴.

2.1.3.2. Alkoholy, které produkují archaea

Membránové lipidy archaea jsou tvořeny isoprenoid-L-glycerol diethery a di-L-glycerol tetraethery, takže na rozdíl od bakteriálních membránových lipidů obsahují éterově vázané mastné alkoholy a dioly na glycerol (obr. 2.2)¹⁵. Z acyklických mastných alkoholů mezi ně patří fytan-1-ol a bifytan-1-ol¹⁶. Archaea obsahují ve své buněčné stěně polymery podobné mureinu, jejichž jednou ze stavebních jednotek je undekaprenyl fosfát¹⁵. Bakterie využívají jako prekurzory pro „glycosyl carrier“ lipidy pouze polyprenoly, zatím co eukaryotické buňky výlučně dolicholy. Halofilní a thermoacidofilní archaea využívají pro tento účel pouze dolicholy, methanogenní archaea používají polyprenoly i dolicholy, což z archaea dělá zajímavou skupinu z evolučního hlediska¹⁷.

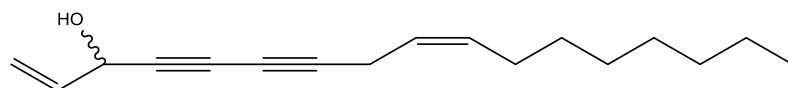


Obr. 2.2: strukturní vzorec archaeolu, typického membránového lipidu archaea¹⁸.

2.1.3.3. Alkoholy, které produkují houby a rostliny

2.1.3.3.1. Mastné alkoholy

Mastné alkoholy s krátkými řetězci se vyskytují u některých druhů hub a rostlin (1-okten-3-ol^{19, 20}, oktan-3-ol a další²⁰). Alkoholy s delšími řetězci jsou přítomny v rostlinných voscích na jejich listech. Jedná se především o volné a esterově vázané primární alkoholy (C₂₂-C₄₀) a sekundární alkoholy (C₂₁-C₃₅)²¹. Z mrkve byl izolován sekundární mastný alkohol falkarinol, který obsahuje dvojnou a trojnou vazbu (obr. 2.3)²².



Obr. 2.3: Strukturní vzorec falkarinolu²²

2.1.3.3.2. Terpenické alkoholy

Velmi často se lze u obou říší setkat s větvenými terpenickými alkoholy, jako například primární alkoholy geraniol, citronelol a nerol z extraktu růží²³, levandulol z levandule²⁴, farnesol z oleje cabreuva²⁵, lyratol z rostliny *Cyathocline lyrata*²⁶, fokiolenol z rostliny *Dittrichia viscosa*²⁷, solanesol z tabákového listí²⁸ a terciární alkoholy, velmi rozšířený linalool (houba lošák jelení²⁰, levandule²⁴, mrkev²⁹ a mnoho dalších), Yomogi alkohol a Santolina alkohol (rostlina řebříček žlutý³⁰), hotrienol (lípa malolistá³¹) a *trans*-nerolidol (houba *Hebeloma sinapizans*²⁰). Další, značně rozšířený primární terpenický alkohol v rostlinách je *trans*-fytol, který je strukturální součástí chlorofylu. Jeho isomer, *cis*-fytol, se v malé míře vyskytuje v rostlinných olejích³².

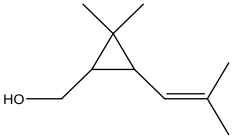
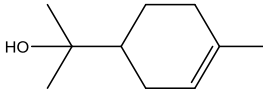
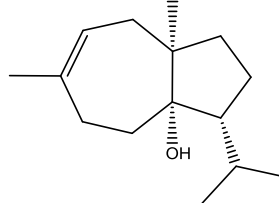
2.1.3.3.3. Polyprenoly

Lineární 1,4-polyprenyl alkoholy s počtem izoprenových jednotek pět a větším se obecně nazývají polyprenoly³³. Polyprenoly se převážně vyskytují na listech kvetoucích rostlin. Podle typu jejího řetězce je lze rozdělit na „all *trans*“ (mezi ně patří spadiokol a již zmíněný solanesol), *trans-trans-trans*-polycis prenyly (fikaprenoly), *trans-trans*-polycis prenyly (betulaprenoly), a dolicholy (E,E-farnesyl-*cis*-polyprenoly s nasycenou izoprenovou skupinou na α -konci)^{34,35}. Dolicholy jsou produkovány i v houbách. Z výše uvedeného dělení byly vynechány glycinoprenoly, což jsou *cis*-polyprenoly obsahující ftylový zbytek na svém ω konci³⁵.

2.1.3.3.4. Cyklické terpenické alkoholy a steroly

V rostlinách se také vyskytují terpenické alkoholy s cyklickými řetězci. Několik příkladů je uvedeno v tab. 2.2.

Tab. 2.2: Příklady terpenických alkoholů obsahujících cykly^{29,36,37}

Název	Chrysanthemol	α -terpinol	Karotol
Významný výskyt	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	Jehličí cédra himalajského	Semena mrkve
Vzorec			

Pro houby jsou ještě charakteristické steroidní alkoholy, přičemž nejznámější a v mnohých druzích nejvíc zastoupený je ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol)³⁸. V menší míře se v některých houbách vyskytují i další podobné sloučeniny, jako například fungisterol²⁰. Steroly se také vyskytují v téměř všech tucích a olejích a jsou

charakteristickou veličinou pro rostlinné oleje (např. cholesterol, stigmasterol a campesterol v olivovém a slunečnicovém oleji)³⁹.

2.1.3.4. Alkoholy, které produkují živočichové

Mnoho bezobratlých živočichů využívá alkoholy spolu s aldehydy, epoxidy apod. jako feromony. Bourec pro tento účel používá bombykol⁴⁰, mezi samičí feromony druhu mola *Heliothis virescens* patří (Z)-11-hexadecen-1-ol⁴¹ a obaleč jablečný (*Cydia pomonella*) produkuje hlavně (E,E)-8,10-dodekadienol⁴². Čmeláci mají vyvinutý celý systém feromonů pro množství účelů, přičemž z mastných alkoholů využívají například (E)-2,3-dihydrofarnesol (samčí pohlavní feromon) a geranylgeraniol (samičí pohlavní feromon)⁴³. Hospodářsky významný je výzkum feromonů kůrovců, jako významných škůdců lesních porostů. Složení feromonů jednotlivých druhů kolísá. Hlavní složkou feromonů druhu *Ips duplicatus* jsou terpenoidní alkoholy ipsdienol a E-myrcenol, *Ips tyrographus* využívá methylbutenol a cis-verbenol⁴⁴. Feromony alkoholové povahy se vyskytují i u obratlovců, například hlodavci produkují (Z)-5-tetradecen-1-ol⁴⁵. Z mravence *Lasius meridionalis* byl izolován monoterpenický alkohol lasiol⁴⁶.

Někteří obratlovci využívají mazy a vosky, které obsahují alkoholy, pro promaštění povrchových částí těla. Maz je často komplikovaná směs volných mastných kyselin, monoesterových vosků, alkyl acetátů, triacylglycerolů a mnohých dalších látek⁴⁷. Vosk z ovčí vlny, lanolin, obsahuje steroly, mastné kyseliny, mastné a terpenické alkoholy (volné a esterově vázané), uhlovodíky a další látky. Z alifatických alkoholů tvoří největší složku alkoholy s větveným řetězcem v poloze *anteiso* (hlavně 18-methyleikosanol a 24-methylhexakosanol) a *iso* (24-methyl-pentakosanol a 19-methylnonadekanol)⁴⁸.

Lidský kožní maz (sebum) je produkován mazovými žlázami kůže⁴⁹. Je složen primárně z triacylglycerolů, diacylglycerolů, volných mastných kyselin, voskových esterů, skvalenu a cholesterolu. Voskové estery představují 26% hmotnosti mazu⁵⁰. Speciální maz meibum produkují meibomské žlázy v očních víčkách živočichů⁵¹. Meibum a sebum se liší složením, přičemž dominantní složkou meiba jsou voskové estery, zatímco cholesterol a skvalen jsou v něm zastoupeny mnohem méně v porovnání se sebou⁵². Voskové estery meiba obsahují nevětvené, *iso* a *anteiso* alkoholy. Dvojně vazby jsou převážně přítomné v nevětvených alkoholech C₁₈ až C₃₀ (cit⁵³). V ušním kanálku se produkuje ušní maz zvaný cerumen. U člověka jsou v něm zastoupeny i voskové estery. Alkoholy tvořící voskové estery jsou hlavně primární a nasycené o délce řetězce 12 až 30 uhlíků, přičemž jsou mezi nimi i větvené alkoholy s větvením v poloze *iso* a *anteiso*. Nenasycené primární alkoholy mají délku řetězce 18 až 31 uhlíků a některé z nich jsou taky větvené⁵⁴. Dalším zdrojem lidských lipidů je novorozenecký mázek (vernix caseosa), což je bílá krémovitá hmota pokrývající pokožku plodu a novorozeněte. Byly v něm identifikovány voskové estery i volné mastné alkoholy⁵⁵.

Podobně jako buňky rostlin a hub, syntetizují živočišné buňky dolicholy. Jejich fosforylované formy, dolichol fosfáty, slouží jako přenašeč mono- a oligosacharidů při N-glykosylaci proteinů a syntéze proteinů s glykosylfosfatidyl inositolovou kotvou³⁵.

Retinol je terpenický alkohol, jehož forma *all-trans* se označuje jako vitamin A. V zdravém a dobře vyživovaném lidském organismu se 70% retinolu a jeho derivátů nachází v játrech. Mezi jeho deriváty vyskytující se v organismu patří převážně estery odvozeny od kyseliny palmitové, olejové, stearové a linolové. Hlavním prekurzorem retinolu je β -karoten⁵⁶.

2.1.3.5. Alkoholy fosilního původu

Minerální vosky jsou vosky, které se získávají z fosilních pozůstatků živých organismů. Z rašeliny se získává rašelinový vosk, z lignitu montanový vosk. Montanový vosk se převážně skládá z alifatických uhlovodíků, mastných alkoholů o délce řetězce $C_{14} - C_{30}$, mastných kyselin a jejich esterů⁵⁷. I rašelina obsahuje velké množství alifatických uhlovodíků, mastných alkoholů a kyselin, dále se v ní vyskytují steroly (například cholesterol, nebo 5α -(H)-cholestan- 3β -ol) a terpenoidy (taraxerol, lupenol, apod.). Složení rašeliny se může měnit podle místa svého výskytu a okolních vlivů, které na ní působí. Obecně se v ní vyskytují alkoholy s řetězcem o délce $C_{16} - C_{30}$ (cit. ⁵⁸). Tyto látky se v nich vyskytují hlavně díky rostlinám, z kterých vznikly. Patří sem především mechy rodu *Sphangum* a další bahenní rostliny, jako je klikva bahenní (*Vaccinum oxycoccus*), suchopýrek trasnatý (*Trichophorum cespitosum*), šicha černá (*Empetrum nigrum*), vřes obecný (*Calluna vulgaris*), kyhanka sivolistá (*Andromeda polifolia*) suchopýr pochvaý (*Eriphorum vaginatum*) a mnoho dalších¹.

2.2. Syntéza a biosyntéza alkoholů

2.2.1. Chemická syntéza alkoholů

2.2.1.1. Fischer Tropschova Syntéza

Předpokládá se, že syntéza mastných alkoholů před vznikem života probíhala reakčním mechanismem podobným vodní Fischer – Tropschově syntéze. Tato syntéza se dnes používá k chemické syntéze uhlovodíků a oxouhlovodíků z kyseliny mravenčí a oxidu uhelnatého. Za laboratorních podmínek se mastné alkoholy vytvářejí při teplotách 150 až 250 °C, přičemž délka jejich řetězce se v průměru pohybovala od 8 do 30 uhlíků (nejvíc 32 uhlíků při 200 °C)⁵⁹.

2.2.1.2. Hydrogenace

Hydrogenace je průmyslová metoda syntézy mastných alkoholů a používá se k redukci mastných kyselin na mastné alkoholy aktivovaným vodíkem v přítomnosti katalyzátoru obsahujícího měď. Existují tři typy hydrogenací využívaných v průmyslu,

přičemž všechny probíhají při teplotách 250 až 300 °C a tlacích 200 až 300 barů. Po redukcí mastných kyselin se mastné alkoholy z výstupu destilují a frakcionují⁶⁰.

2.2.1.3. Laboratorní syntéza terpenických alkoholů

Základní reakcí je dimerizace isoprenu účinkem naftyllithia v prostředí tetrahydrofuranu. Vzniklé produkty je následně možno oxidovat kyslíkem na alkoholy. Druhou možností přípravy je přidat fluorid boritý v etherovém komplexu ještě před oxidací, která se poté provede peroxidem vodíku⁶¹.

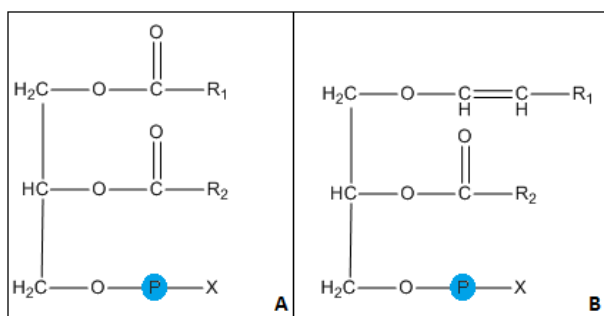
2.2.2. Biosyntéza alkoholů

2.2.2.1. Mastné alkoholy

Mastné alkoholy vznikají v bakteriích⁶², rostlinách⁶³ a živočiších⁶⁴ redukcí mastných kyselin, proto je nutné se zaměřit na biosyntézu kyselin. Jednoduché mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků vznikají z acetylkoenzymu A jako startéru a několika malonylkoenzymů A sloužících na prodlužování řetězce. Reakce růstu řetězce jsou katalyzovány několika enzymy^{1,63}. V malé míře savci umí syntetizovat kyseliny s lichým počtem uhlíků a kyseliny větvené. Nejprozkoumanější je biosyntéza větvených mastných kyselin u bakterií. Pro dosažení větvení jako startéry využívají deaminované aminokyseliny konjugované s acetylkoenzymem A (acetyl-CoA). Pro dosažení větvení u mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků v poloze *iso* se jako startér použije isobutyrylCoA (valinový startér). Pro dosažení větvení v té samé poloze při mastné kyselině s lichým počtem uhlíků se použije isovalerylCoA (leucinový startér). Větvení v poloze *anteiso* se dosáhne použitím α -methylbutyrylCoA (isoleucinového startéru)⁶⁵. Pro živočichy byly jako startéry nepřímo prokázány pouze valinový a isoleucinový. Mechanismus elongace větvených kyselin v poloze *iso* a *anteiso* je stejný jako u nevětvených mastných kyselin⁶⁶.

Vzniklé mastné kyseliny se konvertují na příslušné acyl-koenzymy A a ty se enzymem „fatty-acylCoA-reductase“ redukují až na mastné alkoholy¹. Podle potřeby se následně přeměňují na jiné látky. Tvorbu vosku z alkoholu katalyzují enzymy acylCoA:alkoholacyltransferasy. Lidské syntázy jsou schopny katalyzovat závěrečnou reakci tvorby triacylglycerolů, voskových monoesterů, diesterů a retinylesterů mastných kyselin⁶⁷.

Podle Hayashi et al⁶⁸ se mastné alkoholy můžou syntetizovat přímo (bez toho, aby byla nejprve syntetizována příslušná mastná kyselina). Demonstrovali to *in vitro* na části biosyntézy plasmalogenu probíhající v peroxizomech, které byly izolovány z potkaních jater (obr. 2.4). Jako startér se ukázal nejúčinnější dodekanoyl-CoA a nejvíc produkovaným alkoholem byl hexadekanol. Ten by se pak měl navázat na glycerol éterovou vazbou a následně zredukovat⁶⁸. Obecně je uznávaná teorie, podle které se na glycerol naváže mastná kyselina a vzniklý ester je zredukován na éter enzymem alkylglyceronfosfátsynthasa⁶⁹.

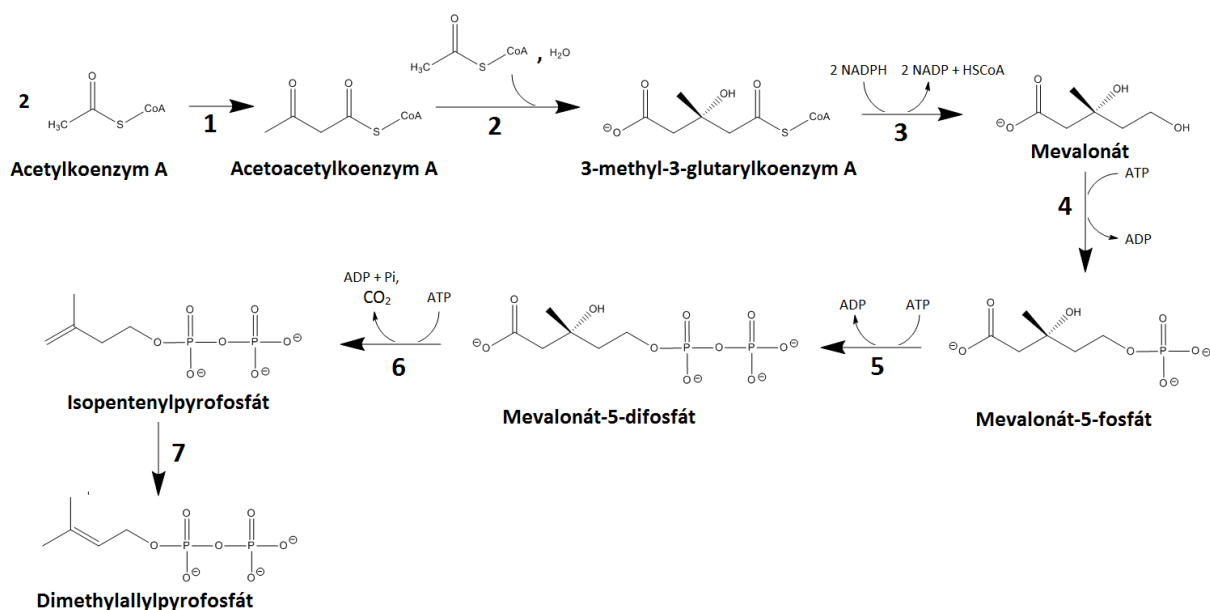


Obr. 2.4: Strukturní vzorec obecného diacylglycerolfosfátu (A) a plasmalogenu (B)⁶⁹

2.2.2.2. Terpenoidy

Terpenoidy mohou v organismech vznikat dvojí cestou, a to mevalonátovou a nemevalonátovou (viz obr. 6 a 7). První je dlouho známá a běžná pro eukaryotické organismy, druhá byla nalezena o dost později v bakteriích, ale také v *Ginkgo biloba*⁷⁰.

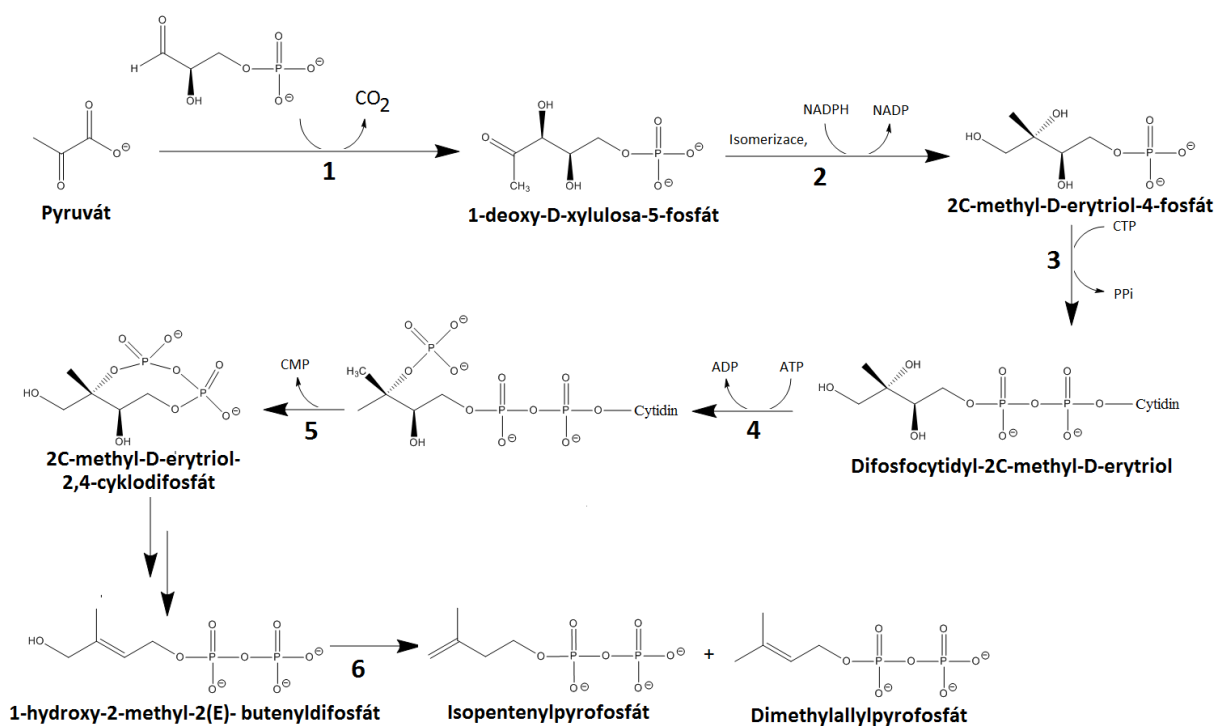
Mevalonátová syntéza začíná Claisenovou kondenzací dvou acetylkoenzymů A za vzniku acetoacetylkoenzymu A. Je dobré poznamenat, že na rozdíl od prvního kroku syntézy mastných kyselin produkt vzniká přímo a neprobíhá žádná karboxylace. Tuto reakci katalyzuje enzym acetoacetylkoenzymAcetyltransferasa (pro enzymy dalších reakcí viz obr. 2.5). Následuje aldolová kondenzace acetoacetylkoenzymu A s dalším acetylkoenzymem A a vzniká 3-methyl-3-glutarylkoenzym A. Ten je následně redukován dvěma molekulami NADPH na (R)-mevalonát, který se dále fosforyluje dvěma molekulami adenosintrifosfátu (ATP). Třetí fosforylace mevalonátu probíhá na terciární hydroxylové skupině, po čem proběhne dekarboxylace a ztráta fosfátu za vzniku isopentenylpyrofosfátu. Ten se nakonec isomerizuje na dimethyl allylpyrofosfát⁷¹.



Obr. 2.5: Mevalonátová biosyntéza isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu. Čísla pod šipkami reprezentují tyto enzymy: **1** – acetoacetylkoenzymAcetyltransferasa **2** – hydroxymethylglutaryl-CoAsyntasa, **3** – 3-hydroxy3-

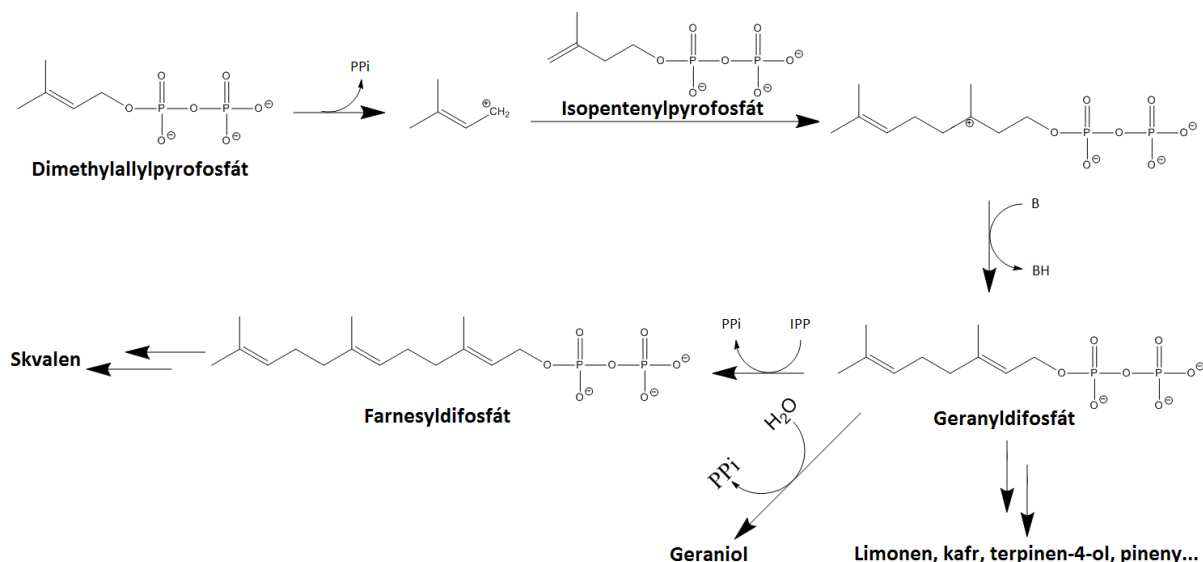
methylglutarylCoA-reduktasa, **4** – mevalonátkinasa, **5** – mevalonátfosfátkinasa, **6** – mevalonátpyrofosfát-dekarboxylasa, **7** – isopentenylidifosfát-delta-isomerasy⁷²

Nemevalonová syntéza (obr. 2.6) vychází z enzymatické dekarboxylace pyruvátu na thiazolovém kruhu thiamindifosfátu (sloužícího jako koenzym). Dále proběhne kondenzace dekarboxylovaného pyruvátu s glyceralddehyd-3-fosfátem, přičemž vznikne 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát, jenž se následně z thiamindifosfátu odštěpí. Dalším krokem je výměna pozic methylu s vodíkem takzvaným acyloinovým přesmykem, což je vlastně vzájemná výměna hydroxylové skupiny a sousedné oxoskupiny. Poté následuje redukce nově vzniklé oxoskupiny na hydroxylovou skupinu a vzniká tím 2-C-methyl-D-erythriol-4-fosfát. Na jeho fosfát se reakcí s cytidyltrifosfátem připojí cytidylfosfát za vzniku difosfocytidyl-2-C-methylerythriolu. Následuje fosforylace hydroxylové skupiny v poloze 2 pomocí ATP, přičemž se produkt záhy zacyklí na 2C-methyl-D-erythriol-2,4-cyklodifosfát za současného uvolnění cytidylmonofosfátu⁷¹. Dalšími kroky, které nejsou zcela objasněny, vzniká 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfát. Při jeho redukci jediným enzymem současně vznikají isopentenylpyrofosfát a dimethylallylpyrofosfát⁷⁰.



Obr. 2.6: Nemevalonátová biosyntéza isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu. Čísła pod šipkami reprezentují tyto enzymy: **1** – 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátsyntasa^w, **2** – 2C-methyl-D-erythriol-4-fosfátsyntasa, **3** – 2C-methyl-D-erythriol-4-fosfátcytidyltransferasa^w, **4** – 4-difosfocytidyl-2C-methyl-D-erythriolkinasa^w, **5** – 2C-methyl-D-erythriol-2,4-cyklodifosfátsyntasa^w, **6** – 1-hydroxy-2-(E)-butenyl-4-difosfátreduktasa⁷⁰

Výsledkem obou cest je vznik dvou sloučenin, isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu. Z nich dál vznikají prekurzory terpenických sloučenin, z nichž geranylidifosfát se považuje za univerzální (obr. 2.7)⁷³.



Obr. 2.7: Reakční mechanismus geranioldifosfátsyntasy (první tři reakce) a některé další možné reakce

Z geranioldifosfátu vzniká geraniol prostřednictvím geraniolsyntasy, ne však v jednom, nýbrž ve dvou krocích. Místo přímé hydrolýzy fosfoesterové vazby dojde k oddělení difosfátu a vzniku karbokationtu jako intermediátu. Tento meziprodukt následně zreaguje s vodou za vzniku geraniolu. Nerol, cis-isomer geraniolu, při této reakci vůbec nevzniká⁷³.

2.2.2.3. Steroly

Biosyntéza sterolů je vlastně pokračováním syntézy terpenoidů. Farnesylpyrophosfát se ve dvou krocích transformuje na skvalen. Skvalen se dále oxiduje skvalenepoxidase a následně se enzymem lanosterolsyntasa změnil na lanosterol. Dalšími enzymy se tato sloučenina může měnit na jiné steroly⁷².

2.3. Vlastnosti mastných alkoholů a jejich derivátů

2.3.1. Obecné vlastnosti

Nasycené nevětvené mastné alkoholy s kratším postranním řetězcem (do 12 uhlíků) jsou při teplotě 25°C kapaliny, alkoholy s počtem uhlíků 13 a více jsou tuhé látky. S prodloužením řetězce klesá rozpustnost ve vodě, při teplotě 25°C je již zcela nerozpustný dodekanol. V tom samém směru také klesá kyselost vodíku hydroxylové skupiny¹. Mastné alkoholy patří mezi amfifilní (amfipatické) látky, což jsou látky, které obsahují hydrofilní a hydrofobní skupinu⁷⁴. Amfifilní látky obecně jsou označovány jako surfaktanty. Jsou to látky snižující povrchové napětí kapalin kvůli schopnosti koncentrovat se na jejich volných površích, nebo fázových rozhraních nemísitelných kapalin⁷⁵.

Mastné alkoholy (a také kyseliny) vytvářejí na vodní hladině monovrstvy známé jako „Langmuirovy filmy“. Tato vrstva se formuje při nadávkování kapky alkoholu nemísitelného s vodou na hladinu vody, přičemž se molekuly alkoholu postupně rozprostírají do

monomolekulární vrstvy do chvíle, než se dosáhne rovnováha mezi vrstvou a zbytkem kapky. V případě 1-dekanolu se ukazuje, že jeho molekuly jsou uspořádány vertikálně a blízko *all-trans* uspořádání⁷⁴.

2.3.2. Reaktivita

2.3.2.1. Reaktivita hydroxylové skupiny

Hydroxylovou skupinu neethoxylovaných i ethoxylovaných alkoholů je možno oxidovat oxidem chromovým na skupinu karboxylovou⁷⁶. Kromě toho ochotně reagují se silylchloridy, například trimethylsilylchloridem³² a *tert*-butyldimethylsilylchloridem⁷⁷. To samé platí pro organické sulfonylchloridy (mesylchlorid⁷⁸ a tosylchlorid⁷⁹). S methylačními činidly (například diazometanem) vytvářejí alkoholy methyl ethery⁸⁰. S aldehydy (například betinaldehydem) reagují na hemiacetály a acetály⁸¹. S chloridy a anhydridy kyselin poskytují příslušné estery^{82,83}.

2.3.2.2. Reaktivita uhlíkového řetězce

Nenasycený lineární uhlíkový řetězec je reaktivní právě v místě násobných vazeb. Popsány byly adice dimethyldisulfidu, ozonu a mnoho dalších⁸⁴. Některé alkoholy s nenasyceným postranním řetězcem mají za určitých podmínek schopnost polymerovat, jako například linalool⁸⁵.

2.3.3. Biologická aktivita

2.3.3.1. Mastné alkoholy

Některé mastné alkoholy vykazují antimikrobiální aktivitu. O velikosti jejich účinku rozhoduje délka jejich řetězce, přítomnost násobných vazeb a organismus, na který působí⁸⁶. Pro bakterii *S. aureus* byl nejtoxičtější undekanol, nejvyšší inhibiči růstu vykazovaly tri-, tetra- a pentadekanol. Již heptadekanol byl pro bakterie téměř netoxický, čím se nepotvrdila dřívější hypotéza, že s klesající hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda roste toxický účinek mastných alkoholů⁸⁷. Nejsilnější antimikrobiální aktivitu měly pro *Mycobacterium tuberculosis* alkoholy C₈ až C₁₁, přičemž největší inhibiči růstu vykazoval n-oktanol⁸⁶. Mechanismem účinku je rozrušování bakteriálních membrán^{86,87}.

Vodní živočichové jsou vystavováni surfaktantům používaných v domácnosti. Polyethoxydy (ethoxyláty mastných alkoholů), jedna se složek surfaktantů, jsou ve vodném prostředí degradovány na mastné alkoholy. Mastné alkoholy jsou mnohem lipofilnější než polyethoxydy a víc se akumulují ve tkáních živých organismů, což se projeví jejich větší toxicitou. Toxicita surfaktantů se proto testuje na vodních organismech, a to *Daphnia magna*, řasech a některých druzích ryb⁷⁵.

2.3.3.2. Terpenické alkoholy

Látky ze skupiny terpenoidů obecně vykazují aktivitu vůči bakteriím, virům, houbám a prvokům². Z alkoholů se vůči některým druhům bakterií ukázaly být účinné geraniol,

citronelol⁸⁸, nerol, linalool⁸⁹, farnesol, nerolidol⁹⁰, fytol⁹¹ a další. Antimykotický účinek byl pozorován u farnesolu²⁵. Jejich účinnost silně kolísá v závislosti na bakteriálních druzích, na které se aplikují. Jsou tu náznaky, že mechanismem účinku by mohlo být, podobně jako u mastných alkoholů, rozrušování buněčných membrán, následkem čeho se do okolního prostředí uvolní měřitelné množství draselných iontů. Bylo to prokázáno pro farnesol a nerolidol⁹⁰.

2.4. Využití mastných, terpenických alkoholů a sterolů

Mastné alkoholy se obecně používají jako emulgátory, změkčovadla a protipěnicí činidla⁹². Bylo prokázáno, že uklidňují podrážděnou kůži. Některé mastné alkoholy se využívají jako sekundární neiontové surfaktanty v krémech a tělových mlécích (cetyl a stearylalkohol), a jako kožní penetranty a lubrikanty tablet a kapsulí (myristylalkohol)⁷⁵. Z jiných se vyrábějí jejich ethoxyláty reakcí s etylenoxidem (například z dodekanolu)⁹³.

Terpenické alkoholy (farnesol, geraniol, rhodinol, fytol a další) jsou vonné látky, které se přidávají do kosmetických přípravků, jako jsou tělové mléko, antiperspiranty, šampony, sprchové gely, toaletní mýdla, laky na vlasy a další. Také se přidávají do čistících prostředků a detergentů^{94,95,96,97}. Solanesol je 45-ti uhlíkatý terpenický alkohol, který je prekurzorem koenzymu Q a analogů vitamínu K využívaných na léčbu vředů, srdečních a onkologických nemocí²⁸. V medicíně se také využívají některé deriváty steroidních látek jako protizánětlivá léčiva (např. prednizon)⁹⁸.

2.5. Analýza mastných a terpenických alkoholů

2.5.1. Separální metody

Mastné alkoholy se často vyskytují ve složitě smíšené směsi lipidů (viz část 2.1.3.4), která ještě může být složkou ještě komplexnější směsi. Pro izolaci všech lipidů z přírodních směsí byla u novorozeneckého mázku a lipidů z rohovky vepře použita metoda vyvinutá Folchem et al⁹⁹. Obecně se jedná o extrakci přírodní směsi chloroformem a methanolem po dobu jedné až dvou hodin a následnou centrifugaci. Po odpaření rozpouštědla se získá izolovaná směs lipidů. Podle potřeby ještě můžou následovat další čistící procedury^{99,100}. Pokud v izolovaných lipidech převažuje jeden typ látek a cílem konečné izolace je minoritní složka, musí se v tom případě oddělit majoritní složka od ostatních další metodou. Dochází k tomu například při zpracování rostlinných olejů, kde majoritní složku všech lipidů tvoří triacylglyceroly (95-98%). Pro oddělování se používají tři základní techniky: saponifikace (zahřívání lipidů v alkoholickém roztoku hydroxidu draselného), liquid-liquid partition a chromatografické techniky (sloupcová chromatografie, nebo nověji používané superkritická fluidní separace a extrakce na tuhé fázi). Pro některé skupiny lipidů může být jedna nebo více ze zmíněných technik nevhodná, protože se tím může změnit jejich složení¹⁰¹. Dál se získané frakce, resp. všechny lipidy dělí pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC), nebo preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)^{100,99}. Pro frakci obsahující volné a/nebo esterově vázané mastné alkoholy se může použít saponifikace za následné

extrakce nesaponifikovatelných složek dietyléterem. Získaná frakce se dále dělí na TLC, kde jeden pruh vytvoří pouze mastné alkoholy⁹⁹.

Pro izolaci frakce mastných alkoholů z jednodušších směsí, jako je odpadní voda, se po technikách sloužících k zakoncentrování rovnou použije TLC¹⁰².

2.5.2. Spektrometrické metody

2.5.2.1. Spektroskopické metody

Mastné alkoholy vykazují slabou absorpci v UV-VIS oblasti. Ke zvýšení citlivosti detekce se musí derivatizovat¹⁰³. Infračervenou spektroskopií lze pro určení různých parametrů monovrstev mastných alkoholů na rozhraní vzduchu a vody, jako například sklon molekulových řetězců k vodní hladině, nebo samotnou identifikaci hydroxylové skupiny¹⁰⁴.

2.5.2.2. Hmotnostní spektrometrie

2.5.2.2.1. Analýza mastných alkoholů obecně

Z dalších spektrometrických metod se k detekci a identifikaci alkoholů používá především hmotnostní spektrometrie. Při detekci elektronovou ionizací je možné je detegovat přímo¹⁰⁵, při použití s plynovou chromatografií se derivatizují k zlepšení chromatografických vlastností¹⁰⁶. Měkké ionizační techniky (např. ESI, APCI, MALDI) nejsou schopny detegovat samotné mastné a terpenické alkoholy s dostatečnou citlivostí^{6,75}. Proto je při jejich analýze derivatizace nezbytná.

Derivatizační techniky mastných alkoholů lze rozdělit na: 1. záměnu hydroxylové skupiny za jinou skupinu 2. záměnu vodíku hydroxylové skupiny za derivatizační činidlo a 3. v případě nenasycených alkoholů adice derivatizačního činidla na dvojnou vazbu.

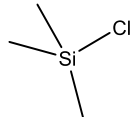
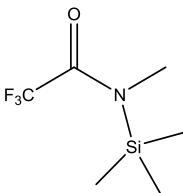
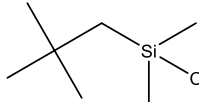
První možností transformace primárního alkoholu je jeho oxidace na karboxylovou kyselinu Jonesovým činidlem. Po této derivatizaci je možné detegovat samotné karboxylové kyseliny v negativním módu⁷⁶. Druhou možností je změna hydroxylové skupiny na skupinu sulfonovou, kterou také lze detegovat v negativním módu¹⁰⁷. Pro konkrétnější údaje viz tab. 2.3.

Tab. 2.3: Metody derivatizace hydroxylové skupiny alkoholů.

Typ derivatizace	Derivatizace látkou	Vzorec látky	Metoda analýzy	Cíl	Ref
Změna hydroxylové skupiny na jinou skupinu	Oxid chromový	CrO ₃	ESI-MS	Oxidace na kyselinu, dosáhnutí signálu v negativním módu	76
	Kyselina sírová	H ₂ SO ₄	„liquid secondary ion mass spektrometry“	Příprava sulfonových kyselin a identifikace dvojných vazeb	107

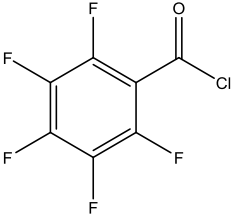
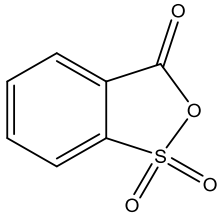
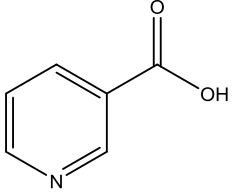
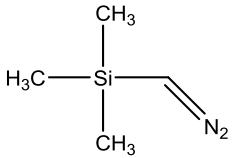
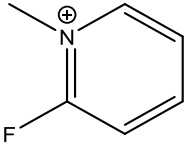
Mezi metody, které vytváří deriváty alkoholů, patří silylace, neboli derivatizace alkoholů s organokřemičitými sloučeninami. Silylace je velmi užitečná metoda při analýze mastných alkoholů plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií s elektronovou ionizací (EI-MS), protože potlačením interakcí dipól-dipól v původních alkoholech se po derivatizaci výrazně zvýší jejich těkavost¹⁰⁶. Příklady vyvinutých silylací jsou v tabulce 2.4.

Tab. 2.4: Příklady derivatizačních činidel sloužících k silylaci alkoholů.

Typ derivatizace	Derivatizace látkou	Vzorec látky	Metoda analýzy	Cíl	Ref
Silylace	Trimethyl-chlorsilan		GC/EI-MS	Stanovení fytole / analýza (ne)nasyčených alkoholů a diolů	32
	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl) trifluoroacetamid		GC/EI-MS	Stanovení aminokyselin, mastných alkoholů, mastných kyselin a sterolů	20
	<i>Terc</i> -butyl dimethylsilyl chlorid		GC/MS	Identifikace <i>n</i> -, iso- a anteiso- alkoholů	1
			GC/MS	Hledání dvojných vazeb	77

Acylace a alkylace jsou další možnosti derivatizace mastných alkoholů. Mohou se použít jako alternativní derivatizace k silylaci při použití v GC/MS. Podobně jako při silylaci se sníží polarita derivátů a tím se zvýší jejich těkavost. Mezi acylace patří například acetylace a reakce s pentafluorobenzoylchloridem, mezi alkylace patří methylace a reakce s pentafluorobenzylbromidem¹⁰⁶. V snaze zajistit permanentní náboj mastných alkoholů po derivatizaci se používají činidla s permanentním kladným nábojem, jako je sůl 2-fluor-*N*-methylpyridinia, nebo betainaldehyd. V případě 2-fluor-*N*-methylpyridinia odstoupí fluor a na aromatický kruh se naváže alkohol přes kyslík. Pro další příklady viz tab. 2.5.


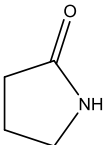
Tab. 2.5: Vybrané acylace a alkylace hydroxylové skupiny.

Typ derivatizace	Derivatizace látkou	Vzorec látky	Metoda analýzy	Cíl	Ref
Acylace	Pentafluorobenzoyl chlorid		GC/CI-MS	Derivatizace chlorovaných mastných alkoholů	82
	Anhydrid kyseliny 2-sulfobenzoové		HPLC/ESI-MS	Derivatizace mastných alkoholů a ethoxylátů alkoholů a jejich analýza	83
	Kyselina nikotinová		EI-MS	Hledání dvojných vazeb a větvení mastných alkoholů	106
Alkylace	Diazomethan	CH_2N_2	GC/EI-MS	Malé zvýšení molekulové hmotnosti	106
	Trimethylsilyl diazomethan		Možné využití v EI-MS*	Alternativa k toxickému diazomethanu/ metylace stericky bráněných skupin	80
	2-fluor-N-methylpyridinium p-toluylsulfonát		HPLC/ESI-MS	Současná detekce mastných alkoholů a jejich ethoxylátů	108

*V článku nebyla provedena analýza pomocí MS, ale pomocí NMR. Produkty jsou ale identické jako při methylaci diazomethanem, která se v MS využívá.

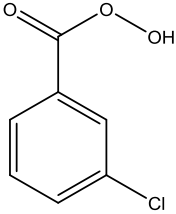
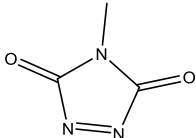
Ostatní derivatizace mastných alkoholů jsou založeny na specifické reakci hydroxylové skupiny. Pro různé účely mohou být derivatizovány například pyridinem nebo pyrrolidin-2-onem (tab. 2.6).

Tab. 2.6: Ostatní derivatizace hydroxylové skupiny.

Typ derivatizace	Derivatizace látkou	Vzorec látky	Metoda analýzy	Cíl	Ref
Ostatní derivatizace –OH skupiny	Pyridin		HPLC/ESI-MS	Identifikace mastných alkoholů v tkáni štítné žlázy	109
			MALDI	Identifikace mastných alkoholů a cholesterolu v lidských vlasech	6
	Pyrrolidin-2-on		EI-MS	Hledání dvojných vazeb a větvení	106

U nenasycených mastných alkoholů je možné derivatizovat jejich násobné vazby (tab. 2.7). Jelikož jsou tyto derivatizace univerzální pro všechny nenasycené sloučeniny, budou tady uvedeny příklady používaných derivatizací v hmotnostní spektrometrii pro podobné sloučeniny (zejména mastné kyseliny a dlouhé uhlovodíky). První skupinou reakcí je oxidace dvojných vazeb. Jde například o epoxidaci a ozonolýzu, přičemž je lze uplatnit pouze u sloučenin s jednou dvojnou vazbou⁸⁴. Druhou skupinu reakcí tvoří adice reakčního činidla na dvojnou vazbu. Jedním z činidel je dimetyldisulfid, který se může použít i na analýzu látek se dvěma dvojnými vazbami, kde podle jejich vzdálenosti od sebe vzniknou buď thiomethylové skupiny, nebo cyklické adukty s jedním atomem síry v kruhu¹¹⁰. Pro hledání konjugovaných vazeb je vhodný 4-methyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion, který s nimi vytváří diels-alderove adukty¹¹¹.

Tab. 2.7: Derivatizace nenasycených mastných alkoholů v místě dvojně vazby.

Typ derivatizace	Derivatizace látkou	Vzorec látky	Metoda analýzy	Cíl	Ref
Reakce na dvojně vazbě	m-chlór perbenzoová kyselina		EI-MS	Lokalizace dvojných vazeb nenasycených látek s jednou dvojnou vazbou	106
	Ozon	O ₃	EI-MS	Lokalizace dvojných vazeb polynenasycených alkoholů	110
	4-methyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion		GC/EI-MS	Geometrie a pozice konjugovaných dvojných vazeb	111

2.5.2.2.2. Analýza větvených mastných alkoholů

Mastné alkoholy lze podle jejich větvení rozdělit plynovou chromatografií¹. Samotná spektra alkoholů však neposkytují informace o poloze větvení, proto se pro tento musí derivatizovat. Pro hledání větvení ze spekter elektronové ionizace existuje několik derivatizačních procedur popsaných výše (reakce s kyselinou nikotinovou a pyrrolidin-2-onem). Větvení se projeví zeslabením signálu v místě větvení.

Pro analýzu derivátů mastných alkoholů měkkými ionizačními technikami je vhodné, aby měla derivatizační skupina snadno nabíjitelný, případně permanentně nabitý atom. Bylo popsáno několik derivatizačních postupů mastných alkoholů pro měkké ionizační techniky (viz výše), avšak žádná z nich nebyla prozkoumána na detekci větvení v řetězcích alkoholů.

3. Cíl práce

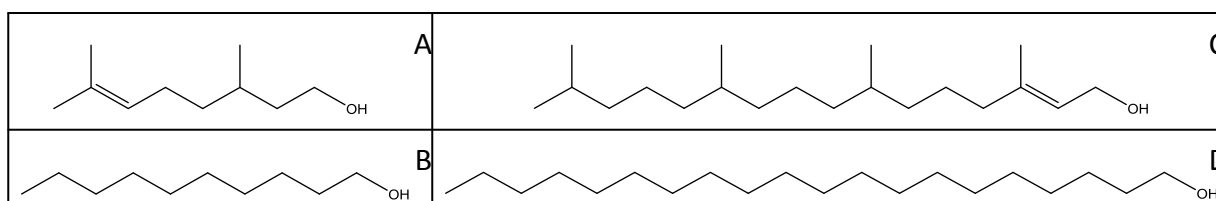
Cílem práce je prozkoumat možnosti derivatizace mastných alifatických alkoholů s využitím známých i nově navržených postupů a reakcí. Vzniklé deriváty budou testovány s ohledem na možnost jejich detekce pomocí měkkých ionizačních technik hmotnostní spektrometrie. Současně se bude testovat možnost využít fragmentační spektra derivátů pro určování poloh methylového větvení v řetězcích alifatických alkoholů.

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

- 2-Fluor-*N*-methylpyridinium-*p*-toluensulfonát (2-FMPS), $\geq 90\%$, (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- 4-Jodpyridin, 97%, (Sigma-Aldrich, Čína)
- 8-Methylnonan-1-ol, Sigma-Aldrich (čistota a země původu neuvedena)
- Aceton, $\geq 99,8\%$ (Sigma-Aldrich, UK)
- Acetonitril, 99,9% (Fluka, Německo)
- Acetylchlorid, $\geq 99,0\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Arachidylarachidát, (Sigma-Aldrich, Německo, čistota neuvedena) roztok 4 mg/ml, 2:1 (v/v, aceton:chloroform) připraven v laboratoři školitele
- Beta-citronelol, 95% (Sigma-Aldrich, Německo), vzorec uveden na obr. 4.1
- Betinaldehyd chlorid, $>99\%$, (Sigma-Aldrich, USA)
- Dekan-1-ol, 99% (Sigma-Aldrich, Německo), vzorec uveden na obr. 4.1
- Dicyklohexylkarbodiimid (DCC), 99% (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Diethylether, 99,98%, (Lach-ner, Česká republika, destilovaný v laboratoři školitele)
- Dichlormethan – 99,8% (Lach-Ner, Česká republika, destilovaný v laboratoři školitele)
- Dimetylamino­pyridin (DMAP), 98% (Fluka, Čína)
- Eikosan-1-ol, 98%, (Sigma-Aldrich, India), vzorec uveden na obr. 4.1
- Ethylacetát, $\geq 99,7\%$ (Fluka, Německo)
- Fytol, 97% směs isomerů (Sigma-Aldrich, Německo), vzorec uveden na obr. 4.1
- Hexan, 97% (Fluka, Německo)
- Chloroform, p.a., stabilizovaný 1% ethanolem (Penta, Česká republika, destilovaný v laboratoři školitele)
- Isochinolin, 97%, (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), 98% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 5-nitro-2-hydroxybenzoová (NHB), 99%, (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- Kyselina fosfomolybdenová (PMA) – činidlo připraveno v laboratoři školitele: k 900 ml destilované vody se přidalo 60 ml 96% kyseliny sírové, 25 g hydrátu kyseliny fosfomolybdenové a 10 g síranu ceričitého. Směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 2 hodin
- Kyselina nikotinová, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- Kyselina sírová, 96% p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Mesylchlorid, $\geq 99,7\%$ (Sigma-Aldrich, Čína)
- Methanol, $\geq 99,9\%$ (Fluka, Německo)
- Methyljodid, 99%, stabilizovaný (Acros Organics, UK)
- Pentadekan-1-ol, 99% (Sigma-Aldrich, USA)
- Pyridin, 99,8%, bezvodý, (Sigma-Aldrich, Německo)
- Pyrrolidin-2-on, $\geq 99\%$, (Sigma-Aldrich, USA)

- Rhodamin 6G, 95%, (Sigma-Aldrich, UK) ethanolový roztok (0,05%) připraven v laboratoři školitele
- Thionylchlorid, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triethylamin (TEA), 99%, (Merck, Německo)
- Trifenylfosfin, (Lachema, Česká republika, čistota neuvedena)
- Toluén, 99% p.a. (Penta, Česká republika)
- Uhličitan stříbrný, (Lachema, Česká republika, čistota neuvedena)



Obr. 4.1: Vzorce modelových mastných alkoholů: citronelol (A), dekan-1-ol (B), fytol (C) a eikosan-1-ol (D).

4.2. Použité materiály

- Silikagel pro TLC (60G, Merck, Německo)
- Silikagel pro filtraci (velikost částic: 60-120 μm , Merck, Německo)
- Vata přečištěná Soxhletovou extrakcí ve směsi chloroform:methanol (1:1, v/v) po dobu 10 hodin

4.3. Přírodní materiály

- Panenský včelí vosk, sběr: 2007, lokalita: ČR

4.4. Přístroje a zařízení

- Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent 5975B MSD (Agilent, USA)
- Hmotnostní spektrometr SYNAPT G2 (Waters, USA)
- Analytické váhy Mettler AE 240
- Termomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- Elektrická ploténka (ETA, Česká republika)
- UV lampa Camag (Maneko, Česká republika)

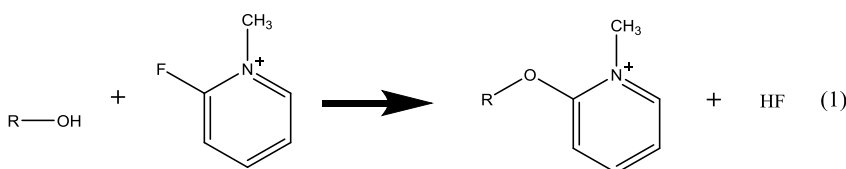
4.5. Pracovní postupy syntéz derivátů mastných alkoholů

4.5.1. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes kyslík

4.5.1.1. Derivatizace 2-fluor-*N*-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátem

K 5,5 ml acetonitrilu bylo přidáno 30 μ l TEA, 60 μ l alkoholu (dekanolu nebo citronelolu) a 50 mg 2-FMPS. Reakční směs byla míchána při rychlosti 100 otáček za minutu a laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Poté byl objem směsi snížen přibližně na 0,3 ml odpařováním pod dusíkem. V případě dekanolu byla získána sytě žlutá viskózní kapalina, v případě citronelolu žlutohnědá viskózní kapalina. K oběma kapalinám bylo přidáno 1,5 ml destilované vody.

Reakce probíhala dle následující rovnice:



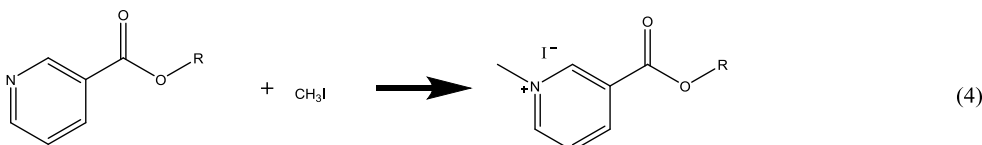
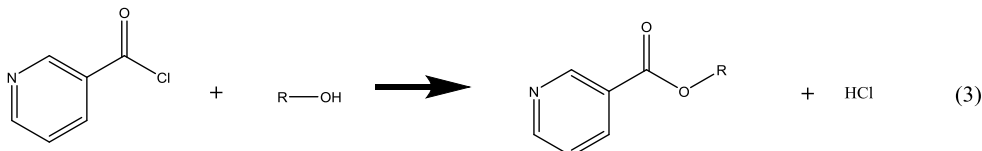
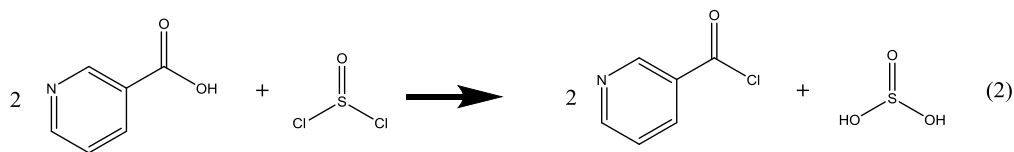
Rovnice č. 1: Reakce alifatického alkoholu s 2-FMPS.

4.5.1.2. Derivatizace kyselinou nikotinovou a methyljodidem

K 0,3 mg kyseliny nikotinové bylo přidáno 20 μ l thionylchloridu a vzniklá směs byla zahřátá v olejové lázni v skleněné vialce se zúženým dnem (screw neck micro vial) na 100 °C po dobu 10 minut. Přebytek thionylchloridu byl odpařen proudem dusíku a na stěnách se vytvořil bílý prášek chloridu kyseliny nikotinové. Chlorid kyseliny byl rozpuštěn v 30 μ l 20% roztoku citronelolu (resp. dekanolu) v acetonitrilu. Roztok byl zahřát na 100 °C po dobu 1,5 minuty. Byl získán ester kyseliny nikotinové ve formě průhledné kapaliny.

K 5,0 μ l alikvótu odebraného z připraveného roztoku esteru bylo přidáno 5,0 μ l methyljodidu. Výsledný roztok byl mírně zahříván horkovzdušnou pistolí po dobu jedné minuty pro urychlení reakce. Průhledný roztok se zbarvil silně žlutě až červeně v případě citronelyl esteru a slabě zeleně v případě decylesteru.

Reakce probíhaly dle následujících rovnic:



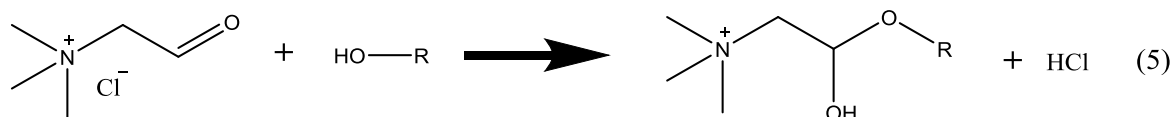
Rovnice č. 2 a 3: Esterifikace kyseliny nikotinové za přítomnosti thionylchloridu.

Rovnice č. 4: Methylace esterů kyseliny nikotinové.

4.5.1.3. Derivatizace betainaldehydem

Zrnko betainaldehydu o hmotnosti přibližně 300 µg bylo ponořeno do 4 µl fytole a byla provedena ultrazvuková sonikace po dobu jedné hodiny. Poté bylo k směsi přidáno 5 µl acetonitrilu, ale betainaldehyd se úplně nerozpustil. Směs byla postupně zahřívána z 40 °C na 120 °C po dobu 12 minut a poté byla zahřívána na 120 °C po dobu dalších 13 minut. Zrnko betainaldehydu zčervenalo, což signalizovalo proběhnutí reakce, tj. vzniku hemiacetálu.

Reakce probíhala dle následující rovnice:



Rovnice č. 5: Syntéza hemiacetálu z betainaldehydu a alifatického mastného alkoholu.

4.5.1.4. Derivatizace kyselinou 2,5-dihydroxybenzoovou a kyselinou 5-nitro-2-hydroxybenzoovou

Byly připraveny čtyři vzorky o složení shrnutém v tab. 4.1.

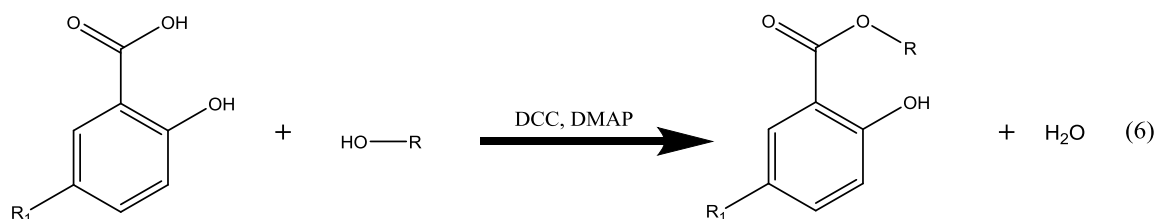
Tab. 4.1: Složení vzorků při derivatizaci kyselinami DHB a NHB.

Vz. č.	hmotnost kyseliny (mg)	objem alkoholu (µl)
1	46,2 (DHB)	4,6 (citronelol)
2	46,2 (DHB)	4,8 (dekanol)
3	54,9 (NHB)	4,6 (citronelol)
4	54,9 (NHB)	4,8 (dekanol)

Do všech vzorků bylo přidáno 300 µl dichlormethanu, přičemž se nikdy zcela nerozpustila ani jedna kyselina. Ke každému vzorku bylo přidáno 3,2 mg DCC v 100 µl

dichlormethanu sloužícího jako aktivátor kyseliny a 2 mg DMAP sloužícího jako katalyzátor. Směs se nechala míchat při laboratorní teplotě po dobu 3,5 hodin a rychlosti 300 otáček za minutu. Po skončení reakce byla provedena analytická TLC na komerčním silikagelu a s mobilní fází hexan:etylacetát (v/v, 83:17). Látky byly vizualizovány pomocí PMA. Poté byla provedena preparativní TLC se stejnou mobilní a stacionární fází, pásy produktů byly vizualizovány pod UV lampou ($\lambda = 254 \text{ nm}$), označeny tužkou a seškrábány do 6 ml acetonitrilu. Následně byla provedena extrakce ultrazvukovou sonikací po dobu 45 minut při laboratorní teplotě. Nakonec se vzniklé roztoky přefiltrovaly, aby byly zbaveny pevných částí. Byly získány estery kyselin DHB a NHB s citronelolem a dekanolem.

Reakce probíhala dle následující rovnice:



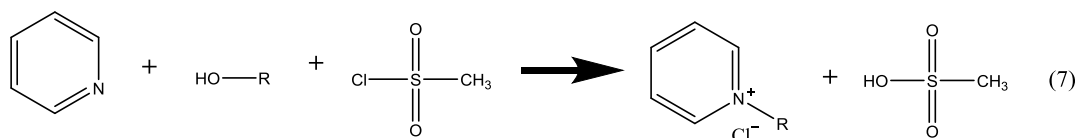
Rovnice č. 6: Schéma esterifikace vybraných karboxylových kyselin a alkoholů. $\text{R}_1 = -\text{OH}, -\text{NO}_2$

4.5.2. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes dusík

4.5.2.1. Derivatizace pyridinem

K 400 μl acetonitrilu bylo přidáno 5 μl alkoholu (dekanolu, citronelolu, 8-methylnonanolu, nebo fytolu). Pro 4,5 mg eikosanolu bylo jako rozpouštědlo použito 500 μl směsi acetonitril:hexan v poměru 9:1. Ke všem zmíněným roztokům bylo následně přidáno 5 μl pyridinu a 5 μl mesylchloridu. Všechny roztoky byly zahřívány na 50 $^\circ\text{C}$ po dobu dvou hodin.

Reakce probíhala dle následující souhrnné rovnice:

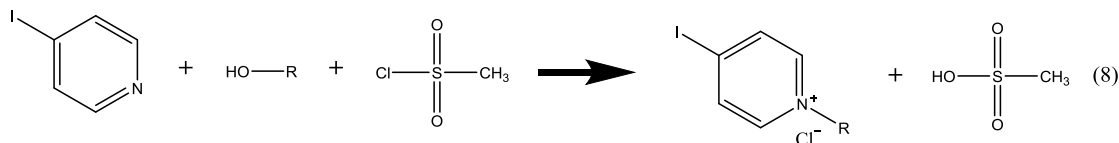


Rovnice č. 7: Obecná stechiometrická rovnice reakce pyridinu a alifatických mastných alkoholů.

4.5.2.2. Derivatizace 4-jodpyridinem

K 1 ml acetonitrilu bylo přidáno 10 mg 4-jodpyridinu, čím se vytvořil přesycený roztok. Následně bylo k přesycenému roztoku přidáno 5 μl fytolu a 5 μl mesylchloridu. Výsledný roztok byl zahříván 2 hodiny při 50 $^\circ\text{C}$.

Reakce probíhala dle následující souhrnné rovnice:

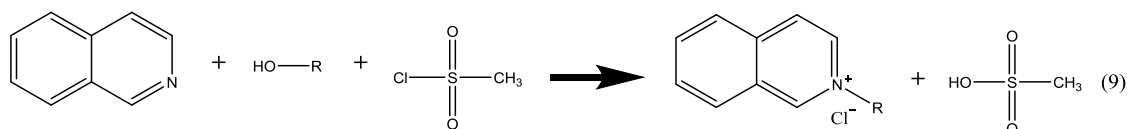


Rovnice č. 8: Stechiometrická rovnice reakce 4-jodpyridinu, alifatického alkoholu a mesylchloridu.

4.5.2.3. Derivatizace isochinolinem

K 1 ml acetonitrilu bylo přidáno 5 μ l isochinolinu, 5 μ l fytolu a 5 μ l mesylchloridu. Výsledný roztok měl růžovou barvu. Následně byl zahřát na 2 hodiny při teplotě 50 $^{\circ}$ C.

Reakce probíhala dle následující souhrnné reakce:

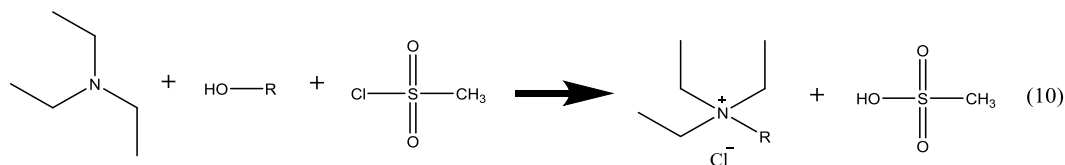


Rovnice č. 9: Stechiometrická rovnice reakce isochinolinu, fytolu a mesylchloridu.

4.5.2.4. Derivatizace triethylaminem

K 10 μ l fytolu bylo přidáno 10 μ l mesylchloridu a poté 10 μ l TEA. Bylo pozorováno vyvíjení bílé páry v důsledku prudkého zahřátí směsi. Následně bylo k směsi přidáno 400 μ l acetonitrilu a výsledný roztok se nechal zahřívát jednu hodinu při 40 $^{\circ}$ C. Při zahřívání roztok slabě zežloutnul.

Reakce probíhala dle následující souhrnné rovnice:



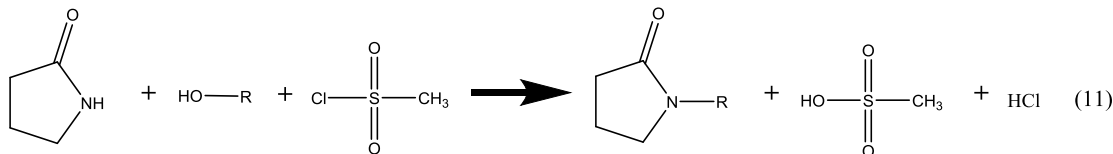
Rovnice č. 10: Stechiometrická rovnice reakce TEA, alifatického alkoholu a mesylchloridu.

4.5.2.5. Derivatizace pyrrolidin-2-onem

Alkohol o objemu 5 μ l (citronelol, fytol, nebo dekanol) byl vždy rozpuštěn v 100 μ l acetonitrilu a následně bylo k roztokům přidáno 5 μ l mesylchloridu a 5 μ l pyrrolidin-2-onu. Roztoky byly dál zahřívány 3 hodiny při teplotě 60 $^{\circ}$ C.

Bylo naváženo 1,0 mg eikosan-1-olu, který byl následně rozpuštěn v 50 μl hexanu a dále bylo přidáno 200 μl acetonitrilu. Poté bylo k roztoku přidáno 5 μl mesylchloridu a 5 μl pyrrolidin-2-onu. Roztok byl zahříván 3 hodiny při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$.

Reakce probíhala dle následující souhrnné rovnice:



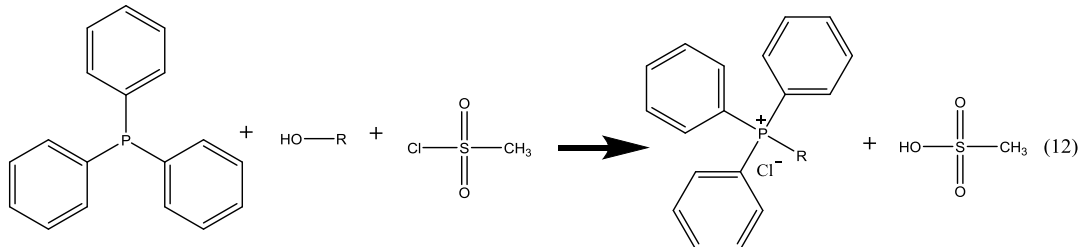
Rovnice č. 11: Stechiometrická rovnice reakce pyrrolidin-2-onu, alkoholu a mesylchloridu.

4.5.3. Příprava derivátů, ve kterých je mastný alkohol vázaný přes fosfor

4.5.3.1. Derivatizace trifenylofosfinem

Bylo naváženo 0,8 mg trifenylofosfinu a následně rozpuštěno v 200 μl acetonitrilu. Dále bylo k roztoku přidáno 2,5 μl fytolu a 2,0 μl mesylchloridu. Roztok byl poté zahříván 3 hodiny při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$.

Reakce probíhala dle následující souhrnné rovnice:



Rovnice č. 12: Stechiometrická rovnice reakce trifenylofosfinu, fytolu a mesylchloridu.

4.6. Pracovní postupy při izolaci mastných alkoholů z voskových esterů z včelího vosku a jejich následné derivatisace

4.6.1. Isolace voskových esterů z včelího vosku tenkovrstevnou chromatografií

4.6.1.1. Analytická tenkovrstvá chromatografie

Včelí vosk (100 mg) byl zcela rozpuštěn v 5 ml chloroformu. Roztok byl následně analyzován pomocí TLC pro zjištění retardačního faktoru voskových esterů. Jako standard pro voskové estery byl použit roztok arachidylarachidátu. Pro analytickou TLC byla použita skleněná destička (25x75mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck), na kterou byly vzorky

naneseny skleněnou kapilárou. Jako mobilní fáze se použila směs diethylether:hexan (7:93 v/v). Po skončení vyvíjení byla provedena vizualizace sprejováním 10% roztokem kyseliny sírové ve vodě (v/v) a následným zahřátím desky horkovzdušnou pistolí.

4.6.1.2. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Pro izolaci voskových esterů byla provedena preparativní TLC. Pro preparativní TLC bylo použito 12 skleněných destiček (60x75mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck), na které byl nanášen roztok včelího vosku skleněnou kapilárou vždy třikrát na startovní linii. Poté byla jako mobilní fáze použita směs diethylether:hexan (7:93 v/v). Po vyvinutí a vyschnutí byly desky postříkány ethanolovým roztokem rhodaminu 6G (0,05%). Po odpaření ethanolu byly pod UV lampou při vlnové délce 254 nm vizualizovány a označeny pásy voskových esterů. Identifikace byla provedena na základě porovnání pozic skvrn z analytické TLC a pásů z preparativní TLC. Následně byly pásy voskových esterů z preparativních desek seškrábány do kolonky na vrstvu vaty, která byla překryta práškovým silikagelem o velikosti zrn 60-120 μm . Voskové estery byly pak extrahovány 8 ml éteru, který byl následně částečně odpařen proudem plynného dusíku a při objemu přibližně 2 ml byl přesunut do předem zvážené skleněné vialky. Obsah vialky byl odpařen do sucha a vialka byla vážená do chvíle, kdy už si udržovala konstantní hmotnost. Celkem bylo získáno 7,4 mg voskových esterů.

Pro analýzu plynovou chromatografií bylo 0,9 mg voskových esterů rozpuštěno v 0,9 ml chloroformu.

4.6.2. Transesterifikace voskových esterů na mastné alkoholy a methylestery mastných kyselin

Voskové estery o hmotnosti 3,0 mg izolované podle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1. byly v ampuli rozpuštěny v 250 μl směsi methanolu a chloroformu (3:2 v/v). Pro dosažení rozpuštění byla směs zahřata na 55 $^{\circ}\text{C}$. Následně bylo ke směsi v ampuli přidáno 17 μl acetylchloridu a ampule byla ponořena na 3 minuty do suchého ledu. Po zchlazení obsahu ampule byla zatavena nad plynovým horákem a vložena do vodní lázně na jednu hodinu při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$. Po ukončení transesterifikační reakce byla ampule otevřena a reakční směs zneutralizována uhličitánem stříbrným. Kapalína nad pevnou fází byla převedena do vialky s insertem.

4.6.3. Isolace mastných alkoholů ze směsi po transesterifikaci tenkovrstvou chromatografií

4.6.3.1. Analytická tenkovrstvá chromatografie

Byla provedena analytická TLC směsi mastných alkoholů a methylesterů mastných kyselin. Jako standard byl použit roztok arachidylarachidátu ke zjištění přítomnosti nezreagovaných voskových esterů a roztok eikosanolu k zjištění retardačního faktoru mastných alkoholů. Jako stacionární fáze byl použitý silikagel (silikagel 60G, Merck) na

skleněném sklíčku (25x75mm), na který byly vzorky aplikovány skleněnou kapilárou. Jako mobilní fáze byla použita směs diethylether:hexan (7:93, v/v) a při druhé optimalizaci směs těchto rozpouštědel v jiném poměru (17:83, v/v). Po ukončení vyvíjení a usušení desek byla provedena vizualizace 10% vodním roztokem kyseliny sírové (v/v) a zahřátím horkovzdušnou pistolí. Pro následující preparativní TLC byla vybrána mobilní fáze diethylether:hexan (17:83, v/v).

4.6.3.2. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Po identifikaci mastných alkoholů a přizpůsobení mobilní fáze k TLC analýze byla provedena preparativní TLC. Byla použita skleněná deska (60x75 mm), na níž byla stacionární fáze silikagel (silikagel 60G, Merck). Na desku byla nanášena směs mastných alkoholů a methylesterů mastných kyselin skleněnou kapilárou. Jako mobilní fáze byla použita směs diethylether:hexan v poměru 1:5. Po ukončení vyvíjení a vysušení desky byla deska postříkána alkoholickým roztokem rhodaminu 6G. Po odpaření ethanolu byl pruh mastných alkoholů vizualizován pod UV lampou UV zářením o vlnové délce 254 nm. Následně byl seškrábán do skleněné kolonky na vrstvu vaty, která byla částečně překryta vrstvou práškového silikagelu o velikosti zrn 60-120 μm . Seškrábaný silikagel byl extrahován 8 ml diethyletheru. Diethylether byl odpařen do objemu přibližně 2 ml a vzorek byl převeden do předem zvážené skleněné vialky. Odpařování diethyletheru pokračovalo dál ve vialce až do konstantní hmotnosti vialky. Bylo izolováno 1,3 mg směsi mastných alkoholů, které byly rozpuštěny v 900 μl chloroformu a analyzovány na GC/MS. Po opětovném odpaření zbylo opět 1,3 mg směsi mastných alkoholů, které byly až do doby derivatisace uchovávány pod hexanem (ve kterém se nerozpustily) při teplotě 4 °C.

4.6.4. Derivatizace mastných alkoholů z voskových esterů včelího vosku pyrrolidin-2-onem

Hexan, kterým byly převrstveny mastné alkoholy byl odpařen až do konstantní hmotnosti vialky. Alkoholy byly rozpuštěny v 50 μl toluenu a následně bylo k roztoku přidáno 150 μl acetonitrilu, 1 μl pyrrolidin-2-onu a 1 μl mesylchloridu. Roztok byl zahříván 3 hodiny při teplotě 60 °C (pro reakční schéma viz rovnice č 11).

4.7. Měření derivátů alkoholů na hmotnostních spektrometrech

4.7.1. Měření spekter na spektrometru LCQ Fleet

Deriváty alkoholů byly studovány na hmotnostním spektrometru LCQ Fleet se sférickou iontovou pastí. Analýza byla prováděna přímým nástřikem do iontového zdroje pro ESI, nebo APCI. Parametry jsou uvedeny v tab. 4.2. Kolizní energie byly vždy nastavovány individuálně, v rozsahu 20,0 – 31,5%. Nastavování šířky isolačního okna bylo také nastavováno manuálně, v rozmezí 1,0 – 1,5 Da. Časový záznam byl pořizován po dobu 1 až 2 minut. K vyhodnocování dat byl použitý program Xcalibur, verze 3.0.63 (Thermo Fischer Scientific, USA).

Tab. 4.2: Nastavení iontového zdroje při měření na LCQ Fleet.

Parametr	Hodnota		
	ESI+	ESI-	APCI+
Teplota zmlžovače (°C)	/	/	375
Teplota kapiláry (°C)	275	275	275
Napětí na tubusové čočce (V)	75,0	-125,0	105,0
Napětí na kapiláře (V)	10,0	-45,0	21,2
Průtok dusíku (steath gas) (a.u.)	8,00	8,00	60,00
Průtok dusíku (auxilliary gas) (a.u.)	0,00	0,00	10,00

4.7.2. Měření spekter na spektrometru LTQ Orbitrap XL

Deriváty alkoholů byly také studovány na hmotnostním spektrometru LTQ Orbitrap XL s lineární i orbitální pastí. Analýza byla prováděna přímým nástřikem do iontového zdroje pro ESI nebo APCI. K analýze byla použita metoda s parametry uvedenými v tab. 4.3. Kolizní energie byly vždy nastavovány individuálně, v rozsahu 20,0 – 30,0% (pro lineární iontovou past) a 18,0 – 53,0% (pro orbitální past). Šířka isolačního okna byla vždy 1,0 Da (pro lineární iontovou past i orbitální past). Časový záznam byl pořizován po dobu 1 až 2 minut. K vyhodnocování dat byl použitý program Xcalibur, verze 3.0.63 (Thermo Fischer Scientific, USA).

Tab. 4.3: Nastavení iontového zdroje při měření na LTQ Orbitrap XL.

Parametr	Hodnota		
	ESI+	ESI-	APCI+
Teplota zmlžovače (°C)	/	/	350
Teplota kapiláry (°C)	275	275	200
Napětí na tubusové čočce (V)	150,0	-120,0	100,0
Napětí na kapiláře (V)	9,0	-16,0	30,0
Průtok dusíku (steath gas) (a.u.)	35,00	50,00	55,00
Průtok dusíku (auxilliary gas) (a.u.)	5,00	10,00	5,00

4.7.3. Měření spekter na spektrometru Synapt G2

Derivát fytolu a betainaldehydu byl studován na hmotnostním spektrometru Synapt G2 s TOF analyzátozem. Analýza byla prováděna přímým nástřikem do ESI zdroje. Napětí na sprejovací kapiláře bylo nastaveno na 3,00 kV, napětí na vzorkovací kónické elektrodě bylo 15,00 V a napětí na extrakčním kónusu bylo 4,00 V. Teplota ve zdroji byla 120 °C, desolvatační teplota byla 220°C. Průtok desolvatačního plynu byl 600 a.u. Kolizní energie byla nastavena individuálně na hodnotu 35%. Šířka isolačního okna byla vždy 1,0 Da. Časový záznam byl pořizován po dobu 1 minuty. K vyhodnocování dat byl použitý program MassLynx, verze 4.1 (Waters).

4.7.4. Analýzy vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Deriváty pyrrolidin-2-onu byly analyzovány na GC/MS Agilent se zdrojem pro elektronovou ionizaci a kvadrupólovým analyzátozem. Přístroj byl vybaven kapilární kolonou Restek 13423 (30,0 m x 250,00 μm , tloušťka filmu 0,25 μm). Vzorek byl dávkován pomocí automatického dávkovače Agilent (injektor série 7683B). Pro sběr a vyhodnocení dat byl použit program Data analysis software - enhanced mode (Agilent Technologies).

Při GC/MS analýzách derivátů pyrrolidin-2-onu bylo využito dávkování s děličem toku a dělicí poměr byl 10:1 s dávkovaným objemem vzorku 1 μl a teplotou injektoru 200 $^{\circ}\text{C}$. Nosným plynem bylo hélium. Teplotní program byl nastaven tak, že počáteční teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$ byla udržována 2 minuty, následně byla zvyšovaná rychlostí 8 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do teploty 200 $^{\circ}\text{C}$, dále se rychlost zvýšila na 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ až do konečné teploty 320 $^{\circ}\text{C}$, která byla udržována dalších 10 minut. Vyhřívání rozhraní bylo topeno na 280 $^{\circ}\text{C}$, kvadrupólový hmotnostní analyzátor na 150 $^{\circ}\text{C}$ (max. 200 $^{\circ}\text{C}$) a teplota zdroje činila 230 $^{\circ}\text{C}$ (max. 250 $^{\circ}\text{C}$). Použitá ionizační energie byla 70 eV a spektra byla snímána v rozsahu m/z 25-600.

Při GC/MS analýzách voskových esterů včelího vosku bylo využito dávkování s děličem toku a dělicí poměr byl 5:1 s dávkovaným objemem vzorku 2 μl a teplotou injektoru 230 $^{\circ}\text{C}$. Nosným plynem bylo hélium. Teplotní program byl nastaven tak, že počáteční teplota kolony 60 $^{\circ}\text{C}$ byla udržována 2 minuty, následně byla zvyšovaná rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do konečné teploty 330 $^{\circ}\text{C}$, která byla udržována dalších 30 minut. Vyhřívání rozhraní bylo topeno na 300 $^{\circ}\text{C}$, kvadrupólový hmotnostní analyzátor na 150 $^{\circ}\text{C}$ (max. 200 $^{\circ}\text{C}$) a teplota zdroje činila 230 $^{\circ}\text{C}$ (max. 250 $^{\circ}\text{C}$). Použitá ionizační energie byla 70 eV a spektra byla snímána v rozsahu m/z 25-800.

Při GC/MS analýzách mastných alkoholů z voskových esterů včelího vosku bylo využito dávkování s děličem toku a dělicí poměr byl 5:1 s dávkovaným objemem vzorku 2 μl a teplotou injektoru 230 $^{\circ}\text{C}$. Nosným plynem bylo hélium. Teplotní program byl nastaven tak, že počáteční teplota kolony 60 $^{\circ}\text{C}$ byla udržována 2 minuty, následně byla zvyšovaná rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do konečné teploty 320 $^{\circ}\text{C}$, která byla udržována dalších 10 minut. Vyhřívání rozhraní bylo topeno na 280 $^{\circ}\text{C}$, kvadrupólový hmotnostní analyzátor na 150 $^{\circ}\text{C}$ (max. 200 $^{\circ}\text{C}$) a teplota zdroje činila 230 $^{\circ}\text{C}$ (max. 250 $^{\circ}\text{C}$). Použitá ionizační energie byla 70 eV a spektra byla snímána v rozsahu m/z 25-800.

5. Výsledky a diskuze

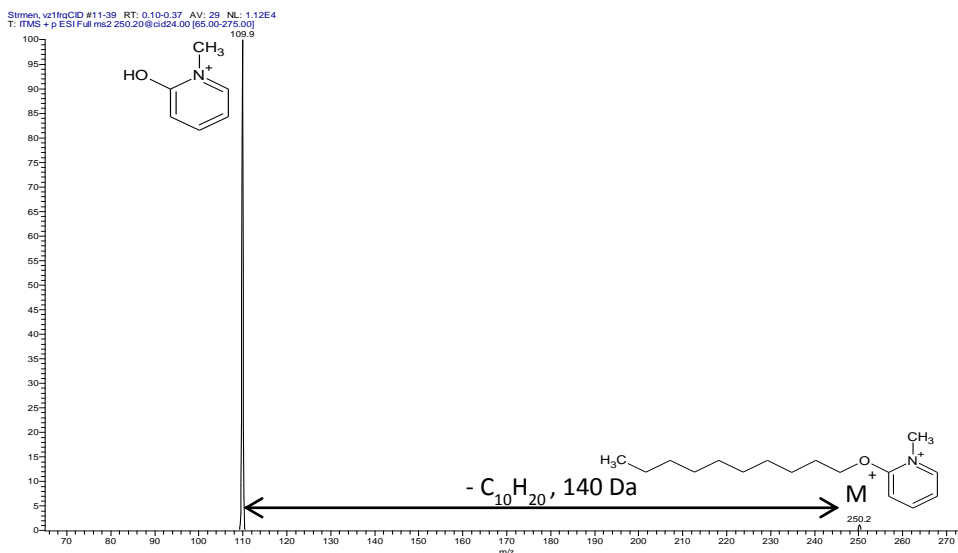
5.1. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů spojených s derivatizačním činidlem přes kyslík

5.1.1. Spektra derivátů alkoholů po reakci s 2-fluor-*N*-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátem

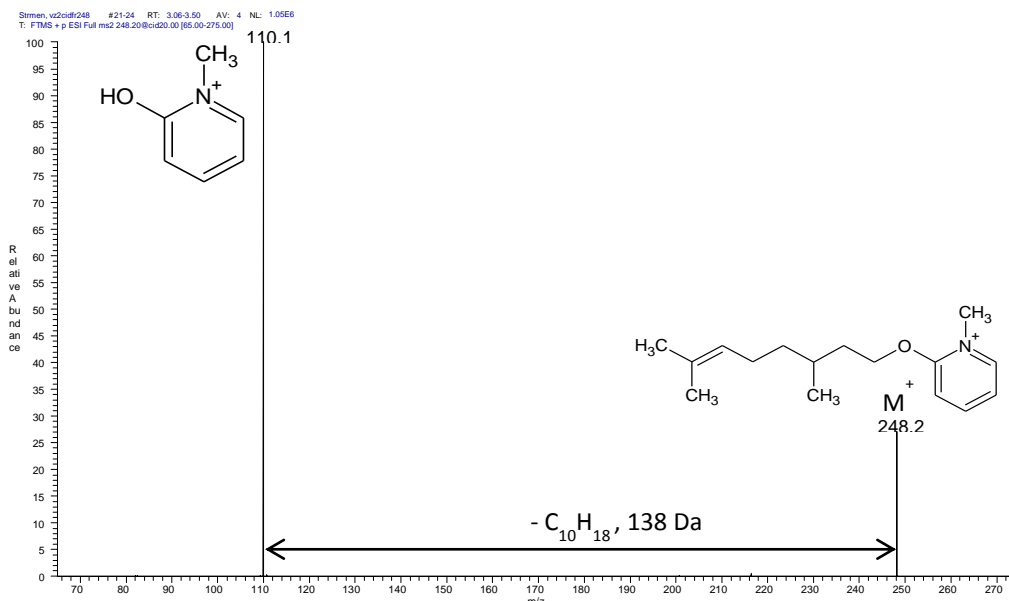
Deriváty 2-FMPS byly analyzovány na lineární iontové pasti a orbitální pasti. Jako iontový zdroj byl použitý ESI a pozitivní mód detekce, jelikož měly sloučeniny permanentní kladný náboj.

Provedení reakce bylo velmi jednoduché. Analýzou hmotnostní spektrometrii byly detegovány oba produkty s velmi dobrou intenzitou signálu. Potvrdilo se tedy uspokojivé zvýšení detekčního limitu mastných alkoholů touto metodou.

Při MS/MS se deriváty alkoholů (citronelolu a dekanolu) a 2-FMPS rozpadaly na 2-hydroxy-1-methylpyridiniový ion (m/z 110) a neutrální alken (v případě citronelolu na neutrální alkadien). Pro lokalizaci větvení je tato derivatizace nevhodná. (obr. 5.1 a 5.2).



Obr. 5.1: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu 2-FMPS a dekanolu na lineární iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 24,0%.



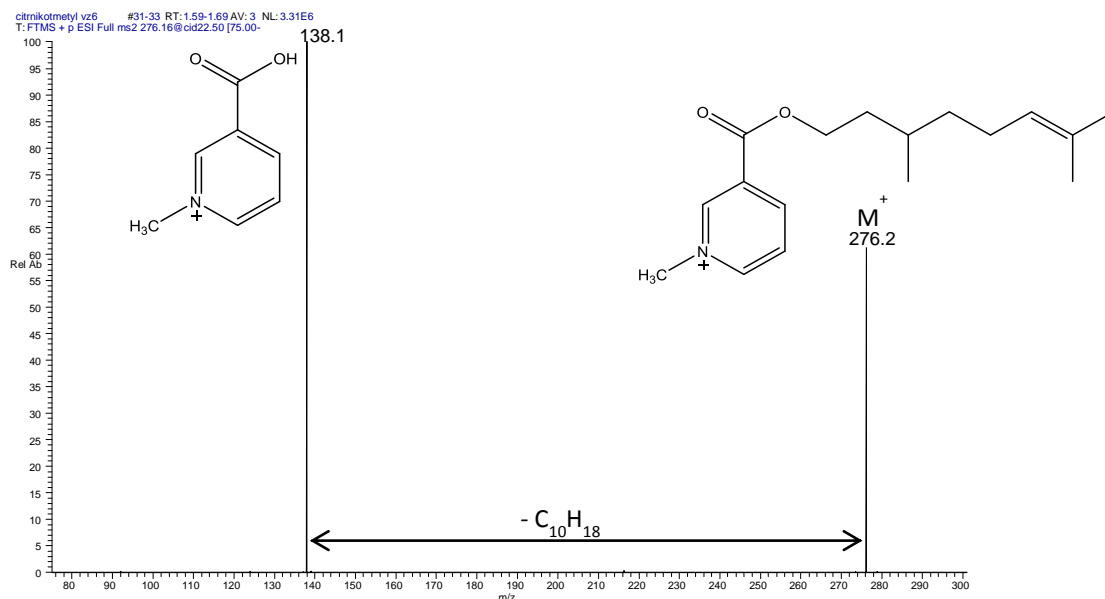
Obr. 5.2: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu 2-FMPS a citronelolu na orbitální pasti. Analýza proběhla přímým nástříkem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 18,0%.

5.1.2. Spektra derivátů alkoholů po reakci s kyselinou nikotinovou a methyljodidem

Ester kyseliny N-methylnikotinové a citronelolu byl analyzován na orbitální pasti. Jako iontový zdroj byl použitý ESI a pozitivní mód detekce.

Esterifikace byla z hlediska provedení náročnější, ale rychlejší, než předešlá reakce s 2-FMPS. Methylace methyljodidem byla jednoduchá i rychlá. Opět došlo k zvýšení detekčního signálu alkoholu.

V MS/MS spektru byl pozorován pouze jediný fragment o m/z 138, který odpovídal kladně nabitě kyselině N-methylnikotinové. Pro hledání větvení je tato metoda rovněž nevhodná (obr. 5.3).



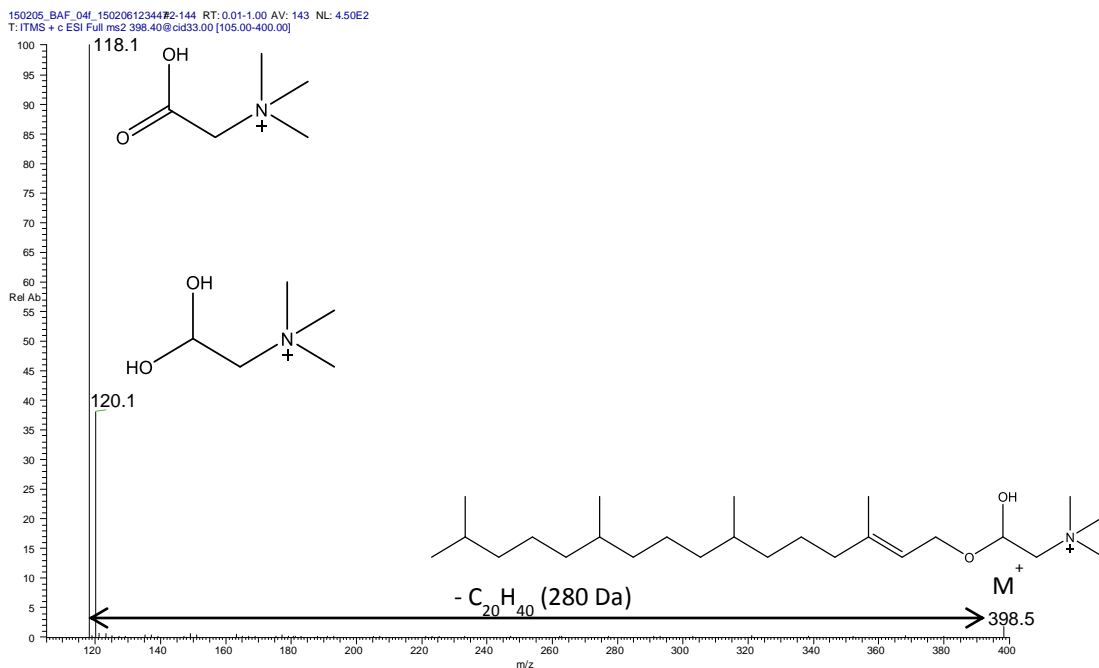
Obr. 5.3: ESI-MS/MS spektrum (CID) esteru kyseliny N-methylnikotinové a citronelolu na ORBITRAP-u. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 25,0%.

5.1.3. Spektra derivátů alkoholů po reakci s betinaldehydem

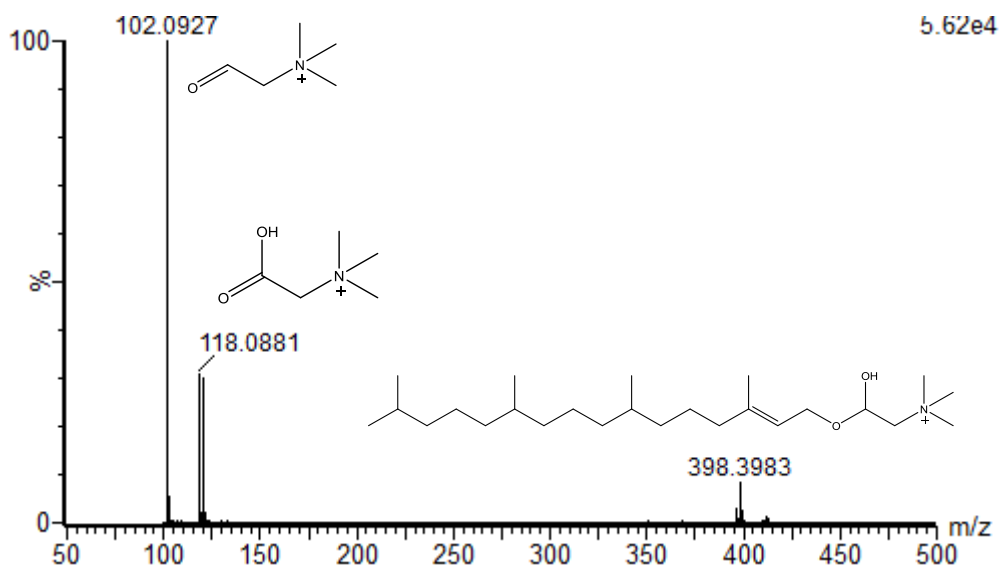
Derivát betinaldehydu a fytolu byl fragmentován ve sférické ionové pasti. Pro srovnání fragmentací byl vzorek také měřen na přístroji Synapt G2. Jako iontový zdroj byl ve všech případech použitý ESI a pozitivní mód detekce.

Derivatizace betinaldehydem byla podobně náročná, jako esterifikace kyselinou nikotinovou. Při této reakci musela být dodržena optimální teplota a čas reakce, aby nezačal vznikat acetal z hemiacetálu. Vznik hemiacetálu byl doprovázen zabarvením vzorku dočervena. Analýza hmotnostní spektrometrií prokázala přítomnost žádaného produktu ve spektru, takže tato metoda je taky vhodná pro detekci primárních mastných alkoholů.

Fragmentační analýza na sférické iontové pasti nepotvrdila možnost využití této derivatizace pro lokalizaci větvení, jelikož žádané fragmenty mezi m/z 120 a m/z 398 nebyly v tomto spektru přítomny. Prekurzor se štěpil hlavně na betain o m/z 118 a 2,2-dihydroxy-N,N,N-trimethylamoniový kation o m/z 120 (obr. 5.4). MS/MS analýza na Synapt G2 prokázala, že majoritním fragmentem je ion o m/z 102 (betinaldehyd), který nebylo při předešlé fragmentaci možné pozorovat v důsledku cut-off iontové pasti. Ani tady nebyly pozorovány významné fragmenty mezi m/z 120 a m/z 398 (obr. 5.5).



Obr. 5.4: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu betainaldehydu a fytolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 31,5%.



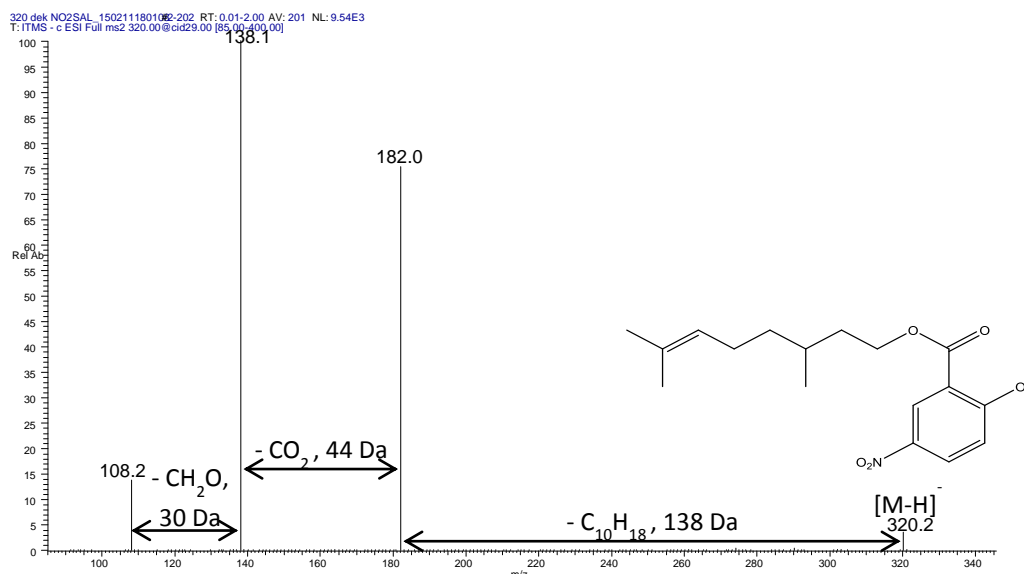
Obr. 5.5: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu betainaldehydu a fytolu na Synapt-TOF-u. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 35%.

5.1.4. Spektra derivátů po reakci s kyselinou 5-nitro-2-hydroxybenzoovou; nebo 2,5-dihydroxybenzoovou

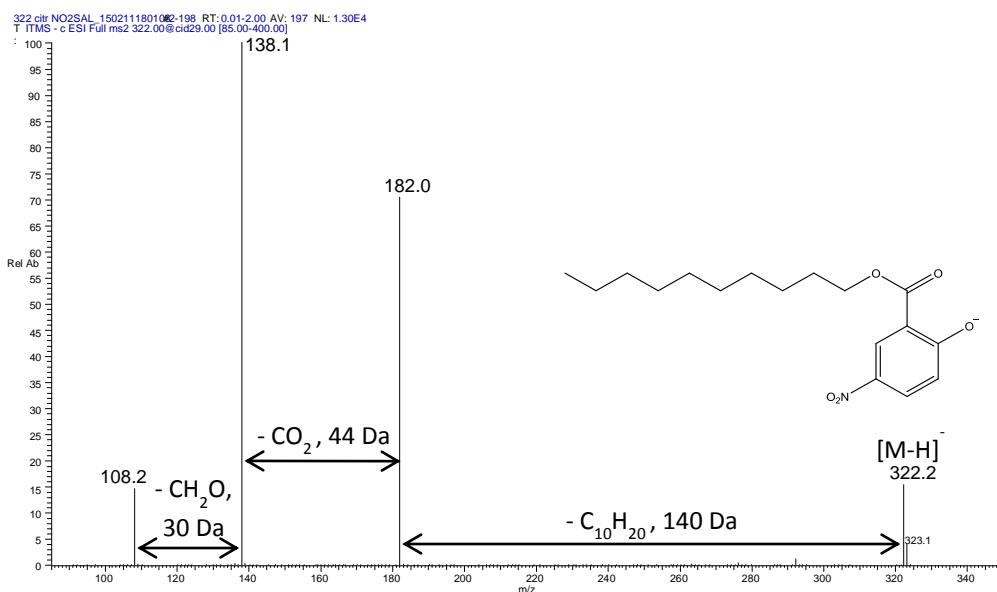
Estery kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové a citronelolu a dekanolu byly analyzovány na sférické iontové pasti, estery kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové byly analyzovány na orbitální pasti. Při všech analýzách byl jako iontový zdroj použitý ESI a měření byla prováděna v negativním módu detekce.

Tyto esterifikace byly náročnější, než doposud prováděné reakce, protože bylo nutné oddělit estery od nezreagovaných výchozích látek pomocí TLC. I v tomhle případě bylo pozorováno výrazné zvýšení detekčního limitu mastných alkoholů a jejich detekci v negativním módu.

Fragmentace obou esterů NHB je obdobná jako v předešlých případech, estery se štěpí zpět na deprotonovanou kyselinu, případně se z benzenového jádra odštěpí funkční skupiny. Pík o m/z 182 odpovídá 2-karboxy-4-nitrofenolátovému aniontu, nebo 2-hydroxy-5-nitrokarboxylátovému aniontu. Pík o m/z 138 odpovídá 4-nitrofenolátovému aniontu, případně se náboj může přesmykovat na benzenové jádro. Ion o m/z 108 může vznikat ztrátou formaldehydu z píku o m/z 138. V oblasti mezi m/z 182 a m/z 320, resp. m/z 322 nebyly nalezeny žádné fragmenty, které by nebylo možné zařadit do šumu (obr. 5.6 a 5.7).

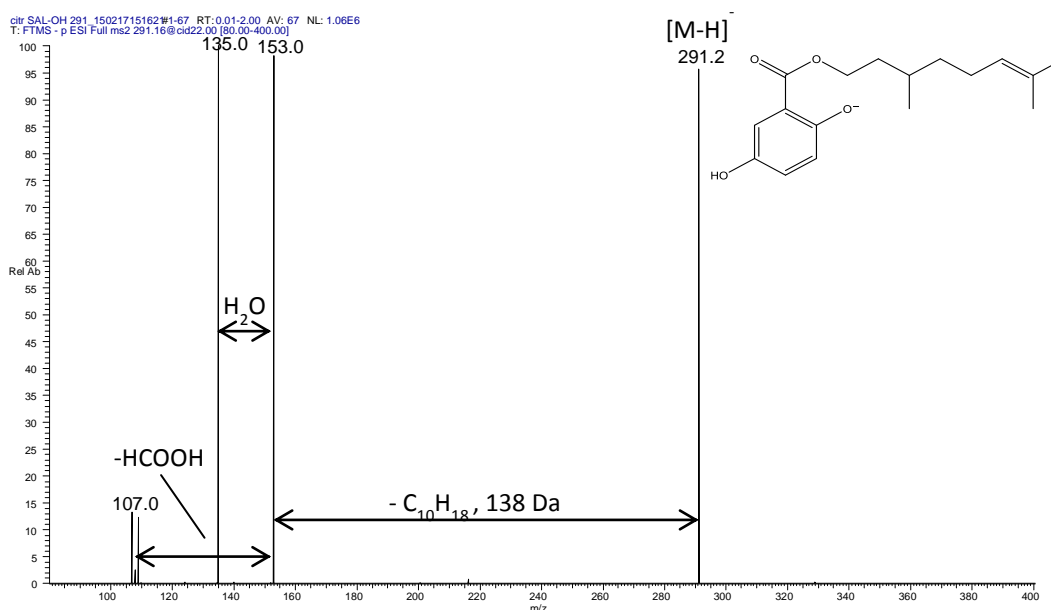


Obr. 5.6: ESI-MS/MS spektrum (CID) esteru kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové a citronelolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 29,0%.

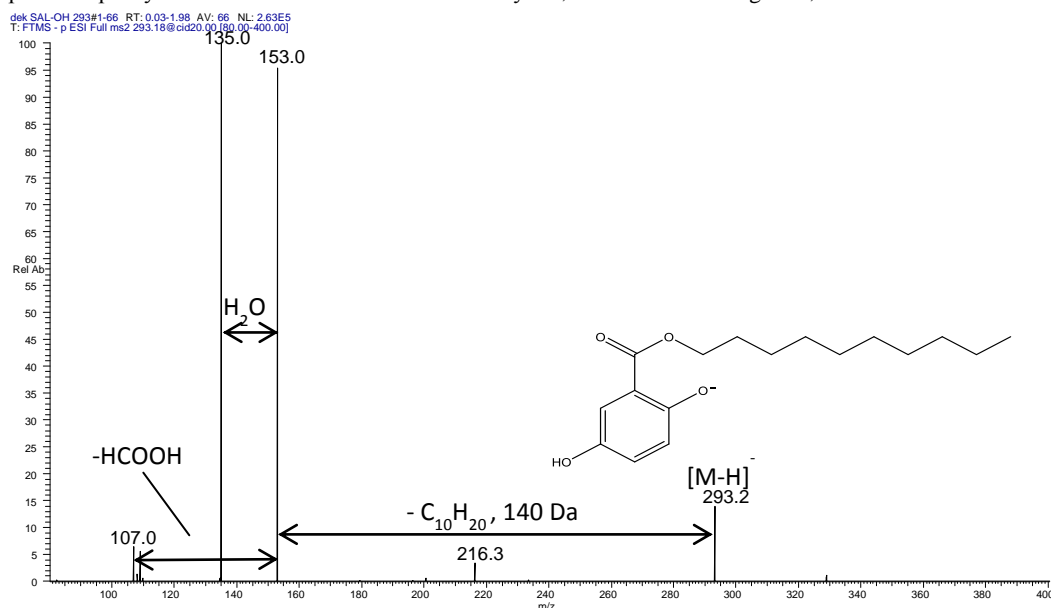


Obr. 5.7: ESI-MS/MS spektrum (CID) esteru kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové a dekanolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 29,0%.

Estery alkoholů a DHB se fragmentují stejným mechanismem jako estery alkoholů a NHB. Pík o m/z 153 odpovídá karboxyhydroxyfenolátovému aniontu, nebo 2,5-dihydroxykarboxylátovému aniontu. Pík o m/z 135 vzniká dehydratací píku o m/z 153, pík o m/z 109 odpovídá 4-hydroxyfenolátovému aniontu a pík o m/z 107 má sumární vzorec $C_6H_3O_2$ a vzniká ztrátou kyseliny mravenčí z iontu o m/z 153. Pík o m/z 216 na obr. 5.9 nepatří do fragmentačního spektra. Ve výsledku se obě derivatizace ukázaly jako nevhodné při hledání větvení mastných alkoholů (obr. 5.8 a 5.9).



Obr. 5.8: ESI-MS/MS spektrum (CID) esteru kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové a citronelolu na ORBITRAP-u. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 22,0%.



Obr. 5.9: ESI-MS/MS spektrum (CID) esteru kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové a dekanolu na ORBITRAP-u. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 20,0%.

5.1.5. Shrnutí k spektrům derivátů alkoholů vázaných přes kyslík

Všechny analyzované deriváty vázané přes kyslík je možné použít pro ESI detekci mastných alkoholů. Významně se ale fragmentovaly v místě napojení uhlovodíkového řetězce mastného alkoholu na derivatizační činidlo přes kyslík. Lze předpokládat, že se obdobně budou chovat i další deriváty spojené s derivatizačním činidlem přes kyslík.

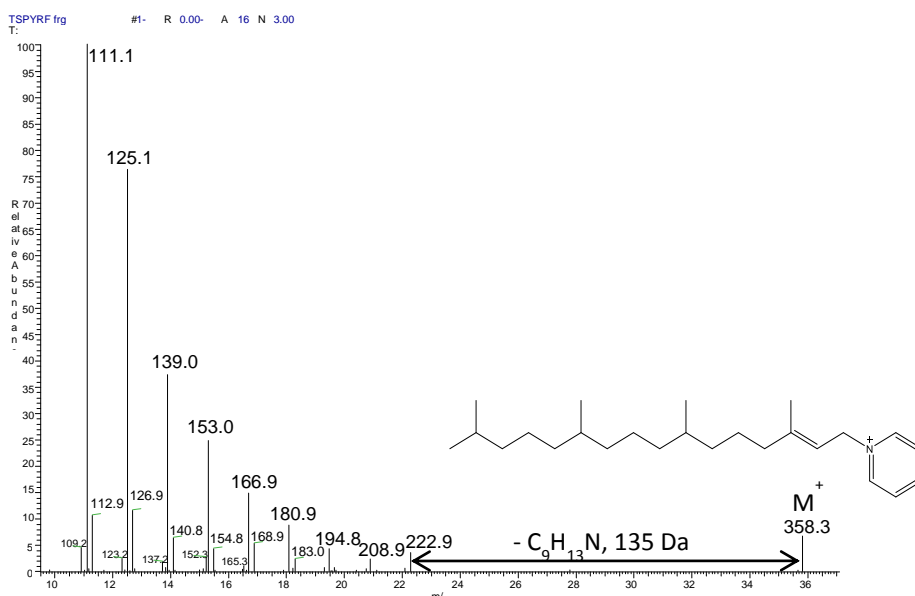
5.2. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů obsahujících dusík

5.2.1. Spektra derivátů alkoholů po reakci s pyridinem

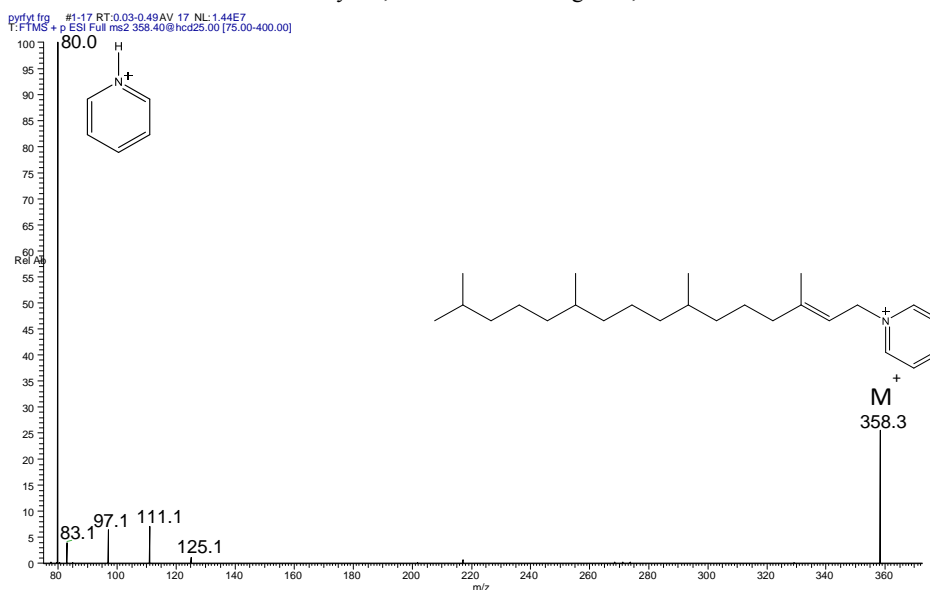
Deriváty pyridinu s citronelolem, fytolem, eikosan-1-olem a dekanolem byly analyzovány na sférické iontové pasti. Všechna měření byla provedena v pozitivním módu.

Analýza hmotnostní spektrometrii potvrdila použitelnost této derivatizace při detekci mastných alkoholů. Reakce proběhla, i když byl do reakční směsi přidán mesylchlorid a netrifluormethansulfonanhydrid, jako uvádí literatura^{6,109}.

Při fragmentaci derivátu pyridinu a fytolu se ve spektru objevily fragmenty vzdálené od sebe vždy o 14 da. Jednalo se o karbokationty s obecným sumárním vzorcem C_nH_{2n} . Na základě jejich intenzit však bohužel nelze identifikovat žádné větvení v řetězci fytolu. Pravděpodobně docházelo k neutrální ztrátě molekuly se sumárním vzorcem $C_9H_{13}N$ a následné fragmentaci iontu $C_{16}H_{31}^+$ o m/z 223. Za tuto neutrální ztrátu může být zodpovědné větvení u dvojné vazby. HCD spektrum derivátu pyridinu a fytolu prokazuje jeho primární rozpad na pyridiniový kation o m/z 80 (obr. 5.10 a 5.11).

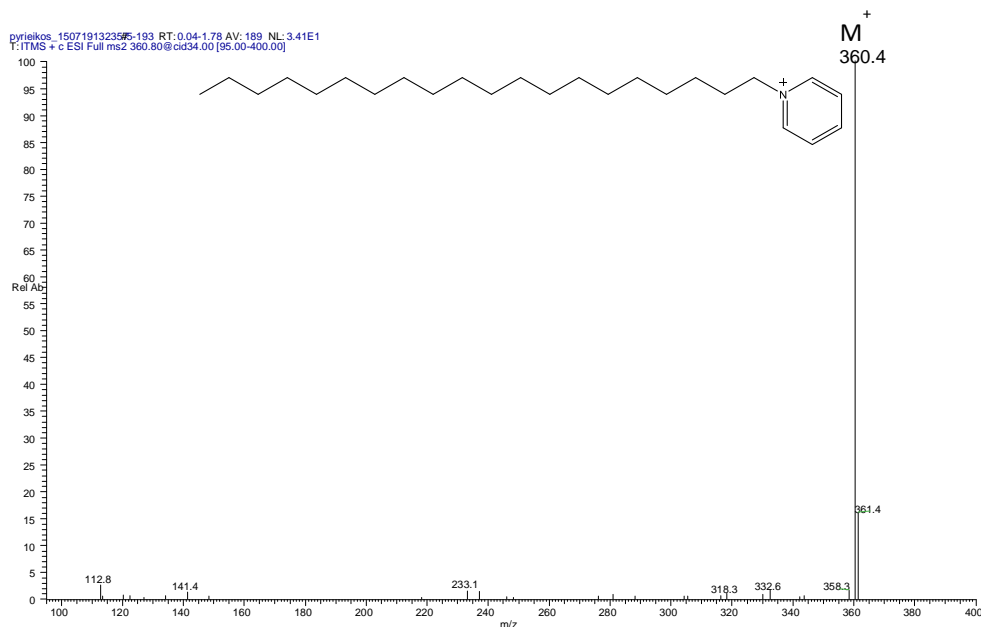


Obr. 5.10: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyridinu a fytolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 25,2%.



Obr. 5.11: ESI-MS/MS spektrum (HCD) derivátu pyridinu a fytolu na orbitální pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 25,0%.

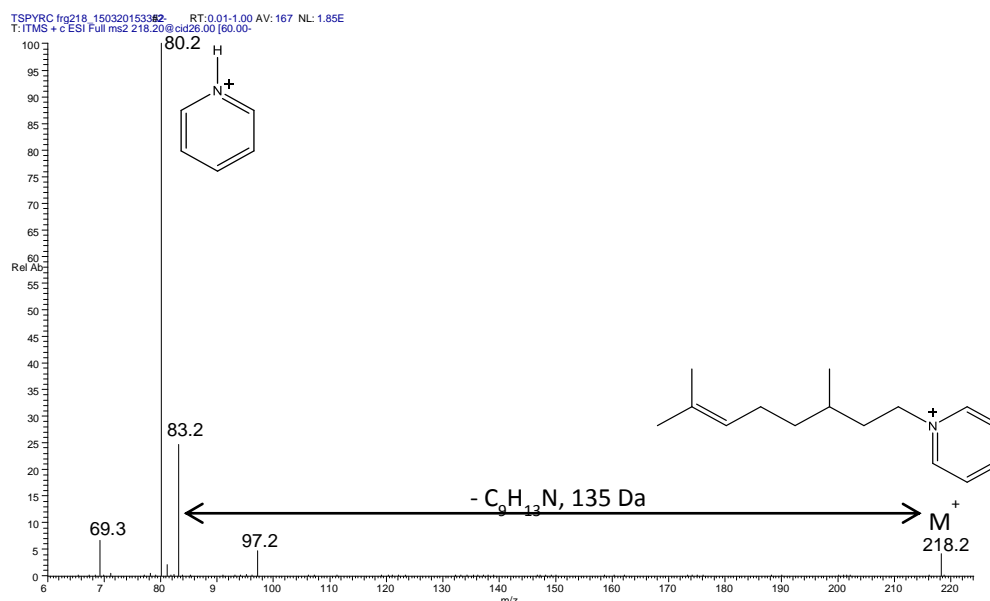
Eikosan-1-ol má při CID fragmentaci velmi chudé fragmentační spektrum, protože se derivát fragmentuje výlučně na nabitý pyridiniový kation, který nelze vidět kvůli cut-off vyplývajícího z principu iontové pasti. Zanedbatelný výskyt píků může být způsoben právě chybějícím větvení blízko pyridinového jádra (obr. 5.12).



Obr. 5.12: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyridinu a eikosan-1-olu na kvadrupólu. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 34,0%.

Fragmentační spektrum derivátu pyridinu a citronelolu demonstruje primární rozpad derivátu na protonovaný pyridin (m/z 80) a neutrální uhlovodíkový řetězec. Pík o m/z 83 může vznikat stejným mechanismem, jako pík 223 u derivátu fytolu (neutrální ztrátou $C_9H_{13}N$). Větvení řetězce se ani v tomto případě nedá ze spektra zjistit. Derivatizace pyridinem se také ukázala jako nevhodná pro hledání větvení (obr. 5.13).

Obr. 5.13: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyridinu a citronelolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým

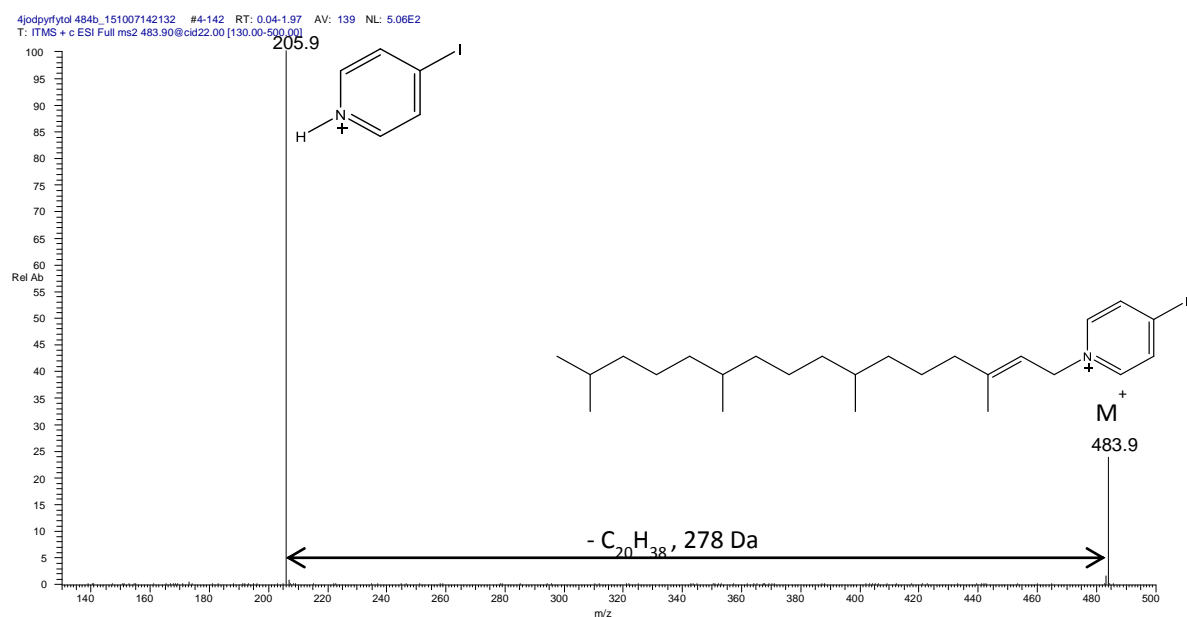


nástříkem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 26,0%.

5.2.2. Spektra derivátů alkoholů po reakci s 4-jodpyridinem

Derivát fytolu a 4-jodpyridinu byl analyzován na sférické iontové pasti v pozitivním módu detekce.

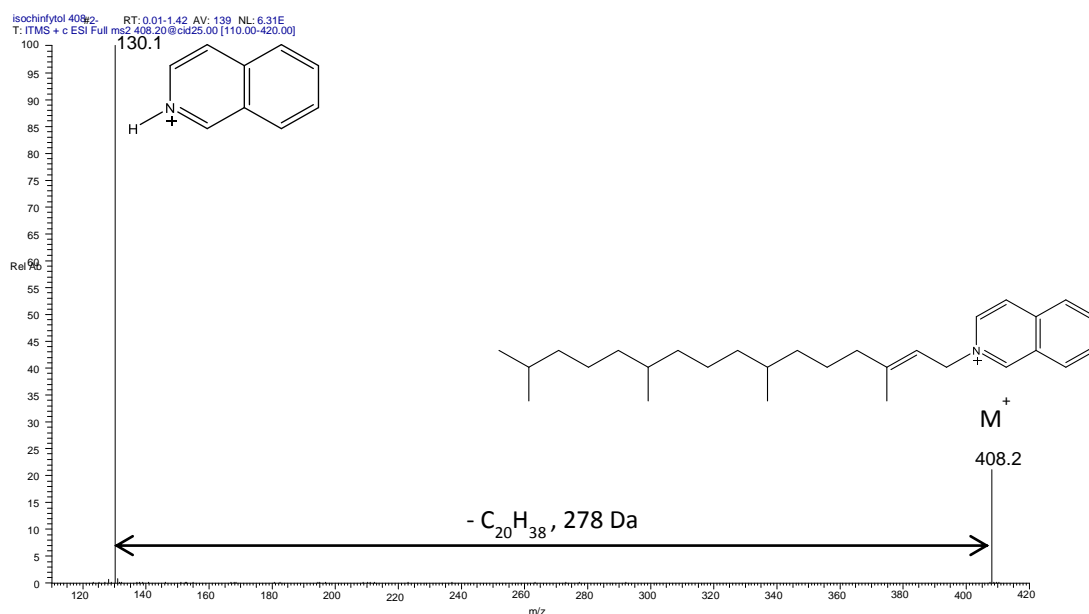
Zvýšení citlivosti detekce fytolu po derivatizaci 4-jodpyridinem bylo stejně účinné, jako při derivatizaci pyridinem. Derivát 4-jodpyridinu a fytolu se však na rozdíl od derivátů pyridinu fragmentuje výhradně zpátky na protonovaný 4-jodpyridin. Pro lokalizaci větvení mastných alkoholů je i tato metoda neúčinná (obr. 5.14).



Obr. 5.14: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu 4-jodpyridinu a fytolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástříkem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 22,0%.

5.2.3. Spektra derivátů alkoholů po reakci s isochinolinem

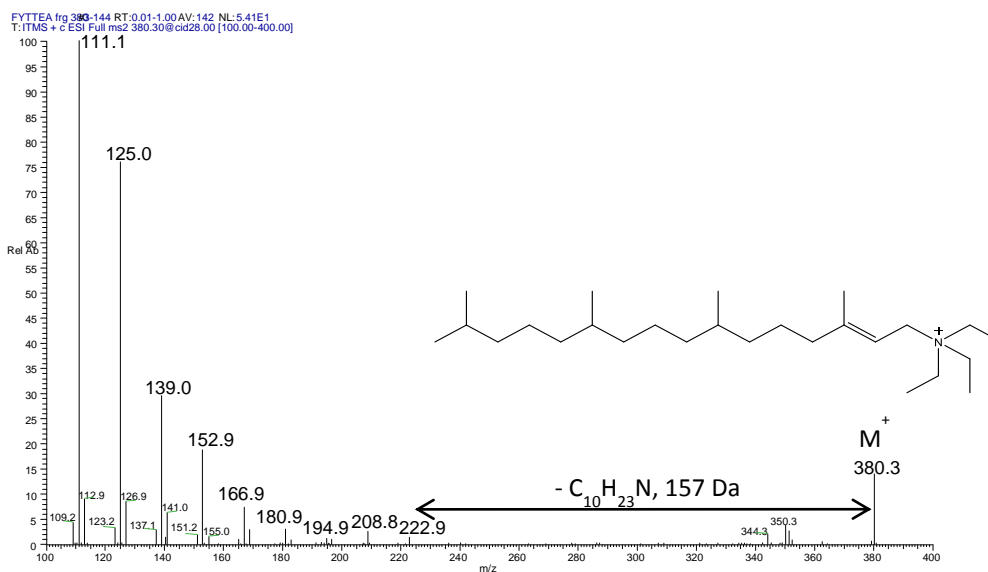
Derivát fytolu a isochinolinu byl analyzován na sférické iontové pasti v pozitivním módu. Účinnost detekce i možnosti lokalizace větvení byla stejná, jako u derivátu 4-jodpyridinu, jelikož se fragmentuje zpátky na protonizovaný isochinolin (m/z 130). Tato derivatizace také není vhodná k analýze větvení na řetězcích mastných alkoholů (obr. 5.15).



Obr. 5.15: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu isochinolinu a fytolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástříkem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 25,0%.

5.2.4. Spektra derivátů alkoholů po reakci s triethylaminem

Derivát fytole a TEA byl analyzován na sférické iontové pasti v pozitivním módu detekce. Účinnost při zlepšení detekci hmotnostní spektrometrii byla stejně dobrá, jako u derivatizaci pyridinem. Fragmentace tohoto derivátu byla analogická fragmentaci derivátu fytole a pyridinu (obr. 5.16). Z toho lze předpokládat obdobné chování i při ostatních derivátech a fragmentačních technikách, proto další experimenty nebyly prováděny.



Obr. 5.16: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu TEA a fytole na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 28,0%.

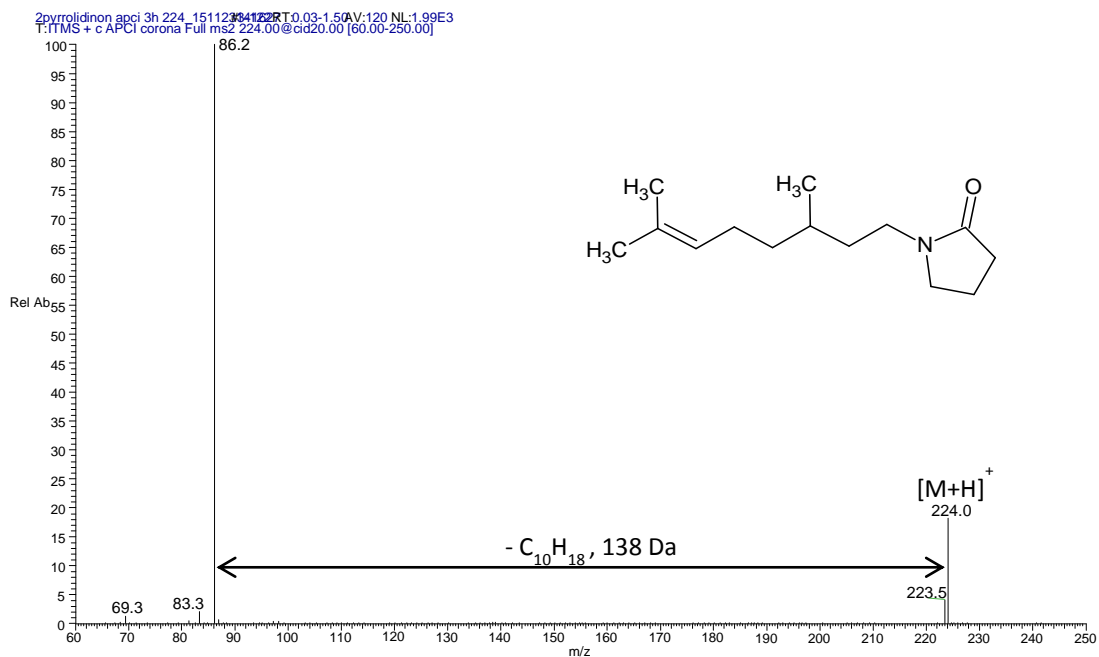
5.2.5. Spektra derivátů alkoholů po reakci s pyrrolidin-2-onem

5.2.5.1. Analýza zdrojem APCI

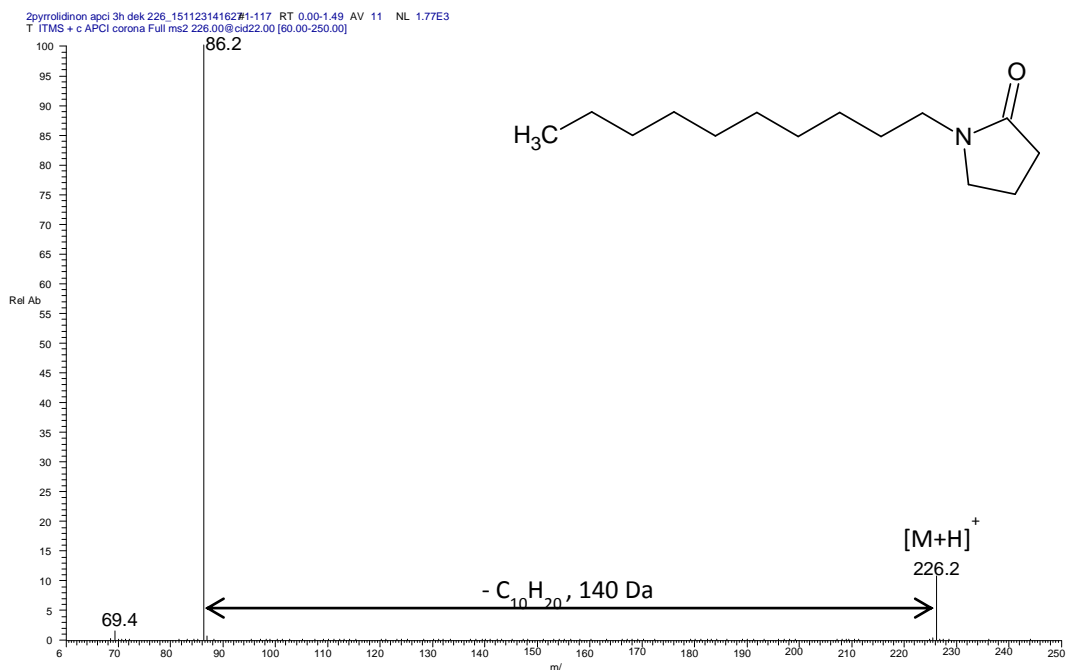
Deriváty pyrrolidin-2-onu s citronelolem, dekanolem a fytolem byly měřeny na sférické iontové pasti v pozitivním módu.

Derivát poskytoval v APCI dobrou intenzitu signálu, jako u předešlých derivatizací. Byla vykonána podobným postupem jako derivatizace ostatními derivatizačními činidly obsahujícími dusík, místo trifluormethansulfonhydridu byl znovu použit mesylchlorid, přičemž reakce proběhla pouze v jednom kroku a bez nutnosti použití dalších činidel, které uvádí literatura (například *tert*-butoxid sodný a dimethylsulfoxid)¹⁰⁶.

Derivát pyrrolidin-2-onu a citronelolu se fragmentoval především na pyrrolidinonový kation. Píky o m/z 69 a m/z 83 reprezentují karbokationty z řetězce citronelolu (obr. 5.17). Derivát pyrrolidin-2-onu a dekanolu neposkytnul kromě píku o m/z 86 žádné jiné významné fragmenty (obr. 5.18).



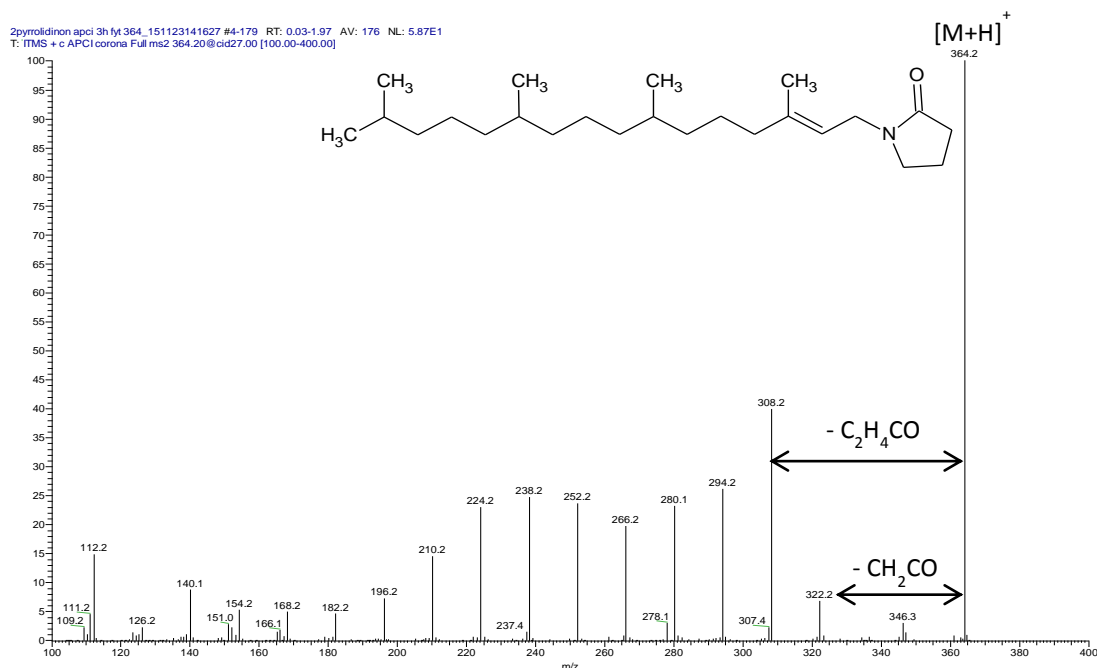
Obr. 5.17: APCI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyrrolidin-2-onu a citronelolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,5 Da a kolizní energie 20,0%.



Obr. 5.18: APCI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyrrolidin-2-onu a dekanolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 22,0%.

Fragmentační spektrum derivátu fytole obsahuje mnohem víc fragmentů, než spektra předešlých dvou derivátů. Kvůli *cut-off* není vidět pík o m/z 86, který by byl pravděpodobně dominantní, jako v předešlých dvou případech. Naproti tomu je pozorována řada píků

vzdálených od sebe vždy o 14 Da, která odpovídá štěpením po methylenové jednotce. Výjimku tvořil pík o m/z 346, který vznikl dehydratací prekurzoru, pík o m/z 322 vznikl neutrální ztrátou ethenonu a pík o m/z 308 vznikl neutrální ztrátou propenonu. Píky o m/z 322 a m/z 308 se mohly dále fragmentovat a poskytnout fragmenty o stejné m/z , jako výchozí derivát. Jednalo by se o posunuté série vůči sérii výchozího derivátu, což by mohlo být důvodem výskytu píků, které by podle předpokladu měly být výrazně méně intenzivní (jedná se o píky m/z 196 a m/z 266). Jedině píky o m/z 126 a m/z 336 jsou prokazatelně nižší, než okolní píky a tím naznačují přítomnost větvení. Jakou mírou přispívají jednotlivé fragmentační série k intenzitě píků, není známo.

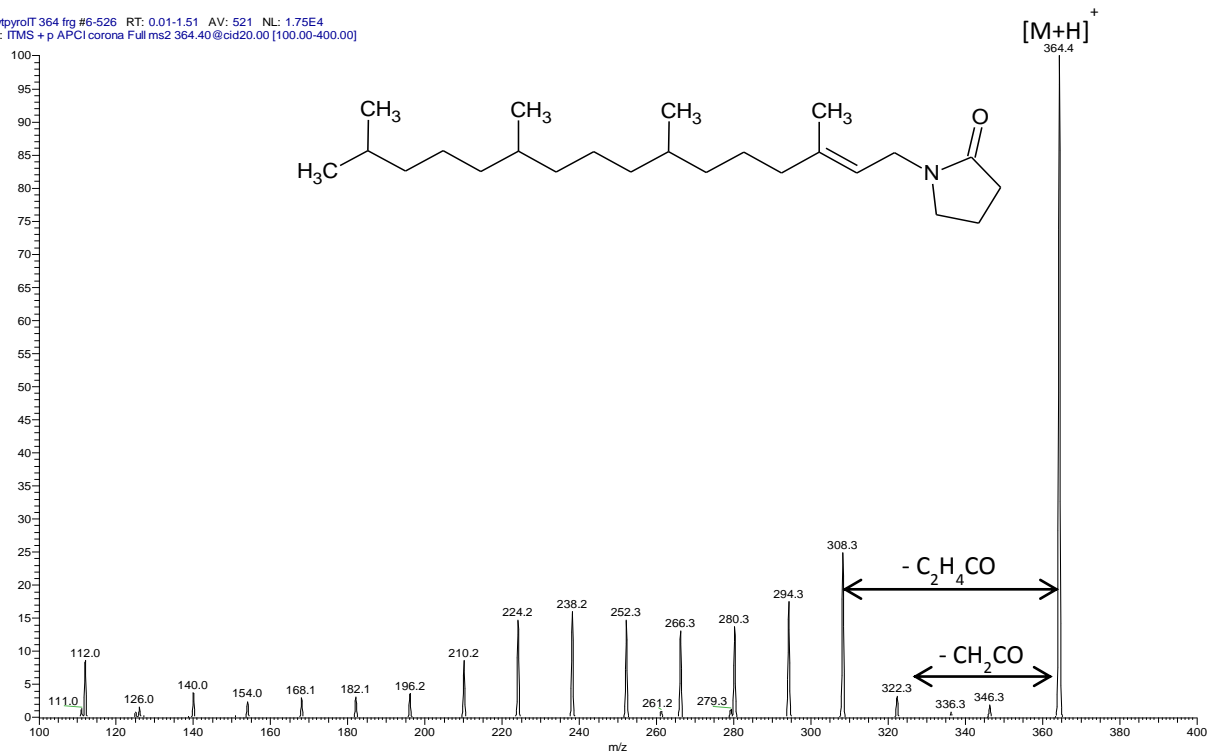


Obr. 5.19: APCI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyrrolidin-2-onu a fytolu na sférické iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 27,0%.

Deriváty pyrrolidin-2-onu s fytolem a eikosan-1-olem byly analyzovány na lineární iontové pasti v pozitivním módu detekce.

Fragmentační spektrum derivátu fytolu z lineární iontové pasti je obdobné, jako ze sférické iontové pasti (obr. 5.20). Fragmentační spektrum derivátu eikosan-1-olu se však výrazně liší od předešlých spekter výskytem málo intenzivních píků s lichou hodnotou m/z (počínaje píkem m/z 113). Důvod této změny povahy fragmentace není znám. Pík o m/z 281 odpovídá nabitému eikosanylovému řetězci, tj. neutrální ztrátě pyrrolidin-2-onu. Zvýšená intenzita píku o m/z 325 má neznámý původ, pravděpodobně se jedná o fragment isomerní nečistoty se stejnou m/z jako prekurzor (obr. 5.21).

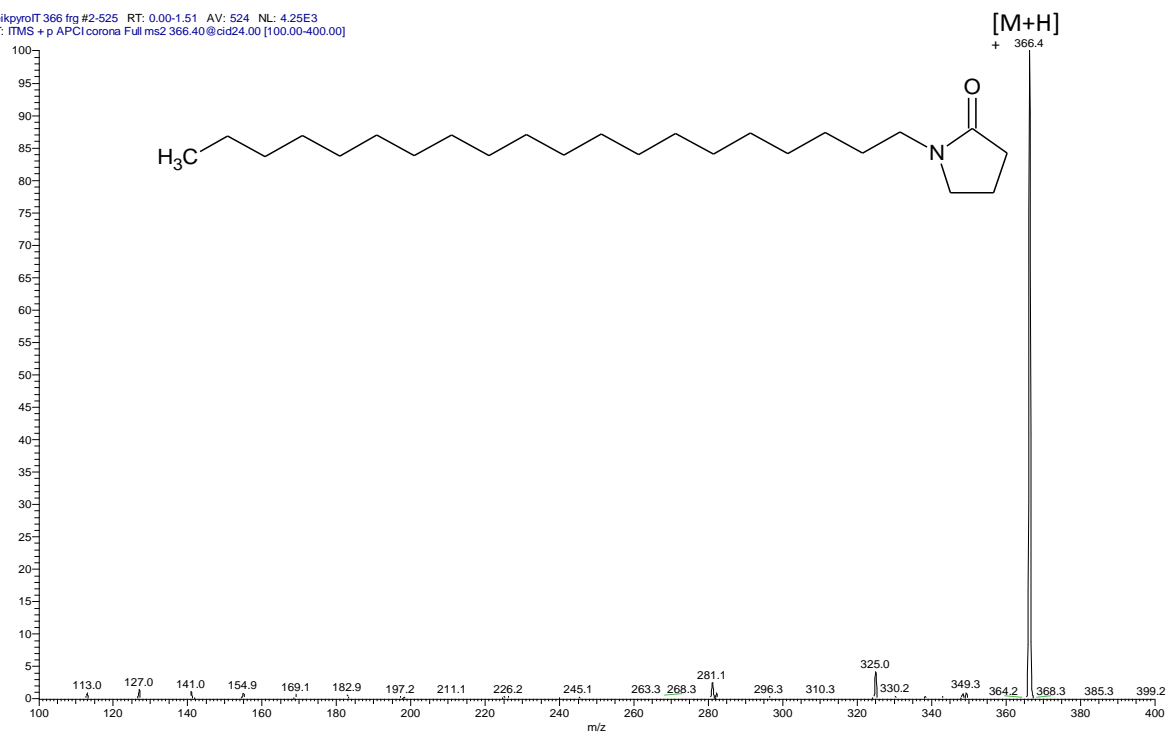
fytyrolT 364 frg #6-526 RT: 0.01-1.51 AV: 521 NL: 1.75E4
T: ITMS + p APCI corona Full ms2 364.40@cid20.00 [100.00-400.00]



Obr. 5.20: APCI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyrrolidin-2-onu a fytolu na lineární iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 20,0%.

Obr. 5.21: APCI-MS/MS spektrum (CID) derivátu pyrrolidin-2-onu a eikosan-1-olu na lineární iontové pasti. Analýza

eikpyrolT 366 frg #2-525 RT: 0.00-1.51 AV: 524 NL: 4.25E3
T: ITMS + p APCI corona Full ms2 366.40@cid24.00 [100.00-400.00]

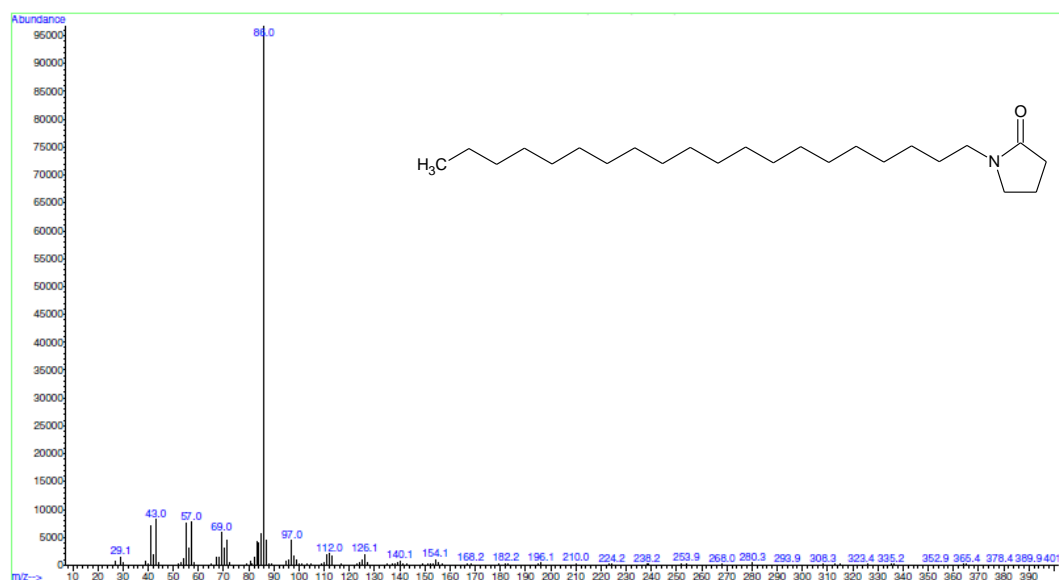


proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 24,0%.

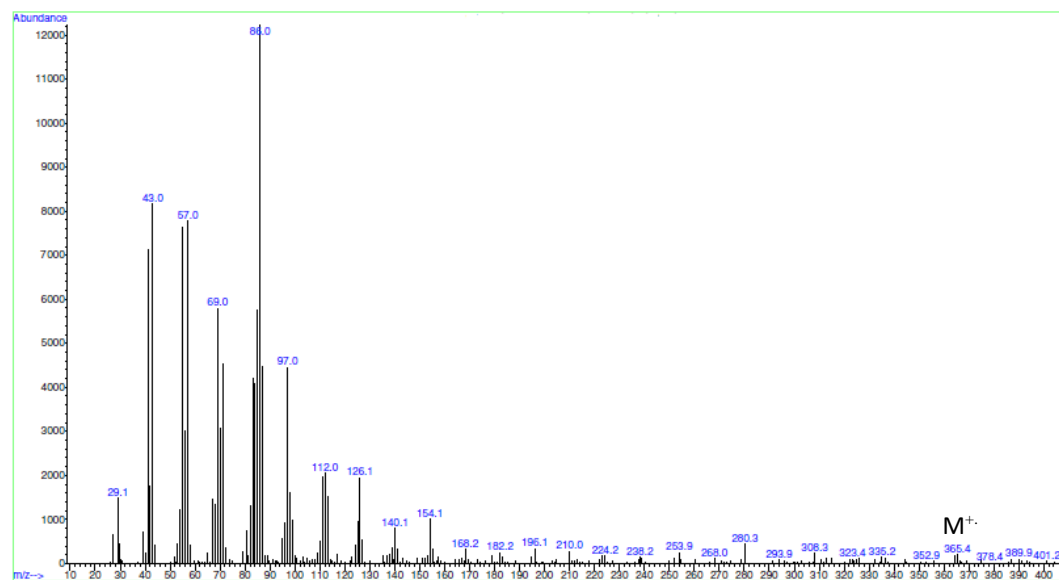
5.2.5.2. Analýza pomocí plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie

Derivatizace pyrrolidin-2-onem byla popsána pro EI-MS¹⁰⁶, proto byla odzkoušena i při elektronové ionizaci, konkrétně pro derivát eikosanolu a fytolu.

EI spektrum derivátu eikosan-1-olu obsahuje dominantně zastoupenému iontu o m/z 86. Fragmenty s hmotou větší, než m/z 112, jsou výlučně sudé, jelikož prekurzorový ion je lichý a dochází ke ztrátám radikálů s lichou hodnotou m/z (obr. 5.22 a 5.23).

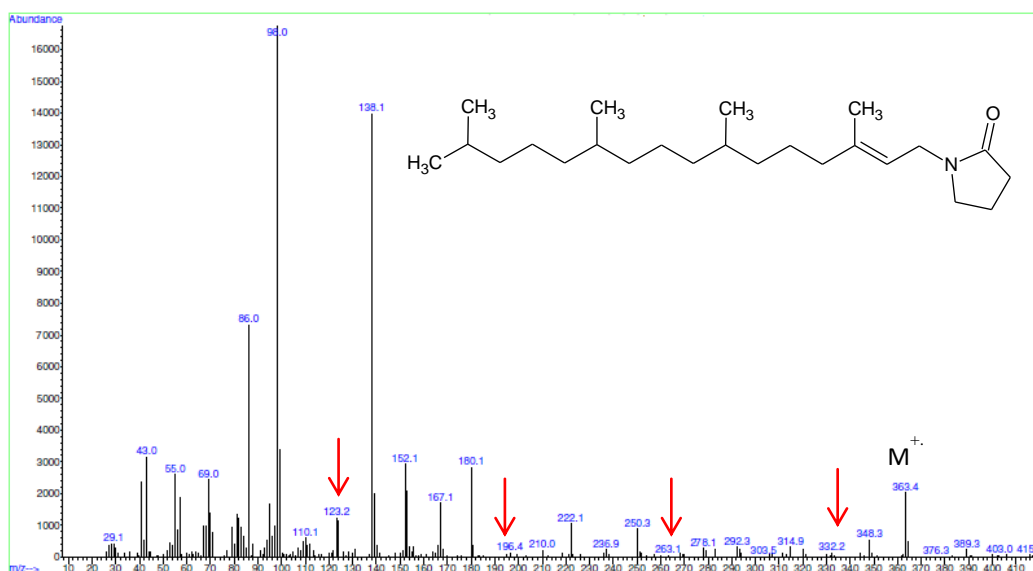


Obr. 5.22: EI-MS spektrum derivátu pyrrolidin-2-onu a eikosanolu na kvadrupólovém analyzátoru.



Obr. 5.23: Detail spektra z obrázku 5.22.

Fragmentační spektrum derivátu fytolu a pyrrolidin-2-onu obsahuje intenzivní molekulový ion o m/z 363,4 a fragmentační píky se sudou i lichou hodnotou m/z . První větvení (počítáno od pyrrolidin-2-onu) se nachází v m/z 125, které není dobře vidět. Druhé větvení je reprezentováno píkem o m/z 195, který je málo intenzivní. Podobně je to i s píky o m/z 265 a m/z 335. Za povšimnutí stojí seskupení píků m/z 152, m/z 167 a m/z 180, která je svými intenzitami podobná seskupení píků m/z 222, m/z 237 a m/z 250. To by mohlo naznačovat opakující se strukturní motiv, v tomto případě isoprenové jednotky. V tomto spektru se na rozdíl od spekter z měkkých iontových zdrojů vyskytuje pík o m/z 348, který



odpovídá ztrátě methyly. Detegovat všechna větvení fytolu se nepovedlo ani za pomoci GC/MS, na kterou byla tato metoda původně určena. Pravděpodobně je to způsobeno přítomností dvojně vazby, která může migrovat po řetězci a tím ovlivňovat fragmentaci.

Obr. 5.24: EI-MS spektrum derivátu pyrrolidin-2-onu a fytolu na kvadrupólovém analyzátoru. Fragmety o m/z odpovídající polohe větvení jsou označeny šipkou.

5.2.6. Shrnutí k derivátům mastných alkoholů obsahujících dusík

Všechny derivatizace byly úspěšné při zvýšení detekčního limitu mastných alkoholů a lze je tedy k tomuto účelu používat. Derivatizace pyridinem se pro lokalizaci větvení nejprve ukázala jako slibná, ale nakonec se ukázalo, že lokalizace z fragmentačních spekter není možná. Substituovaný pyridin (4-jodpyridin) a isochinolin se pro lokalizaci větvení ukázaly jako horší varianty než samotný pyridin. Pravděpodobně to bylo způsobeno menší ochotou neutrální ztráty molekuly **obsahující dusík** u derivátu fytolu a citronelolu. Pouze TEA dosáhl porovnatelné výsledky jako pyridin, avšak ne lepší. Proto se ukazuje, že derivatizace za vzniku kvarterního dusíku není pro lokalizaci větvení dostatečně úspěšná. Derivatizace pyrrolidin-2-onem byla pro mastné alkoholy s krátkým řetězcem (dekanol a citronelol) stejně neúčinná, jako předešlé derivatizační procedury. Derivatizací delších mastných alkoholů (fytolu a eikosan-1-olu) byla získána spektra, která částečně nesla informaci o větvení jejich řetězce. Lineární derivát eikosan-1-olu a pyrrolidin-2-onu neobsahoval ve spektru žádné významné změny intenzit píků a všechny píky ve spektru měly v APCI lichou hodnotu m/z . Derivát fytolu a pyrrolidin-2-onu obsahoval píky s

významně rozdílnou intenzitou a v APCI sudou hodnotou m/z . Je vhodné zmínit, že derivatizace hexahydronerolidolu (terciárního alkoholu) pyrrolidin-2-onem nebyla úspěšná. To prokazuje určitou specifitu této metody pro primární a případně některé sekundární alkoholy.

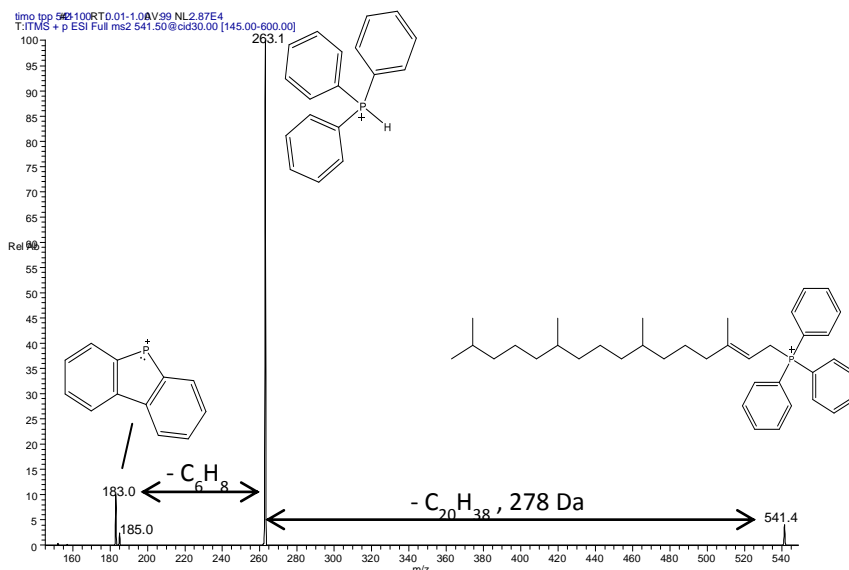
5.3. Hmotnostní spektra derivátů alkoholů obsahující fosfor

5.3.1. Derivatizace trifenylofosfinem

Derivát fytolu a trifenylofosfinu byl analyzován na lineární iontové pasti v pozitivním módu detekce.

Zlepšení detekce bylo pozorováno i u tohoto derivátu, avšak ne o tolik výrazně, jako v předešlých případech. I tady byla aplikována vyvinuta metoda s mesylchloridem, přičemž se povedlo připojit mastný alkohol se zbytkem derivatizačního činidla přes fosfor.

Fragmentační spektrum ukazuje, že fragmentace probíhá podobně jako s deriváty, kde bylo derivatizační činidlo spojeno s alkoholem přes kyslík. Primárním produktem je trifenylhydrogenfosfoniový kation (m/z 263). Pík o m/z 185 je difenylfosfoniový kation a pík o m/z 183 odpovídá kladně nabitému fosforovému analogu karbazolu¹¹². Mezi píkem m/z 263 a parentálním píkem (m/z 541) nejsou žádné intenzivní píky. Pro lokalizaci větvení se derivatizace trifenylofosfinem rovněž ukázala jako nevhodná (obr. 5.25).



Obr. 5.25: ESI-MS/MS spektrum (CID) derivátu TPP a fytolu na lineární iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 Da a kolizní energie 30,0%.

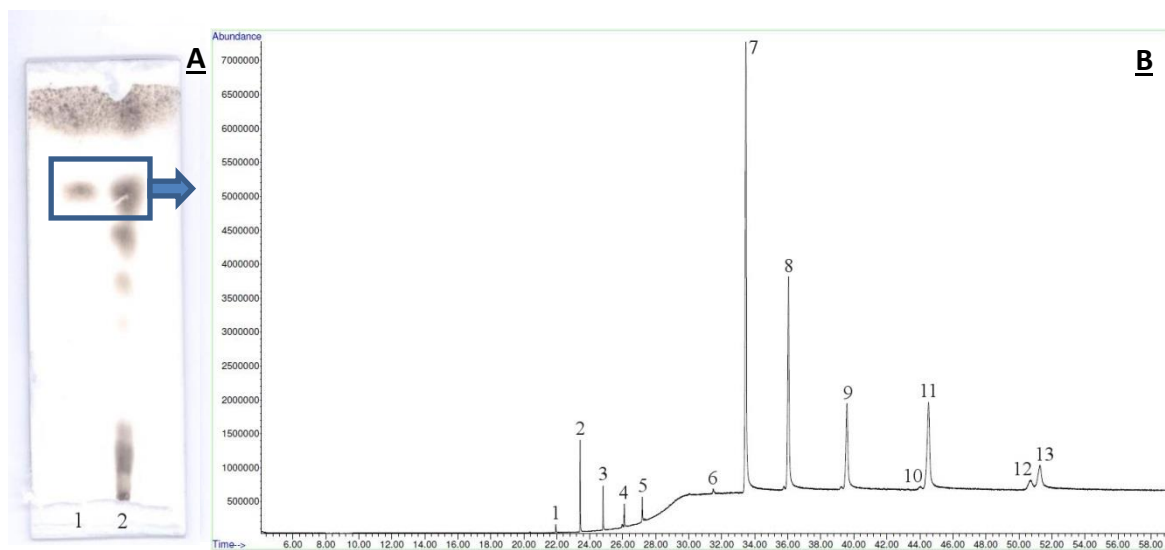
5.3.2. Shrnutí k derivátům mastných alkoholů obsahujících fosfor

Derivát s trifenylofosfinem zvýšil detekční limit fytolu, ale jedná se o horší variantu, jako derivatizace činidly obsahujícími kyslík, nebo dusík. Látka se fragmentovala podobně, jako deriváty mastných alkoholů spojených s derivatizačním činidlem přes kyslík. Fosfor se tedy neukázal jako lepší alternativa k předešlým heteroatomům.

5.4. Isolace mastných alkoholů z voskových esterů včelího vosku

5.4.1. Isolace voskových esterů z včelího vosku

Analytickou TLC byl stanovena hodnota retardačního faktoru voskových esterů $R_f = 0,72$ (obr. 5.26). Na základě toho byly seškrábány zóny silikagelu při preparativní TLC, které měly stejný retardační faktor. GC/EI-MS analýza potvrdila izolaci voskových esterů převážně kyseliny palmitové, ale také izolaci některých uhlovodíků (obr. 5.26 a tab. 5.1). Uhlovodíky neměly na další reakce žádný vliv.



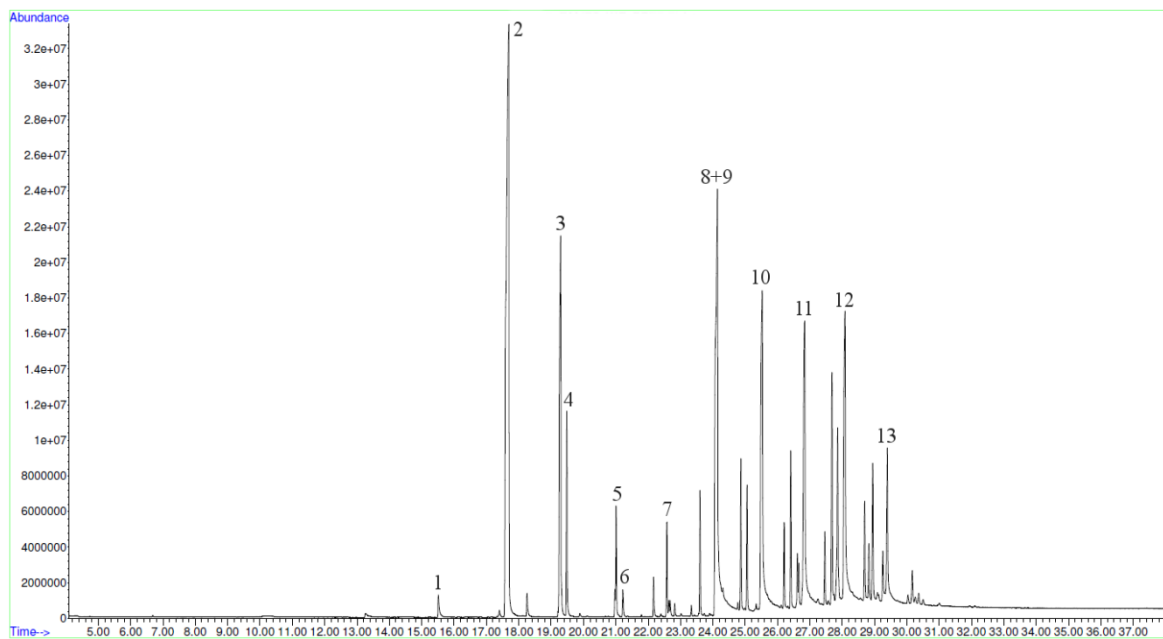
Obr. 5.26: analytická TLC voskových esterů, bod 1: standard arachydlarachidátu, bod 2: včelí vosk, přičemž zóna voskových esterů je označena modrým rámečkem (A); GC/EI-MS spektrum izolovaných voskových esterů (B).

Tab. 5.1: Sloučeniny detegované v izolované frakci voskových esterů z včelího vosku GC/EI-MS analýzou. Identifikace sloučenin byla provedena pomocí jejich fragmentačních EI spekter.

P. č.	t_r (min:s)	Název sloučeniny	Vzorec sloučeniny
1	21:56	pentakosan	$C_{25}H_{52}$
2	23:25	heptakosan	$C_{27}H_{56}$
3	24:48	nonakosan	$C_{29}H_{60}$
4	26:06	hentriakontan	$C_{31}H_{64}$
5	27:11	tritriakonten	$C_{33}H_{66}$
6	31:29	dokosyl hexadekanoát	$C_{38}H_{76}O_2$
7	33:28	tetrakosyl hexadekanoát	$C_{40}H_{80}O_2$
8	36:03	hexakosyl hexadekanoát	$C_{42}H_{84}O_2$
9	39:35	oktakosyl hexadekanoát	$C_{44}H_{88}O_2$
10	44:21	triakontyl hexadecenoát	$C_{46}H_{90}O_2$
11	44:32	triakontyl hexadekanoát	$C_{46}H_{92}O_2$
12	50:44	dotriakontyl hexadecenoát	$C_{48}H_{94}O_2$
13	51:17	dotriakontyl hexadekanoát	$C_{48}H_{96}O_2$

5.4.2. Transesterifikace voskových esterů

GC/EI-MS prokázala úspěšné proběhnutí reakce, přičemž methylestery kyselin eluovaly dřív a mastné alkoholy později. Vyskytovaly se tam i dřív detegované uhlovodíky (obr. 5.27 a tab. 5.2).



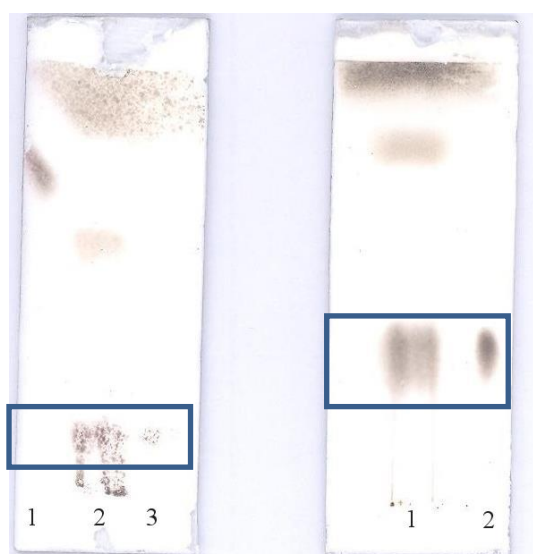
Obr. 5.27: GC/EI-MS produktů voskových esterů po transesterifikaci

Tab. 5.2: Vybrané sloučeniny detegované v směsi voskových esterů po jejich transesterifikaci. Identifikace sloučenin byla provedena na základě jejich fragmentačních EI spekter a jejich porovnáním s NIST knihovnou spekter.

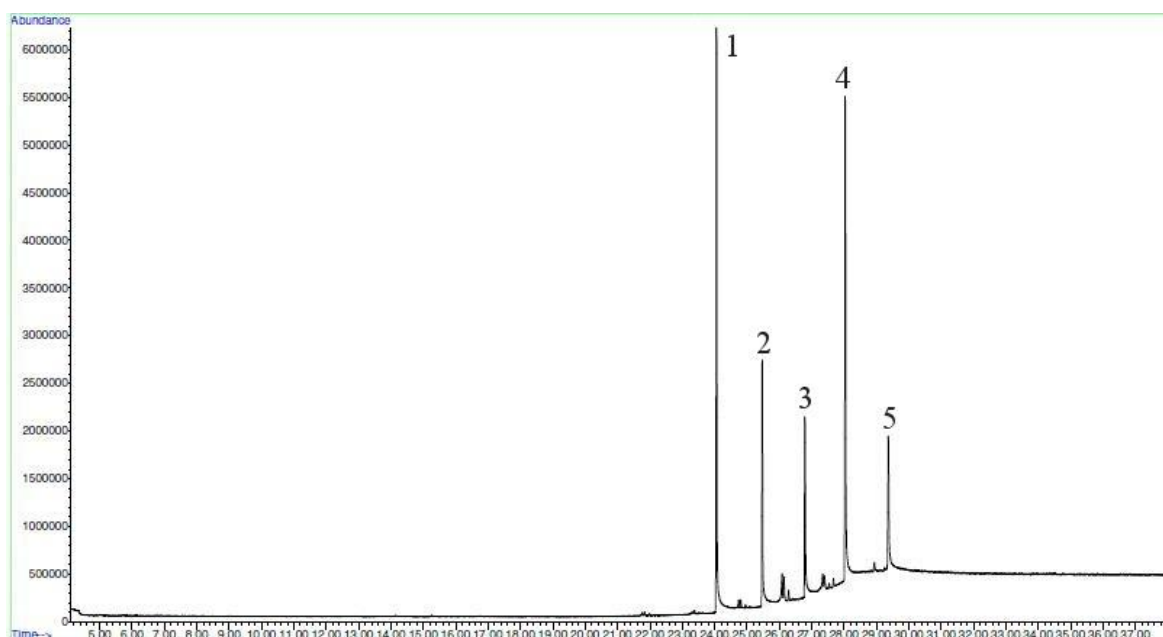
P. č.	t _r (min:s)	Název sloučeniny	Vzorec sloučeniny
1	15:31	methyl tetradekanoát	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
2	17:41	methyl hexadekanoát	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
3	19:18	methyl oktadecenoát	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
4	19:29	methyl oktadekanoát	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
5	21:01	methyl eikosenoát	C ₂₁ H ₄₀ O ₂
6	21:13	methyl eikosoanoát	C ₂₁ H ₄₂ O ₂
7	22:35	pentakosan	C ₂₅ H ₅₂
8	24:06	heptakosan	C ₂₇ H ₅₆
9	24:08	tetrakosanol	C ₂₄ H ₄₉ OH
10	25:32	hexakosanol	C ₂₆ H ₅₃ OH
11	26:50	oktakosanol	C ₂₈ H ₅₇ OH
12	28:05	triakosanol	C ₃₀ H ₆₁ OH
13	29:24	dotriakosanol	C ₃₂ H ₆₅ OH

5.4.3. Isolace mastných alkoholů

Při analýze TLC s použitím stejné mobilní fáze jako při izolaci voskových esterů (7% diethylether v hexanu) měly mastné alkoholy nízký retardační faktor ($R_f = 0,15$). Při použití 20% éteru v hexanu byl retenční faktor zvýšen na 0,35 (obr. 5.28). Zóny silikagelu byly při preparativní TLC seškrábány kolem tohoto retenčního faktoru. GC/EI-MS potvrdila úspěšnou izolaci mastných alkoholů, konkrétně tetrakosanolu, hexakosanolu, oktakosanolu, triakontanolu a dotriakontanolu. Uhlovodíky se v této směsi již nevyskytovaly (obr. 5.29 a tab. 5.3).



Obr. 5.28: Optimalizace mobilní fáze pro izolaci mastných alkoholů. Mobilní fáze 7% éter v hexanu, bod 1: standard arachidylarachidátu, bod 2: směs produktů voskových esterů po transesterifikaci, bod 3: standard eikosanolu (A); Mobilní fáze 20% éter v hexanu, bod 1: směs produktů voskových esterů po transesterifikaci, bod 2: standard eikosanolu (B). Zóny mastných alkoholů jsou označeny rámečkem.



Obr. 5.29: GC/EI-MS spektrum izolovaných mastných alkoholů ze směsi voskových esterů po transesterifikaci

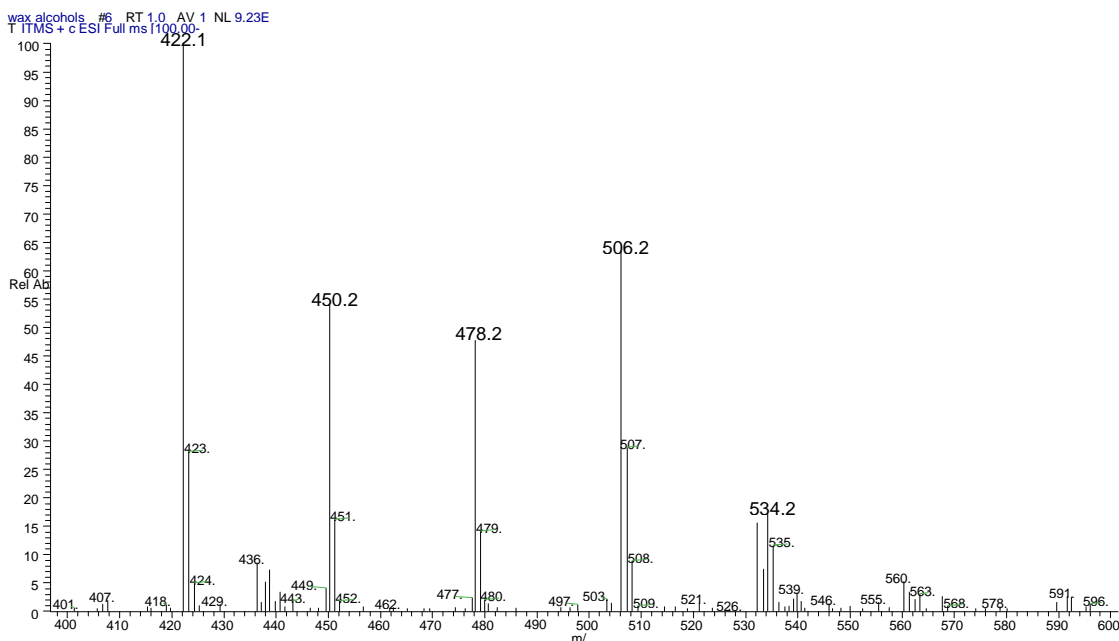
Tab. 5.3: Sloučeniny detegované v směsi izolovaných mastných alkoholů. Identifikace sloučenin byla provedena na základě jejich fragmentačních EI spekter a jejich porovnáním s NIST knihovnou spekter-

P. č.	t _r (min:s)	Název sloučeniny	Vzorec sloučeniny
1	24:03	tetrakosanol	C ₂₄ H ₄₉ OH
2	25:28	hexakosanol	C ₂₆ H ₅₃ OH
3	26:48	oktakosanol	C ₂₈ H ₅₇ OH
4	28:02	triakontanol	C ₃₀ H ₆₁ OH
5	29:22	dotriakontanol	C ₃₂ H ₆₅ OH

5.4.4. Derivatizace alkoholů z voskových esterů včelího vosku a jejich analýza

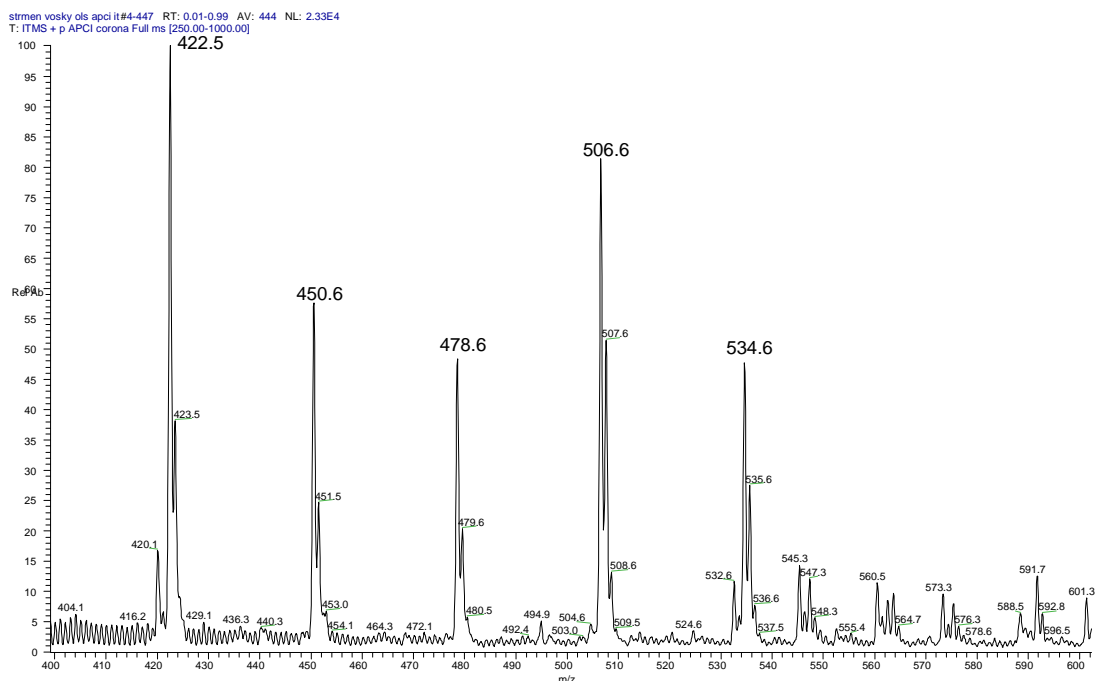
Deriváty mastných alkoholů s pyrrolidin-2-onem byly měřeny lineární iontové pastí. Analýzy byly prováděny v pozitivním módu detekce a jako zdroj ionizace byl použitý ESI i APCI.

Ionty 422, 450, 478, 506 a 534 přísluší derivátům tetrakosanolu, hexakosanolu, oktakosanolu, triakontanolu a dotriakontanolu (vždy s odstupem 28 Da), přičemž všechny tyto alkoholy byly prokázány při GC/EI-MS analýze. Další píky ve spektru jsou nečistoty, které se také ochotně ionizují (obr. 5.30).



Obr. 5.30: ESI-MS spektrum derivátů pyrrolidin-2-onu a mastných alkoholů izolovaných z voskových esterů včelího vosku na sférické iontové pastí.

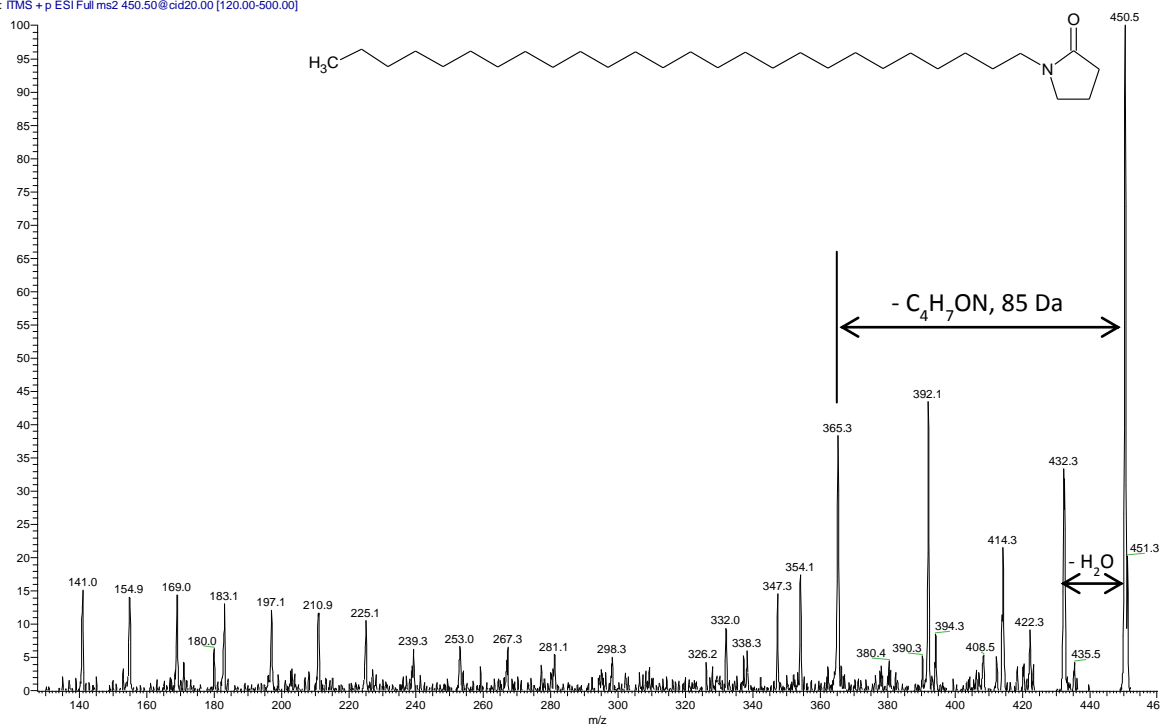
Všech pět iontů derivátů mastných alkoholů se vyskytuje i v tomto spektru. Z jejich větší intenzity signálu lze soudit, že tyto deriváty se v roztoku nachází z větší části v neutrální formě (obr. 5.31).



Obr. 5.31: APCI-MS spektrum derivátů pyrrolidin-2-onu a mastných alkoholů izolovaných z voskových esterů včelího vosku na lineární iontové pasti.

Derivát hexakosanolu a pyrrolidin-2-onu byl analyzován na lineární iontové pasti. Jeho fragmentační spektrum obsahuje fragmenty o lichém m/z (počínaje píkem 141). Tento jev byl již dřív pozorován u derivátu eikosan-1-olu, což by mohlo naznačovat i podobnou strukturu řetězce tohoto derivátu. Také je pozorována ztráta vody (pík 432) a pyrrolidin-2-onu (pík 365). Píky 392 a 414 mají neznámý původ (obr. 5.32).

waxolsbmx 450_160316165650 #3-109 RT: 0.02-0.99 AV: 107 NL: 1.53E1
T: ПMS + p ESI Full ms2 450.50@cid20.00 [120.00-500.00]



Obr. 5.32: ESI-MS/MS spektrum derivátu pyrrolidin-2-onu a hexakosanolu izolovaného z voskových esterů včelího vosku na lineární iontové pasti. Analýza proběhla přímým nástřikem. Šířka isolačního okna byla 1,0 da a kolizní energie 20,0%.

5.4.5. Shrnutí k derivatizaci mastných alkoholů izolovaných z voskových esterů včelího vosku

Byla provedena úspěšná izolace mastných alkoholů a jejich následná derivatizace pyrrolidin-2-onem. Deriváty všech izolovaných mastných alkoholů byly detegovány v iontovém zdroji ESI i APCI. Fragmentace derivátu hexakosan-1-olu poskytla podobné fragmentační spektrum, jako derivát eikosan-1-olu, což je v souladu s předpokladem, že lineární alkoholy se fragmentují podobně.

6. Závěr práce

Po všech provedených derivatizačních procedurách bylo možné detegovat mastné alkoholy měkkými ionizačními technikami. Všechny jsou použitelné pro citlivou detekci kteréhokoliv primárního mastného alkoholu měkkými ionizačními technikami. Většina derivátů se při fragmentační analýze rozpadala zpátky na kladně, nebo záporně nabitě původní derivatizační činidlo a neutrální uhlovodíkový řetězec mastného alkoholu. U derivátů mastných alkoholů s pyridinem, triethyaminem a pyrrolidin-2-onem byly také pozorovány fragmenty odpovídající štěpení jiných vazeb, u derivátů pyrrolidin-2-onu se jednalo také o štěpení po řetězci mastného alkoholu. Po izolaci mastných alkoholů z včelího vosku a jejich následné derivatizaci pyrrolidin-2-onem bylo možné všechny deriváty detegovat použitím ESI i APCI iontového zdroje. Při reakci totiž vzniká neutrální derivát, který se z části může naprotonovat kyselinou chlorovodíkovou, která vzniká jako vedlejší produkt. Navíc, derivát hexakosan-1-olu z včelího vosku poskytl očekávané fragmentační spektrum, které bylo podobné fragmentačnímu spektru lineárního derivátu eikosan-1-olu. Pomocí elektronové ionizace, na kterou byla derivatizace pyrrolidin-2-onem původně vyvinuta, nebyla nalezena větvení u derivátu fytolu. Zřejmě to bylo způsobeno dvojnou vazbou, která se ve fytolu nachází. Jednou možností na zviditelnění poloh větvení by mohla být vícestupňová fragmentace některých píků u derivátů pyridinu, triethyaminu a pyrrolidin-2-onu (např MS³), ale kvůli nízké intenzitě to není možné. Ukazuje se, že lokalizace větvení pomocí měkkých ionizačních technik na přístrojích s nízkoenergetickými mechanismy fragmentace (CID) zřejmě nebude možná.

7. Literatura

- ¹ Mudge S.M. (2005). Fatty alcohols—a review of their natural synthesis and environmental distribution. *Executive summary of the Soap and Detergent Association*. Str. 1–152
- ² Cowan M. M.: Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, str. 564-582 (1999)
- ³ Sindhu Kanya T.C., Jaganmohan Rao L., Shamanthaka Sastry M.C.: Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry* **101**, Str. 1552-1557 (2007)
- ⁴ Högnadóttir Á., Rouseff R. L.: Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **998**, str. 201 – 211 (2003)
- ⁵ Spencer G. F., Plattner R. D., Miwa T.: Jojoba oil analysis by high pressure liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **54**, str. 187 – 189 (1977)
- ⁶ Wang H., Wang H., Zhang L., Zhang J., Guo Y.: N-Alkylpyridinium isotope quaternization for matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of cholesterol and fatty alcohols in human hair. *Analytica Chimica Acta* **690**, str. 1-9 (2011)
- ⁷ Konstantopoulou MA., Krokos MD., Mazomenos BE.: Chemical composition of corn leaf essential oils and their role in the oviposition behavior of *Sesamia Monagrioides* females. *Journal of Chemical Ecology* **11**, str. 2243 – 2256 (2004)
- ⁸ Jayaprakasha GK., Rao LJ., Sakariah KK.: Chemical Composition of Volatile Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Buds. *Zeitschrift für Naturforschung C* **57**, str. 990 – 993 (2002)
- ⁹ Nivinskienė O., Butkienė R., Gudalevič A., Mockutė D., Meškauskienė V., Grigaliūnaitė B.: Influence of urban environment on chemical composition of *Tilia cordata* essential oil. *CHEMIJA* **18**, str. 44-49 (2007)
- ¹⁰ Aichholz R., Lorbeer E.: Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry: I. High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **855**, str. 601 – 615 (1999)
- ¹¹ Amoroso M. J., Benimeli C. S., Cuzzo S. A.: *ACTINOBACTERIA Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes*. Boca Raton, CRC Press 2013
- ¹² Alugupalli S., Larsson L.: Secondary fatty alcohols of *Mycobacterium xenopi*. *Journal of general microbiology* **138**, str. 2499-2502 (1992)
- ¹³ Cane DE, Ikeda H.: Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. *Accounts of chemical research* **45**, str. 463-472 (2012)
- ¹⁴ Thorne K. J. I., Kodicek E.: The structure of bactoprenol, a lipid formed by lactobacilli from mevalonic acid. *Biochemical Journal* **99**, str. 123-127 (1966)
- ¹⁵ Kandler O., König H.: Cell Wall Polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, str. 305-308 (1998)
- ¹⁶ Schouten S., Hoefs M. J. L., Koopmans M. P., Bosch H.-J., Damsté J. S. S.: Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Organic Geochemistry* **29**, str. 1305-1319 (1998)
- ¹⁷ Mori T., Ogawa T., Yoshimura T., Hemmi H.: Substrate specificity of undecaprenyl diphosphate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **436**, str. 230-234 (2013)
- ¹⁸ Oba M., Sakata S., Tsunogai U.: Polar and neutral isoprenyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry* **37**, str. 1643-1654 (2006)
- ¹⁹ Lin L., Zhuang M., Lei F., Yang B., Zhao M.: GC/MS analysis of volatiles obtained by headspace solid-phase microextraction and simultaneous–distillation extraction from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and stem. *Food Chemistry* **136**, str. 555-562 (2013)
- ²⁰ Carvalho L. M., Carvalho F., de Lourdes Bastos M., Baptista P., Moreira N., Monforte A. R., da Silva Ferreira A. C., de Pinho P. G.: Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Talanta* **118**, str. 292-303 (2014)
- ²¹ Müller C., Riederer M.: Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of chemical ecology* **31**, str. 2621-2651 (2005)
- ²² Hansen S. L., Purup S., Christensen L. P.: Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L) *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, str. 1010-1017 (2003)

- ²³ Kurkcuoglu M., Abdel-Megeed A., Husnu Can Baser K.: The composition of Taif rose oil. *Planta Medica* **77**, str. 1306 – 1306 (2011)
- ²⁴ Nadalin V., Lepojević Ž., Ristić M., Vladić J., Nikolovski B., Adamović D.: Investigation of cultivated lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction and its extracts. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* **20**, str. 71-86 (2014)
- ²⁵ Krist S., Banovac D., Tabanca N., Wedge D. E., Gochev V. K., Wanner J., Schmidt E., Jirovetz L.: Antimicrobial activity of nerolidol and its derivatives against airborne microbes and further biological activities. *Natural product communications* **10**, str. 143-148 (2015)
- ²⁶ Devgan O. N., Bokadia M. M., Bose A. K., Trivedi G. K., Chakravarti K. K.: The structure and stereochemistry of lyratol a new C₁₀ alcohol from *Cyathocline lyrata*. *Tetrahedron* **25**, str. 3217 – 3221 (1969)
- ²⁷ Al-Qudah M. A., Al-Haber H. I., Mayyas A. S., Abu-Orabi S. T., Abu Zagra M. A.: Chemical Compositions of the Essential Oil from the Jordanian Medicinal Plant *Dittrichia Viscosa*. *Jordan Journal of Chemistry* **5**, str. 343-348 (2010)
- ²⁸ Zhou H.-J., Liu C.-Z.: Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of chromatography A* **1125**, str. 135-139 (2006)
- ²⁹ Flamini G., Cosimi E., Cioni P. L., Molfetta I., Braca A.: Essential-Oil Composition of *Daucus carota* ssp. *major* (Pastinocello Carrot) and Nine Different Commercial Varieties of *Daucus carota* ssp. *Sativus* Fruits. *Chemistry & Biodiversity* **11**, str. 1022-1033 (2014)
- ³⁰ Muselli A., Desjobert J.-M., Bernardini A.-F., Costa J.: Santolina Alcohol as Component of the Essential Oil of *Achillea ageratum* L. from Corsica Island. *Journal of Essential Oil Research* **19**, str. 319-322 (2007)
- ³¹ Fitsiou I., Tzakou O., Hancianu M., Poiata A.: Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils. *Journal of Essential Oil Research* **19**, str. 183-185 (2007)
- ³² Vetter W., Schröder M., Lehnert K.: Differentiation of Refined and Virgin Edible Oils by Means of the *trans*- and *cis*-Phytol Isomer Distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, str. 6103-6107 (2012)
- ³³ Řezanka T., Votruba J.: Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources. *Journal of Chromatography A* **936**, str. 95-110 (2001)
- ³⁴ Bamba T., Fukusaki E., Minakuchi H., Nakazawa Y., Kobayashi A.: Separation of polyprenol and dolichol by monolithic silica capillary column chromatography. *Journal of lipid research* **46**, str. 2295-2298 (2005)
- ³⁵ Kurisaki A., Sagami H., Ogura K.: Distribution of polyprenols and dolichols in soybean plant. *Phytochemistry* **44**, str. 45-50 (1996)
- ³⁶ Yang T., Gao L., Hu H., Stoopen G., Wang C., Jongsma MA.: Chrysanthemyl diphosphate synthase operates *in planta* as a bifunctional enzyme with chrysanthemol synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, str. 36325-36335 (2014)
- ³⁷ Zeng WC., Zhang Z., Gao H., Jia LR., He Q.: Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*). *Journal of Food Science* **77**, str. 824-829 (2012)
- ³⁸ Weete D. J.: Structure and function of sterols in fungi. *Advances in lipid research* **23**, str. 115-167 (1989)
- ³⁹ Jabeur H., Zribi A., Makni J., Rebai A., Abdelhedi R., Bouaziz M.: Detection of Chemlali Extra-Virgin Olive Oil Adulteration Mixed with Soybean Oil, Corn Oil, and Sunflower Oil by Using GC and HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, str. 4893-4904 (2014)
- ⁴⁰ Ando T., Yamakawa R.: Analyses of lepidopteran sex pheromones by mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, str. 990-1002 (2011)
- ⁴¹ Galizia G. C., Sachse S., Mustaparta H.: Calcium Responses to Pheromones and Plant Odours in the Antennal lobe of the male and female moth *Heliothis virescens*. *Journal of Comparative Physiology A* **186**, str. 1049-1063 (2000)
- ⁴² Löfstedt Ch., Bengtsson M.: SEX PHEROMONE BIOSYNTHESIS OF (E,E)-8,10- DODECADIENOL IN CODLING MOTH *Cydia pomonella* INVOLVES E9 DESATURATION. *Journal of chemical ecology* **14**, str. 903-915 (1988)
- ⁴³ Ayasse M., Jarau S.: Chemical ecology of bumble bees. *Annual Review of Entomology* **59**, str. 299-319 (2014)
- ⁴⁴ Byers J. A., Schlyter F., Birgersson G., Franckle W.: E-myrcenol in *Ips Duplicatus*: An aggregation pheromone component new for bark beetles. *Experientia* **46**, str. 1209-1211 (1990)
- ⁴⁵ Gomez-Diaz C., benton R.: The joy of sex pheromones. *EMBO Reports* **14**, str. 874-883 (2013)
- ⁴⁶ Lloyd H. A., Jones T. H., Hefetz A., Tengö J.: Lasiol, a new acyclic monoterpene in the mandibular gland secretion of *lasius meridionalis*. *Tetrahedron letters* **31**, str. 5559-5562 (1990)
- ⁴⁷ Nikkari T.: Comparative chemistry of sebum. *Journal of Investigative Dermatology* **62**, str. 257-267 (1974)
- ⁴⁸ Nejaký report Final report of the safety assesment for acetylated lanolin alcohol and related compounds.
- ⁴⁹ Elias P. M. (editor): *Advances in Lipid Research: Skin Lipids (Volume 24)*. San Diego, Academic Press, 1991
- ⁵⁰ Thiboutot D.: Regulation of Human Sebaceous Glands. *Journal of Investigative Dermatology* **123**, str. 1-12 (2004)

-
- ⁵¹ Nicolaidis N., Santos E. C., Papadakis K.: Double-Bond Patterns of Fatty Acids and Alcohols in Steer and Human Meibomian Gland Lipids. *Lipids* **19**, str. 264-277 (1984)
- ⁵² Butovich I. A., Wojtowicz J. C., Molai M.: Human tear film and *meibum*. Very long chain wax esters and (O-acyl)-omega hydroxy fattyacids of *meibum*. *Journal of Lipid Research* **50**, str. 2471-2485 (2009)
- ⁵³ Shine W. E., McCulley J. P.: Role of Wax Ester Fatty Alcohols in Chronic Blepharitis. *Investigative ophthalmology & visual science* **34**, str. 3515-3521 (1993)
- ⁵⁴ Stránský K., Valterová I., Kofroňová E., Urbanová K., Zarevúcka M., Wimmer Z.: Non-polar Lipid Components of Human Cerumen. *Lipids* **46**, str. 781-788 (2011)
- ⁵⁵ Tollin M., Bergsson G., Kai-Larsen Y., Lengqvist J., Sjövall J., Griffiths W., Skúladóttir G. V., Haraldsson Á., Jörnvall H., Gudmundsson G. H., Agerberth B.: *Vernix caseosa* as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids, and their interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, str. 2390-2399 (2005)
- ⁵⁶ OByrne S. M., Blaner W. S.: Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *The Journal of Lipid Research* **54**, str. 1731-1743 (2013)
- ⁵⁷ Wei X., Yuan Ch., Zhang H., Li B.: Montan wax: The state-of-the-art review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **6**, str. 1230-1236 (2014)
- ⁵⁸ Wöstmann R., Liebezeit G.: Geochemical evidence for different peat sources in the Siak estuary and along the east coast of Sumatra, Indonesia. *Mires and Peat* **10**, článku 2 (2012)
- ⁵⁹ Rushdi A. I., Simoneit B. R.: Lipid formation by aqueous Fischer-Tropsch-type synthesis over a temperature range of 100 to 400 degrees C. *Origins of Life and Evolution of Biosphere* **31**, str. 103-118 (2001)
- ⁶⁰ Voeste T., Buchold H.: Production of Fatty Alcohols from Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**, str. 350-352 (1984)
- ⁶¹ Watanabe S., Suga K.: Synthesis of terpene alcohols from isoprene and naphthyllithium. *Australian Journal of Chemistry* **24**, str. 1301-1303 (1974)
- ⁶² Zheng Y.-N., Li L.-L., Liu Q., Yang J.-M., Wang X.-W., Liu W., Xu X., Liu H., Zhao G., Xian M.: Optimization of fatty alcohol biosynthesis pathway for selectively enhanced production of C12/14 and C16/18 fatty alcohols in engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **11**, str. ??-?? (2011)
- ⁶³ Kunst L., Samuels A. L.: Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research* **42**, str. 51-80 (2003)
- ⁶⁴ Wanders R. J. A.: Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* **83**, str. 16-27 (2003)
- ⁶⁵ Oku H., Yagi N., Nagata J., Chinen I.: Precursor role of branched-chain amino acids in the biosynthesis of iso and anteiso fatty acids in rat skin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1214**, str. 279-287 (1994)
- ⁶⁶ Oku H., Onotogi M., Nagata J., Wada K., Chinen I.: Selective Use of L-Valine and L-Isoleucine for the Biosynthesis of Branched-chain Fatty Acids in Rat Skin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**, str. 891-895 (1995)
- ⁶⁷ Biester E.-M., Hellenbrand J., Gruber J., Hamberg M., Frentzen M.: Identification of avian wax synthases. *BMC Biochemistry* **13**:4 (2012)
- ⁶⁸ Hayashi H., Sato A.: Fatty alcohol synthesis accompanied with chain elongation in liver peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1346**, str. 38-44 (1997)
- ⁶⁹ Braverman N. E., Moser A. B.: Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1822**, str. 1442-1452 (2012)
- ⁷⁰ Adam P., Hecht S., Eisenreich W., Kaiser J., Grawert T., Arigoni D., Bacher A., Rohdich F.: Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, str. 12108-12113 (2012)
- ⁷¹ McMurry J., Tadhg B.: *The organic chemistry of biological pathways*. Roberts and Company Publishers 2005
- ⁷² Mazein A., Watterson S., Hsieh W.-Y., Griffiths W. J., Ghazal P.: A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. *Biochemical pharmacology* **86**, str. 56-66 (2013)
- ⁷³ Iijima Y., Gang D. R., Fridman E., Lewinsohn E., Pichersky E.: Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Physiology* **134**, str. 370-379 (2004)
- ⁷⁴ Wolfrum K., laubereau A.: Vibrational sum-frequency spectroscopy of an adsorbed monolayer of hexadecanol on water. Destructive interference of adjacent lines. *Chemical Physics Letters* **228**, str. 83-88 (1994)
- ⁷⁵ Beneito-Cambra M., Herrero-Martínez J. M., Ramis-Ramos G.: Analytical methods for the characterization and determination of nonionic surfactants in cosmetics and environmental matrices. *Analytical Methods* **5**, str. 341-354 (2013)

- ⁷⁶ Beneito-Cambra M., Bernabé-Zafón V., Simó-Alfonso E. F., Rami-Ramos G.: Chromium(VI) oxide oxidation of non-ethoxylated and ethoxylated alcohols for determination by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, str. 2093-2100 (2010)
- ⁷⁷ Chance D. L., Gerhardt K. O., Manwhinney T. P.: Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of primary and secondary fatty alcohols and diols as their *tert*.-*butyldimethylsilyl* derivatives. *Journal of Chromatography A* **771**, str. 191-201 (1997)
- ⁷⁸ Rizzo W. B., Craft D. A., Somer T., Carney G., Trafrova J., Simon M.: Abnormal fatty alcohol metabolism in cultured keratinocytes from patients with Sjögren-Larsson syndrome. *Journal of Lipid Research* **49**, str. 410-419 (2003)
- ⁷⁹ Kabalka G. W., Varma M., Varma R. S.: Tosylation of alcohols. *The Journal of organic Chemistry* **51**, str. 2386-2388 (1986)
- ⁸⁰ Presser A., Hufner A.: Trimethylsilyldiazomethane – A Mild and Efficient Reagent for the Methylation of Carboxylic Acids and Alcohols in Natural Products. *Monatschäfte für Chemie* **135**, str. 1015-1022 (2004)
- ⁸¹ Rhodes D., Rich P. J., Myers A. C., Reuter C. C., Jamieson G. C.: Determination of Betaines by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Plant Physiology* **84**, str. 781-788 (1987)
- ⁸² Wang W., Albert C. J., Ford D. A.: Approaches for the analysis of chlorinated lipids. *Analytical Biochemistry* **443**, str. 148-152 (2013)
- ⁸³ Zu Ch., Praay H. N., Bell B. M., Redwine O. D.: Derivatization of fatty alcohol ethoxylate non-ionic surfactants using 2-sulfobenzoic anhydride for characterization by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, str. 120-128 (2010)
- ⁸⁴ Dunkelblum E., Tan S. H., Silk P. J.: Double-bond location in monounsaturated fatty acids by dimethyl disulfide derivatization and mass spectrometry: Application of Analysis of Fatty Acids in Pheromone Glands of Four Lepidoptera. *Journal of Chemical Ecology* **11**, str. 265-277 (1984)
- ⁸⁵ Jacob M. V., Olsen N. S., Anderson L. J., Bazaka K., Shanks R. A.: Plasma polymerised thin films for flexible electronic applications. *Thin Solid Films* **546**, str. 167-170 (2013)
- ⁸⁶ Mukherjee K., Tribedi P., Mukhopadhyay B., Kumar Sil A.: Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **338**, str. 177-183 (2012)
- ⁸⁷ Togashi N., Shiraishi A., Nishizaka M., Matsuoka K., Endo K., Hamashima H., Inoue Y.: Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **12**, str. 139-148 (2007)
- ⁸⁸ Singh D., Kumar T. R. S., Gupta V. K., Chaturvedi P.: Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations. *Indian Journal of Experimental Biology* **50**, str. 714-717 (2012)
- ⁸⁹ Kotan R., Kordali S., Cakir A.: Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung* **62c**, str. 507-513 (2007)
- ⁹⁰ Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hirose K., Hamashima H., Shimada J.: The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* **237**, str. 325-331 (2004)
- ⁹¹ Ghanejan M. T., Ehrampoush M. H., Jebali A., Hekmatimoghaddam S., Mahmoudi M.: Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal* **2**, str. 13-16 (2015)
- ⁹² Liebert M. A.: Final Report on the Safety Assessment of Stearyl Alcohol, Oleyl Alcohol, and Octyl Dodecanol. *Journal of the American College Toxicology* **4**, str. 1-29? (1985)
- ⁹³ Cox M. F.: The effect of "peaking" the ethylene oxide distribution on the performance of alcohol ethoxylates and ether sulfates. *Surfactants & Detergents* **67**, str. 599-604 (1990)
- ⁹⁴ Lapczynski A., Bhatia S. P., Letizia C. S., Api A. M.: Fragrance material review on farnesol. *Food and Chemical Toxicology* **46**, str. 149-156 (2008)
- ⁹⁵ Lapczynski A., Bhatia S. P., Foxenberg R. J., Letizia C. S., Api A. M.: Fragrance material review on geraniol. *Food and Chemical Toxicology* **46**, str. 160-170 (2008)
- ⁹⁶ Lapczynski A., Bhatia S. P., Letizia C. S., Api A. M.: Fragrance material review on rhodinol. *Food and Chemical Toxicology* **46**, str. 259-262 (2008)
- ⁹⁷ McGinty D., Letizia C. S., Api A. M.: Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology* **48**, str. 59-63 (2010)
- ⁹⁸ Boardman P. L., Hart F. D.: Clinical measurement of the anti-inflammatory effects of salicylates in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal* **4**, str. 264-268 (1967)
- ⁹⁹ Tollin M., Bergsson G., Kai-Larsen Y., Lengqvist J., Sjövall J., Griffiths W., Skúladóttir G. V., Haraldsson Á., Jörnvall H., Gudmundsson G. H., Agerberth B.: *Vernix caseosa* as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids, and their interactions. *Celular and molecular life sciences* **62**, str. 2390-2399 (2005)

-
- ¹⁰⁰ Dreyfus H., Guérolde B., Freysz I., Hicks D.: Successive Isolation and Separation of the Major Lipid Fractions Including Gangliosides from Single Biological Samples. *Analytical Biochemistry* **249**, str. 67-78 (1997)
- ¹⁰¹ Cert A., Moreda W., Pérez-Camino M. C.: Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oil. *Journal of Chromatography A* **881**, str. 131-148 (2000)
- ¹⁰² Federle T. W., Itrich N. R.: Fate of free and linear alcohol-ethoxylate-derived fatty alcohols in activated sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, str. 30-41 (2006)
- ¹⁰³ Chávez G., Bravo B., Piña N., Arias M., Vivas E., Ysambertt F., Márquez N., Cáceres A.: Determination of aliphatic alcohols after on-line microwave-assisted derivatization by liquid chromatography-photodiode array detection. *Talanta* **64**, str. 1323-1328 (2004)
- ¹⁰⁴ Gericke A., Hühnerfuss H.: Investigation of 2- and E-Unsaturated Fatty Acids, Fatty Acid Esters, and Fatty Alcohols at the Air/Water Interface by Infrared Spectroscopy. *Langmuir* **11**, str. 225-230 (1995)
- ¹⁰⁵ Alugupalli S., Larsson L.: Secondary fatty alcohols of *Mycobacterium xenopi*. *Journal of General Microbiology* **138**, str. 2499-2502 (1992)
- ¹⁰⁶ Zaikin V., Halket J.: *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*. Chichester (West Sussex), IM Publications LLP 2009
- ¹⁰⁷ Nakamura T., Takazawa T., Maruyama-Ohki Y., Nagaki H., Kinoshita T.: Location of Double Bonds in Unsaturated Fatty Alcohols by Microderivatization and Liquid Secondary Ion Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **65**, str. 837-840 (1993)
- ¹⁰⁸ Dunphy J. C., Pessler D. G., Morrall S. W., Evans K. A., Robaugh D. A., Fujimoto G., Negahban A.: Derivatization LC/MS for the Simultaneous Determination of Fatty Alcohol and Alcohol Ethoxylate Surfactants in Water and Wastewater Samples. *Environmental Science and Technology* **35**, str. 1223-1230 (2001)
- ¹⁰⁹ Cao Y., Guan Q., Sun T., Wang H., Leng J., Guo Y.: N-alkylpyridinium quaternization combined with liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry: A highly sensitive method to quantify fatty alcohols in thyroid tissues. *Analytica Chimica Acta* **849**, str. 19-26 (2014)
- ¹¹⁰ Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G., Tonini C.: Determination of Double Bond Position in Diunsaturated Compounds by Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Derivatives. *Analytical Chemistry* **59**, str. 694-699 (1987)
- ¹¹¹ Reaney M. J. T.: Liu Y.-D., Taylor W. G.: Gas Chromatographic Analysis of Diels-Alder Adducts of Geometrical and Positional Isomers of Conjugated Linoleic Acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**, str. 1083-1086 (2001)
- ¹¹² Williams D. H., Ward R. S., Cooks R. G.: Studies in Mass Spectrometry. XXIV. A Study of the Reactions Induced in Triphenylphosphine, Triphenylphosphine Oxide, and Related Substances upon Electron Impact. *Journal of the American Chemical Society* **90**, str. 966-972 (1968)