

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Validace metody chromatografického dělení plazmatických lipidů na tenké
vrstvě

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Sabina Vebrová**
Osobní číslo: **C20488**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Validace metody chromatografického dělení plazmatických lipidů na tenké vrstvě**
Téma práce anglicky: **Validation of Plasmatic Lipid Separation By Thin Layer Chromatography**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Popište chemické, fyziologické a metabolické funkce lipidů, se zaměřením na plazmatické frakce a fyziologické mastné kyseliny.
2. Seznamte se se používanými metodami chromatografického dělení plazmatických lipidů na tenké vrstvě a následné analýzy mastných kyselin pomocí chromatografických metodik.

Experimentální část:

1. Navrhněte modernizaci naší analytické metody a experimentálně ji ověřte.
2. Navrhněte metodiku kalibrace analýzy mastných kyselin v každé lipoproteinové frakci pomocí individuálních standardů a proveďte její experimentální ověření.
3. Experimentálně otestujte metodu kalibrace pomocí standardního přídatku a porovnejte její přesnost s dříve používanou metodou.
4. Výsledky analýz statisticky zpracujte a vypočítejte analytické parametry modernizované metody.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. RUIZ J. I. and OCHOA B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J. Lip. Res.* 1997, 38, 1482 – 1489.
2. TVRZICKA E. and VECKA M. et al. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection. *Anal. Chim. Acta*, 2002, **465** 337-350.
3. FURTADO J., BEQARI J. and CAMPOS H. Comparison of the Utility of Total Plasma Fatty Acids versus those in Cholesteryl Ester, Phospholipid, and Triglyceride as Biomarkers of Fatty Acid Intake. *Nutrients* 2019, **11** (9), 2081-2098.
4. FIORE E. and TESSARI R. et al. Identification of Plasma Fatty Acids in Four Lipid Classes to Understand Energy Metabolism at Different Levels of Ketonemia in Dairy Cows Using Thin Layer Chromatography and Gas Chromatographic Techniques (TLC-GC). *Animals* 2020, **10**, 571 – 592.
5. JENKINS D., and DIALLO C. et al. Method Validation Approaches for Pharmaceutical Assessments – Highlights with High Performance Thin Layer Chromatographic (HPTLC) Techniques, Calibration and Validation of Analytical Methods – A Sampling of Current Approaches, Mark T. Stauffer, IntechOpen, . (December 20th 2017) DOI: 10.5772/intechopen. 71765. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/57781>.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Ing. Martina Špryncová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

LS.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlášení

Prohlašuji:

Práci s názvem Validace metody chromatografického dělení plazmatických lipidů na tenké vrstvě jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 05.05.2022

Bc. Sabina Vebrová v.r.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce panu prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc. za odborné vedení práce a za podporu, trpělivost, vstřícnost a pomoc při jejím vytváření. Děkuji také Ing. Bc. Martině Špryncové, Ph.D. především za pomoc při práci, poskytnutí podkladů a materiálů k tomuto tématu se vztahujících, možnost konzultací a osobních setkání za účelem diskuse o řešeném problému. Na závěr bych chtěla poděkovat za podporu mé rodině, která mi byla oporou po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá problematikou stanovení plazmatických lipidů pomocí tenkovrstvé chromatografie. V teoretické části jsou zmíněny vlastnosti lipidů, jejich dělení do jednotlivých skupin, rozdělení mastných kyselin a lipidový metabolismus. Nakonec jsou zde rozebírány chromatografické metody pro stanovení plazmatických lipidů. Experimentální část obsahuje použité pracovní postupy pro přípravu interních standardů využívaných pro validaci metody tenkovrstvé chromatografie. Dále jsou v práci rozebírány výsledky kalibrací použitých interních standardů.

KLÍČOVÁ SLOVA

lipidy, mastné kyseliny, interní standard, tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, validace

TITLE

Validation Of Plasmatic Lipid Separation By Thin Layer Chromatography

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the determination of plasma lipids by thin layer chromatography. The theoretical part mentions the properties of lipids, their division into individual groups, the division of fatty acids and lipid metabolism. Finally, chromatographic methods for the determination of plasma lipids are discussed here. The experimental part contains the working procedures used for the preparation of internal standards used for the validation of the thin layer chromatography method. Furthermore, the results of calibrations of the used internal standards are discussed in the work.

KEYWORDS

lipids, fatty acids, internal standards, thin layer chromatography, gas chromatography, validation

OBSAH

SEZNAM ILLUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 Lipidy	14
1.1.1 Mastné kyseliny	14
1.1.2 Jednoduché lipidy.....	17
1.1.3 Složené lipidy	19
1.2 Metabolismus lipidů.....	21
1.2.1 Trávení lipidů	21
1.2.2 Lipoproteinový transport	22
1.2.3 Lipolýza	25
1.2.4 Oxidace mastných kyselin	26
1.2.5 Syntéza mastných kyselin.....	27
1.2.6 Syntéza triacylglycerolů	28
1.3 Chromatografie.....	29
1.3.1 Kapalinová chromatografie	29
1.3.2 Plynová chromatografie.....	32
1.3.3 Tenkovrstvá chromatografie.....	38
1.3.4 Příklady vnitřních standardů pro stanovení lipidů.....	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
2.1 Přístrojové vybavení a pracovní pomůcky pro tenkovrstvou a plynovou chromatografii	45
2.2 Použité chemikálie	46
2.3 Pracovní postup	48

2.3.1	Příprava kalibračních roztoků interních standardů.....	48
2.3.2	Derivatizace kalibračních roztoků interních standardů a jejich stanovení plynovou chromatografií	49
2.3.3	Stanovení interních standardů s pool plazmou	50
2.3.4	Stanovení interních standardů pomocí tenkovrstvé a plynové chromatografie.....	51
2.4	Analytické parametry metody.....	53
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	55
3.1	Chromatografické záznamy	55
3.2	Kalibrační křivky.....	55
3.3	Analytické parametry metody.....	56
3.3.1	Přesnost metody.....	56
3.4	Diskuse	57
3.5	Tripentadekanoin jako interní standard pro triacylglyceroly	58
3.6	1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin jako interní standard pro fosfolipidy	58
3.7	1,3-dipentadekanoin jako interní standard pro diacylglyceroly	59
3.8	Kyselina pentadekanová jako interní standard pro volné mastné kyseliny	60
3.9	Cholesteryl pentadekanoát jako interní standard pro estery cholesterolu	61
4	ZÁVĚR.....	62
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	63

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Lipoproteinová částice, převzato a upraveno z: Bhagavan, 2015	22
Obrázek 2 β -oxidace, převzato a upraveno z: Ahern, 2021	27
Obrázek 3 Schéma GC, převzato a upraveno z: Obeidat, 2021	32
Obrázek 4 Schéma FID, převzato a upraveno z: Morad, 2014.....	36
Obrázek 5 Obecný postup TLC, převzato a upraveno z: mz-at.de.....	39
Obrázek 6 Schématické znázornění experimentální metodiky.....	51
Obrázek 7 Příprava TLC desky	52
Obrázek 8 Chromatografický záznam kalibračního roztoku IS po deproteinaci.....	55
Obrázek 9 Kalibrační křivky IS 5.....	57
Obrázek 10 Kalibrační křivky IS 1	58
Obrázek 11 Kalibrační křivky IS 6.....	59
Obrázek 12 Kalibrační křivky IS 3.....	59
Obrázek 13 Kalibrační křivky IS 4.....	60
Obrázek 14 Kalibrační křivky IS 5.....	61
Tabulka 1 Nasycené MK	15
Tabulka 2 Mononenasycené MK.....	15
Tabulka 3 Omega-3 MK.....	17
Tabulka 4 Omega-6 MK.....	17
Tabulka 5 Skutečné koncentrace kalibračních roztoků jednotlivých IS.....	49
Tabulka 6 Parametry vycházející z kalibračních přímek.....	56
Tabulka 7 Přesnost metody.....	57

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA	arachidonová kyselina (z angl. arachidonic acid)
ALA	α -linolenová kyselina (z angl. α -linolenic acid)
apo	apoprotein
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
CoA	koenzym A
CPT	karnitin-palmitoyl transferáza (z angl. carnitine palmitoyl transferase)
CV	variační koeficient (z angl. coefficient of variation)
DAD	detektor diodového pole (z angl. diode array detector)
DAG	diacylglyceroly
DHA	dokosaheptaenová kyselina (z angl. docosahexaenoic acid)
ECD	detektor elektronového záchytu (z angl. electron capture detector)
ECH	ester cholesterolu
EPA	eikosapentaenová kyselina (z angl. eicosapentaenoic acid)
FAD	flavinadenindinukleotid
FAME	methyl-ester mastné kyseliny (z angl. fatty acid methyl ester)
FAS	syntáza mastných kyselin (z angl. fatty acid synthase)
FID	plamenově-ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GLC	plynová rozdělovací chromatografie (z angl. gas-liquid chromatography)
GMS	glycerolmonostearát (z angl. glycerol monostearate)
GSC	plynová adsorpční chromatografie (z angl. gas-solid chromatography)
GSL	glykosfingolipidy (z angl. glycosphingolipids)

HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (z angl. high density lipoproteins)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. hydrophilic interaction liquid. chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (z angl. high-performance thin-layer chromatography)
HSL	hormon-senzitivní lipáza
IDL	lipoproteiny o střední hustotě (z angl. intermediate density lipoproteins)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IS	interní (vnitřní) standard (z angl. internal standard)
LA	linolová kyselina (z angl. linoleic acid)
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LCAT	lecitin-cholesterolacyltransferáza (z angl. lecithin cholesterol acyltransferase)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low density lipoproteins)
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie (z angl. liquid-liquid chromatography)
Lp (a)	lipoprotein (a)
LPA	lysofosfatidová kyselina (z angl. lysophosphatidic acid)
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie (z angl. liquid-solid chromatography)
MAG	monoacylglyceroly
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometr (z angl. mass spectrometry)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (z angl. monounsaturated fatty acid)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)

PA	fosfatidová kyselina (z angl. phosphatidic acid)
PL	fosfolipidy (z angl. phospholipids)
PLOT	otevřené trubicové kolony s tenkou vrstvičkou porézního materiálu (z angl. porous-layer open tubular columns)
PTV	programovatelný teplotní vaporizér (z angl. programmable temperature vaporizer)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acid)
RF	retenční faktor
SCOT	otevřené kapilární kolony s vrstvou nosiče se zakotvenou kapalinou (z angl. support-coated open tubular columns)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
TAG	triacylglyceroly, triglyceridy
<i>t</i> BME	<i>tert</i> -butylmethylether
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin-layer chromatography)
UPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra performance liquid chromatography)
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (z angl. very-low density lipoproteins)
VMK	volné mastné kyseliny
WCOT	kapilární kolona s kapalnou stacionární fází tvořící tenký film (z angl. wall-coated open tubular columns)

ÚVOD

Studium moderní chemie lipidů začalo v 17. a 18. století. V roce 1665 Robert Boyleov, anglo-irský filozof a chemik, poprvé popsal mléčný vzhled krve u zvířat po jídle. Teprve v roce 1774 pán Henson určil, že tento mléčný vzhled obsahuje tuk. Mezitím ve Francii v roce 1769 Poulletiere de la Salle obohatil lipidovou chemii o izolaci pevné tukové látky (cholesterolu) ze žlučových kamenů. Nejrozsáhleji ji však studoval v 19. století (1786-1889) chemik Michel Eugene Chevreul. Chevreul se vyučil chemikem pro textilní barviva, ale proslavil se svým výzkumem v procesu zmýdlnění. Vynalezl moderní výrobu mýdla, identifikoval několik mastných kyselin (MK) a navrhl v roce 1816 název „*cholesterin*“ pro tvrdou bílou tukovou látku, kterou našel ve žlučových kamenech. Tento název vznikl spojením řeckého slova „*chole*“, které znamená žluč a řeckého slova „*stereos*“ jehož význam je pevný. Salkowski v roce 1872 jako první vyvinul metodu pro identifikaci cholesterolu ve žlučových kamenech pomocí kyseliny sírové, která způsobí vznik charakteristického zabarvení. Až téměř o 20 let později došlo k úpravám této metody. Lieberman v roce 1885 poprvé popsal extrakční metody využívající kyselinu sírovou a octovou s chloroformem. Následoval článek vydaný v roce 1890, jehož autor Burchard využíval Liebermannovu metodu ke kvantifikaci cholesterolu. Tento postup je nyní znám jako Liebermannova-Burchardova reakce, která se dodnes používá. (Mcnamara, 2006)

Za objevitele papírové chromatografie je považován Runghe, který separoval barviva na filtračním papíře. Evoluce chromatografie začala Tswettovými experimenty k oddělení rostlinných pigmentů. Později Ismailov a Shraiber použili částice oxidu hlinitého rozprostřeného na skleněné desce místo toho, aby byly zabaleny do kolony. V 50. letech 20. století získala papírová chromatografie široké uplatnění zejména při separaci vzorků biologického původu. Tuto metodu publikoval Consden a kol., kteří k ní také vyvinuli teorii, zavedli termín retenční faktor (RF) a použili 2D separaci s dvěma různými vyvíječnými systémy. Papírová chromatografie měla široké uplatnění v 60. letech 20. století, ale nyní si svůj zásadní význam mezi vysoce výkonnými separačními metodami udržela pouze tenkovrstvá chromatografie (TLC). (Kalász, 2020)

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lipidy

Lipidy jsou volně definovány jako biologické látky, které jsou hydrofóbní povahy a ve většině případů rozpustné v organických rozpouštědlech. (Fahy, 2005) Lipidy lze klasifikovat na základě jejich fyzikálních vlastností, kdy se při pokojové teplotě dělí na oleje a tuky. Dále podle jejich polaritě na neutrální a polární lipidy. Neutrální lipidy jsou MK, steroly a acylglyceroly. Do polárních lipidů se zahrnují fosfolipidy (PL) a glykolipidy. Nejčastěji se, ale lipidy dělí podle struktury na jednoduché a složené. První skupinou jsou jednoduché lipidy, které jsou složeny z MK a alkoholu a poskytují maximálně dva typy produktů hydrolýzy, alkohol a kyselinu. Patří sem vosky, acylglyceroly a jejich estery. Druhou skupinou jsou složené lipidy, které poskytují tři a více produktů hydrolýzy a patří sem např. PL, glykolipidy a sfingolipidy. (Day, 2016)

Lipidy jsou rozmanitou a všude přítomnou skupinou sloučenin, které mají klíčové biologické funkce. Mezi tyto funkce se řadí: zdroj energie, strukturální složka buněčných membrán, účast na signálních drahách a další. K popisu kompletního lipidového profilu v buňce, tkáni nebo celého organismu se používá slovo lipidom, který je podskupinou metabolomu. Věda, která studuje lipidom se nazývá lipidomika a zabývá se buněčnou fyziologií a patologií. (Fahy, 2011)

1.1.1 Mastné kyseliny

MK jsou uhlovodíkové řetězce různé délky a stupně nenasycenosti s karboxylovou skupinou na jednom konci a methylovou skupinou na druhém konci. Nejvíce zastoupeny jsou MK se sudým počtem uhlíků a přímým řetězcem. Také existují MK s lichým počtem uhlíků, rozvětveným řetězcem nebo substituované MK. Uhlovodíkový řetězec může být dlouhý od 2 až do 30 uhlíků. Do délky 6 uhlíků se jedná o krátké řetězce. Středně dlouhý řetězec mají MK s 6-12 uhlíky a dlouhý řetězec MK, které obsahují více jak 12 uhlíků. MK mohou být buď nasycené nebo nenasycené. Další rozlišení v jejich struktuře spočívá v umístění dvojných vazeb a z jejich *cis*- a *trans*- konformace. (Burdge, 2017)

Nasycené mastné kyseliny

Nasycené MK se nacházejí v rostlinných i živočišných zdrojích. V **Tabulce 1** jsou uvedeny nejznámější nasycené MK s typicky sudým počtem uhlíků. MK s lichým počtem uhlíků se nacházejí ve stopovém množství v živočišných a rostlinných tucích, více se však vyskytují v lipidech bakterií. (Kenar, 2017)

Tabulka 1 Nasyčené MK

vzorec	triviální název	systematický název
$C_4H_8O_2$	máselná	butanová
$C_6H_{12}O_2$	kapronová	hexanová
$C_8H_{16}O_2$	kaprylová	oktanová
$C_{10}H_{20}O_2$	kaprinová	dekanová
$C_{12}H_{24}O_2$	laurová	dodekanová
$C_{14}H_{28}O_2$	myristová	tetradekanová
$C_{16}H_{32}O_2$	palmitová	hexadekanová
$C_{18}H_{36}O_2$	stearová	oktadekanová
$C_{20}H_{40}O_2$	arachová	eikosanová
$C_{22}H_{44}O_2$	behenová	dokosanová
$C_{24}H_{48}O_2$	lignocerová	tetrakosanová

převzato a upraveno z: Akinbule, 2014

Mononenasyčené mastné kyseliny

Tabulka 2 Mononenasyčené MK

vzorec	izomer	triviální název	systematický název
$C_{10}H_{18}O_2$	<i>cis</i>	kaprolejová	dec-9-enová
$C_{12}H_{22}O_2$	<i>cis</i>	laurolejová	dodec-9-enová
$C_{14}H_{26}O_2$	<i>cis</i>	myristolejová	tetradec-9-enová
$C_{16}H_{30}O_2$	<i>cis</i>	palmitolejová	hexadec-9-enová
$C_{18}H_{34}O_2$	<i>cis</i>	olejová	oktadec-9-enová
$C_{18}H_{34}O_2$	<i>trans</i>	elaidová	oktadec-9-enová
$C_{18}H_{34}O_2$	<i>trans</i>	vakcenová	oktadec-11-enová
$C_{20}H_{38}O_2$	<i>cis</i>	gadolejová	eikos-9-enová
$C_{22}H_{42}O_2$	<i>cis</i>	eruková	dokos-13-enová
$C_{22}H_{42}O_2$	<i>trans</i>	brassidová	dokos-13-enová

převzato a upraveno z: Akinbule, 2014

Mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) jsou chemicky klasifikovány jako MK obsahující jednu dvojnou vazbu a některé z nich jsou přiblíženy v **Tabulce 2**. V *cis* konfiguraci jsou atomy vodíku na stejné straně jako dvojná vazba, zatím co v *trans* konfiguraci jsou atomy vodíku a dvojná vazba na opačných stranách. *Cis* izomery jsou převládající formou MUFA

v potravinách. Nejběžnější *cis* forma vyskytující se v potravinách je kyselina olejová. (Schwingshackl, 2012)

Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou klasifikovány jako MK s dvěma a více dvojnými vazbami v jejich páteři. Bylo zjištěno, že PUFA jsou nezbytné pro normální vývoj a fungování mozku, srdce a také pro rovnováhu všech tkání a orgánů. Nejdůležitější role a nejvýznamnější funkce jsou připisovány PUFA, které jsou označovány jako esenciální MK. Esenciální MK nemohou být v těle syntetizovány a musí být tedy do těla dodávány potravou. Podle chemické struktury je lze dále dělit do různých skupin. Omega MK jsou klasifikovány podle polohy první dvojných vazby, kdy je rozdíl mezi nimi vyjádřen počtem omega. Lze rozlišit dvě hlavní skupiny omega-3 a omega-6. Ve skupině omega-3 je první dvojná vazba umístěna na třetím uhlíku od methylového konce řetězce, proto název omega-3. V případě skupiny omega-6 se první dvojná vazba nachází na šestém uhlíku od methylového konce řetězce, proto název omega-6. (Sokoła-Wysoczańska, 2018)

Primární přirozené PUFA jsou v *cis*-konfiguraci a obsahují dvě až šest dvojných vazeb, které jsou nekonjugované a vzájemně oddělené methylenovými skupinami. U rostlin je počet dvojných vazeb v MK jen málokdy vyšší než tři. Naopak u živočichů a řas může být přítomno až šest dvojných vazeb. (Kenar, 2017)

Mezi omega-3 MK patří (viz. **Tabulka 3**) především kyselina dokosaheptaenová (DHA), kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina α -linolenová (ALA). Prekurzorem pro syntézu MK ze skupiny omega-3 je ALA a zároveň je jedinou esenciální MK z této skupiny. Na EPA a DHA se může metabolizovat ALA, ale tyto MK mohou být také dodávány potravou. Zdrojem této MK jsou rostlinné oleje (lněné semínko, řepkový olej, konopný olej a další), ořechy a semena (chia semínka). MK EPA a DHA se běžně vyskytují v rybách a mořských plodech (chobotnicový a rybí olej), a proto jsou nazývány jako mořské omega-3. Důvodem, proč jsou tyto MK přítomny v mořských organismech je jejich ochrana před ztuhnutím jejich tělesných tekutin při nízkých teplotách. (Sokoła-Wysoczańska, 2018)

Mezi omega-6 MK patří (viz. **Tabulka 4**) především kyselina arachidonová (AA), kyselina γ -linolenová a kyselina linolová (LA). Pro omega-6 je základní sloučeninou LA, která je přijímána z potravy, tělo ji neumí syntetizovat. Po vstřebání LA dochází k její přeměně na AA. Přírodními zdroji omega-6 MK jsou kukuřičný a slunečnicový olej, ořechy, kokosový olej a mandle. Z živočišných zdrojů je to vepřové maso i sádlo a krůtí tuk. (Sokoła-Wysoczańska, 2018)

Tabulka 3 Omega-3 MK

vzorec	triviální název	systematický název
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	α-linolenová	oktadeka-9,12,15-trienová
C ₁₈ H ₂₈ O ₂	stearidonová	oktadeka-6,9,12,15-tetraenová
C ₂₀ H ₃₂ O ₂	eikosatetraenová	eikosa-8,11,14,17- tetraenová
C ₂₀ H ₃₀ O ₂	eikosapentaenová	eikosa-5,8,11,14,17- pentaenová
C ₂₂ H ₃₄ O ₂	clupanodonová	dokosa-7,10,13,16,19-pentaenová
C ₂₂ H ₃₂ O ₂	dokosahexaenová	dokosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoá
C ₂₄ H ₃₈ O ₂	tetrakosapentaenová	tetrakosa-9,12,15,18,21-pentaenová
C ₂₄ H ₃₆ O ₂	nisinová	tetrakosa-6,9,12,15,18,21-hexaenová

převzato a upraveno z: Mariamenatu, 2021

Tabulka 4 Omega-6 MK

vzorec	triviální název	systematický název
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	linolová	oktadeka-9,12-dienová
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	γ-linolenová	oktadeka-6,9,12-trienová
C ₂₀ H ₃₄ O ₂	dihomo-γ-linolenová	eikosa-8,11,14-trienová
C ₂₀ H ₃₂ O ₂	arachidonová	eikosa-5,8,11,14-tetraenová
C ₂₂ H ₃₆ O ₂	adrenová	dokosa-7,10,13,16-tetraenová
C ₂₄ H ₄₀ O ₂	tetrakosatetraenová	tetrakosa-9,12,15,18-tetraenová
C ₂₄ H ₃₈ O ₂	tetrakosapentaenová	tetrakosa-6,9,12,15,18-pentaenová
C ₂₂ H ₃₄ O ₂	osbondová	dokosa-4,7,10,13,16-pentaenová

převzato a upraveno z: Mariamenatu, 2021

1.1.2 Jednoduché lipidy

Acylglyceroly

Acylglyceroly, dříve nazývané jako glyceridy, jsou estery MK a glycerolu. Glycerol má tři hydroxylové funkční skupiny, které mohou být esterifikovány jednou, dvěma nebo třemi MK. Podle počtu esterifikovaných hydroxylových skupin dělíme acylglyceroly na monoacylglyceroly (MAG), diacylglyceroly (DAG) a triacylglyceroly (TAG). (Sharma, 2008)

MAG jsou látky neiontového charakteru a jsou povrchově aktivní. Mají GRAS status (Všeobecně uznávány jako bezpečné) podle Food and Drugs Administration a jsou hojně

používány v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Využití je v kosmetickém průmyslu, protože oproti iontově povrchově aktivním látkám nemají MAG vedlejší účinky při požití a nedráždí kůži. Ve farmaceutickém průmyslu jsou MAG využívány jako změkčovadla pro náplasti nebo při výrobě pomalu se uvolňujících léků. (Freitas, 2008) V potravinářství se používají jako zahušťovadla, protispékavá a konzervační činidla, emulgační činidlo pro oleje atd. Jeden z MAG využívaný jako emulgátor je glycerolmonostearát, známý jako GMS. (Sharma, 2008)

DAG jsou složeny ze dvou MK esterifikovaných na trojmocný alkohol glycerol. Glycerol v případě DAG má esterifikované dvě hydroxylové skupiny. Existují dva možné strukturní izomery. Acyl migruje v molekulách DAG a dochází k rovnováze mezi strukturními izomery a tvorbě tzv. amfolytu, a to kvůli lipofilním MK a hydrofilní hydroxylové skupině. Výsledkem je, že DAG mají povrchově aktivní vlastnosti. (Nicholson, 2019)

DAG se často používají v potravinářských produktech stejně jako MAG jako emulgátory. Obvykle se jedná o směs DAG a MAG, ale lepším emulgátorem je však samotný MAG. Molekula DAG má pouze jednu hydroxylovou skupinu oproti MAG, které mají skupiny dvě, a to způsobuje, že mají větší lipofilitu a nižší hodnotu hydrofilně-lipofilní rovnováhy. Více jsou vyhledávané MAG díky jejich povrchové aktivitě, která je způsobena uvedenými rozdíly. Ale vzhledem k lepším emulgačním vlastnostem směsi DAG/MAG a dražší výrobě samotných MAG se používá jejich směs. (Nicholson, 2019)

Dalším přínosem DAG je jejich vliv na zdraví člověka. Zjistilo se, že jejich konzumací se snižuje hladina TAG v séru a působí pozitivně proti obezitě, snižují tukové zásoby, index tělesné hmotnosti a obvod pasu. (Nicholson, 2019)

TAG obsahují tři MK esterifikované glycerolovým hlavním řetězcem. TAG jsou hlavním dietárním tukem, které jsou ve střevě hydrolyzovány lipázami na volné mastné kyseliny (VMK), MAG a ve střevních buňkách znovu reesterifikovány na TAG. Mohou být syntetizovány i v těle, a to v játrech nebo tukové tkáni. V tukové tkáni jsou TAG uloženy a slouží jako zásobárna energie. V případě potřeby jsou působením hormon-senzitivní lipázy (HSL) uvolněny. Tato HSL je aktivována hormonálně např. glukagonem, a naopak inhibována inzulinem. (Bayly, 2014)

V lidském těle se získává energie z TAG. TAG, které tvoří 15 % až 20 % z celkové hmotnosti a poskytují 9 kcal/kg. Prvotním zdrojem, jež je použit je glukóza poskytující 4 kcal/g. Glukóza je uložena v těle ve formě glykogenu a její hmotnost je v řádu gramů, proto během hladovění se zásoby rychle vyčerpají, v řádu hodin, a začne se využívat zásoba TAG. Pokud by tělu došly zásoby i tuků začnou se odbourávat proteiny. (Abourjaili, 2010)

Zvýšení sérové hladiny TAG spojené s nízkou hladinou lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL) a inzulínovou rezistencí vede k rozvoji rizika ischemické choroby srdeční (ICHS). Nízkohustotní lipoproteinové částice a chylomikronové zbytky dělají TAG více aterogenními. Tyto zbytky jsou menší, ale bohatší na cholesterol a snáze vstřebatelné makrofágy. Po vstřebání zbytků se makrofágy mění na pěnové buňky tvořící plak. Dále zvýšení hladiny TAG a lipoproteinu o velmi nízké hustotě (VLDL) způsobují zvýšení cholesterol ester transfer proteinové aktivity, která způsobí změnu v produkci z HDL i lipoproteinu o střední hustotě (IDL) na lipoprotein o nízké hustotě (LDL) cholesterol. Tyto faktory vedou k rozvoji aterosklerózy a tím zvyšují riziko ICHS. (Abourjaili, 2010)

Vosky

Vosky jsou tvořeny alifatickými látkami s dlouhým řetězcem. Obecně obsahují MK s velmi dlouhým řetězcem, primární a sekundární alkoholy, uhlovodíky, estery sterolů, alifatické aldehydy, TAG atd. Vosky lze klasifikovat jako přírodní nebo syntetické. Přírodní vosky se dále dělí na obnovitelné a neobnovitelné. Neobnovitelné jsou minerální vosky, které se získávají např. z hnědého uhlí a mohou být surový nebo rafinovaný jako je např. montan. Obnovitelné přírodní vosky lze chemicky upravit různými metodami např. hydrogenací. Většina vosků má relativně nízkou viskozitu. Jsou nerozpustné ve vodě a rozpustnost v organických rozpouštědlech je závislá na teplotě. (Tinto, 2017)

1.1.3 Složené lipidy

Složené, nebo-li komplexní lipidy jsou ty, které po hydrolýze poskytují tři a více produktů. Komplexní lipidy obsahují tedy kromě MK a alkoholů zbytky jako je například fosfátová skupina ve PL a cukry v glykolipidech. Mezi složené lipidy patří např. PL, glykolipidy a sfingolipidy. (Xiao, 2021)

Fosfolipidy

PL jsou skupinou polárních lipidů, ve kterých jsou MK i kyselina fosforečná esterifikovány na alkohol. PL se dělí do dvou tříd na fosfoglyceridy s glycerofosfolipidy a sfingolipidy. V glycerofosfolipidech a fosfoglyceridech je alkoholem glycerol a ve sfingolipidech sfingosin. Základní skupiny jako jsou cholin, ethanolamin, inositol a serin jsou esterifikovány kyselinou fosforečnou spolu s glycerolem nebo sfingosinem. Hydrofilní hlavu tvoří báze, které mají pozitivní a kyselý fosfát s negativním nábojem. Hydrofóbní konec tvoří uhlovodíkový řetězec, který umožňuje PL spontánně utvářet speciální struktury ve vodném prostředí. Mezi těmito strukturami jsou rozšířené dvojvrstvy s hydrofóbním jádrem hlavními složkami všech buněčných membrán. Micelární struktury jsou vidět v krevních

lipoproteinech a buněčných lipidových tělech a jsou nezbytné pro absorpci lipidů a vitamínů rozpustných v tucích. (El-Bacha, 2016)

Biochemické a fyziologické vlastnosti této skupiny polárních lipidů do značné míry souvisejí s chemickou vlastností, nazývanou amfipatie. Amfipatie znamená, že PL interagují jak s lipidy, tak s vodou a jinými polárními sloučeninami. Membrány savčích buněk obsahují více než 1 000 různých PL, které mají strukturní i regulační funkce. PL vykonávají strukturní funkce v buněčných membránách, které se liší složením PL podle funkce buněk a organel. Nejhojnějšími PL v krevní plazmě a organelách u savčích buněk jsou fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin. U bakterií je převládajícím PL pouze fosfatidylethanolamin. V plazmatické membráně a Golgiho aparátu se nachází fosfatidylserin a kardiolipin v mitochondriálních membránách. (El-Bacha, 2016)

Glykolipidy

Glykolipidy jsou obecným termínem pro komplexní lipidy tvořené z cukerné části a lipidové části. Dělí se do dvou kategorií na glykosfingolipidy (GSL) a glykoglycerolipidy v závislosti na struktuře lipidové skupiny. GSL mají alkalicky stabilní sfingoidní základní hlavní řetězec. Naopak glycerolový hlavní řetězec glykoglycerolipidů je alkalicky labilní. (Ito, 2007)

Mezi glykoglycerolipidy patří např. monogalaktosyldiglyceridy, které jsou běžně přítomny v listech rostlin a v řasách. Obsahují vysoký podíl PUFA a nejspíše hrají roli ve fotosyntéze. Nacházejí se také v centrálním nervovém systému některých zvířat. Digalaktosyldiglyceridy často doprovázejí monogalaktosyldiglyceridy v chloroplastech vyšších rostlin a řasách, ale v nižších koncentracích. (Gordon, 2003)

GSL jsou široce distribuovány od tzv. nižších zvířat k vyšším zvířatům, a to v rozmanitých strukturách. U savců se jedná o gangliosidy, kdy GSL obsahuje ještě kyselinu sialovou. Gangliosidy jsou hlavními kyselými GSL v centrálním nervovém systému a hrají roli v nervových funkcích, buněčné adhezi, proliferaci a transdukci signálu. (Itonori, 2007)

Sfingolipidy

Sfingolipidy jsou složeny ze sfingoidní základní kostry, ke které může být připojena MK prostřednictvím amidové vazby a hlavní skupina pomocí primárního hydroxyly. Hlavní skupiny se pohybují od vodíku po složitější druhy jako je fosfocholinová skupina sfingomyelinu a jednoduché až komplexní glykany GSL. (Merrill, 2008)

Sfingolipidy fungují jako strukturální složky membrán, lipoproteinů, kůže i např. jako modulatory a mediatory buněčné signalizace. Sfingolipidy mají tendenci se spojovat navzájem i s cholesterolem a určitými kategoriemi proteinů, jako jsou ty připojené k membráně prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Agregáty jsou geneticky označovány jako rafty. Rafty jsou malé, odlišné a kapalinou uspořádané subdomény plazmatické membrány, které se tvoří a rychle dispergují díky vysoce nasyceným alkylovým řetězcům a intermolekulárním vodíkovým můstkům sfingolipidů. (Merrill, 2008)

1.2 Metabolismus lipidů

1.2.1 Trávení lipidů

Dezintegrace potravy zahrnuje tři fáze: orální zpracování, žaludeční trávení a střevní trávení. Proces trávení začíná v dutině ústní s prvním soustem. Následuje jeho žvýkání a rozmělnění. Takto připravená potrava je transportována spolknutím přes hltan, jícen až do žaludku k dalšímu zpracování. (Liu, 2019)

Ústa

V ústech na lipidy začínají působit lingvální lipázy, které jsou vylučovány slinnými žlázami. Přítomnost lipidů v ústech stimuluje dále jejich trávení a vstřebávání (Meynier, 2017)

Žaludek

Působením intenzivních peristaltických vln v *antru* při vstupu do žaludku se vyvolá promíchání potravy se žaludečními šťávami. Přítomnost povrchově aktivních sloučenin dále usnadňuje emulgaci lipidů. Adsorpce žaludeční lipázy na rozhraní olej-voda lipidových kapiček iniciuje hydrolyzu TAG, za vzniku především DAG a neesterifikovaných MK. Lidská žaludeční lipáza je spolu s pepsinogenem v hlavních buňkách proximálního žaludku a rychlost její sekrece závisí na typu a množství přijímané potravy. (Acevedo-Fani, 2022)

Žaludeční lipáza je stabilní při hodnotách pH 2 až 7, s maximální lipolytickou aktivitou při pH 5-5,4. Přednostně hydrolyzuje TAG v poloze 3, což vede k tvorbě 1,2-DAG. Lipolýza TAG obsahujících MK se středně dlouhým řetězcem je považována za účinnější než lipolýza TAG obsahujících MK s dlouhým řetězcem, protože aktivita žaludeční lipázy je inhibována akumulací MK s dlouhým řetězcem na rozhraní lipid-voda. Aktivní místo žaludeční lipázy se skládá z katalytické triády serinových, histidinových a aspartátových zbytků, které se běžně vyskytují v serinových proteázách a jiných lipázách. (Acevedo-Fani, 2022)

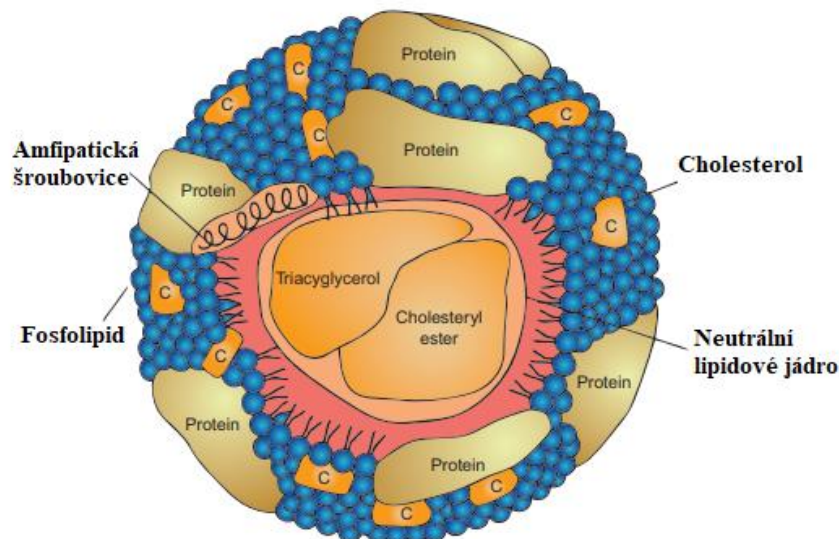
Střevo

Po vstupu do tenkého střeva jsou lipidy v potravě dále emulgovány žlučovými kyselinami, které výrazně zesilují lipolýzu pankreatickou lipázou na rozhraní lipid-voda.

Hydrolýza TAG pankreatickou lipázou poskytuje 2-MAG a MK pro střevní absorpci enterocyty. Ester cholesterolu (ECH) je hydrolyzován karboxylesterhydrolázou (cholesterolesterázou) za uvolnění volného cholesterolu a MK. Volný cholesterol je zabudován do micel, které jsou primárně složeny ze žlučových kyselin a menšího množství PL, MK a 2-MAG. Tyto micely jsou transportovány přes střevní lumen ke kartáčovému lemu enterocyty, kde dochází k vychytávání cholesterolu, MK a 2-MAG. Dietní a žlučové PL jsou primárně štěpeny pankreatickou fosfolipázou A2, produkující lysofosfolipidy a VMK. Inhibice aktivity lipázy nebo snížení přísunu žlučových kyselin vede ke snížení luminální absorpce lipidů. (Ko, 2020)

Potom, co enterocyty vychytají štěpné produkty lipidů, dojde k jejich reesterifikaci dobře koordinovanou skupinou proteinů a zpětnému sestavení do TAG, ECH a PL. Střevní lipidy jsou pak zabaleny do pre-chylomikronů s apolipoproteinem (apo) B48 nebo uloženy jako intracelulární lipidové kapičky. Mikrosomální triglyceridový transferový protein zprostředkovává balení lipidů do pre-chylomikronů, které jsou transportovány z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu ke zrání přes pre-chylomikronové transportní vezikuly. Zralé chylomikrony jsou pak vylučovány exocytózou a transportovány lymfatickým systémem. (Ko, 2020)

1.2.2 Lipoproteinový transport



Obrázek 1 Lipoproteinová částice, převzato a upraveno z: Bhagavan, 2015

Lipoproteiny (viz. **Obrázek 1**) jsou skupinou komplexních částic tvořených z amfipatických apo, které nesou širokou škálu lipidů, a proto mají důležité fyziologické funkce při jejich transportu. Základní strukturou je obal tvořený vrstvou PL a volného cholesterolu

obklopující jádro z cholesterylesterů a TAG s jedním nebo více proteiny spojenými s povrchovými PL a částečně zapuštěnými do hydrofobního lipidového jádra. (Afonso, 2019)

Úlohou proteinů je tedy solubilizovat a stabilizovat lipoprotein ve vodném prostředí jako je krevní plazma, která je hlavním místem působení lipoproteinů. Ty jsou klasifikovány podle jejich velikosti a hustoty, která je určena poměrem proteinu k lipidu, a proto závisí na složení lipidů a apo. Lipoproteiny se dělí na chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL a lipoprotein (a) (Lp(a)). (Afonso, 2019)

Chylomikrony

Dietní tuky absorbované ve střevě jsou zabaleny do velkých chylomikronů bohatých na TAG, které jsou dodávány krevním řečištěm do míst metabolismu nebo skladování lipidů. Tyto lipoproteiny interagují s lipoproteinovou lipázou a podléhají lipolýze, a tím dochází ke vzniku chylomikronových zbytků. Hlavními místy aktivity lipoproteinové lipázy jsou tuková tkáň, kosterní svalstvo, mléčná žláza a myokard. Zde se MK z TAG používají pro skladování, oxidaci nebo sekreci zpět do oběhu. Částice ochuzené o TAG, chylomikronové zbytky, vychytávají apoE a cholesterylester z HDL a jsou rychle přijímány játry prostřednictvím procesu zprostředkovaného apoE receptorem. (Ordovas, 2013)

Hlavní strukturální protein chylomikronů je apoB48. ApoB48 je protein, který je produkován z apoB100 unikátním editačním procesem používaným ve střevních buňkách, který vytváří protein, jehož délka je 48 % délky apoB100. Obsahují také další apo jako jsou apoC a apoA. Tyto proteiny se mohou redistribuovat do jiných tříd lipoproteinů v séru, protože chylomikrony přenášejí svůj obsah lipidů do buněk a interagujících lipoproteinů. Chylomikrony mají nejnižší hustotu ze všech lipoproteinů. Při ponechání vzorku plazmy přes noc v lednici, tak vyplavou na povrch a vytvoří krémovou vrstvu. (Freeman, 2016)

VLDL

VLDL také obsahují povrchový protein apoB100, ale na rozdíl od chylomikronů, které jsou syntetizovány ve střevě jsou VLDL částice primárně sestaveny v játrech. Funkční úlohou VLDL částic je dodávat TAG do periferní tkáně. TAG tvoří asi 48 % hmotnosti VLDL částice. Na periférii působí na VLDL lipoproteinová lipáza a uvolňuje z něj TAG do tukové tkáně pro ukládání tuku nebo do svalové tkáně, kde mohou být využity pro energii. Zbytky VLDL zbavené TAG a obohacené o cholesterylestery mohou být v játrech recyklovány interakcí apoB se specifickým LDL receptorem. Další remodelace zbytků VLDL produkuje částice obohacené o cholesterylester, a to nejdříve IDL a poté LDL. (Sikorski, 2007)

IDL

IDL se tvoří jako mezistupeň v normálním metabolismu VLDL. Jsou rychle katabolizovány, a proto je koncentrace v plazmě obvykle velmi nízká. IDL jsou buď přímo vychytávány játry prostřednictvím vazby povrchového apoE, který je přítomný na IDL na apoE nebo apoB100/apoE receptory, nebo jsou konvertovány na LDL. (Reckless, 2003)

LDL

LDL jsou zodpovědné za dodávání cholesterolu do tkání používaného pro syntézu a opravu buněčné membrány a za procesy, jako je syntéza steroidních hormonů a vitamínu D. Vstup do buněk probíhá buď nespecifickým způsobem závislým na koncentraci nebo regulovanou cestou zprostředkovanou receptorem LDL. LDL se váže na specifickou LDL apoB100/apoE receptory na buněčných membránách a komplexy LDL-receptor jsou internalizovány a podléhají lysozomální degradaci. ECH je hydrolyzován na volný cholesterol, zatímco většina LDL receptorů je recyklována. Nejvyšší koncentrace receptorů se nachází v játrech. LDL nejsou homogenní a mohou být rozdělené na základě velikosti a hustoty na LDL₁, LDL₂ a LDL₃. Největší a nejméně hustý je LDL₁, který je zároveň lepší substrát pro LDL receptor a také méně podléhá oxidaci. Nadbytek LDL₃ je spojen s vyšším rizikem vzniku ICHS. (Reckless, 2003)

HDL

HDL hraje důležitou roli v reverzním transportu cholesterolu. Během reverzního transportu se transportuje cholesterol periferních buněk do jater, což je důležitý krok, který buňky zbavuje zátěže cholesterolu. Prekurzorové částice HDL jsou vylučovány jako diskovité struktury játry a střevem a mohou absorbovat volný cholesterol z buněčných membrán. Jedná se o proces, který je zprostředkován adenosintrifosfátem (ATP) kazetovým transportérem 1, apoAI a apoA-IV. Hlavním apo HDL je apoAI a aktivuje enzym lecitin-cholesterolacyltransferázu (LCAT), který esterifikuje přijatý volný cholesterol, aby umožnil účinnější balení cholesterolu pro transport. Reverzní transport je zajišťován 3 různými cestami. První cestou je, že velké HDL částice s více kopiemi apoE mohou být vychytávány játry prostřednictvím LDL receptoru. Druhá cesta spočívá v selektivním vychytávání nahromaděných ECH z HDL v játrech pomocí receptoru B1. Tento receptor se nachází primárně v játrech a neplacentárních steroidních tkáních. Poslední třetí cesta spočívá v přenosu ECH z HDL na lipoproteiny bohaté na TAG. Poruchy koncentrací apo, funkce enzymů, transportních proteinů, receptorů, dalších proteinů a clearance z plazmy mohou mít zásadní vliv na antiaterogenní vlastnosti HDL. (Kwan, 2007)

Lipoprotein(a)

Nejpolymorfnější z lipoproteinů je Lp(a). Lp(a) je hybridní lipoprotein složený z částice podobné LDL obsahující jednu molekulu apo apoB100 kovalentně navázanou na apo(a), glykoprotein charakterizovaný opakováním neobvyklé struktury nazývané „*kringle*“, která připomíná skandinávské pečivo. Lp(a) se skládá nejen z apoB a apo(a), ale také z hmotnosti sacharidů na apo(a), stejně tak z cholesterolu, ECH a PL. Hladiny Lp(a) jsou významně ovlivněny věkem, pohlavím nebo životním stylem. (Ruscica, 2021)

1.2.3 Lipolýza

Lipolýza se dělí na gastrointestinální, vaskulární a intracelulární. Prvním typem je gastrointestinální lipolýza, která zprostředkovává katabolismus tuků z potravy. Dalším typem je vaskulární lipolýza, která je zodpovědná za hydrolýzu TAG spojených s lipoproteinem v krvi. Poslední typ je intracelulární lipolýza, která katalyzuje rozklad TAG uložených v intracelulárních lipidových kapičkách pro následný export MK. Hlavními lipolytickými enzymy gastrointestinálního traktu jsou lingvální lipáza, žaludeční lipáza, pankreatická lipáza a proteiny související s pankreatickou lipázou. Cévní hydrolýza TAG závisí na lipoproteinové lipáze a jaterní lipáze. Pankreatické a vaskulární lipázy jsou strukturně příbuzné. Intracelulární lipolýza TAG zahrnuje neutrální a kyselé lipázy přítomné v lysozomech. Mezi dobře charakterizované neutrální TAG hydrolázy patří adipózní triglyceridová lipáza a HSL. Nejdůležitější lysozomální hydroláza je lysozomální kyselá lipáza. (Zechner, 2012)

Hydrolýza TAG na MK a glycerol vyžaduje tři po sobě jdoucí kroky s třemi různými enzymy. Počáteční krok je převod TAG na DAG, který je katalyzován adipózní triglyceridovou lipázou. Druhý krok je hydrolýza DAG na MAG pomocí HSL. Poslední krok je katalyzován MAG lipázou. (Zechner, 2012)

TAG jsou hlavní energetickou rezervou savců a jsou uloženy v bílé tukové tkáni. Ukládají se a syntetizují v cytosolových lipidových kapičkách v době přebytku energie. Tyto lipidové kapičky mají jádro složeno z TAG a ECH, které je obklopeno monovrstvou PL. Fosfolipidová vrstva je potažena proteiny. TAG jsou z těchto lipidových kapiček mobilizovány prostřednictvím lipolýzy v době energetické potřeby k vytvoření MK. Lipolýza slouží k zajištění MK jako zdroje energie pro jiné orgány a je jedinečnou funkcí adipocytů. (Ahmadian, 2010)

V době nedostatku energie jsou TAG hydrolyzovány na MK a glycerol lipolýzou. Vzniklé MK mohou vstoupit do oběhu a být vychytávány jinými orgány pro β -oxidaci

a následnou tvorbu ATP. Kromě toho mohou uvolněné MK a glycerol také sloužit jako substráty v játrech pro ketogenezi a glukoneogenezi. (Ahmadian, 2010)

1.2.4 Oxidace mastných kyselin

Příjem a aktivace mastných kyselin

Přijímání MK do buněk je usnadňováno specifickými proteiny jako je CD36 a protein plazmatické membrány vázající mastné kyseliny. V cytosolu jsou MK aktivovány na estery acyl-koenzymu A (CoA) acyl-CoA syntázami a poté směřovány do různých metabolických drah např. syntéza lipidů a β -oxidace. Pro β -oxidaci je důležitý import acyl-CoA do mitochondrií, ale mitochondriální membrána je pro něj nepropustná. (Houten, 2016)

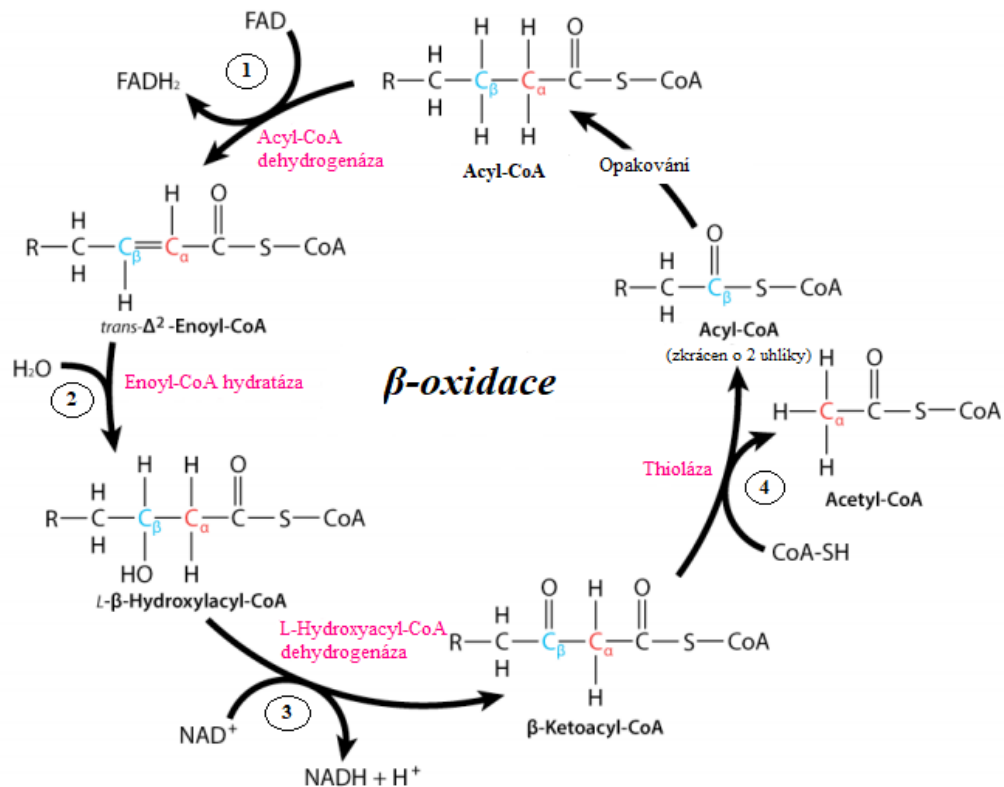
Karnitinový cyklus

Mitochondriální membrána je nepropustná pro acyl-CoA a MK musí být konjugovány s karnitinem pro vstup do mitochondrií. Karnitin je akumulován uvnitř buňky prostřednictvím vysoce afinitního přenašeče karnitinu OCTN2 v srdci, svalech a ledvinách. Karnitin tvoří vysokoenergetickou esterovou vazbu s MK, které mají dlouhý řetězec, působením karnitin-palmitoyl transferázy (CPT) 1. CPT 1 je umístěná ve vnitřní části vnější mitochondriální membrány a jejím působením vznikají acylkarnitiny. Palmitoyl transferáz existuje více izoform: CPT-1, CPT-1A, CPT-1B, CPT-1C. Jaterní CPT-1 je exprimována v játrech, mozku, ledvinách a např. v plicích. Acylkarnitiny jsou poté translokovány přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí acylkarnitin translokázy. Jakmile je CPT-2 ve vnitřní mitochondriální membráně odstraní se karnitin z acylkarnitinů a znovu generuje acyl-CoA. Karnitin se následně vrací do cytoplazmy pro další cyklus a acyl-CoA vstupuje do β -oxidace. (Longo, 2016)

β -oxidace

Mastné acyl-CoA v mitochondriální matrici jsou substráty pro β -oxidaci. Tento cyklický proces se skládá ze čtyř reakcí (viz. **Obrázek 2**), při kterých se zkracuje acylový řetězec mastného acyl-CoA o dva atomy uhlíku najednou a produkuje acetyl-CoA. První krok reakce je odstranění dvou vodíků z atomů uhlíku 2 a 3 acyl-CoA za vzniku odpovídajícího *2-trans-enoyl-CoA*. Vodíky jsou zpočátku přijímány flavinadeninukleotidem (FAD) kofaktorem acyl-CoA dehydrogenázy. Acyl-CoA dehydrogenáza je enzym, který tuto reakci katalyzuje. Následně jsou vodíky převedeny do FAD enzymu rozpustné matrice zvané flavoprotein za současného přenosu elektronů. Nakonec jsou přiváděny do mitochondriálního elektronového transportního řetězce, který dodává energii pro tvorbu ATP oxidativní fosforylací. (Schulz, 2013)

Při druhé β -oxidaci se přidá voda přes dvojnou vazbu 2-*trans*-enoyl-CoA pomocí enoyl-CoA hydratázy za vzniku L- β -hydroxyacyl-CoA. Třetí reakcí je dehydrogenace L- β -hydroxyacyl-CoA závislá na nikotinamidadeninukleotidu (NAD) katalyzovaná L-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou. Produkt této reakce β -ketoacyl-CoA je substrátem čtvrté a poslední reakce β -oxidace katalyzované thiolázou, která štěpí sloučeninu v přítomnosti CoA mezi uhlíky 2 a 3 za vzniku acyl-CoA zkráceného o dva atomy uhlíku a acetyl-CoA. Opakované cykly β -oxidace vedou k úplné degradaci MK na acetyl-CoA. (Schulz, 2013)



Obrázek 2 β -oxidace, převzato a upraveno z: Ahern, 2021

1.2.5 Syntéza mastných kyselin

Syntéza MK je přesným opakem β -oxidace, kdy β -oxidace probíhá v matrix mitochondrií a syntéza MK v cytoplasmě. Využívá nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) jako redukční činidlo, acylový nosný protein místo koenzymu A a multienzymový komplex tzv. syntázu mastných kyselin (FAS). FAS vykonává sedm různých funkčních aktivit v jediném polypeptidovém řetězci. (Gyamfi, 2019)

Během syntézy MK dodává acetyl-CoA atomy uhlíku a ATP a NADPH poskytují potřebnou energii a redukční ekvivalenty. Acetyl-CoA, který vzniká odbouráváním glukózy, aminokyselin nebo ketolátek, není schopen projít skrz vnitřní membránu mitochondrie do cytosolu. Kvůli tomu dochází ke kondenzaci s oxalacetátem za přítomnosti enzymu citrát

syntázy za vzniku citrátu. Citrát se může pohybovat přes vnitřní membránu mitochondrie do cytosolu buď pomocí citrátového/fosfátového antiportu nebo citrátového/malátového antiportu. Když je citrát v cytosolu, tak je štěpen ATP citrátlyázou na acetyl-CoA a oxalacetát. Poté je cytosolový acetyl-CoA přeměněn na malonyl-CoA prostřednictvím karboxylační reakce katalyzované acetyl-CoA karboxylázou. Vytvořený malonyl-CoA se používá k syntéze řetězce MK za katalýzy FAS zahrnující opakovanou kondenzaci 2 uhlíkových jednotek, které jsou odvozené z malonyl-CoA. Každý průchod cyklem vede k prodloužení mastného acylového řetězce o dva uhlíky až po C16 tedy palmitát, který je konečným produktem. (Clarke, 2013)

Syntéza MK začíná od methylového konce a pokračuje směrem ke karboxylovému konci. Jako první se tedy přidávají C16 a C15 a jako poslední C2 a C1. Pro syntézu palmitátu z acetyl-CoA je např. zapotřebí 14 NADPH a 7 ATP. MK, delší než kyselina palmitová, jsou produkovány enzymy pro prodlužování řetězce MK, které se nazývají elongázy. Tyto elongázy prodlužují palmitát za vzniku mnoha dalších MK. Elongázy se nacházejí v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu a obvykle působí přes karboxy konec. Dvouuhlíkové jednotky jsou odebírány z malonyl-CoA, který je donor uhlíkových jednotek a předávány na vznikající MK. Tato reakce zahrnuje v podstatě stejné enzymatické kroky jako provádí FAS. (Gyamfi, 2019)

Malonyl-CoA hraje klíčovou roli v energetickém metabolismu. Maximální rychlost *de novo* syntézy MK určuje cytosolová koncentrace malonyl-CoA, který je substrátem pro FAS. Jako inhibitor CPT řídí malonyl-CoA rychlost vstupu MK do mitochondrií a je tedy klíčovým determinantem rychlosti oxidace MK. Stav, který vedou k vysokým hladinám malonyl-CoA jako je např. vysoký příjem sacharidů, potlačují vstup MK do mitochondrií a zvyšují jejich tok k TAG. Naopak podmínky vedoucí k nízkým koncentracím malonyl-CoA podporují oxidaci MK, protože se uvolňuje CPT. (Clarke, 2013)

1.2.6 Syntéza triacylglycerolů

TAG jsou primární jednotkou ukládání energie v eukaryotických buňkách. TAG tvoří více než 90 % obsahu bílých adipocytů. Syntéza TAG je nezbytná v enterocytech pro absorpci lipidů z potravy a v hepatocytech pro syntézu a transport VLDL. (Coleman, 2011)

Biosyntéza TAG začíná sekvenční acylací glycerol-3-fosfátu pomocí acyl-CoA thioestery s dlouhým řetězcem. Počáteční krok je katalyzován 1-glycerol-3-fosfát acyltransferázou za vzniku kyseliny lysofosfatidové (LPA). Z druhé acylace v poloze sn-2 LPA acyl-CoA za přítomnosti enzymu acylglycerol-3-fosfátacyltransferázy vzniká kyselina

fosfatidová (PA). PA je hydrolyzována PA fosfatázou za vzniku DAG. Při konečném esterifikačním kroku DAG pomocí acyltransferázy vznikají TAG. (Coleman, 2011)

1.3 Chromatografie

Chromatografie je jednou z nejdůležitějších analytických technik. Umožňuje separaci a následně kvalitativní a kvantitativní analýzu komplexních směsí, pokud jsou vzorky těkavé nebo rozpustné ve vhodném rozpouštědle. Chromatografie je založena na rozdělení složek vzorku mezi dvě fáze, jednu stacionární a jednu mobilní. Rozlišujeme více typů chromatografií např. plynovou, kapalinovou a superkritickou kapalinovou chromatografii. Chromatografie je všestranná a může být vysoce účinná. (Meyer, 2005)

K chromatografické separaci jsou zapotřebí dvě fáze mobilní a stacionární. Stacionární fáze (SF) může být pevná nebo kapalná, mobilní fáze (MF) je kapalina, plyn nebo nadkritická tekutina. Obě fáze musí být schopny fyzikálně nebo chemicky interagovat s molekulami vzorku, ale ne mezi sebou. Když MF protéká stacionární fází nebo přes ni, analyty ve směsi vzorku procházejí charakteristickým rozdělením mezi dvě fáze. MF transportuje, stacionární zůstává. (Meyer, 2005)

1.3.1 Kapalinová chromatografie

Proces v kapalinové chromatografii (LC) je výsledkem mnohočetných interakcí mezi analytem, SF a MF. Podle fyzikálního stavu SF se LC dělí na chromatografii rozdělovací (LLC) a chromatografii adsorpční (LSC). Obě metody lze využít v režimu normální i reverzní fáze. Všechny metody jsou prováděny konvenční kolonovou chromatografií, moderní kolonovou chromatografií označovanou jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) a planární chromatografií na tenké vrstvě. (Nesterenko, 2018)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je chromatografická technika, která se používá k separaci, identifikaci a kvantifikaci složek směsí, k separaci chemických sloučenin nebo k identifikaci složek biologického vzorku. MF se nejčastěji skládá ze dvou rozpouštědel různých polarit, které se používají v gradientu. SF je běžně pevné kolonové pouzdro o délce několika centimetrů, které obsahuje nosné částice oxidu křemičitého a na nich imobilizovanou navázanou látku, která ovlivňuje separaci složek analytu na základě jejich relativních polarit. Rozdílné sloučeniny v různé míře interagují se SF, což znamená, že polarita směsi rozpouštědel potřebná k jejich odstranění z kolony (doba retence) může být použita jako charakteristický identifikátor sloučeniny za stejných podmínek. (Blum, 2014)

Při chromatografii na normální fázi se často používá nemodifikovaný oxid křemičitý spolu s gradientem pohybujícím se od nepolárních k polárním rozpouštědlům. Polárnější složky analytu se adsorbují silněji na SF, a proto vyžadují polárnější MF k jejich vytěsnění a eluci z kolony. Naopak nepolární složky mají slabou afinitu ke SF, a proto eluují v kratším retenčním čase. Chromatografie na reverzní fázi využívá např. 8-uhlíkové nebo 18-uhlíkové řetězce vázané na oxid křemičitý a gradient pohybující se od polárního až po nepolární rozpouštědlo. Lipofilnější složky analytu se snadněji adsorbují a jsou eluovány z kolony, když se polarita rozpouštědla sníží. (Blum, 2014)

Při HPLC na normální fázi se tedy používá polární stacionární fáze jako je oxid křemičitý a nepolární mobilní fáze např. hexan, chloroform nebo diethylether. Více polární látky ze vzorku jsou na koloně zadržovány déle než látky méně polární. V případě HPLC na reverzní fázi je SF nepolární jako je C8 nebo C18, zatímco MF je polární kapalina např. směsi vody, methanolu a acetonitrilu. Princip reakce je založen na hydrofobních interakcích, takže platí, že čím více nepolární materiál, tím více je na koloně zadržován. Téměř 90 % všech reakcí se provádí v režimu reverzní HPLC. (Sankar, 2019)

Možnost měnit MF během analýzy se nazývá gradientová chromatografie. Někdy je žádoucí začít s relativně nepolární MF a pak postupně zvyšovat její polaritu přidáváním dalšího a dalšího polárního rozpouštědla. Toho lze dosáhnout snadno pomocí dvou nebo více rozpouštědel a dvou nebo více čerpadel. Počítač řídí množství každého rozpouštědla a tím mění polaritu mobilní fáze během analýzy. Gradientní chromatografie se používá, když analyt obsahuje složky s různou polaritou. Jeho použití může pomoci oddělit podobné látky s nízkou hmotností při zachování přiměřené doby experimentu. Pokud se složení MF nemění během HPLC jedná se o izokratickou chromatografii. Protože MF jsou kapaliny, tak se analýzy běžně provádí při pokojové teplotě, aby nedošlo k nárůstu tlaku, když se kapaliny blíží k bodu varu. (Houck, 2015)

Detektory

Detektory v HPLC musí umět detekovat kapalně vzorky. Pokud není přítomna žádná složka analytu, MF protéká detektorem sama. Pokud je složka analytu přítomna, tak dochází ke změně vlastností MF. Tyto změny se projeví jako změny koncentrace látek v MF, které jsou měřeny detektory. Nejpoužívanějším detektorem pro HPLC je spektrofotometr detekující ultrafialové/viditelné světlo (UV/VIS), protože většina sloučenin absorbuje v UV/VIS oblasti. Většina MF není aktivní ve vybraném UV nebo VIS spektrálním rozsahu, takže na ni detektor nereaguje. Speciální typ tohoto detektoru se nazývá detektor diodového pole (DAD), který může měřit současně všechny vlnové délky UV a VIS absorbance analytu, takže existuje mnoho

způsobů, jak můžeme data prezentovat. Lze vynést závislost retenčního času proti absorbanci, což je klasický 2D chromatogram. Nebo lze vytvořit závislost absorbance ku retenčnímu času a ku vlnové délce a vytvořit tak 3D chromatogram. 3D chromatogram představuje mnohem více informací než jednoduchý 2D chromatogram. (Houck, 2015)

Využití kapalinové chromatografie

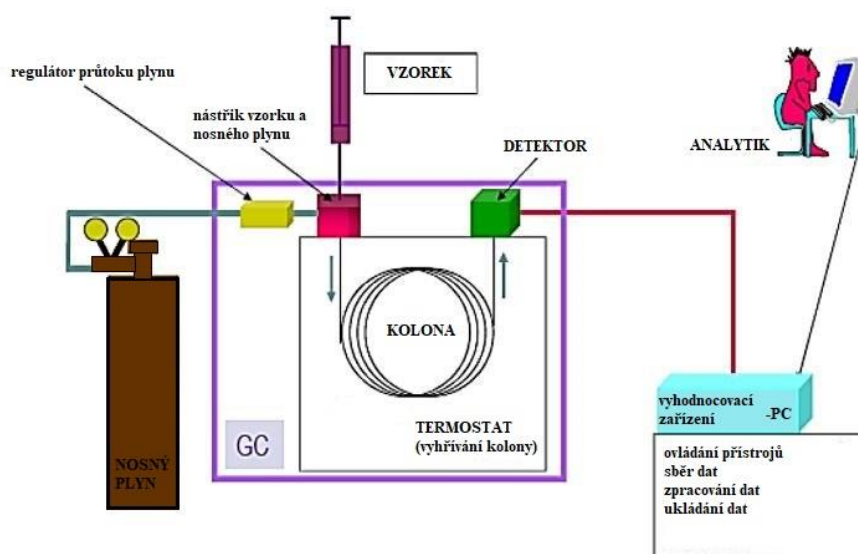
LC, konkrétně HPLC má mnoho využití. Ve farmacii je to třeba kontrola kvality léčiv, identifikace padělaných léčivých přípravků nebo stanovení doby použitelnosti farmaceutických výrobků. U analýz environmentálního prostředí se používá např. při detekci fenolů v pitné vodě, hodnocení toxicity TNT v sedimentu, identifikace difenylhydraminu ve vzorcích a další. Ve forenzním odvětví se HPLC využívá pro identifikaci anabolických steroidů v séru, moči, potu a vlasech. Dále se využívá při analýzách textilních barviv a mobilní HPLC přístroj se používá na tanečních zábavách pro identifikaci a kvantifikaci tanečních drog. Využití HPLC je také při analýzách potravin, kdy se využívá např. při analýzách cukru v ovocných šťávách, polycyklických aromatických uhlovodíků v zelenině a ovoci nebo např. při stopové analýze vojenských trhavin v zemědělských plodinách. (Kumar, 2018)

Využití kapalinové chromatografie při identifikaci lipidů

Použití HPLC je dobře známý přístup v oblasti lipidomiky pro rutinní analýzu komplexních lipidových směsí, sestávajících buď z normální fáze nebo LC na reverzní fázi. První typ odděluje lipidy na základě jejich polární funkční skupiny, zatímco druhý rozlišuje lipidové druhy na základě jejich lipofilního složení. V současné době je zájem o použití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), která umožňuje separaci tříd lipidů na základě složení hlavních skupin. Na rozdíl od separace lipidů v HILIC se HPLC na reverzní fázi řídí interakcí mezi hydrofobní SF a hydrofobních mastných acylových řetězců. To umožňuje separaci lipidů v rámci třídy nebo diferenciaci lipidů na základě délky jejich uhlíkové řetězce a stupně nasycenosti. Existuje mnoho nepolárních SF, které se využívají v analýze lipidů. Nejvyužívanějšími SF jsou však fáze s oktadecylsilanovými skupinami (C18). (Pham, 2019)

1.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je unikátní a všestranná analytická technika používaná k identifikaci látek. V počátečních fázích vývoje byla aplikována na analýzu plynů a pár z velmi těkavých složek. Základní princip GC spočívá v tom, že čím vyšší je afinita sloučeniny ke SF, tím víc bude sloučenina zadržována kolonou a tím déle bude trvat, než bude eluována a detekována. Hlavní částí GC (viz. **Obrázek 3**) je tedy kolona, ve které dochází k separaci složky, a k tomu je třeba přidat zdroj a řízení průtoku nosného plynu kolonou, prostředek zavádění vzorku a prostředek pro detekci složek, když se eluují z konce kolony. (Wedad, 2017)



Obrázek 3 Schéma GC, převzato a upraveno z: Obeidat, 2021

Mobilní fáze

Jako nosný plyn (MF) se v GC používají dusík, helium nebo vodík. Vysoká čistota použitých plynů je nezbytná, protože stopy nečistot jako je kyslík nebo voda mohou reagovat s rozpuštěnými látkami a narušit tím SF nebo odezvu detektoru. Pro dosažení rychlejší separace se doporučuje použití helia, ale jako levnější alternativa se používá dusík. Vodík také poskytuje velmi rychlé separace, ale je škodlivý a jeho použití jako MF vyžaduje zvláštní péči. Volba nosného plynu závisí na použitém detektoru. (Ruiz-Matute, 2018)

Stacionární fáze

SF v GC může být pevná látka a kapalina, což vede ke dvěma chromatografickým režimům. První je plynová adsorpční chromatografie (GSC) a druhá plynová rozdělovací chromatografie (GLC). První režim je zvláště užitečný pro měření fyzikálních parametrů a pro analýzu určitých sloučenin jako jsou např. permanentní plyny nebo velmi polární malé molekuly. Analytické separace organických látek jsou prováděny především v režimu GLC. Kapalná fáze jsou obvykle polymerní molekuly s dostatečnou stabilitou a viskozitou, aby stály

na koloně při teplotě analýzy a byly schopné rychle rozpouštět rozpouštěné látky. Tyto polymery jsou často zesíťovány, aby se zlepšila fázová stabilita a prodloužila se životnost kolony. (Ruiz-Matute, 2018)

Kolony v GC

Za nejdůležitější část GC jsou považovány chromatografické kolony, které jsou zodpovědné za separační proces. Používají se dva typy kolon, a to náplňová a kapilární. Protože první komerční přístroje akceptovaly pouze náplňové kolony, byly první studie prováděny pouze na nich. Náplňové kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli a mají vnější průměr 0,64 nebo 0,32 cm a jsou dlouhé 0,61-3,05 m. Pro jejich výrobu mohou být použity také inertní materiály jako je sklo, nikl, teflon a ocel. Nikl, teflon a ocel se dále mohou potahovat sklem nebo teflonem. Výplň je tvořena inertním nosičem, na kterém je impregnovaná SF. Pevný nosič zadržuje kapalnou SF a měl by mít velký povrch, být chemicky inertní, mít nízkou sorpční aktivitu vůči běžným analytům a mít dobrou mechanickou pevnost, aby se zabránilo lámání potažených částic během plnění a manipulace s kolonou. Povrch nosiče křemeliny má mnoho aktivních míst vytvořených z volných hydroxylových skupin, které tvoří nežádoucí vodíkové vazby s molekulami polárních rozpuštěných látek a způsobují ochlazení píků. I ten nejinertnější materiál musí být promyt kyselinou a silanizován, aby byl více inertní. Některé typické deaktivované nosiče jsou např. Supelcoport, Chromosorb W-HP a Gas Chrom Q II. Nevýhodou deaktivace je, že tyto nosiče se stávají více hydrofobními a jejich potahování polární stacionární kapalinou může být obtížné. (Pino, 2015)

Kapilární kolony nabízejí významné zvýšení separační kapacity ve srovnání s náplňovými kolonami. Proto se využívají k separaci komplexních směsí sloučenin, které jsou úzce příbuzné, jak chemicky, tak fyziologicky. (Kataoka, 2014) Kapilární chromatografické kolony nejsou plněny výplňovým materiálem jako kolony náplňové, místo toho je vnitřní stěna potažena tenkým filmem nebo kapalnou fází. Vzhledem k tomu, že trubice je otevřená, její odpor vůči proudění je velmi nízký, a proto se nazývá otevřená trubková kolona. (Pino, 2015) Typické rozměry kapilárních kolon jsou vnitřní průměr 0,05-0,53 mm a délka 10-50 m. Kapilární kolony z taveného oxidu křemičitého jsou pevné a flexibilní, mají větší povrch, který zlepšuje jejich výkon. Existují tři různé typy kapilárních kolon, a to kapilární kolona s kapalnou stacionární fází tvořící tenký film (WCOT), otevřená kapilární kolona s vrstvou nosiče se zakotvenou kapalinou (SCOT) a otevřená trubková kolona s tenkou vrstvičkou porézního materiálu (PLOT). (Kataoka, 2014)

Oblíbené jsou WCOT kolony díky jejich vysoké separační účinnosti a jsou známé jako kapilární GC kolony kvůli jejich všudypřítomnosti. Jsou obvykle vyrobeny z taveného oxidu

křemičitého a jsou extrémně odolné, pokud je aplikován vnější povlak z polyamidového polymeru. Přibližný rozsah provozních teplot u GC kolon z taveného oxidu křemičitého je 60-350 °C v závislosti na typu SF. (Shellie, 2013) Jsou dlouhé typicky až 100 m s vnitřními průměry kapilárních rozměrů potaženými tenkým a obvykle imobilizovaným filmem SF opouštějícím otevřený vnitřní průchod středem kolony. Jedná se o kolony, které dominují spolu s náplňovými kolonami v GLC. (Poole, 2013)

Otevřené trubkové kolony s porézní vrstvou a náplňové kolony dominují v GSC. Jsou totožné s WCOT, ale kapalná fáze je nahrazena vrstvou jemných adsorpčních částic. WCOT a PLOT jsou první volbou pro analytické separace, protože mají vynikající kapacitu a chemickou inertnost. (Poole, 2013) PLOT obsahují porézní vrstvu pevného adsorbentu jako je oxid hlinitý, molekulární síta nebo Porapak. Jsou vhodné pro analýzu světla, netěkavých plynů a dalších těkavých sloučenin. (Pino, 2015)

SCOT jsou kapilární kolony obsahující kapalnou fázi, kterou je potažen povrch vrstvy velmi jemného pevného nosného materiálu. Tyto kolony mohou pojmout více kapalné fáze a mají vyšší kapacitu vzorku než WCOT. Se zavedením zesíťovacích technik bylo možné použití stabilních tlustých vrstev v kolonách WCOT a tím se staly kolony SCOT nadbytečnými. (Pino, 2015)

Zavádění vzorku

Zavedení vzorku v GC je zásadní. Vzorek musí být zaveden do hlavy kolony jako úzký pás, jinak se sníží rozlišení. Složení injektované zátky by mělo být skutečně reprezentativní pro původní směs, aby nedošlo k ovlivnění kvality kvantitativních výsledků. Existuje řada injektorů, které umožňují zavedení široké škály vzorků. Správná volba injekčního režimu a správná technika mají zásadní význam pro získání vysoce kvalitních výsledků GC analýzy. (Shellie, 2013)

Split/splitless metoda

Nejběžnější injekční technikou je vstřikování kapaliny přes samotěsnící přepážku do vyhřívaného split/splitless injekčního portu. Kapalný roztok vzorku se odpařuje ve vyhřívaném portu. Pro dělené vstřikování vstupuje do kolony pouze malá část páry a zbytek je odváděn do odpadu. Dělené vstřikování by se mělo používat pro koncentrované kapalně vzorky a používá se také pro analýzu plynů a headspace. Průtok až k bodu rozdělení je vysoký, takže vstřikovací port se rychle vyprázdí. Primární výhodou děleného vstřikování je to, že se do kapilární GC kolony zavádějí úzké vstřikovací pásy. Dělené vstřikování je ideální pro separace s vysokým rozlišením a rychlou GC. Většina vzorku se odvádí do odpadu, proto není

vhodné využívat dělenou injekci ke stopové analýze. Rozdělení někdy způsobí diskriminaci vysokomolekulárních rozpuštěných látek ve vzorku, takže vzorek vstupující do kolony nemusí být reprezentativní pro vzorek vstříkovaný. (Shellie, 2013)

Přímé vstříkování

Přímé vstříkování se používá u kapilárních kolon se širokým průměrem ($>0,32$ mm) provozovaných při relativně vysokých průtocích 5-15 ml/min. Injektor se skládá z termostátové horké odpařovací komory s přímým spojením mezi vložkou a kolonou. (Poole, 2018)

Injektor programovaného teplotního vaporizéru

Injektor programovatelného teplotního vaporizéru (PTV) lze použít jako split/splitless injektor pro vzorky normálního objemu nebo jako velkoobjemový injektor. Ve srovnání se split/splitless vstříkováním PTV injektor výrazně snižuje diskriminaci méně těkavých sloučenin, minimalizuje tepelnou degradaci kvůli kratší době setrvání vzorku při zvýšených teplotách a je adaptabilní pro zavedení široké škály objemů vzorků. Velkoobjemové injekce jsou zajímavé, protože umožňují zvýšení detekovaných signálů, které jsou důležité pro stopovou analýzu. Tento typ je také tolerantnější k netěkavým složkám matrice a poskytuje dobrou kvantitativní přesnost. Dále se používá také jako užitečné spojení metod přípravy vzorků s GC, jako je HPLC, extrakce superkritickou tekutinou, pevná extrakce a tepelná desorpce. (Poole, 2018)

Vstříkování na kolonu

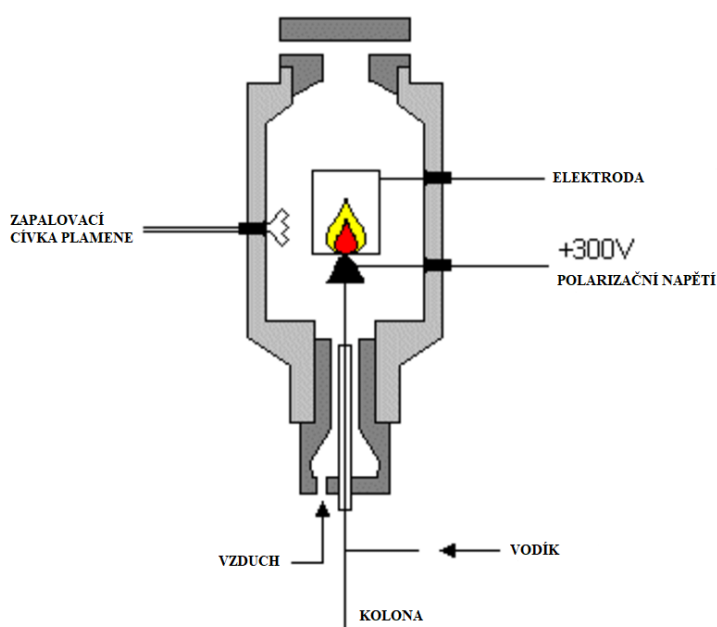
Při vstříkování na kolonu je vzorek v kapalném stavu přímo zaváděn do kolony tenkou injekční jehlou bez odpařování nebo rozdělení toku. Injektory na koloně vyžadují použití kapilárních kolon s vnitřním průměrem v rozsahu 0,2-0,5 mm. Tento způsob vstříkování zabraňuje diskriminaci a minimalizuje degradaci termostabilních sloučenin, ale analyzované látky musí být čisté a bez netěkavých složek. (Ruiz-Matute, 2018)

Detektory

Úlohou GC detektoru je produkovat měřitelný elektronický signál jako odezvu na látky eluované z kolony. Pro GC aplikace je k dispozici celá řada detektorů. Některé detektory jsou citlivé pouze na specifické typy chemických sloučenin, zatímco jiné jsou považovány za univerzální, protože jsou schopny detekovat téměř vše. Detektory se také liší jejich limity detekce. Obecně platí, že čím selektivnější je detektor, tím větší je jeho citlivost. (Stauffer, 2008)

Plamenově ionizační detektor

Popularita plamenově ionizačního detektoru (FID) je zapříčiněna jeho téměř univerzální odezvou na organické sloučeniny, nízkými detekčními limity, dlouhodobou stabilitou, nízkým mrtvým objemem, jednoduchou konstrukcí, rychlou odezvou a výjimečným lineárním dosahem. Pouze např. fixní plyny (He, Ar, Ne,..), některé oxidy dusíku, sloučeniny obsahující jeden atom uhlíku vázaný na kyslík nebo síru, voda a další neposkytují významnou odezvu. Detektor je někdy označován jako uhlíkově selektivní detektor s téměř stejnou molární odezvou pro uhlovodíky na základě jejich počtu atomů uhlíku a relativní odezvou pro sloučeniny obsahující uhlík pouze s několika atomy uhlíku. (Poole, 2016)



Obrázek 4 Schéma FID, převzato a upraveno z: Morad, 2014

Signál FID (viz. **Obrázek 4**) je výsledkem spalování organických látek v malém plameni vodík-vzduch. Nosný plyn kolony je smíchán s vodíkem a spálen v úzkém otvoru v komoře, kterou proudí přebytečný vzduch. Jako zapalovač slouží žhavicí svíčka, která se na okamžik zapne při spuštění. Ionty produkované v plameni se shromažďují aplikací malého napětí mezi špičku trysky a válcovou elektrodu umístěnou několik milimetrů nad plamenem. Malé iontové proudy jsou převedeny na napětí a zesíleny přesným elektrometrem. Důležité kroky při ionizaci jsou tvorba radikálů, vyžadující nepřítomnost kyslíku a chemická ionizace radikálů reakcí s atomární nebo molekulárním kyslíkem v excitovaném stavu. Degradace organických sloučenin v plameni je pravděpodobně důsledkem útoku atomů vodíku

způsobujících štěpení vazeb uhlík-uhlík. Štěpení nenasycených vazeb probíhá po hydrogenaci. (Poole, 2016)

Detektor elektronového záchytu

Detektor elektronového záchytu (ECD) je selektivní detektor, protože analyty s vysokou elektronovou afinitou jako jsou halogenové organické sloučeniny, jsou detekovány ve velmi malých množstvích na koloně. Z tohoto důvodu se ECD často používá v GC pro stanovení halogenovaných kontaminantů v různých typech vzorků. (Tranchida, 2020)

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr (MS) nezjistí pouze přítomnost nebo nepřítomnost analytu, ale i poskytne strukturální informace o molekule, což často umožní její identifikaci. Sám o sobě je extrémně výkonný nástroj, který se však stává nevyužitelným při analýze komplexních směsí analytů. Jeho optimální využití totiž spočívá v analýze čistých sloučenin, kdy je identifikace neznámých látek nejpravděpodobnější. (Stauffer, 2013)

Vzorek je nejprve vstříkovan do GC, separován přes kolonu a následně prochází přenosovou linkou a je analyzován v MS. Celý děj je řízen přes počítač. Spojení GC-MS nepřidává pouze schopnost jednoho k druhému, ale znásobuje obě schopnosti a vede k úplnému analytickému nástroji. Zatímco specifičnost GC samotné a samotné MS není vysoká, tak kombinace obou vede k enormnímu zvýšení specifičnosti. Pokud by dvě sloučeniny nebyly separovány chromatografickým procesem, tak existuje velká šance, že budou vykazovat odlišné strukturální údaje a budou rozlišeny pomocí MS. Dvě podobné sloučeniny vykazující velmi blízké hmotnostní spektrum mají velkou šanci, že budou od sebe odlišeny za pomoci separace chromatografickým procesem. I tak se najdou sloučeniny, které mají velmi blízké chromatografické a strukturální charakteristiky např. strukturální izomery, které spojení GC-MS nerozliší. (Stauffer, 2013)

Většina typů MS lze upravit tak, aby odebíraly výtok z GC kolony za předpokladu, že čerpání iontového zdroje je dostatečné k odstranění nosného plynu. Kvadrupólové přístroje, ve kterých je separace iontů dosaženo tím, že se ionty nechají driftovat mezi čtyřmi soustředěnými tyčemi nesoucí stejnsměrný a střídavý potenciál jsou pravděpodobně nejlépe přizpůsobeny této technice, díky jejich rychlým skenovacím vlastnostem a absenci vysokých potenciálů iontových zdrojů. V poslední době byly pro monitorování výtoků z GC kolon přizpůsobeny přístroje pro měření doby letu. Jednou z hlavních výhod upraveného analyzátoru doby letu je vysoká citlivost, protože většina iontů, které jsou pulzovány do analyzátoru nakonec dosáhnou detektoru. (Harvey, 2017)

Využití plynové chromatografie při identifikaci lipidů

Analýza MK v lipidech je vyžadována v řadě lékařských i nutričních oborech. V konvenčních metodách jsou MK izolovány pomocí TLC poté derivatizovány a následně stanoveny jako methyl-estery mastných kyselin (FAME) pomocí GC. (Ichikara, 2020)

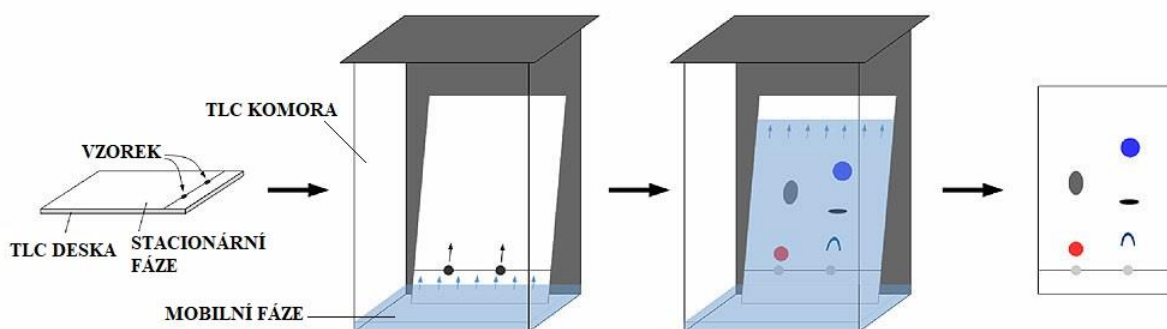
Nejvíce využívanou metodou pro analýzu MK je tedy GC. Casal a Oliveira uvádějí, že GC analýza MK je první chromatografickou metodou známou v analýze MK po dobu 60 let. Hlavním krokem v GC analýze je tedy přeměna MK na vhodné těkavé deriváty. Nejčastěji se jedná o deriváty methyl-, ethyl-, isopropyl-, které jsou získané esterifikací MK. Tento postup usnadňuje těkavost MK a zlepšuje separaci a citlivost na detektory. Využívají se tyto esterifikační metody: methylace katalyzovaná H^+ , esterifikace katalyzovaná OH^- , esterifikace benzylalkoholem, chloridem boritým a další. Rychlou a levnou metodou je kyanomethylová derivatizace. Současný výzkum ukazuje, že detekční metoda ionizace plamenem je nejběžnější analytickou metodou používanou při rutinní kvantitativní analýze MK v různých matricích. Jedná se o levnou metodu ve srovnání s GC-MS. Studie provedené společností Schreiner potvrdily přesnost a robustnost této techniky pro kvantifikaci dlouhých řetězců PUFA. Od roku 2002 došlo k nárůstu využitelnosti GC-FID pro stanovení omega-3, omega-6 MK ve vzorcích. Podle Bockinga a spolupracovníků lze PUFA včetně omega-3, omega-6 a kyseliny linolové kvantifikovat pomocí GC-FID v séru pro klinickou diagnostiku a při kontrole kvality potravin. (Dołowy, 2015)

1.3.3 Tenkovrstvá chromatografie

TLC poskytuje rychlou, levnou a přesnou metodu pro kvalitativní analýzu. Vyžaduje minimální a snadno dostupné vybavení a využívá snadno naučené laboratorní dovednosti. Metody, které používají pokročilé přístrojové vybavení pro separaci jsou známy jako vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC), instrumentální TLC a moderní TLC, aby se odlišily od své mateřské konvenční TLC. (Poole, 2013)

Princip TLC

TLC (viz. **Obrázek 5**) používá jako pevnou fázi tenkou skleněnou desku potaženou buď oxidem hlinitým nebo silikagelem. SF je rozpouštědlo zvolené podle vlastností složek směsi. Principem TLC je rozdělení sloučeniny mezi pevnou fázi (tenkou vrstvou) nanesenou na skleněnou nebo plastovou desku a kapalnou MF (eluční rozpouštědlo), která se pohybuje po pevné fázi. Malé množství sloučeniny nebo směsi se aplikuje na výchozí bod těsně nad dnem TLC desky. (Bele, 2011)



Obrázek 5 Obecný postup TLC, převzato a upraveno z: *mz-at.de*

Destička se potom nechá vyvíjet ve vyvíjecí komoře, která obsahuje směs rozpouštědel, tak aby jejich hladina sahala těsně pod úroveň aplikovaných vzorků na desce. Rozpouštědlo je nasáváno částicemi na desce prostřednictvím kapilárního působení, a jak se rozpouštědlo pohybuje nad směsí, tak každá sloučenina buď zůstane v pevné fázi nebo se rozpustí v rozpouštědle a pohybuje se po desce dál nahoru. Zda se sloučenina posune na desce dále nebo ne závisí na fyzikálních vlastnostech jednotlivé sloučeniny a závisí tedy na její molekulární struktuře, zejména funkčních skupinách. Platí, že čím podobnější jsou fyzikální vlastnosti sloučeniny a MF, tím déle zůstane sloučenina v MF. MF nese nejrozpustnější sloučeniny nejdále po TLC desce. Sloučeniny, které jsou méně rozpustné v MF a mají vyšší afinitu k částicím na TLC desce tak zůstávají pozadu. (Bele, 2011)

Sorbenty používané v TLC

Silikagel

Nejvíce používaným sorbentem pro TLC práci je silikagel. Je to amorfnní porézní matrice vyrobená přidáním kyseliny do roztoku křemičitanu sodného. Při správném řízení hydratačního procesu se silikagel zasítuje za vzniku hydrogelu, který se poté promyje a suší, tím se získá silikagel o velikosti pórů 60 Å a povrchem 500 m²/g. Silikagel o těchto parametrech je standardem používaným v TLC po mnoho let. Aktivní částí jakéhokoli povrchu silikagelu jsou skupiny Si-O-H (silanoly), které se váží na polární skupiny na sloučeninách ve směsi v různé míře, což umožňuje rozdílnou migraci (separaci). Voda se silně váže na silanoly, takže kontrola vlhkosti ve vzruchu a rozpouštědel použitých k přípravě MF je důležitá pro dosažení reprodukovatelných výsledků. Povrchové pH většiny silikagelů je neutrální, a to tedy umožňuje separaci neutrálních, kyselých a zásaditých sloučenin. (Rabel, 2018)

Alumina

Alumina (Al₂O₃) je další oxid kovu využívaný v aplikacích TLC. Na tenkých vrstvách oxidu hlinitého je sorpce založena na částečných kladných a záporných nábojích na povrchu a případné vodě na něm sorbované. Oxid hlinitý může být vyroben tak, aby jeho povrch byl

zásaditý, neutrální nebo kyselý. To umožňuje adsorpční separaci pouze na základě povrchového pH. Další separační charakteristikou je rozdílná velikost pórů povrchu. Byla provedena celá řada separací za využití oxidu hlinitého, a to zejména bazických látek a polyaromatických uhlovodíků. (Rabel, 2018)

Mobilní fáze

MF používaná pro silikagel je organické rozpouštědlo nebo směs organických rozpouštědel. Jak se MF pohybuje kolem povrchu silikagelu, transportuje analyt kolem částic SF. Molekuly analytu se však mohou volně pohybovat s rozpouštědlem, pouze pokud nejsou vázány na povrchu silikagelu. Zlomek času, po který je analyt vázán na povrch silikagelu vzhledem k době, kterou stráví v roztoku, tedy určuje RF. Na schopnost analytu vázat se na povrch silikagelu v přítomnosti konkrétního rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel lze pohlížet jako na součet dvou kompetitivních interakcí. Za první, polární skupiny v rozpouštědle mohou soutěžit s analytem o vazebná místa na povrchu silikagelu. Pokud se tedy použije vysoce polární rozpouštědlo, bude s ním silně interagovat povrch silikagelu a zanechá na něm několik míst SF bez vazby analytu. Analyt se proto bude rychle pohybovat přes SF. Podobně mohou polární skupiny v rozpouštědle silně interagovat s polárními funkčními skupinami analytu a zabránit interakci analytu s povrchem silikagelu. Tento efekt vede k rychlému pohybu analytu při průchodu SF. Navíc se musí brát v úvahu schopnost rozpouštědla utvářet vodíkové vazby. Příkladem je methanol, který je silným donorem vodíkové vazby a silně inhibuje schopnost všech analytů, kromě těch nejpolarnějších, vázat se na povrch silikagelu. (Kumar, 2013)

Aplikace vzorku na TLC desku

Zařízení pro aplikaci musí zajistit správné umístění vzorku na TLC desce a přesné dávkování specifických objemů vzorku. Dále je třeba zabránit jakémukoli poškození vrstvy. Moderní přístroje podporují umístění vzorků ve směrech x a y buď v předem definovaných nebo volitelných krocích. Zatímco manuální zařízení obecně využívají pravítka, automatizované aplikátory vzorků obsahují softwarově řízenou mechaniku pro reprodukovatelné umístění vzorků. Pro ruční dávkování vzorku se používají jednorázové kapiláry s pevným objemem, odměrné mikropipety nebo mikrostříkačky. Automatizované přístroje používají motorem poháněné injekční stříkačky. (Reich, 2017)

Existují dva základní způsoby přenosu vzorku na vrstvu, kontaktní nanášení a aplikace sprejem. Během kontaktního nanášení je vzorek přenesen do vrstvy kapilárním působením, když se kapilára nebo jehla dotkne povrchu. Délka kontaktu a dávkovaný objem vzorku určují velikost aplikovaného místa. Pokud je vzorek rozpuštěn v silném rozpouštědle a jsou

aplikovány velké objemy, bude během aplikace probíhat kruhová chromatografie, která má za následek tvorbu zdeformovaných zón. Technika sprejování tento problém překonává. Vzorek je atomizován pomocí stlačeného vzduchu nebo inertního plynu, když opouští špičku stříkačky aplikátoru. Tímto způsobem lze dosáhnout ostře zaměřené startovací zóny. Úpravou rychlosti dávkování se lze vyhnout smáčení SF během aplikace, a tím se eliminuje jakákoliv nežádoucí chromatografie. (Reich, 2017)

Vyvíjení v TLC komoře

Existuje mnoho typů vývojových komor pro TLC, které byly navrženy s funkcemi, které pomáhají řídit reprodukovatelnost vývoje. Komora by samozřejmě měla být dostatečně velká, aby se do ní vešla TLC deska. Pro malé TLC destičky postačí jakákoli malá skleněná nádoba se šroubovacím uzávěrem. Komory bez šroubovacích uzávěrů by měly být uzavřeny pomocí vakuového vaziva, aby byla komora co nejlépe utěsněna. Vývoj v normální fázi a v reverzní fázi je jednoduchý. Po umístění destičky do vyvíjecí komory a zavření víka se destička vyvíjí, dokud se rozpouštědlo nedostane blízko horní části destičky. Poté může být odstraněna pro vizualizaci. (Santiago, 2013)

Vizualizace

Po vyvolání TLC destičky lze pouhým okem vidět pouze barevné sloučeniny, ale mnoho sloučenin zbarvených není, a proto je nezbytná alternativní metoda vizualizace desky. Existuje mnoho metod pro vizualizaci TLC destiček. Metody vizualizace spadají do tří tříd: destruktivní, polodestruktivní a nedestruktivní. Různé skvrny spadají do třídy metod destruktivní vizualizace, protože jakákoli sloučenina přítomná na desce se rozloží a vytvoří tmavou skvrnu. Některá vizualizační činidla jsou univerzální, protože umožňují vizualizaci mnoha různých funkčních skupin nebo tříd sloučenin. Jiná barviva mohou dobře fungovat pouze pro určitou třídu sloučenin. Pro detekci aminokyselin a aminů se využívá ninhydrin, který při reakci s aminoskupinou vytváří fialové až hnědé skvrny. Dále pro detekci organických kyselin se využívá bromkrezolová zeleň, která s nimi utváří žluté skvrny na modrém pozadí atd. (Meyers, 2008)

Jako polo-destruktivní metoda vizualizace se využívají páry jódu. Mnoho sloučenin je absorbuje a na světle hnědém pozadí se změní na tmavě hnědé. Jód má silnou afinitu k nenasyceným nebo aromatickým sloučeninám. Změna barvy však není vždy trvalá, takže místa by měla být označena tužkou pro budoucí použití. Dále je možné použít k vizualizaci určitých sloučenin UV světlo, pokud obsahují UV indikátor. Sloučeniny obsahující chromofor absorbující UV záření se nazývají UV aktivní a lze je touto metodou vizualizovat. Takové

sloučeniny blokuji absorpenci UV světla fluorescenčním indikátorem a vytvářejí tmavé skvrny na světlém pozadí. Z toho důvodu je tato metoda označována jako UV stínovací a řadí se mezi nedestruktivní metody, protože nefotolabilní sloučeniny se za těchto podmínek obecně nerozkládají. Pro tento účel detekce jsou komerčně dostupné ruční UV lampy s UV světlem s dlouhou i krátkou vlnovou délkou. Viditelné tmavé skvrny je třeba zakroužkovat tužkou pro budoucí použití. (Meyers, 2008)

Využití TLC při stanovení lipidů

Metoda TLC a její zpřesněná metoda HPTLC jsou v dnešní době nepostradatelnými nástroji moderní analytické chemie. V oblasti lipidů se TLC klasicky používá pro rutinní separace, identifikace jednotlivých lipidů a jejich kvantitativní stanovení.

Nejoblíbenější SF pro separaci lipidů jsou silikagel, oxid hlinitý a křemelina, přičemž zcela dominantní je silikagel. V normální fázi TLC je SF polární (silikagel) a MF zcela nepolární (rozpuštědla typu hexan nebo chloroform). Chromatografie na normální fázi je standardní metodou separace lipidů podle rozdílů v polaritě způsobených rozdíly v hlavních skupinách. Hlavní výhodou TLC je to, že oddělené lipidové frakce lze snadno vizualizovat vazbou na barvivo. Využívají se pro barvení např. 2',7'-dichlorofluorescein nebo rhodamin. Tyto barviva dávají žluté nebo růžové skvrny, pokud je TLC deska osvětlena UV světlem. (Fuchs, 2011)

Jako běžné modifikátory silikagelu se používají dusičnan stříbrný a kyselina boritá. Dusičnan stříbrný je zvláště užitečný pro separaci glycerolipidů nebo VMK s různým stupněm nenasycenosti. Naproti tomu impregnace oxidu křemičitého kyselinou boritou je metodou volby k rozlišení izomerních lipidů jako jsou 1,2- a 1,3- monoacylglyceroly nebo lipidy se sacharidovými skupinami. (Fuchs, 2015)

1.3.4 Příklady vnitřních standardů pro stanovení lipidů

Jing X Kang se svými kolegy ve své práci použili pro stanovení lipidů jako interní standard (IS) MK C23. Tuto kyselinu přidali ke vzorku tkáně na začátku stanovení. V této studii byly buňky extrahovány pomocí směsi chloroform-methanol (2:1) s 0,005% butylovaným hydroxytoluenem a poté se směs nechala 1 minutu intenzivně míchat. Dále se směs ponechala při 4 °C přes noc. Druhý den se přidal 1 ml 0,9% NaCl a směs se znovu promíchala. Fáze s lipidy se odebrala. Chloroform byl vysušen pod dusíkem a MK podrobena methylaci. (Kang, 2005)

V další práci bylo využito více IS. Pro TAG C13, PL-fosfatidylcholin C23 a pro methylestery-methylester C21. Variační koeficient byl menší nebo roven 2,5, opakovatelnost

metody < 15 % a střední reprodukovatelnost < 15 %. Popis přípravy vzorku: 200 µl vzorku bylo smícháno s KH₂PO₄ (0,5 M roztok, tj. 0,3 ml), 1,5 ml chloroformu a 0,5 ml methanolu. Následovala methylace, kdy se v 10 ml zkumavce smíchalo 200 µl plazmy a ethanolu se 100 µl IS C13 a 100 µl roztoku IS C23. Do nádoby byly přidány 2 ml methanolu a 2 ml plynného HCl v bezvodém methanolu a nakonec 1 ml *n*-hexanu. Pevně uzavřené zkumavky byly zahřívány na 100 °C po dobu 60 minut za občasného míchání. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidaly ke směsi 2 ml vody a zkumavka byla intenzivně protřepána a centrifugována při 1200x / min. po dobu 5 minut. Po odebrání byla horní organická fáze přenesena do GC. Při analýze erytrocytů byl použit lyzační pufr a interní standard C23. Na rozdíl od stanovení v plazmě, kdy se použil ethanol a interní standard C13. (Cruz-Hernandez, 2017)

Pro analýzu FAME v krvi a dalších biologických vzorcích se jako IS používá hlavně kyselina margarová C17 a nonadekanová C19. Někteří autoři použili ke stanovení PUFA v séru kyselinu dokosatrienovou C22:3n3. Pro stanovení PUFA v rybím oleji byla použita kyselina trikosanová C23 a C24:1n9. (Tvrzická, 2002)

Další studie ukazuje systém schopný selektivně oddělit plazmatické PL od jiných lipidových tříd během několika minut. V této práci byla využita směs IS. Tento směsný standard obsahoval cholesterylheptadekanoát, tritridekanoin, kyselinu arachidonovou, diolein, monolinolein, L-a-fosfatidylcholindiarachidoyl. Jako IS pro kvantifikaci fosfolipidové a nepolární lipidové frakce byl použit 1,2-ditridekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin a kyselina stearová. Experimenty předcházející této práci prokázaly, že nejlepším rozpouštědlem pro eluci neutrálních lipidů z papíru ošetřeného silikagelem aniž by docházelo k rozpouštění PL, byl aceton. Vysušená skvrna byla poté namočená v 1 ml acetonu na 10 minut, aby se eluovaly všechny lipidové třídy kromě PL. Po druhém promytí byla skvrna standardní směsí umístěna do 6 ml scintilační lahvičky pro transesterifikaci MK. (Liu, 2020)

V další práci byla jako IS využita kyselina heptadekanová. Kdy se k 0,2 ml lidské plazmy ve skleněné zkumavce přidalo 0,6 ml methanolu obsahujícího 5 µg kyseliny heptadekanové a 1 µg 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-kresolu jako antioxidantu. Následně se směs nechala vortexovat po dobu 2 minut. Zkumavka byla centrifugována při 1500x / minutu po dobu 3 minut a supernatant byl přenesen do nové skleněné zkumavky. Sraženiny byly znovu extrahovány 0,2 ml 75% methanolem. Po vortexování a centrifugaci byl supernatant smíchán s prvním methanolickým roztokem. K novému roztoku byl přidán 1 ml vody, 0,6 ml *tert*-butylmethyletheru (*t*BME) a 0,02 ml 10% trimethylsilyldiazomethanem v hexanu. Směs byla vortexována po dobu 2 minut a inkubována při laboratorní teplotě 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 5 µl kyseliny octové a vytvořené FAME byly extrahovány 0,5 ml hexanu.

Zkumavka byla vortexována 1 minutu a centrifugována při 1500x / minutu po dobu 1 minuty. Vrstva hexan / *t*BME byla přenesena do nové zkumavky a odpařena do sucha ve vakuu. Koncentrát byl rozpuštěn v 1 ml hexanu a promyt 95% methanolem, aby došlo k odstranění PL. Hexanová vrstva se promyla 1 ml vody, odstředila 1 minutu při 1500 otáčkách za minutu a odpařila se do sucha ve vakuu. Takto vzniklé FAME byly rozpuštěny v 0,06 ml hexanu nebo izooktanu a alikvot o objemu 1 μ l byl nastříknut do GC. (Ichihara, 2020)

V poslední práci byly využity dva IS. První IS byl 10,11-dichloroundekanová kyselina a jako druhý byl použit kyselina tetradekanová. Tyto IS byly přidány až po provedení TLC. Postup: Alikvoty lipidových extraktů a také VMK vyškrábané z TLC destičky byly doplněny 10 μ g kyseliny 10,11-dichloroundekanové (1. IS v 10 μ l *n*-hexanu). Následovalo ošetření 2 ml 1% kyseliny sírové v methanolu v pískové lázni po dobu 1,5 hod za účelem přenosu všech MK v roztoku do FAME. Po ochlazení na ledu byly přidány 2 ml čisté vody, nasyceného vodného roztoku NaCl a FAME byly extrahovány 2 ml *n*-hexanu. Dále bylo přidáno 5 μ g ethylesteru kyseliny tetradekanové (2. IS ředěný 10 μ l hexanu) a výsledný roztok vzorku byl změřený pomocí GC/MS. (Eibler, 2017)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a pracovní pomůcky pro tenkovrstvou a plynovou chromatografii

- automatické pipety
 - Eppendorf, Hamburk, Německo
- centrifuga MPW-340
 - Mechanika Precyza, Varšava, Polsko
- chromatografická vana
- chromatografické vialky s pryžovým septem
 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- inserty do chromatografických vialek
 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- kolona HP-88
 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- magnetická míchadla
- mikrozkušavky Eppendorf
- odměrné válce – 50 a 100 ml
- pasturovy pipety
- plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A GC
 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
- pyrexové zkumavky
 - Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Velká Británie
- skleněné pipety – 5 a 10 ml
- stříkací pistole Desaga pro chromatografii na tenké vrstvě
 - Heidelberg, Německo
- termoblok s odpařovacím zařízením a mícháním:
 - Pierce Reacti.Thermo Scientific, Asheville, NC, USA
- třepačka REAX top
 - Heidolph instrumenst GmbH & Co. KG, Schwabach, Německo
- UV 240 lampa
 - A. Krüss Optronic GmbH, Darmstadt, Německo

2.2 Použité chemikálie

mobilní fáze pro TLC

diethylether, p.a., nestabilizovaný

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,7 %, hustota 714 kg/m³, M = 74,12 g/mol, číslo šarže: 2611091121

kyselina octová, čistá

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 1050 kg/m³, M = 60,05 g/mol, číslo šarže: 1907280714

n-hexan, p.a.

- výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,43 %, hustota 660 kg/m³, M = 86,18 g/mol, číslo šarže: PP/2019/05665

deproteinační roztok

isopropylalkohol, p.a.

- výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR
- balení 1000 ml, obsah 100 %, hustota 780 kg/m³, M = 60,1 g/mol, číslo šarže: PP/2017/02567

kyselina trihydrogenfosforečná, p.a.

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1000 ml, obsah 84-87 %, hustota 1700 kg/m³, M = 98 g/mol, číslo šarže: 1801230113

n-heptan, čistý

- výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR
- balení 1000 ml, hustota 680 kg/m³, M = 100,21 g/mol, číslo šarže: PP/2010/14672

detekční činidlo

2',7'-dichlorfluorescein

- výrobce: Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Německo
- balení 100 ml, 90 %, pro TLC, M = 401,2 g/mol, číslo šarže: 319108554

interní standardy

Tripentadecanoin (IS1)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro TAG

Cholesteryl pentadecanoát (IS2)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro ECH

1,3-dipentadecanoín (IS3)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro DAG

kyselina pentadecanová (IS4)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro FFA

kyselina *cis*-13,16,19 dokosatrienová (IS5)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro FFA

1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (IS6)

- výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- IS pro PL

další použité chemikálie

Acetylchlorid, Reagent Plus > 98%

- výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- balení 500 ml, číslo šarže: STBD5754V

Dichlormethan, p.a.

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,5 %, hustota 1325 kg/m³, M = 84,93 g/mol, číslo šarže: 2207100717

Chloroform, p.a.

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,8 %, hustota 1477 kg/m³, M = 119,38 g/mol, číslo šarže: PP/2013/01048

Methanol, p.a.

- výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,98 %, hustota 790 kg/m³, M = 32,04 g/mol, číslo šarže: 220

Standard pro TLC: poolová plazma (plazma více dárců z kontrolní skupiny)

Toluen, p.a.

- výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR
- balení 1000 ml, obsah 99,28 %, hustota 870 kg/m³, M = 92,14 g/mol, číslo šarže: PP/2013/02444

Uhličitan draselný, bezvodý

- výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR
- balení 1 000g, M = 138, 21 g/mol, číslo šarže: 2608030821V

Tlakové láhve

Dusík: N2 4.0, UN 1066

- výrobce: Linde Gas a.s., Praha, ČR

Helium: He 5.0, UN 1046

- výrobce: Linde Gas a.s., Praha, ČR

Vodík: H2 5.0 ≥ 99, 999

- výrobce: Linde Gas a.s., Praha, ČR

Vzduch: O2 20 %, N2 80 %, UN 1956

- výrobce: Linde Gas a.s., Praha, ČR

Chromatografické desky

TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20x20 cm, balení 25 kusů

- výrobce: Merck, Darmstadt, Německo

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava kalibračních roztoků interních standardů

Kalibrační roztok IS 1,2,3 a 4 byl připraven smícháním různých objemů (odpovídajících daným koncentracím kalibračních roztoků) koncentračního roztoku (1 mg/ml) s odpovídajícím objemem směsi toluen-methanol v poměru 1:4. Kalibrační roztok IS 5 byl připraven smícháním různých objemů koncentračního roztoku (250 µg/ml) s odpovídajícím objemem směsi toluen-methanol v poměru 1:4. Kalibrační roztok IS 6 byl připraven shodným postupem, ale z koncentračního roztoku o koncentraci 25 mg/ml.

Od každého IS bylo připraveno celkem 5 kalibračních roztoků, jejichž teoretická koncentrace je 10,20,30,40 a 50 µg/ml. Skutečné koncentrace, po přepočítání podle navážky IS jsou uvedeny spolu s navážkou IS 1,2,3 a 4 v **Tabulce 5**. IS5 a IS6 nejsou uvedeny v tabulce, protože jejich koncentrace nebyla přepočítávána z důvodu neznalosti přesných navážek.

Tabulka 5 Skutečné koncentrace kalibračních roztoků jednotlivých IS

IS	navážka [g]	skutečná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]				
1	0,0113	11,3	22,6	33,9	45,2	56,5
1	0,0105	10,5	21	31,5	42	52,5
2	0,0104	10,4	20,8	31,2	41,6	52
3	0,0101	10,1	20,2	30,3	40,4	50,5
4	0,0103	10,3	20,6	30,9	41,2	51,5

2.3.2 Derivatizace kalibračních roztoků interních standardů a jejich stanovení plynovou chromatografií

Derivatizace – převedení mastných kyselin na odpovídající methylestery

Do pyrexových zkumavek byla vložena magnetická míchadla a následně do nich byl napipetován 1 ml daného kalibračního roztoku IS (1,2,3,4,5 a 6) a 1 ml směsi toluen-methanol v poměru 4:1. Poté bylo do každé pyrexové zkumavky velmi opatrně přidáno 200 μl acetylchloridu, který sloužil jako katalyzátor reakce. Takto připravené zkumavky byly uzavřeny víčkem s teflonovým těsněním, tak aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla. Dále byly zkumavky vloženy do předem vyhřátého termobloku na 100 °C se zapnutým mícháním na úroveň 8 po dobu 60 minut.

Po uplynutí reakční doby byly zkumavky vytaženy z termobloku a ponechány ve stojánku na ochlazení na laboratorní teplotu. Do zkumavky bylo přidáno 5 ml 6% roztoku K_2CO_3 , který zneutralizoval vzniklé kyseliny v reakční směsi. Následovalo intenzivní třepání uzavřených zkumavek v rukou po dobu 2 minut a centrifugace 10 minut při 3 000 otáčkách za min. při laboratorní teplotě. Centrifugací byla směs ve zkumavkách rozdělena na dvě vrstvy, horní organickou a dolní vodnou. Horní organické vrstvy byly odpipetovány do připravených skleněných zkumavek a odpařeny do sucha pod dusíkem v digestoři. Ke každému odparku bylo přidáno 100 μl směsi toluen-methanol v poměru 1:4. Vzniklé roztoky byly řádně zvortexovány a přepipetovány do chromatografických vialek s insertem a uzavřeny víčkem s pryžovým septem. Vzorke se do analýzy na GC skladovaly v lednici při teplotě 4 °C.

Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem

Připravené vzorky v uzavřených vialkách byly naskládány do karuselu (max. 15 vzorků). Dále byly puštěny plyny. Na ventilu jsou dva budíky, první ukazuje množství plynu v lahvi a druhým se nastavuje tlak. Pro měření byl tlak udržován na 6-7 bar. Poté byl zapnut

GC bílým tlačítkem vlevo dole. Tlačítkem STATUS jsme mohli přepnout do modulu, který ukazuje, co se děje v GC/FID jako např. teploty a kolik procent je už z daného vzorku změřeno.

Nastavení sekvence měření

Nastavení sekvence měření vzorků bylo prováděno v programu Instrument 1 online. Jako první byl měřen HEXAN, který se používá k promytí kolony. Hexan byl dáván do sekvence měření po každých 5 vzorcích i jako poslední vzorek pro měření. Teplotní program na koloně byl nastaven na: počáteční teplotu 130 °C po dobu 1 minuty, potom o 2 °C za minutu do teploty 176 °C po dobu 2 minut, o 1 °C za minutu do teploty 186 °C po dobu 1 minuty, o 0,2 °C za minutu do teploty 190 °C po dobu 1 minuty, o 1 °C za minutu do teploty 220 °C po dobu 4 minut. Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 92 minut. Dávkování vzorku bylo v módu split (10:1) a dávkované množství vzorku bylo 1 µl. Typ kolony HP-88, který byl použit při měření FAME má tyto parametry: 100 m x 0,250 mm x 0,20 µ, teplotní limit od 50 °C do 250 °C.

Vyhodnocení vzorků

Získané chromatogramy byly integrovány v programu Instrument 1 offline. Při vyhodnocování kalibračních roztoků IS byl v záznamu viditelný pouze 1 pík, který se se zvyšující koncentrací kalibračního roztoku zvětšoval. Získané hodnoty byly dále zpracovávány v MS Excel 2010.

2.3.3 Stanovení interních standardů s pool plazmou

Precipitace bílkovin a extrakce lipidů

Do připravených skleněných zkumavek bylo napipetováno 500 µl rozmražené pool plazmy, ke které bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku. Deproteinační roztok byl připraven smícháním 2-propanolu, *n*-heptanu a 2M kyseliny fosforečné, a to v poměru 40:20:1. Takto připravené směsi byly promíchány na vortexu a inkubovány 10 minut ve stojánku při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl do zkumavek přidán 1 ml jednotlivých kalibračních roztoků IS (např. kalibrační roztok o koncentraci 10 µl IS 1) a 1,5 ml destilované vody. Vzniklé směsi byly znovu promíchány na vortexu a centrifugovány 10 minut při 3 000 otáčkách za min. Centrifugací byla směs rozdělena na horní organickou a dolní vodnou fázi. Organické fáze byly přepipetovány do označených pyrexových zkumavek a odpařeny do sucha v atmosféře dusíku v digestoři.

Derivatizace– převedení mastných kyselin na odpovídající methylestery

viz kapitola 2.3.2

Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem

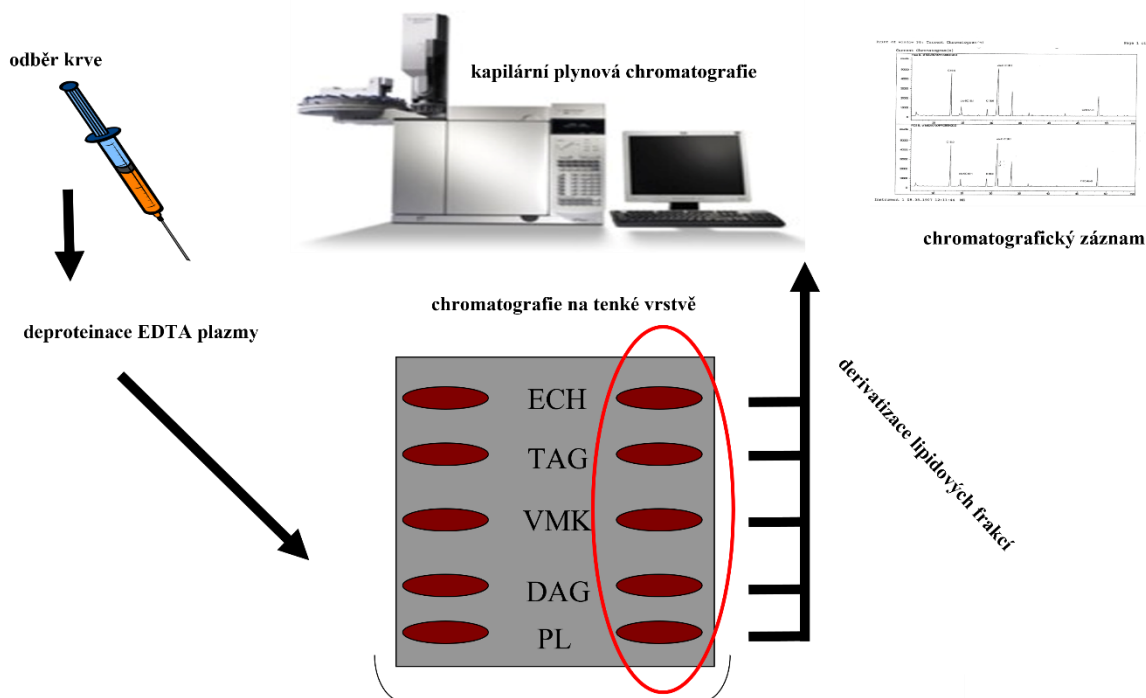
viz kapitola 2.3.2

Vyhodnocení vzorků

Získané chromatogramy byly integrovány v programu Instrument 1 offline. Při vyhodnocování kalibračních roztoků IS s pool plazmou bylo v záznamu více viditelných píků, ale pouze 1 pík, který se se zvyšující koncentrací kalibračního roztoku zvětšoval. Získané hodnoty byly dále zpracovávány v MS Excel 2010.

2.3.4 Stanovení interních standardů pomocí tenkovrstvé a plynové chromatografie

Na **Obrázku 6** je schématicky znázorněn postup celého experimentu. K této práci byla zapotřebí pool plazma od zdravých dárců, která se získává centrifugací vzorků plné krve. Po centrifugaci byla plazma odebrána do Eppendorf zkumavek a uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, dokud nebyla zapotřebí k analýze. Dalšími kroky, které jsou podrobně rozepsány níže, byla deproteinace této plazmy, rozdělení vzorku do 5 lipidových frakcí, jejich derivatizace a následné stanovení vzniklých FAME GC. Výsledkem analýzy je chromatografický záznam dané lipidové frakce.



Obrázek 6 Schématické znázornění experimentální metodiky

Precipitace bílkovin a extrakce lipidů

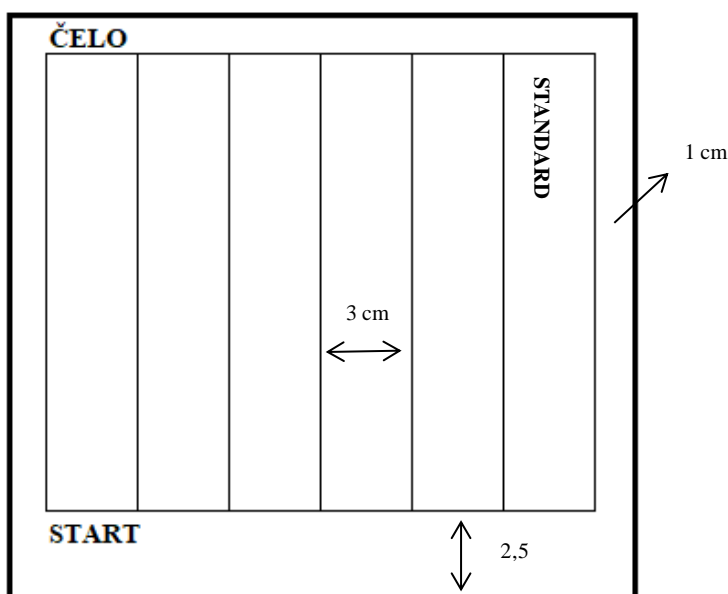
Do připravených skleněných zkumavek bylo napipetováno 500 μ l rozmražené pool plazmy, ke které bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku. Byl připraven smícháním 2-propanolu, *n*-heptanu a 2M kyseliny fosforečné, a to v poměru 40:20:1. Takto připravené směsi byly promíchány na vortexu a inkubovány 10 minut ve stojánku při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl do zkumavek přidán 1 ml jednotlivých kalibračních roztoků IS (např. kalibrační roztok o koncentraci 10 μ l IS 1) a 1,5 ml destilované vody. Vzniklé směsi byly znovu promíchány na vortexu a centrifugovány 10 minut při 3 000 otáčkách za min. Centrifugací byla směs rozdělena na horní organickou a dolní vodnou fázi. Organické fáze byly přepipetovány do označených skleněných zkumavek a odpařeny do sucha v atmosféře dusíku v digestoři.

Příprava mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

Do chromatografické vany byla smícháním 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 98% kyseliny octové připravena MF. MF se v chromatografické vaně nechala před analýzou 40 minut sytit. Poté byly do vany umístěny chromatografické desky s nadávkovanými vzorky. Do jedné chromatografické vany bylo možné umístit pouze 2 TLC desky.

Příprava chromatografické desky pro tenkovrstvou chromatografii

Měkkou tužkou se na chromatografickou desku vyznačily jednotlivé dráhy, start a čelo. Start byl označen 2,5 cm od spodního okraje desky a čelo ve vzdálenosti 1 cm od jejího horního okraje. Plocha desky byla rozdělena celkem na 6 drah o šířce 3 cm a zároveň byly označeny okraje šířky desky 1 cm (viz. **Obrázek 7**). Vzniklé dráhy byly nahoře označeny čísly vzorků a standardem. Standard je používán k postřiku detekčním činidlem.



Obrázek 7 Příprava TLC desky

Tenkvrstvá chromatografie

K odparkům bylo přidáno 75 μ l směsi chloroform-methanol (poměr 2:1). Vzniklé roztoky byly důkladně promíchány na vortexu. Pomocí skleněných Pasteurových pipet byly postupně nanесeny celé objemy vzorků na startovní čáru TLC desky tak, aby nedošlo k poškození jejího povrchu. Vzorky byly nanášeny rovným tahem do dráhy, aby se nedotýkaly jejího ohraničení a vznikla 2 cm dlouhá linie. Jeden vzorek byl nanášen asi v 6 vrstvách, a to vždy po zaschnutí předešlé vrstvy. Zkumavka byla vypláchnuta 25 μ l směsi chloroform-methanol (poměr 2:1) a postup nanášení byl zopakován. Deska po zaschnutí byla vložena do chromatografické vany do doby, než MF dosáhla hranice vzorků. Deska se vyjmula a ponechala znovu zaschnout (zakoncentrovat). Po zaschnutí byla deska vložena zpátky do chromatografické vany a nechala se vyvíjet, dokud MF nedosáhla označeného čela (cca 50 minut při zakrytí vany krabicí). Opět se deska vyjmula z vany a nechala se vysušit v digestoři. Tím byly lipidy rozseparovány do 5 frakcí: PL, DAG, VMK, TAG a ECH.

Detekce rozdělených vrstev

K detekci rozdělených vrstev byl použit 2',7'-dichlorfluorescein, který byl rozprášen v oblasti standardu. Ostatní dráhy byly zakryty starou TLC deskou, aby nedošlo k jejich potřísnění činidlem. Pro následnou vizualizaci byla použita UV lampa.

Izolace jednotlivých složek lipidů

Podle standardu byly tužkou označeny jednotlivé frakce o minimální mezeře mezi nimi 0,5 cm. Získaná jednotlivá pole byla z desky vyškrábána do předem označených pyrexových zkumavek s uzávěrem s teflonovým těsněním. U IS 1 byly vyškrábány pouze frakce TAG, u IS 2 frakce s ECH, u IS 3 frakce s DAG, u IS 4 frakce s VMK, u IS 5 frakce s VMK a u IS 6 frakce s PL.

Derivatizace– převedení mastných kyselin na odpovídající methylestery

viz kapitola 2.3.2

Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem

viz kapitola 2.3.2

Vyhodnocování vzorků

viz kapitola 2.3.2

2.4 Analytické parametry metody

Byly určeny tyto parametry: linearita, přesnost a opakovatelnost.

Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými (analytickým signálem a koncentrací analytu). Nyní se k hodnocení linearity spíše používá korelační koeficient, který měří stupeň korelace a ne linearitu. Závisí na rozložení bodů na přímce.

Přesnost analytické metody

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými hodnotami, které byly naměřeny opakovaně za stejných analytických podmínek v homogenním vzorku. Míra přesnosti je dána variačním koeficientem (CV):

$$CV (\%) = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

kde SD-směrodatná odchylka měření, AVG-aritmetický průměr

Opakovatelnost vyjadřuje míru těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, stejném místě a za stejných podmínek v krátkém časovém úseku. Mez opakovatelnosti udává 2,8 násobek směrodatné odchylky.

Směrodatná odchylka (SD) znázorňuje, jak moc jsou hodnoty odchýleny od průměru hodnot. SD byla vypočtena u naměřené přesnosti podle vzorce:

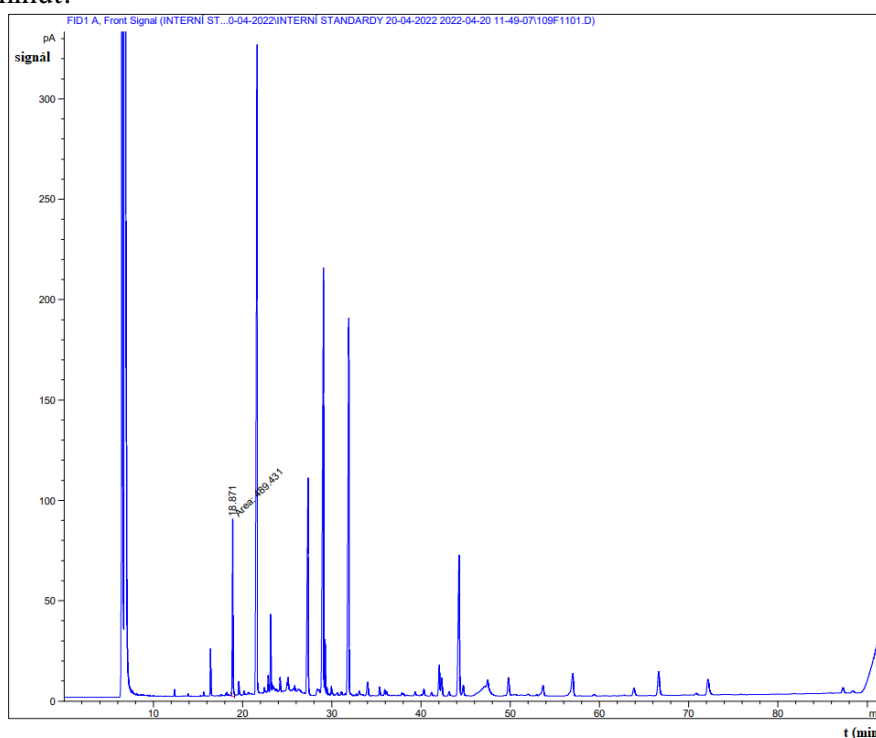
$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

kde SD-směrodatná odchylka měření, x_i -koncentrace jednoho vzorku v sérii, AVG aritmetický průměr, n-počet vzorků

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Chromatografické záznamy

Z chromatografických záznamů byly zintegrovány plochy píků kalibračních roztoků IS, odpovídající retenčnímu času IS, zaznamenány do tabulky vytvořené v aplikaci MS Excel 2010. IS 1, 2, 3 a 4 mají retenční čas stejný, a to cca 19 minut. IS 5 má retenční čas cca 55 minut a IS 6 23 minut.



Obrázek 8 Chromatografický záznam kalibračního roztoku IS po deproteinaci.

Na **Obrázku 8** je uveden příklad chromatografického záznamu IS 1 po deproteinaci o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ (skutečné koncentraci 42 $\mu\text{g/ml}$). Na ose x je retenční čas v minutách a na ose y signál detektoru. Na tomto chromatografickém záznamu je možné odečíst na ose x retenční čas IS v min., který je 18,87 min a dále je vidět zintegrovaná plocha píku, která je 489,431.

3.2 Kalibrační křivky

Připravené kalibrační roztoky IS podle postupů uvedených v kapitole 2.3 byly nadále zpracovány v MS Excel 2010. Z chromatografických záznamů byly v tomto programu zkonstruovány kalibrační křivky pro každý vzorek, jak pro samotný IS, tak pro IS po deproteinaci i pro IS zpracovaný TLC. U kalibračních křivek se vygenerovaly rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti, které jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

Tabulka 6 Parametry vycházející z kalibračních přímk

vzorek	název	vzorec	R ²	rovnice regrese
IS 1	tripentadekanoin	C ₄₈ H ₉₂ O ₆	0,97	y = 17,023x - 190,88
plazma IS 1	tripentadekanoin	C ₄₈ H ₉₂ O ₆	0,9839	y = 9,4067x + 62,21
TLC IS 1	tripentadekanoin	C ₄₈ H ₉₂ O ₆	0,9669	y = 4,2981x + 10,51
IS 2	cholesteryl pentadekanoát	C ₄₂ H ₇₄ O ₂	0,9935	y = 5,8385x - 63,64
plazma IS 2	cholesteryl pentadekanoát	C ₄₂ H ₇₄ O ₂	0,9454	y = 9,449x + 90,27
TLC IS 2	cholesteryl pentadekanoát	C ₄₂ H ₇₄ O ₂	0,9024	y = 9,1918x - 35,986
IS 3	1,3-dipentadekanoin	C ₃₃ H ₆₄ O ₅	0,9662	y = 7,1752x - 25,39
plazma IS 3	1,3-dipentadekanoin	C ₃₃ H ₆₄ O ₅	0,9775	y = 8,7287x + 99,48
TLC IS 3	1,3-dipentadekanoin	C ₃₃ H ₆₄ O ₅	0,9645	y = 5,8655x - 6,8095
IS 4	pentadekanová kyselina	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0,913	y = 14,656x - 172,74
plazma IS 4	pentadekanová kyselina	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0,8723	y = 4,4051x + 63,735
TLC IS 4	pentadekanová kyselina	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0,9858	y = 15,601x - 48,221
IS 5	dokosatrienová kyselina	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	0,9621	y = 11,072x - 20,66
plazma IS 5	dokosatrienová kyselina	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	0,9428	y = 10,108x - 30,9
TLC IS 5	dokosatrienová kyselina	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	0,9179	y = 6,059x - 21,39
IS 6	1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	0,9393	y = 9,1744x - 6,208
plazma IS 6	1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	0,8606	y = 8,02x + 411,6
TLC IS 6	1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	0,9405	y = 4,714x + 26,66

R²-korelační koeficient, y-plocha píku interního standardu, x-koncentrace v µg/ml

3.3 Analytické parametry metody

3.3.1 Přesnost metody

Parametry přesnosti metody (průměr, SD, CV a mez opakovatelnosti) jsou uvedeny v **Tabulce 7** a byly vypočteny z měření 10 vzorků koncentračních roztoků IS 1 o koncentraci 50 µg/ml. Vzorky byly připraveny dle metody uvedené v kapitole 2.3.2.

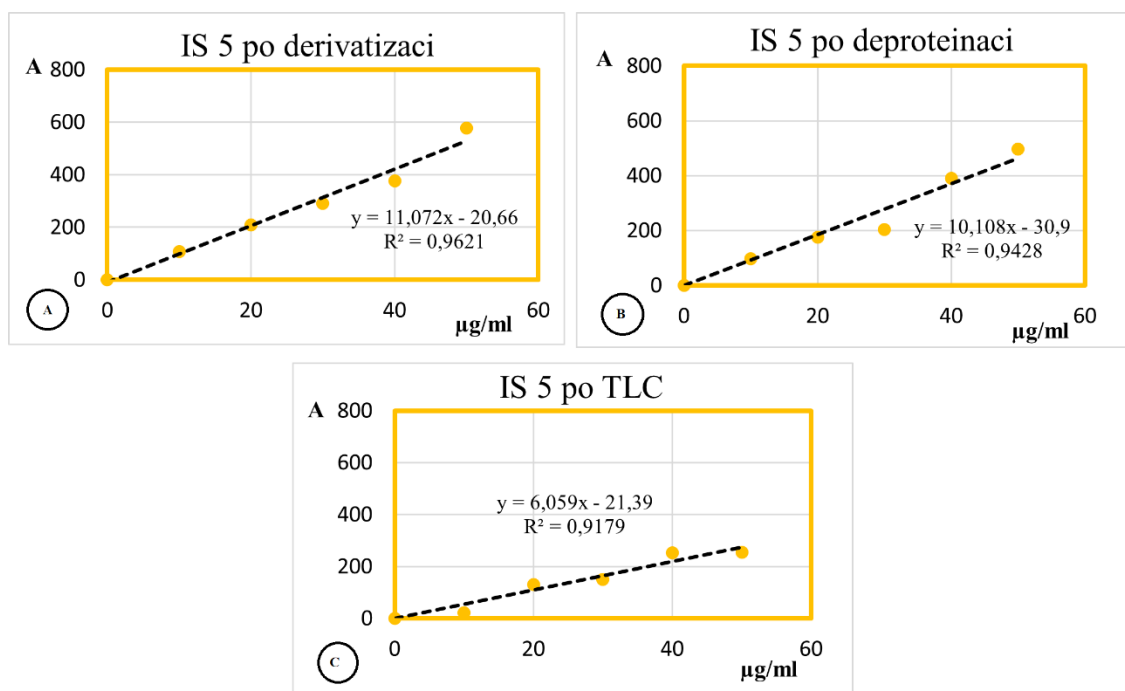
Tabulka 7 Přesnost metody

n	průměr ± SD [$\mu\text{g/ml}$]	CV [%]	mez opakovatelnosti
10	841,315 ± 92,14	10,95	257,99

n= počet měření, SD-směrodatná odchylka, CV-variační koeficient

3.4 Diskuse

Celý analytický postup měření koncentrací MK v plazmatických frakcích (PL, DAG, VMK, TAG a ECH) se skládá ze tří hlavních analytických operací, které mohou ovlivňovat výsledné zjištění koncentrace MK. Doposud používaný analytický postup byl založen na použití jednoho IS, kterým je nefyziologická MK (kyselina *cis*-13,16,19-dokosatrienová), která se v lidské plazmě nevyskytuje. Směrnice závislosti koncentrace na ploše píku vyjadřuje vztah mezi těmito hodnotami a umožňuje přepočítat plochu píku na koncentraci MK v plazmě.



Obrázek 9 Kalibrační křivky IS 5

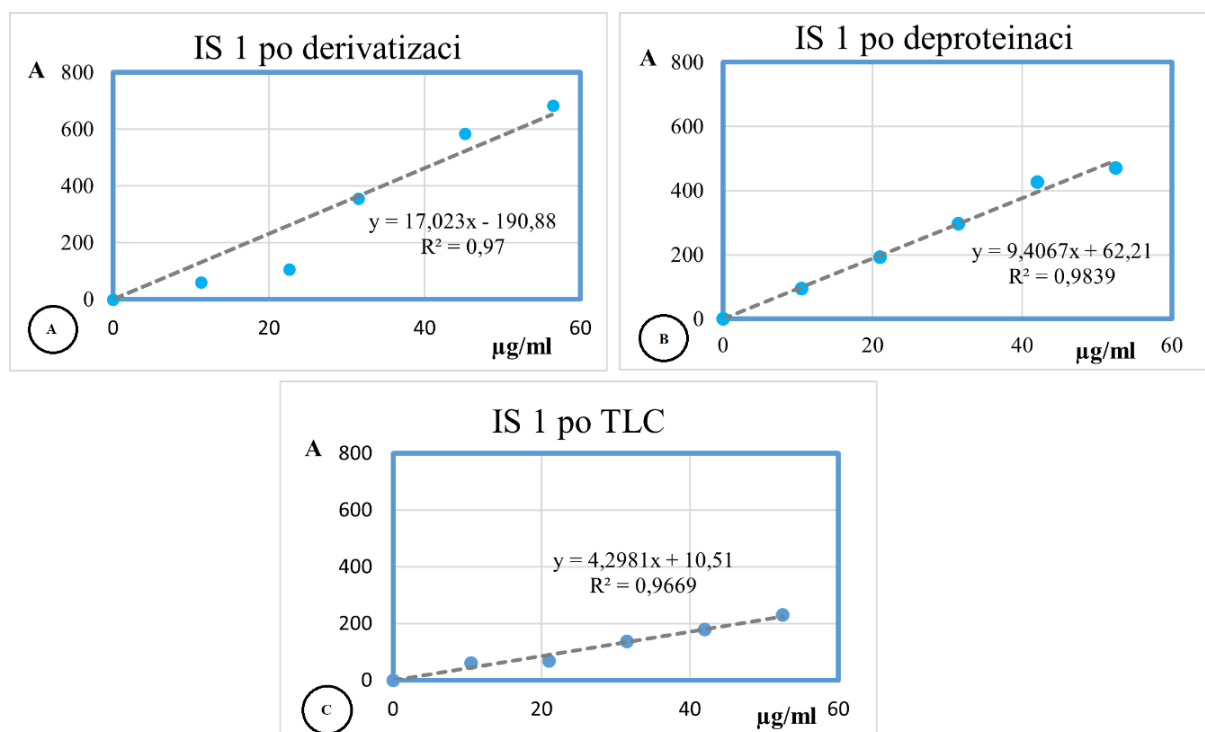
Z **Obrázku 9** A a B je zřejmé, že linearita křivky je výborná a je charakterizována korelačním koeficientem $R^2=0,9621$ a $R^2=0,9428$. Ztráty IS jsou při zařazení deproteinace velmi malé, a to 8,71 %. Velké ztráty jsme našli při zařazení TLC (viz. **Obrázek 9** C) a tyto ztráty činily 45,28 %. Tyto hodnoty platí pro frakci VMK a jsou používány i pro přepočty ploch na koncentrace v dalších plazmatických frakcích.

V mé práci jsem se zabývala analýzou pravdivosti tohoto zjednodušení. Z analytického hlediska by každá frakce měla mít vlastní vnitřní standard, který by umožňoval přesný přepočítání plochy píku na koncentraci. Chemické složení jednotlivých frakcí lidské plazmy je odlišné.

Potvrzení popsané metodiky pomocí výpočtů koncentrací mastných kyselin v dalších frakcích nebylo prozatím popsáno.

3.5 Tripentadekanoin jako interní standard pro triacylglyceroly

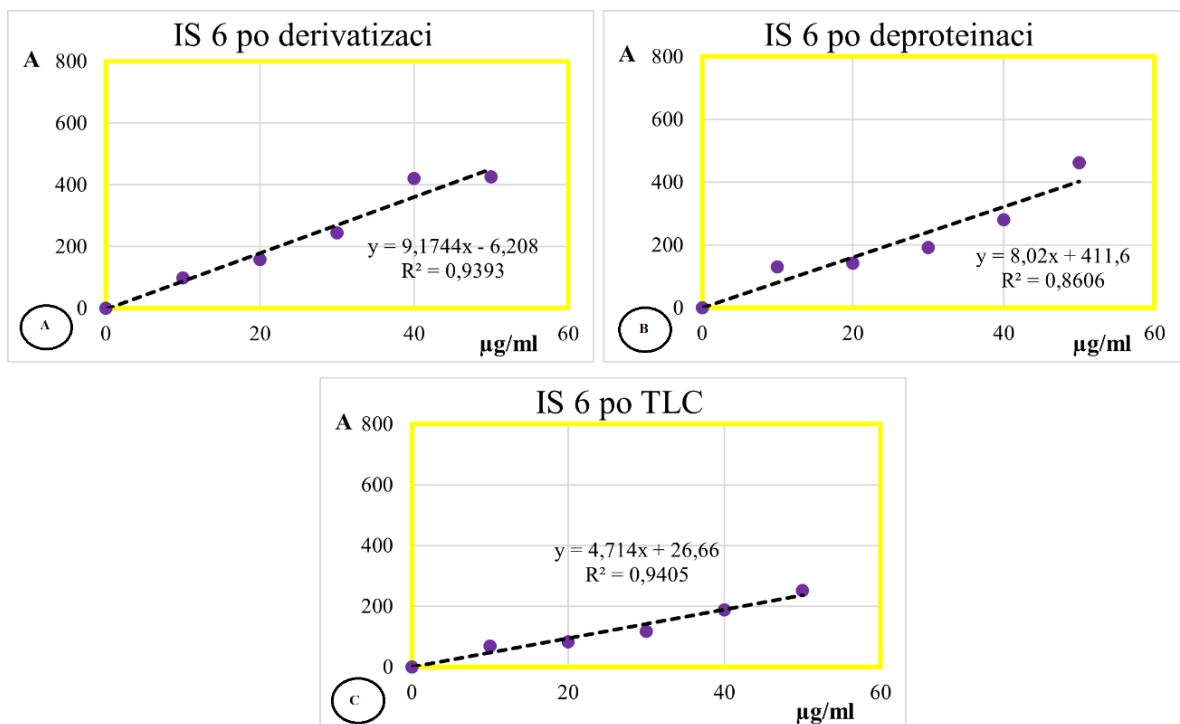
Koncentrační závislosti ve frakci TAG jsou odlišné, a to hlavně při použití pouze derivatizace čistého standardu, kde odezva použitých koncentrací je nezvykle vysoká (viz. **Obrázek 10 A**). Tato anomálie se při měření koncentrace standardu v plazmě neprojevila a závislosti jsou srovnatelné s dříve používaným standardem. Odezva plochy píku při použití celého analytického postupu je nižší. Směrnice závislosti IS 1 je 4,2981 oproti 6,059 u IS 5. Je tedy zřejmé, že koncentrace TAG jsou při použití původního standardu nadhodnocené v průměru o 40,97 % (viz **Obrázek 10 C**).



Obrázek 10 Kalibrační křivky IS 1

3.6 1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin jako interní standard pro fosfolipidy

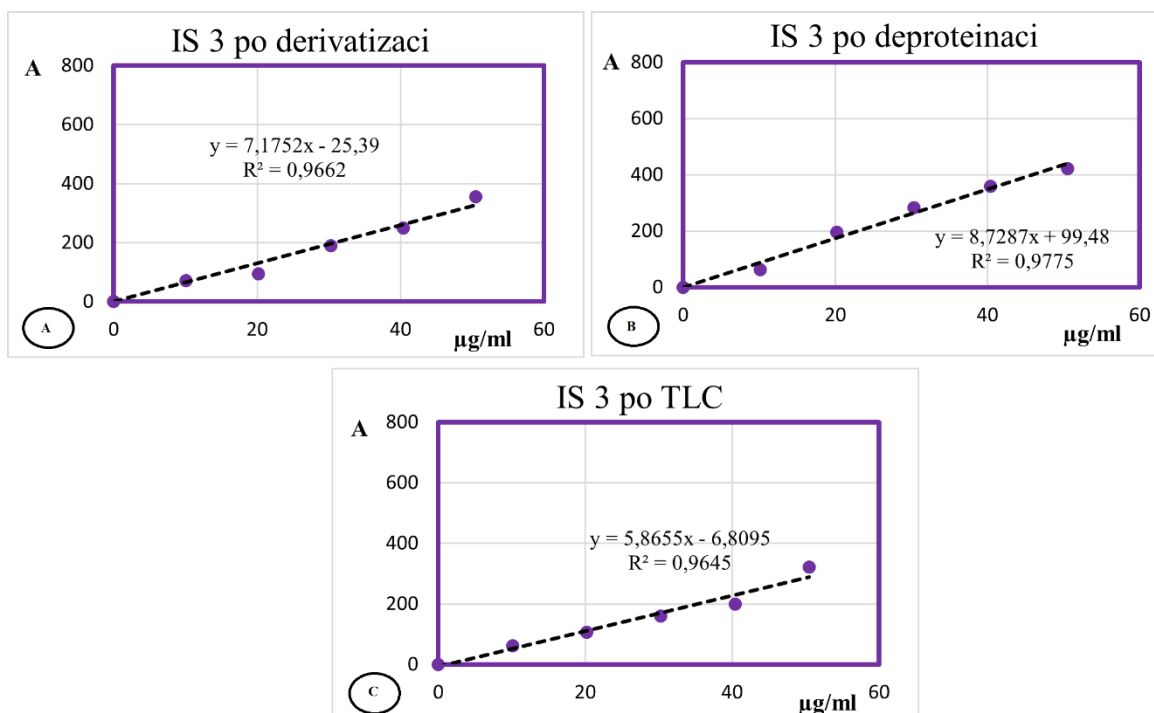
Při využití IS 6 pro frakci PL je z kalibračních křivek na **Obrázku 11** zřejmé, že jejich linearita je velmi dobrá. Hodnoty korelačních koeficientů jsou $R^2=0,9393$, $0,8606$ a $0,9405$. Ztráty po deproteinaci jsou velmi malé, a to asi 12,58 %. Velké ztráty jsou však opět zaznamenány po provedení TLC, a to 48,62 %. Výsledná směrnice u IS 5 je 6,059 a směrnice IS 6 je 4,714 (viz. **Obrázek 11 C**). Z tohoto srovnání plyne, že IS 5 nadhodnocuje výsledky koncentrací PL o 28,53 %.



Obrázek 11 Kalibrační křivky IS 6

3.7 1,3-dipentadekanoin jako interní standard pro diacylglyceroly

Na Obrázku 12 jsou uvedeny kalibrační křivky IS 3, kde je jejich linearita výborná, protože hodnoty korelačních koeficientů jsou $R^2 = 0,9662$, $0,9775$ a $0,9645$. Směrnice těchto kalibračních křivek pro frakci DAG jsou při použití IS 3 v porovnání s IS 5 zcela rozdílné.

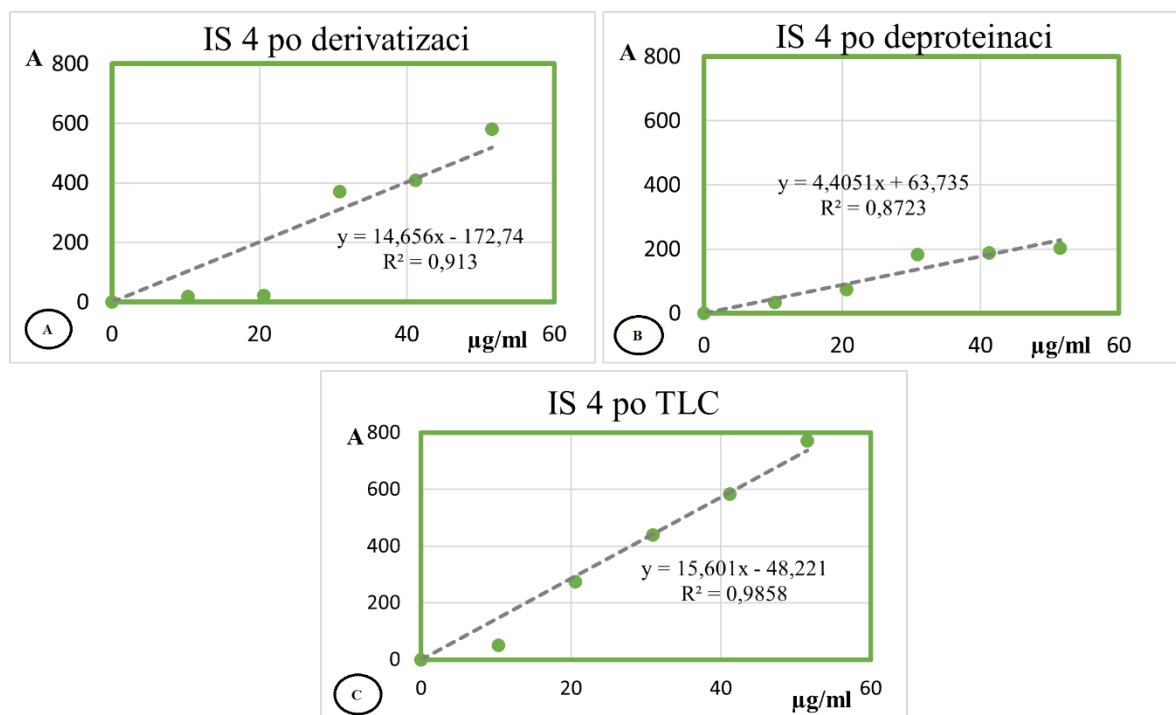


Obrázek 12 Kalibrační křivky IS 3

Po derivatizaci IS 3 je směrnice 7,1752 (viz. **Obrázek 12 A**). oproti 11,072. Ztráty u analytického postupu po TLC ve srovnání s derivatizací jsou v porovnání se ztrátami u IS 5 dvojnásobně menší. (18,25 a 45,28 %). Po zařazení TLC je směrnice IS 3 5,8655 (viz **Obrázek 12 C.**) a směrnice IS 5 6,059. Dochází tím k nadhodnocení koncentrací standardně využívaným postupem pouze o 3,28 %. V případě DAG je použití celého analytického postupu s původním standardem oprávněné.

3.8 Kyselina pentadekanová jako interní standard pro volné mastné kyseliny

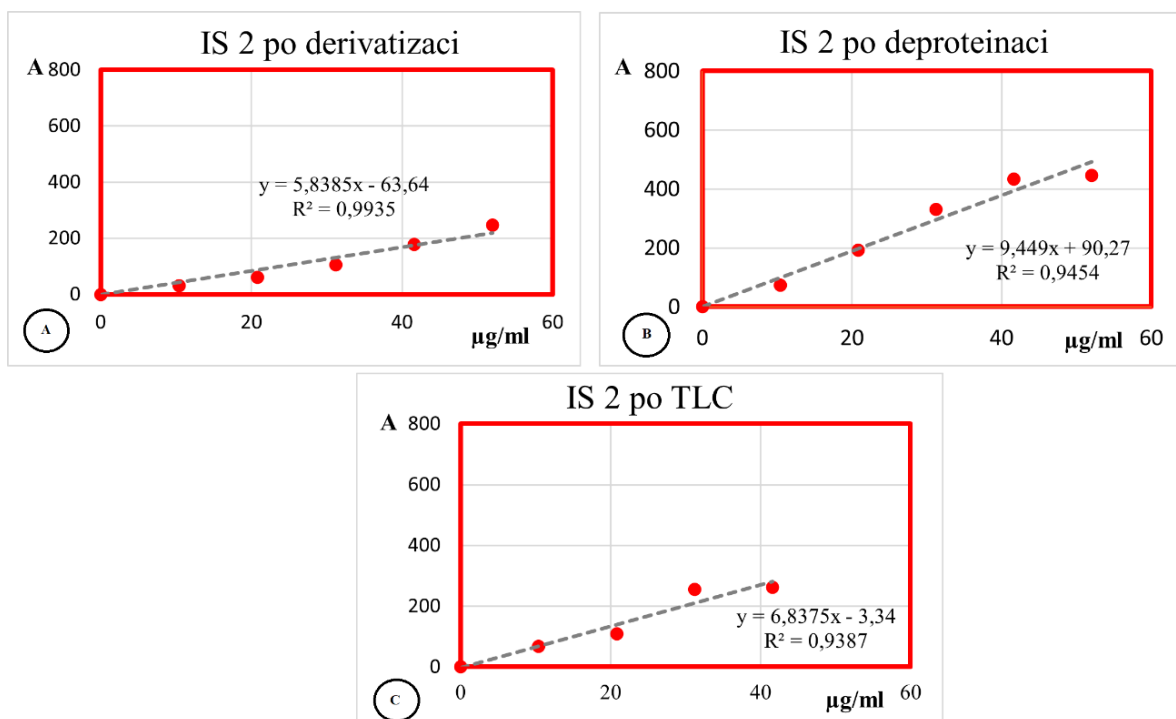
Použití levnějšího a dostupnějšího standardu kyseliny pentadekanové (IS 4) ve frakci VMK se ukázalo jako chybné. Směrnice jednotlivých závislostí u kalibračních přímk při použití derivatizace a deproteinace jsou odlišné (viz. **Obrázek 13 A a B**). Tyto směrnice jsou 14,656 a 4,4051. Koncentrační závislost plochy píku vs. koncentrace je zcela odlišná. Je zřejmé, že při separaci VMK po TLC došlo i k vyškřábání sousední frakce (TAG nebo DAG), protože nalezené plochy píků jsou proti původnímu standardu více než dvojnásobné. Tomuto faktu odpovídá směrnice koncentrační závislosti, která je téměř trojnásobná (15,601 vs. 6,059).



Obrázek 13 Kalibrační křivky IS 4

3.9 Cholesteryl pentadekanoát jako interní standard pro estery cholesterolu

Výsledky koncentrací MK ve frakci ECH jsou zatíženy prozatím nespécifikovanou chybou. Zřejmě došlo k neúplné derivatizaci, nebo nepřítomnosti katalyzátoru, nebo k odlišnému průběhu derivatizační reakce v přítomnosti silikagelu při TLC. Z grafu závislosti plochy píku na koncentraci je viditelné, že použití celého analytického postupu nevykazuje podstatné změny a směrnice závislosti je téměř shodná 6,8375 vs. 6,059 (viz. **Obrázek 14 C**). Dochází však k nesprávnému navýšení výsledných koncentrací o 12,85 % v případě zavedení nového analytického postupu.



Obrázek 14 Kalibrační křivky IS 5

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provedení validace metody chromatografického dělení plazmatických lipidů na tenké vrstvě. Důvodem byla prozatím neprovedená validace doposud používaného analytického postupu, ve kterém se pro přepočty ploch píků na koncentrace MK ve všech plazmatických frakcích používá pouze jeden IS. Tím je nefyziologická MK (kyselina *cis*-13,16,19-dokosatrienová), která je využívána pro VMK i pro výpočty koncentrací MK v ostatních frakcích (PL, DAG, TAG a ECH).

Každá lipidová frakce, by správně z analytického hlediska měla mít svůj IS, z kterého by se přepočítávala koncentrace MK v dané frakci. V této studii byly pro srovnání s používaným standardem využity jako IS tyto fyziologické MK: pro PL 1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin, pro DAG 1,3-dipentadekanoin, pro VMK kyselina pentadekanová, pro TAG tripentadekanoin a pro ECH cholesteryl pentadekanoát.

Při využití IS pro frakci TAG bylo zjištěno, že při využití standardního IS dochází k nadhodnocení výsledných koncentrací o 40,97 %. K nadhodnocení výsledných koncentrací dochází také u frakcí PL a DAG. U frakce PL jsou výsledné koncentrace nesprávně navýšeny o 28,53 %. U DAG jsou koncentrace nadhodnocené pouze o 3,28 %. V tomto případě je tedy použití kyseliny *cis*-13,16,19-dokosatrienové jako IS oprávněné. Naopak ECH vykazují u nového analytického postupu nadhodnocení koncentrací o 12,85 %. Ve frakci VMK se použití levnějšího IS kyseliny pentadekanové ukázalo oproti standardně využívanému IS jako chybné. Výsledná směrnice koncentrační závislosti je téměř trojnásobná (15,601 oproti 6,059).

Podářilo se mi tedy zjistit, že u frakcí PL, DAG a TAG dochází u rutinně používané metody k nadhodnocení výsledných koncentrací v různé procentuální míře. Naopak u ECH dochází k nesprávnému navýšení výsledků při využití IS pro tuto frakci. Dále jsem zjistila, že využití levnějšího IS kyseliny pentadekanové ve srovnání s kyselinou *cis*-13,16,19-dokosatrienovou je nesprávné.

Závěrem bych doporučila pro úplné zpřesnění výsledků uvedené postupy opakovat vícekrát a znovu porovnávat s již zavedenou metodou. Dále pak mimo srovnávání směrníc a korelačních koeficientů kalibračních křivek také porovnání vypočtených koncentrací MK po TLC.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- ABOURJAILI, Georges, Norbert SHTAYNBERG a kol. Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology, and treatment. *Metabolism*. 2010, **59**(8):1210-1220
- ACEVEDO-FANI, Alejandra a Harjinder SINGH. Biophysical insights into modulating lipid digestion in food emulsions. *Progress in Lipid Research*. 2022, **85**
- AFONSO, Catarina B. a Corinne M. SPICKETT. Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation. *Redox Biology* . 2019, **23**
- AHERN, Kevin a Indira RAJAGOPAL. Fatty Acid Oxidation. In: Biology LibreTexts [online]. Oregon State University, 6. march 2021. [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: [6.11: Fatty Acid Oxidation-Biology LibreTexts](#)
- AHMADIAN, Maryam, Yuhui WANG a Hei Sook SUL. Lipolysis in adipocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010, **42**(5):555-559
- AKINBULE, Oluwafunke. Fatty acid and dietary fibre contents of some nigerian standardized soups nad dishes. Abeokuta, 2014, 98. Thesis. [online]. Federal University of Agriculture.
- BAYLY, Graham R. Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. Elsevier, 2014, 702-736. ISBN 9780702051401
- BELE, Archana A. a Anubhala KHALE. An Overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011, **2**(2):256-267
- BHAGAVAN, N.V. a Chung-Eun HA. Lipids III. Essentials of Medical Biochemistry. Elsevier, 2015, 321-337. ISBN 9780124166875
- BLUM, Francesca. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*. 2014, **75**(2):C18-C21
- BURDGE, Graham C. a Philip C. CALDER. Introduction to Fatty Acids and Lipids. CALDER, P.C., D.L. WAITZBERG a B. KOLETZKO, ed. *Intravenous Lipid Emulsions*. Basel: S. KARGER, 2014, 1-16. World Review of Nutrition and Dietetics. ISBN 978-3-318-02752-5
- CLARKE, S.D. a M.T. NAKAMURA. Fatty Acid Structure and Synthesis. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, 2013, 285-289. ISBN 9780123786319
- COLEMAN, Rosalind A. a Douglas G. MASHEK. Mammalian Triacylglycerol Metabolism: Synthesis, Lipolysis, and Signaling. *Chemical Reviews*. 2011, **111**(10):6359-6386

- CRUZ-HERNANDEZ, Cristina, Sagar K. THAKKAR a kol. Quantification of fatty acids in erythrocytes and plasma by fast gas chromatography. *Journal of Separation Science*. 2017, **40**(16):3289-3300
- DAY, L. Lipid Chemistry. *Encyclopedia of Food Grains*. Elsevier, 2016, 248-256. ISBN 9780123947864
- DOŁOWY, Małgorzata a Alina PYKA. Chromatographic Methods in the Separation of Long-Chain Mono-and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Chemistry*. 2015, **2015**:1-20
- EIBLER, Dorothee, Sabine KRÜGER a kol. Combined thin layer chromatography and gas chromatography with mass spectrometric analysis of lipid classes and fatty acids in malnourished polar bears (*Ursus maritimus*) which swam to Iceland. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1046**:138-146
- EL-BACHA, T. a A.G. TORRES. Phospholipids: Physiology. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 352-359. ISBN 9780123849533
- FAHY, Eoin, Dawn COTTER a kol. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011, **1811**(11):637-647
- FAHY, Eoin, Shankar SUBRAMANIAM a kol. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2005, **46**(5):839-861
- FREEMAN, Mason W. a Geoffrey A. WALFORD. Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier, 2016, 715-736.e7. ISBN 9780323189071
- FREITAS, Larissa, Tânia BUENO a kol. Monoglicérides: produção por via enzimática e algumas aplicações. *Química Nova*. 2008, **31**(6):1514-1521
- FUCHS, Beate, Rosmarie SÜSS a kol. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(19):2754-2774
- FUCHS, Beate, Yulia POPKOVA a kol. Separation of (Phospho)Lipids by Thin-Layer Chromatography. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. Elsevier. 2015, 375-405. ISBN 9780124172234
- GORDON, M.H. FATS. Classification. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, 2287-2292. ISBN 9780122270550
- GYAMFI, Daniel, Enoch OFORI AWUAH a Stephen OWUSU. Lipid Metabolism. *The Molecular Nutrition of Fats*. Elsevier, 2019, 17-32. ISBN 9780128112977

- HARVEY, David J. Gas Chromatography/Mass Spectrometry ☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2017. ISBN 9780124095472
- HOUCK, Max M., Jay A. SIEGEL. Separation Methods. *Fundamentals of Forensic Science*. Elsevier, 2015, 121-151. ISBN 9780128000373
- HOUTEN, Sander M., Sara VIOLANTE a kol. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*. 2016, **78**(1):23-44
- ICHIHARA, Ken'ichi, Chihiro KOHSAKA a kol. Determination of free fatty acids in plasma by gas chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2020, **603**
- Institut Galenus. Monoenové mastné kyseliny. [online]. ©2008-2022. [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: [Monoenové nenasycené mastné kyseliny \(galenus.cz\)](http://galenus.cz)
- ITO, M. Degradation of Glycolipids. *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, 2007, 193-208. ISBN 9780444519672
- ITONORI, S. a M. SUGITA. Glycophylogenetic Aspects of Lower Animals. *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, 2007, 253-284. ISBN 9780444519672
- KALÁSZ, Huba, Mária BÁTHORI a Klára L. VALKÓ. Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. Elsevier, 2020, 523-585. Handbook of Analytical Separations. ISBN 9780444640703
- KANG, Jing X a Jingdong WANG. *BMC Biochemistry*. 2005.**6**(1)
- KATAOKA, H. Amines: Gas Chromatography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2014. ISBN 9780124095472
- KENAR, James A., Bryan R. MOSER a Gary R. LIST. Naturally Occurring Fatty Acids. *Fatty Acids*. Elsevier, 2017, 23-82. ISBN 9780128095218.
- KO, Chih-Wei, Jie QU, a kol. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020, **17**(3):169-183
- KUMAR, Sanjeet, K. JYOTIRMAYEE a Monalisa SARANGI. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medical Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013,**18**(1):126-132

KUMAR, Yogesh, Sayed Md MUMTAZ a Mustaq AHMAD. HPLC: Principle and Maintenance with Application. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*. 2018, **2**(5):1618-1626

KWAN, Bonnie C.H., Florian KRONENBERG a kol. Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007, **18**(4):1246-1261

LIU, Ge a GIBSON Robert. A rapid method for the separation of the phospholipids from the neutral lipids in plasma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2020, **157**

LIU, Weilin, Aiqian YE a kol. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, **263**:52-67

LONGO, Nicola, Marta FRIGENI a Marzia PASQUALI. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016, **1863**(10):2422-2435

MARIAMENATU, Abeba Haile, Emebet Mohammed ABDU a Gerhard M. KOSTNER. Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) versus Deficiency of Omega-3 PUFAs in Modern-Day Diets: The Disturbing Factor for Their “Balanced Antagonistic Metabolic Functions” in the Human Body. *Journal of Lipids*. 2021, **2021**:1-15

MCNAMARA, Judith R., G. Russell WARNICK a Gerald R. COOPER. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **369**(2):158-167

MERRILL, Alfred H. Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, 2008, 363-397. ISBN 9780444532190

MEYER, V.R. CHROMATOGRAPHY | Principles. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2005, 98-105. ISBN 9780123693976.

MEYERS, C.L.F. a D.J. MEYERS. Thin-Layer Chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. 2008, **34**(1)

MEYNIER, Anne a Claude GENOT. Molecular and structural organization of lipids in foods: their fate during digestion and impact in nutrition. *OCL*. 2017, **24**(2)

MORAD, Hashem S. Moataz. Development of new highly active nano gold catalysts for selective oxidation reactions. 2014, 203. Thesis. [online]. University of Cardiff. Dostupné

z:https://www.researchgate.net/publication/307965030_Development_of_new_highly_active_nano_gold_catalysts_for_selective_oxidation_reactions

MZ-ANALYSENTECHNIK. Thin Layer Chromatography. [online]. 2022. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: [Thin Layer Chromatography-MZ-Analysentechnik GmbH \(mz-at.de\)](https://www.mz-at.de)

NESTERENKO, Pavel N. a Marianna D. PALAMAREVA. Liquid Chromatography: Principles. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018. ISBN 9780124095472

NICHOLSON, Reed A. a Alejandro G. MARANGONI. Diglycerides. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier, 2019, 70-73. ISBN 9780128140451

OBEIDAT, Yusra. The Most Common Methods for Breath Acetone Concentration Detection: A Review. *IEEE Sensors Journal*. 2021, **21**(13):14540-14558

ORDOVAS, J.M. Lipoproteins. *Encyclopedia of Human Nutrition*. Elsevier, 2013, 80-86. ISBN 9780123848857

PHAM, Thu Huong, Muhammad ZAEEM a kol. Targeting Modified Lipids during Routine Lipidomics Analysis using HILIC and C30 Reverse Phase Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1)

PINO, Verónica, Jared L. ANDERSON a kol. *Analytical Separation Science*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015. ISBN 9783527678129

POOLE, C.F. Detectors☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2016. ISBN 9780124095472

POOLE, C.F. Gas Chromatography. Column Technology. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2013. ISBN 9780124095472

POOLE, C.F. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. Principles. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2013. ISBN 9780124095472

POOLE, Colin F. Gas Chromatography. Instrumentation ☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018. ISBN 9780124095472

RABEL, Fredric a Joseph SHERMA. Thin-Layer Chromatography—Plate Technology. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018. ISBN 9780124095472

RECKLESS, J.P.D. a J.M. LAWRENCE. HYPERLIPIDEMIA. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, 3183-3192. ISBN 9780122270550

REICH, Eike a Valeria MAIRE-WIDMER. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY | Instrumentation ☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2017. ISBN 9780124095472

RUIZ-MATUTE, A.I., S. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ a kol. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC). *Modern Techniques for Food Authentication*. Elsevier, 2018, 415-458. ISBN 9780128142646

RUSCICA, Massimiliano, Cesare R. SIRTORI a kol. Lipoprotein(a): Knowns, unknowns and uncertainties. *Pharmacological Research*. 2021, **173**

SANKAR, Ravi P. a SNEHALATHA, Sai K. a kol. Applications of HPLC in Pharmaceutical Analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2019, **59**(1):117–124

SANTIAGO, Marina a Scott STROBEL. Thin Layer Chromatography. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*. Elsevier, 2013, 303-324. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780124200678

SHARMA, Kritika, Sujata NEGI a kol. Partical Glycerides – An Important Nonionic Surfactant for Industrial Applications: An overwie. 2017, **3**(1):10-19

SHELLIE, R.A. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier, 2013, 579-585. ISBN 9780123821669

SCHULZ, H. Fatty Acid Oxidation. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, 2013, 281-284. ISBN 9780123786319

SCHWINGSHACKL, Lukas a Georg HOFFMANN. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*. 2012, **4**(12):1989-2007

SIKORSKI, J.A. Atherosclerosis/Lipoprotein/Cholesterol Metabolism. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier, 2007, 459-494. ISBN 9780080450445

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, Ewa, Tomasz WYSOCZAŃSKI a kol. Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders-A Review. *Nutrients*. 2018, **10**(10)

STAUFFER, E. Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier, 2013, 596-602. ISBN 9780123821669

- STAUFFER, Eric, Julia A. DOLAN a Reta NEWMAN. Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*. Elsevier, 2008, 235-293. ISBN 9780126639711
- TINTO, W.F., T.O. ELUFIOYE a J. ROACH. Waxes. *Pharmacognosy*. Elsevier, 2017, 443-455. ISBN 9780128021040
- TRANCHIDA, Peter Q. a Luigi MONDELLO. Detectors and basic data analysis. *Basic Multidimensional Gas Chromatography*. Elsevier, 2020, 205-227. *Separation Science and Technology*. ISBN 9780128137451
- TVRZICKÁ, E., M. VECKA a kol. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography—flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2):337-350
- WEDAD Q., AL-Bukhaiti, Anwar NOMAN a kol. Gas Chromatography: Principles, Advantages ad Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2017, **6**(1):123-128
- XIAO, Changrui, Francis ROSSIGNOL a kol. Inherited disorders of complex lipid metabolism: A clinical review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2021, **44**(4):809-825
- ZECHNER, Rudolf, Robert ZIMMERMANN a kol. FAT SIGNALS-Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metabolism*. 2012, **15**(3):279-291