

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných mastných kyselin v lidské krvi získané technikou suché

kapky

Diplomová práce

2023

Bc. Leona Marinčinová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Leona Marinčinová**  
Osobní číslo: **C21457**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Stanovení vybraných mastných kyselin v lidské krvi získané technikou suché kapky**  
Téma práce anglicky: **Determination of Selected Fatty Acids in Human Blood Obtained by Dried Spot Technique**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Možnosti stanovení mastných kyselin v biologických vzorcích, zaměření na metody plynové chromatografie s hmotnostní a plamenově ionizační detekcí.  
Zpracování vzorku suché kapky krve před vlastní analýzou.

### Experimentální část:

Technika suché kapky krve, volba vhodných extrakčních činidel pro extrakci mastných kyselin ze vzorku suché kapky krve.  
Validace metody GC-MS pro stanovení vybraných mastných v lidské krvi získané technikou suché kapky.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení vybraných mastných kyselin v lidské krvi získané technikou suché kapky 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 (zákon 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 4. 5. 2023

Bc. Leona Marinčinová v. r.

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu své diplomové práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu psaní této práce věnoval. Zároveň bych ráda poděkovala Mgr. Michalu Kopčilovi, Ph.D. za užitečné rady a informace.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá možností stanovení vybraných mastných kyselin v lidské krvi (získané technikou suché kapky) metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Práce je zaměřena na přípravu vzorku před analýzou a sleduje vliv některých faktorů, které ovlivňují kvantitativní výsledky. Byly testovány různé techniky zavádění vnitřního standardu ke vzorku, stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při pokojové teplotě, 4 °C a -20 °C s přídavkem a bez přídavku antioxidačního činidla, butylovaného hydroxytoluenu. Z analytických parametrů metody byly určeny linearita a nepřesnost v sérii.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mastné kyseliny, suchá kapka krve, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

## **ANNOTATION**

This thesis deals with the possibility of determining selected fatty acids in human blood (obtained by the dried spot technique) by the method of gas chromatography with mass detection. This thesis is focused on sample preparation before analysis and the influence of some factors affecting quantitative results. Different techniques of introducing an internal standard to the sample were tested, the stability of selected fatty acids in a sample of dried blood spot at room temperature, 4 °C, and -20 °C with and without the addition of the antioxidant agent, butylated hydroxytoluene. Linearity and imprecision were determined from the analytical parameters of the method.

## **KEYWORDS**

fatty acids, dried blood spot, gas chromatography with mass detection

# OBSAH

ÚVOD .....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Lipidy .....	14
1.1.1 Mastné kyseliny .....	14
2.1 Metoda suché kapky krve .....	17
2.1.1 Odběr vzorku suché kapky krve .....	17
2.1.2 Přeprava a skladování vzorků suché kapky krve .....	18
2.1.3 Parametry ovlivňující kvantitativní analýzu vzorků suché kapky krve .....	19
2.1.4 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve .....	20
2.1.5 Využití techniky suché kapky krve v klinické praxi .....	20
3.1 Možnosti stanovení mastných kyselin v biologických vzorcích .....	21
3.1.1 Typy biologických vzorků pro stanovení mastných kyselin .....	21
3.1.2 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií .....	22
3.1.3 Analýza mastných kyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií .....	26
4.1 Referenční rozmezí mastných kyselin v biologických vzorcích .....	30
2 CÍL PRÁCE .....	31
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
3.1 Vzorky .....	32
3.2 Chemikálie .....	32
3.3 Pomůcky a přístrojové vybavení .....	34
3.4 Pracovní roztoky .....	35
3.5 Příprava vzorků suché kapky krve .....	42
3.6 Pracovní postupy stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí .....	51
3.6.1 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsných standardech o koncentraci asi 20 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu .....	51
3.6.2 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu S5 .....	52
3.6.3 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu o koncentraci asi 10 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu .....	52
3.6.4 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu o koncentraci asi 10 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu (příprava methylesterů mastných kyselin) .....	52
3.6.5 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve .....	52

3.6.6 Podmínky pro stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí .....	53
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	54
4.1. Určení retenčních časů ethylesterů mastných kyselin při separaci plynovou chromatografií.....	56
4.2. Určení odezvy detektoru na koncentraci jednotlivých ethylesterů vybraných mastných kyselin.....	58
4.3. Zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí .....	59
4.3.1 Vyjmutí vyseknutého terčíku vzorku suché kapky krve před krokem derivatizace mastných kyselin.....	59
4.3.2 Porovnání dvou typů derivatizačních činidel pro přípravu ethylesterů mastných kyselin.....	59
4.3.3 Volba vhodného extrakčního činidla ethylesterů mastných kyselin z reakční směsi .....	60
4.4 Testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky stanovení hladin vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve .....	60
4.4.1 Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v celé krevní skvrně a vyseknutém terčíku vzorku suché kapky krve .....	60
4.4.2 Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčíku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve .....	62
4.4.3 Technika zavádění vnitřního standardu u vzorků suché kapky krve .....	64
4.4.4 Stabilita mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve při pokojové teplotě, 4 °C a -20 °C .....	66
4.4.5 Analytické parametry metody.....	66
5 ZÁVĚR .....	70
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	71
7 PŘÍLOHY .....	79



## SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A ROVNIC

<b>Obrázek 1</b> $\beta$ -oxidace mastných kyselin, převzato z [1].....	16
<b>Obrázek 2</b> Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin.....	42
<b>Obrázek 3</b> Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných vybraných mastných kyselin.....	43
<b>Obrázek 4</b> Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu.....	44
<b>Obrázek 5</b> Způsob pipetování roztoku vnitřního standardu (nahore vlevo) a krve (dole vlevo) na odběrovou kartu, a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (dole vpravo) pro porovnání poměrů ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu .....	44
<b>Obrázek 6</b> Způsob pipetování roztoku vnitřního standardu (šedé kruhy nahore) a krve (červené kruhy nahore), a vyseknutí terčíku ze vzorku vnitřního standardu (šedé kruhy dole) a vzorku suché kapky krve (červené kruhy dole) pro porovnání poměrů ploch píku jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu.....	45
<b>Obrázek 7</b> Způsob pipetování krve (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů ploch píku jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu .....	46
<b>Obrázek 8</b> Způsob pipetování krve (vlevo nahore), roztoku vnitřního standardu na vzorek zaschlé krve (vpravo nahore) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vlevo dole) pro porovnání poměrů ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu .....	46
<b>Obrázek 9</b> Způsob pipetování krve (obrázky nahore) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení nepřesnosti metody stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve .....	47
<b>Obrázek 10</b> Způsob pipetování krve (obrázky nahore) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve.....	48

<b>Obrázek 11</b> Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při pokojové teplotě .....	49
<b>Obrázek 12</b> Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při 4 °C .....	50
<b>Obrázek 13</b> Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při –20 °C.....	51
<b>Tabulka 1</b> Vybraná derivatizační činidla využívaná při analýze mastných kyselin metodou plynové chromatografie .....	24
<b>Tabulka 2</b> Vybraná derivatizační činidla využívaná při analýze mastných kyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie .....	28
<b>Tabulka 3</b> Příprava zásobních roztoků mastných kyselin .....	36
<b>Tabulka 4a</b> Příprava pracovních roztoků mastných kyselin o koncentraci asi 100 mg/l.....	37
<b>Tabulka 4b</b> Příprava pracovních roztoků mastných kyselin o koncentraci asi 100 mg/l.....	38
<b>Tabulka 5</b> Přehled mastných kyselin v jednotlivých sadách .....	38
<b>Tabulka 6a</b> Příprava směsného standardu mastných kyselin o koncentraci asi 10 mg/l.....	38
<b>Tabulka 6b</b> Příprava směsného standardu mastných kyselin o koncentraci asi 10 mg/l.....	39
<b>Tabulka 7a</b> Příprava směsného standardu (S5) mastných kyselin .....	39
<b>Tabulka 7b</b> Příprava směsného standardu (S5) mastných kyselin .....	40
<b>Tabulka 8</b> Příprava směsných standardů S0–S4 .....	41
<b>Tabulka 9a</b> Koncentrace mastných kyselin ve směsných standardech S1–S5.....	41
<b>Tabulka 9b</b> Koncentrace mastných kyselin ve směsných standardech S1–S5 .....	42
<b>Tabulka 10</b> Retenční časy ethylesterů a methylesterů vybraných mastných kyselin, cílové a referenční m/z pro ethylestery mastných kyselin .....	57
<b>Tabulka 11</b> Plochy píků ethylesterů mastných kyselin vztažených na $\mu\text{mol/l}$ .....	58
<b>Tabulka 12</b> Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu z celé krevní skvrny a vyseknutém terčíku krevní skvrny stejného vzorku suché kapky krve (n = 3).....	61

<b>Tabulka 13</b> Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčíku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve (n = 3) .....	63
<b>Tabulka 14</b> Určení nepřesnosti v sérii pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve (n = 10).....	67
<b>Tabulka 15</b> Parametry kalibračních křivek pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (poměr plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu počítaný prvním způsobem) .....	68
<b>Tabulka 16</b> Parametry kalibračních křivek pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (poměr plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu počítaný druhým způsobem) .....	69
<b>Graf 1</b> Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu v celé krevní skvrně a ve vyseknutém terčíku vzorku suché kapky krve (n = 3).....	62
<b>Graf 2</b> Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčíku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve (n = 3) .....	64
<b>Rovnice 1</b> První způsob výpočtu poměru plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu .....	68
<b>Rovnice 2</b> Druhý způsob výpočtu poměru plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu .....	68

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	protein přenášející acyl (z angl. acyl carrier protein)
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylhydroxytoluen
CPT	karnitinpalmitoyltransferáza (z angl. carnitine palmitoyltransferase)
DBS	suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
DSS	suchá kapka potu (z angl. dried sweat spot)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla (z angl. evaporative light scattering detector)
ETF	elektron přenášející flavoprotein (z angl. electron transfer flavoprotein)
ETF <sub>FDH</sub>	elektron přenášející flavoprotein dehydrogenáza (z angl. electron transfer flavoprotein dehydrogenase)
FAD/FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
FAEE	ethylestery mastných kyselin (z angl. fatty acids ethyl esters)
FAME	methylestery mastných kyselin (z angl. fatty acids methyl esters)
FID	plamenově ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
FTA	technologická společnost Flinders (z angl. Flinders Technology Association)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS-MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NP	normální fáze (z angl. normal phase)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acids)
RP	reverzní fáze (z angl. reversed phase)
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. solid phase extraction)
TAG	triacylglyceroly
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
UV	ultrafialová (z angl. ultraviolet)

## ÚVOD

Metoda suché kapky krve (DBS; z angl. dried blood spot) je alternativní odběrovou technikou. Využívá se především při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických poruch. Oproti běžné venepunkci má výhodu v tom, že se jedná o méně invazivní odběr krve, kdy jsou pacientovi odebrány řádově jen desítky mikrolitrů krve. Jednodušší je také transport do laboratoře a uchovávání vzorků DBS. U celé řady analytů bylo prokázáno, že jsou ve vzorku DBS v porovnání s kapalnou krví více stabilní. Díky těmto a dalším výhodám se technika DBS stále rozšiřuje do více oborů. Uplatňuje se například při terapeutickém monitorování hladin léčiv, v preklinických studiích při vývoji nových léčiv, proteomice nebo metabolomice.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lipidy

Lipidy představují rozmanitou škálu sloučenin, které se klasifikují na základě jejich rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Zahrnují tuky, oleje, steroidy a vosky. Mají různou úlohu. Lze je obecně rozdělit do dvou skupin podle polaritě na polární a nepochární. Polární lipidy mají převážně strukturní úlohu, jedná se například o fosfolipidy. Nepochární lipidy jako triacylglyceroly (TAG) jsou zásobní formou energie.

Lipidy můžeme dále dělit na jednoduché, složené a odvozené lipidy a prekurzory lipidů. Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin (MK) s různými alkoholy. Jde o tuky a vosky. Složené lipidy jsou estery MK obsahující kromě alkoholu a MK ještě další skupiny. Mezi tyto lipidy řadíme fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny, sulfolipidy a aminolipidy. Mezi prekurzory lipidů a odvozené lipidy patří MK, glycerol, steroidy, ketolátky, uhlovodíky, vitaminy rozpustné v tucích a některé hormony.

Některé lipidy nedokáže náš organismus syntetizovat, a proto jsou nezbytnou složkou potravy. Mezi takové lipidy patří například některé polynenasycené MK (PUFA).

### 1.1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny se v přírodních tucích vyskytují především ve formě esterů, ale vyskytují se i v neesterifikované formě jako volné MK. Základní struktura je tvořena dlouhým alifatickým řetězcem s karboxylovou skupinou na jednom konci a methylovou skupinou na konci druhém. Uhlovodíkový řetězec může být nasycený nebo nenasycený. MK v buňkách pocházejí buď z exogenních zdrojů, nebo ze syntézy *de novo*.

#### Syntéza mastných kyselin

Syntéza MK probíhá v cytosolu buňky. Jde o energeticky náročný proces. Vstupní látkou pro syntézu je acetylkoenzym A (acetyl-S-CoA). Konečným produktem je většinou palmitát. Tento proces katalyzují acetyl-S-CoA-karboxyláza a komplex syntázy MK.

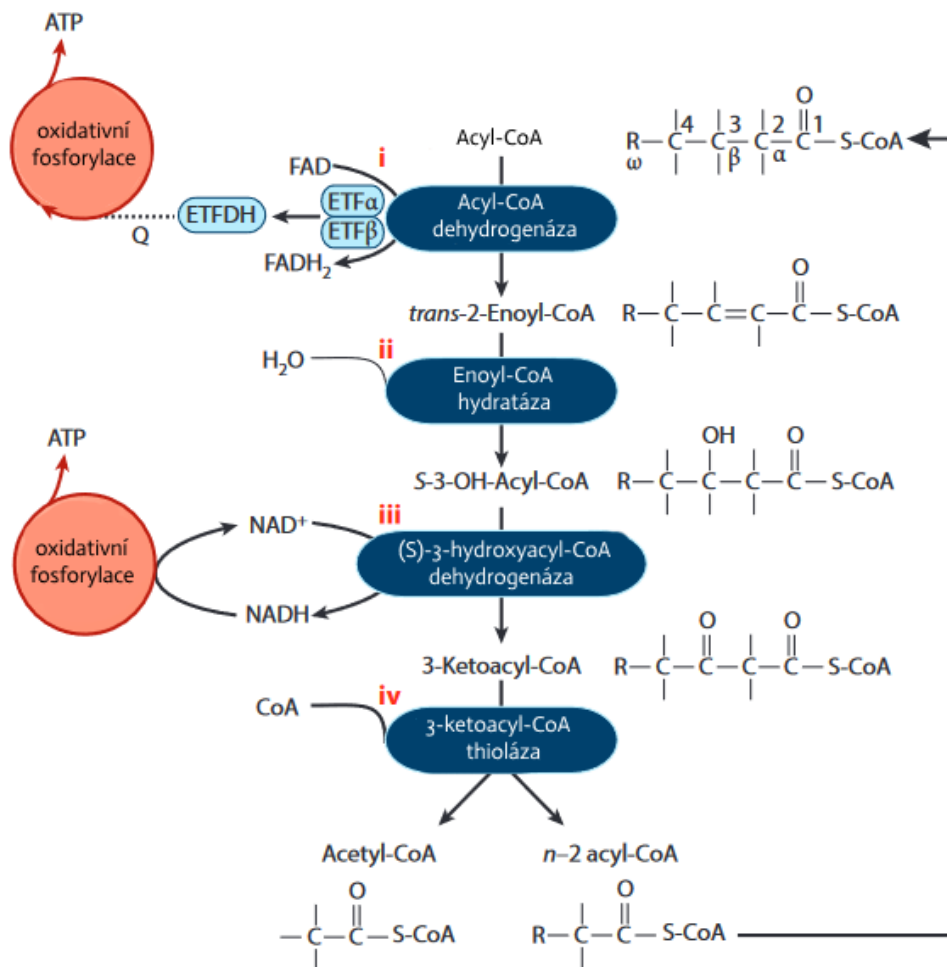
Proces biosyntézy MK lze rozdělit do 3 fází. První fází je karboxylace acetyl-S-CoA na energeticky bohatší malonyl-S-CoA. Tento proces probíhá na enzymovém komplexu acetyl-S-CoA-karboxylázy, který se skládá ze tří podjednotek, biotinu, biotinkarboxylázy a karboxyltransferázy. Prvním krokem přeměny acetyl-S-CoA na malonyl-S-CoA je karboxylace biotinu za účasti ATP, druhým krokem je přenos karboxylu na acetyl-S-CoA za

vzniku malonyl-*S*-CoA. Druhá fáze zahrnuje sled reakcí, jimiž se z malonyl-*S*-CoA syntetizuje nasycený 16-uhlíkatý řetězec kyseliny palmitové. Tyto reakce katalyzuje multienzymový komplex syntázy MK. Součástí multienzymového komplexu je protein přenášející acyl (ACP; z angl. acyl carrier protein), který slouží jako nosič substrátů a meziproductů vznikajících činností jednotlivých enzymů komplexu syntázy MK. Malonyl-*S*-CoA navázaný na ACP podstupuje sled reakcí, kondenzaci, první redukci, dehydrataci a druhou redukci. Těmito kroky je acyl prodlužován (v prvním cyklu acetyl) o C<sub>2</sub> jednotku. Prodloužený acyl o dva atomy uhlíku se přenese z ACP na thiolovou skupinu zbytku cysteinu jednoho z enzymů komplexu. Na uvolněnou thiolovou skupinu se znovu připojí malonylová skupina a proběhne stejný sled reakcí. Tyto cykly se opakují, dokud nevznikne palmitát. Poslední fází je aktivace palmitátu koenzymem A (HS-CoA) za účasti ATP a katalýzy thiokinázou. Vznikne palmitoyl-*S*-CoA, který se zapojí do syntézy lipidů. Využije se pro tvorbu MK s delším řetězcem nebo pro tvorbu nenasycených MK.

### **Odbourávání mastných kyselin**

Zatímco biosyntéza MK probíhá v cytosolu, odbourávání probíhá v mitochondriích a peroxisomech. Proces odbourávání se označuje jako  $\beta$ -oxidace. Ačkoli jsou MK oxidovány na acetyl-*S*-CoA a syntetizovány z acetyl-*S*-CoA, oxidace MK není prostým opakem biosyntézy. Oddělení oxidace v mitochondriích a biosyntézy v cytosolu umožňuje, aby byl každý proces řízen samostatně.

Odbourávání MK je aerobní proces, který vyžaduje přítomnost kyslíku. Tento proces zahrnuje postupné štěpení dvouuhlíkatých jednotek acetyl-*S*-CoA prostřednictvím cyklické řady reakcí katalyzovaných samostatnými enzymy, nejde tedy o multienzymové komplexy jako v případě syntézy MK. MK jsou do mitochondrií transportovány ve formě acylkarnitinů, které vznikají za katalýzy karnitinpalmitoyl(acyl)transferázy (CPT-1). Uvnitř mitochondrií je acylkarnitin přeměněn za katalýzy CPT-2 zpět na acyl-*S*-CoA. Ten se poté odbourává sledem reakcí (dehydrogenace, hydratace, dehydrogenace a thiolytické štěpení), při nichž se z jeho karboxylového konce odštěpí vždy dva uhlíky tak, že se v jednotlivém cyklu vytvoří jedna molekula acetyl-*S*-CoA. Během tohoto procesu vzniká jedna molekula NADH a jedna molekula FADH<sub>2</sub>. Schéma  $\beta$ -oxidace je znázorněno na obrázku 1.



**Obrázek 1**  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, převzato z [1]

Jednotlivé kroky jsou označeny i-iv. Acyl-S-CoA-dehydrogenáza používá jako akceptor elektronů FAD, který je navázaný na enzymu. FADH<sub>2</sub> navázaný na enzymu je oxidován flavoproteinem přenášejícím elektrony (heterodimer ETF $\alpha$  a ETF $\beta$ ) za katalýzy ETF-dehydrogenázou (ETFDH), elektrony jsou přeneseny na koenzym Q (Q) [1].

### Funkce mastných kyselin

Mastné kyseliny, jak volné, tak i jako součást komplexních lipidů, hrají klíčovou úlohu v metabolismu. Jsou důležitými zdroji energie, slouží jako základní složky všech membrán a také jako regulátory genů. Fungují jako tepelná a elektrická izolace, mechanicky chrání orgány.

Vedle sacharidů jsou MK významným zdrojem energie pro většinu aerobních tkání, ne však pro mozek. Tkáně využívají MK jako alternativu glukózy. Oxidace MK nabývá na významu v době omezené dostupnosti glukózy.

Dále jsou MK součástí fosfolipidů buněčných membrán. Existuje pestrá paleta fosfolipidů. Složení MK je ovlivněno mimo jiné stravou, dále stavem metabolismu, působením



hormonů, stavem buňky a genetikou. Složení MK v buněčné membráně ovlivňuje fyzikální vlastnosti membrány, což následně ovlivňuje funkci membránových proteinů a pohyb proteinů v membráně.

Řada MK je schopna regulovat expresi genů nebo aktivitu transkripčních faktorů. To umožňuje MK regulovat metabolické procesy, jako je syntéza a oxidace MK, sestavovat lipoproteiny a regulovat zánět a citlivost na insulin.

## **2.1 Metoda suché kapky krve**

Metoda suché kapky krve (DBS) má vůči klasickému odběru krve hned několik výhod. V první řadě je jen málo invazivní a vyžaduje pouze mikrolitry krve. Manipulace se vzorky DBS, skladování a přeprava jsou možné při pokojové teplotě. Analyty ve vzorcích DBS lze měřit různými chromatografickými, imunochemickými a molekulárně biologickými metodami a hmotnostní spektrometrií. Aplikace techniky DBS metody je dnes poměrně rozšířená. Využívá se při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických chorob, toxikokinetických či farmakokinetických studiích, v klinické farmakologii, forenzní toxikologii a při dopingových testech [2, 3].

### **2.1.1 Odběr vzorku suché kapky krve**

Technika DBS obvykle spočívá v odebrání několika kapek kapilární krve, které se získávají píchnutím malou lancetou do paty nebo prstu. Krev se odebírá na filtrační papír, který je ve formátu kartiček známých jako Guthrieho karty. Vzorky krve se nechají jednoduše bez dalšího zpracování zaschnout. Z chemického hlediska jsou analyty se složkami krve adsorbovány na pevnou matici na bázi celulózy. Adsorpce a pevný charakter vzorku způsobují, že analyty jsou obvykle méně reaktivní než v tekutém vzorku krve. Analyty často vykazují dobrou stabilitu za okolních podmínek po dobu několika dní, v některých případech i několika měsíců [4].

Vzhledem k tomu, že odběr vzorku krve zahrnuje pouze píchnutí do prstu, je možné, aby si ho pacient provedl sám, bez asistence školené osoby. Jelikož je potřeba malé množství vzorku krve, je technika DBS využitelná i tehdy, když je dostupnost krve omezená, to se týká především novorozenců nebo kriticky nemocných pacientů. Techniku DBS se nedoporučuje používat pro analýzu těkavých látek nebo pro kontaminované či hemolyzované vzorky krve [4, 5].

Po zaschnutí krve je vzorek odeslán do laboratoře k analýze. V laboratoři se obvykle ze zaschlého vzorku krve na odběrové kartě vysekne malý disk s definovaným průměrem a provede se extrakce analytů do vhodného rozpouštědla [6].

### **Typy odběrových karet pro techniku suché kapky krve**

Odběrové karty jsou nejčastěji vyrobeny z čisté celulózy. Jedná se o cenově dostupný materiál. Tento typ karet je již několik desetiletí používán při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických chorob. Obecně lze říci, že pro aplikaci plné krve nebo jiných biologických tekutin postačuje jakákoli porézní celulóza. Je však důležité posoudit použitelnost daného typu materiálu pro konkrétní analýzu [7].

Další skupinou jsou celulózové odběrové karty ošetřené různými patentovanými chemikáliemi. Například použití FTA odběrových karet (z angl. Flinders Technology Association) má výhodu v inaktivaci virů, čímž je sníženo riziko infekce. FTA karty mohou být impregnované také různými detergenty a dalšími látkami, čehož se využívá například při technice polymerázové řetězové reakce (PCR). Obsahují látky, které vedou k lýze buněk, denaturaci proteinů a inhibici nukleáz [4, 7, 8].

Problémem při používání odběrových karet z celulózy je vliv hodnoty hematokritu a chromatografický účinek na hladinu stanovovaných analytů. Z tohoto důvodu jsou zvažovány i alternativní necelulózové odběrové karty. Příkladem jsou nitrocelulózové nebo nylonové odběrové karty nebo membrány ze skleněných vláken [7, 8].

Materiál odběrové karty by měl vykazovat výrazné hydrofilní vlastnosti a homogenní strukturu, která umožňuje rovnoměrnou a reverzibilní adsorpci krevních složek včetně proteinů a dalších biologicky aktivních látek v pórech membrány. Pro zlepšení těchto vlastností je povrch odběrových karet různým způsobem upravován [5].

### **2.1.2 Přeprava a skladování vzorků suché kapky krve**

Před skladováním či přepravou vzorků DBS je velmi důležité, aby aplikovaná krev byla zcela vysušena. Doba sušení obvykle závisí na objemu vzorku krve a typu odběrové karty. Obecně se doporučuje, aby doba sušení vzorků krve byla mezi 2-3 hodinami při okolní teplotě. Je nutné zajistit volný přístup vzduchu, avšak je nutné zabránit vystavení vzorků přímému slunečnímu světlu [5].

Přeprava odběrových karet se vzorky DBS je v porovnání se vzorky plné krve mnohem jednodušší a levnější, s nadsázkou lze konstatovat, že odběrové karty lze zaslat jako běžný

dopis. Technika DBS je vhodná v situacích, kdy je studie prováděna na odlehlých místech a v oblastech, kde není možné vzorky krve uchovávat a zpracovávat, tedy tam, kde nejsou k dispozici chladničky, mrazáky a odstředivky, případně v místech, kde není elektrický proud [4, 9].

Po zaschnutí krve na odběrové kartě je inaktivována většina patogenů, čímž je sníženo riziko biologického ohrožení spojené s přepravou vzorků. Snížení rizika biologického ohrožení spolu s jednoduchým skladováním a přepravou (bez nutnosti použití suchého ledu) umožnilo, že se na vzorky DBS nevztahují předpisy o nebezpečných materiálech při přepravě [3].

Skladování vzorků DBS by mělo probíhat bez dosahu přímého slunečního světla a mimo vysokou vlhkost. Pro dlouhodobé skladování vzorků DBS se doporučuje používat sáčky s absorbentem vlhkosti. Pro analýzu látek nestabilních při okolní teplotě je nutné, aby karty se vzorky DBS byly skladovány při nízké teplotě, například při 2-8 °C, -20 °C nebo dokonce -80 °C [5].

### **2.1.3 Parametry ovlivňující kvantitativní analýzu vzorků suché kapky krve**

Ačkoliv má technika DBS mnoho výhod, jednoduchý a málo invazivní způsob odběru krve, přepravu, manipulaci a uchovávání odběrových karet se vzorky DBS, ošetření odběrové karty pro zvýšení stability analyzovaných látek, existuje celá řada parametrů, které ovlivňují kvantitativní výsledky. Jmenovitě jde především o chromatografické účinky, vliv hodnoty hematokritu, objemové účinky a také o stabilitu analytů [10, 11].

Analýza vzorků DBS může být ovlivněna hodnotou hematokritu. Hematokrit je definován jako objemová frakce (vyjádřena v procentech) krve obsazená erytrocyty. Hodnota hematokritu se liší s věkem, pohlavím, zdravotním stavem a také mírně etnickým původem. Referenční hodnoty jsou mezi 40 % a 50 % pro dospělé muže a mezi 35 % a 45 % pro dospělé ženy. Vyšší hodnota hematokritu se projeví vyšší viskozitou krve, tudíž stejné množství aplikované krve s vysokou hodnotou hematokritu se na filtračním papíru rozšíří do menší plochy v porovnání s krví mající hodnotu hematokritu nižší [4, 6, 12].

Dalším faktorem, který ovlivňuje stabilitu analytů ve vzorcích DBS je doba a teplota skladování. U většiny stanovovaných analytů ve vzorcích DBS skladovaných při teplotě 20 °C došlo ke statisticky významnému poklesu hladiny v porovnání se vzorky uchovávanými při teplotě 4 °C nebo nižší než 0 °C. Bylo také zdokumentováno, že časté zmrazování a rozmrazování vzorků DBS vede k významným rozdílům v koncentraci lipidů ve srovnání

s čerstvými vzorky. Analýza vzorků DBS může být také ovlivněna podmínkami při odběru krve na odběrovou kartu. Vysoká teplota a vlhkost mohou usnadnit růst bakterií nebo zvýšit rychlost degradace analytu [10].

#### **2.1.4 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve**

Hlavní výhody techniky DBS již byly zmíněny. Technika DBS je v porovnání s venepunkcí méně invazivní díky možnosti odběru krve po malém vpichu do prstu nebo paty. U mnoha analytů byla touto technikou dosažena jejich zvýšená stabilita. Také přeprava a skladování vzorků DBS jsou jednoduché a relativně levné. Výhodou je také nižší riziko biologického ohrožení pro lidi, kteří se vzorky manipulují. Je požadován malý objem vzorku krve, což je výhodné v situacích, kdy je k dispozici omezené množství odebrané krve [4, 13, 14].

Nevýhody techniky DBS spočívají v kvantitativní analýze. Například kvantifikace daných analytů je často založena na metodě vnitřního standardu, ale u většiny metod využívající techniku DBS se přidávají vnitřní standardy do rozpouštědla použitého k extrakci analytů ze vzorku DBS. Další nevýhodou je množství analyzovaného vzorku, proto jsou pro analýzu většiny biologicky významných molekul nutné vysoce citlivé analytické techniky. Způsob odběru krve může vést k nesrovnalostem ve výsledcích. Pacienti nebo personál odebírající krev by měli být poučeni, jak správně aplikovat krev na odběrovou kartu. Mnoho vzorků DBS totiž nelze analyzovat, protože vykazují srážení, vrstvení, přesycení, nedostatečný objem, kroužky séra, viditelné stopy hemolýzy nebo kontaminace. Proto před odběrem krve je nutné zabránit jakémukoli kontaktu s místem, na které je aplikována krev. Pro stimulaci prokrvení místa vpichu je vhodné masírování a zahřátí, místo vpichu je nutné očistit alkoholem a první kapku krve odstranit. Další kapka krve se aplikuje na odběrovou kartu tak, aby kruh vytištěný na filtračním papíře byl vyplněn úplně a homogenně [14–16].

#### **2.1.5 Využití techniky suché kapky krve v klinické praxi**

V poslední době roste zájem o alternativní techniky odběru vzorků plné krve, zejména v oblastech jako je genomika, proteomika a metabolomika. Technika DBS byla úspěšně použita pro cílenou proteomiku. Byly provedeny různé studie pro sledování významných biomarkerů. Příkladem může být stanovení hemoglobinů pro diagnostiku srpkovité anémie a dalších hemoglobinopatií, či hladiny ceruloplazminu pro diagnostiku Wilsonovy choroby [6, 17-19].

Rostoucí zájem o tuto techniku byl zaznamenán i v oblasti farmacie. Někteří farmaceuti považují tuto metodu za vhodnou alternativu k odběru plazmy nebo séra pro toxikokinetické,

toxikodynamické, farmakokinetické a farmakodynamické experimenty na laboratorních zvířatech. Jedná se o preklinické studie, které se dělají před testováním léčiv na lidech [6, 13].

Co se týká klinických aplikací, nejvýznamnější je novorozenecký screening pro vrozené metabolické poruchy. Technika DBS se zde využívá již více než 50 let. V současné době je diagnostikováno více než 50 vrozených metabolických poruch. Dalším využitím techniky DBS je terapeutické monitorování hladin léčiv. Cílem je udržet vhodným dávkováním léčiva jeho koncentraci v tzv. terapeutickém okně [2, 6, 13].

### **3.1 Možnosti stanovení mastných kyselin v biologických vzorcích**

Mastné kyseliny hrají v biologických systémech zásadní úlohu. Nerovnováha v zastoupení MK souvisí s řadou onemocnění, a proto je jejich stanovení v biologických vzorcích důležité. Pro stanovení hladin MK bylo vyvinuto mnoho analytických strategií. Vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti je třeba při vývoji analytických metod zohledňovat mnoho faktorů, včetně extrakčních a derivatizačních metod, výběru kolon a vnitřních standardů. U všech metod by měl být v počátečním kroku analýzy vzorku přidán vnitřní standard (IS) nepřírodně se vyskytující MK o známé koncentraci, aby bylo možné korigovat případné ztráty MK během přípravy vzorku a správně stanovit výsledné koncentrace. V současné době se jako IS využívají deuterované MK [20, 21].

#### **3.1.1 Typy biologických vzorků pro stanovení mastných kyselin**

V mnoha studiích byly analyzovány hladiny MK v různých biologických vzorcích, například v plazmě, plné krvi, mateřském mléce, moči, erythrocytech, potu, slinách a vzorcích tkání, a to za použití různých analytických strategií [20, 22, 23].

Pro zajištění spolehlivosti při kvalitativní a kvantitativní analýze MK se biologický materiál ošetří tak, aby bylo zabráněno jeho oxidaci. Vzorky séra a plazmy se bezprostředně zamrazí při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tkáně se zamrazí v tekutém dusíku. Tkáně se při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  uchovávají do doby provedení analýzy MK [24].

#### **Stanovení mastných kyselin v plazmě**

Plazma je v biomedicínských studiích pro stanovení MK nejpoužívanějším typem vzorku. Hladiny MK v plazmě úzce souvisejí s mnoha onemocněními, jako je metabolický syndrom, chronické onemocnění, Alzheimerova choroba a rakovina [20, 25, 26].

### **Stanovení mastných kyselin v erytrocytech**

Ve srovnání se vzorky plazmy odráží složení MK v membráně erytrocytů stav životosprávy v období 2-3 měsíců. Profily MK erytrocytů souvisejí se zánětem a některými duševními poruchami, schizofrenií a poruchou autistického spektra. Mimo jiné je složení MK v erytrocytech užitečný ukazatel oxidačního stresu, kardiovaskulárního onemocnění a dalších chronických chorob [20, 27–29].

### **Stanovení mastných kyselin ve slinách**

Před odběrem slin je důležité alespoň hodinu nejíst, nepít a nekouřit. Tyto faktory by mohly ovlivnit hladinu MK ve vzorku slin. Předpokládá se, že koncentrace MK ve slinách souvisí s několika onemocněními, příkladem je cystická fibróza a Sjögrenův syndrom. Ve slinách jsou nejvíce zastoupeny kyselina palmitová, linolová, olejová a stearová [20, 30, 31].

### **Stanovení mastných kyselin v potu**

Místo, ze kterého se pot odebírá, se otre 70% ethanolem. Pot je odebírán do zkumavky nebo na odběrovou kartu z filtračního papíru, na kterém se kapka potu nechá zaschnout. Pouze několik málo laboratoří se zabývalo analýzou vzorků potu, prozatím byla publikována jediná práce stanovující MK ve vzorcích potu získaných technikou suché kapky (DSS; z angl. dried sweat spot) [32, 33].

Při analýze MK v potu bylo prokázáno, že pot obsahuje celou řadu MK, především kyselinu laurovou, myristovou, palmitovou, olejovou a stearovou. Koncentrace MK pozitivně korelují s procentem tělesného tuku pacienta. S rostoucí dobou hladovění se hladiny MK postupně zvyšují. Souvislost mezi hladinami MK v potu a onemocněním nejsou známy [32].

### **3.1.2 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií**

Plynová chromatografie (GC) je nepostradatelnou analytickou technikou při stanovení MK v různých vzorcích. Současné metody GC s použitím kapilárních kolon umožňují citlivé a reprodukovatelné analýzy [34].

K analýze MK se nejčastěji využívá GC ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a plamenově ionizačním detektorem (GC-FID).

Ve srovnání s technikou GC-FID může technika GC-MS poskytnout více informací o struktuře stanovovaných látek. V důsledku toho je GC-MS nejčastěji používanou technikou pro analýzu MK v biologických vzorcích [20].

## **Derivatizace mastných kyselin při jejich stanovení v biologických vzorcích technikou plynové chromatografie**

Derivatizace MK je běžným krokem ke zvýšení jejich těkavosti a citlivosti detekce, ke zlepšení chromatografického rozlišení a snížení chvostování píku pro MK s dlouhým řetězcem [35].

Nejčastěji se MK převádějí na methylestery MK (FAME; z angl. fatty acids methyl esters). Proces derivatizace většinou zahrnuje jednostupňovou kyselou nebo alkalickou transesterifikaci. Pro kyselou transesterifikaci se používá kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová v methanolu nebo trifluorid boritý ( $\text{BF}_3$ ) v methanolu. Při derivatizaci  $\text{BF}_3$  v methanolu se transesterifikují existující estery MK, které jsou přítomny ve všech třídách lipidů. Aby se zabránilo oxidaci nenasycených MK, provádí se transesterifikace za přítomnosti butylhydroxytoluenu (BHT) jako antioxidantu. Takto provedená esterifikace MK v biologických vzorcích dosahuje účinnosti přibližně 97-99 %. Nevýhodou této metody je nestabilita  $\text{BF}_3$  [24, 35].

Pro alkalickou transmetylaci se nejčastěji používají postupy s methoxidem sodným nebo hydroxidem draselným v methanolu. Derivatizace methoxidem sodným je při laboratorní teplotě relativně rychlá. Tento postup však není vhodný pro metylaci volných MK. Použití hydroxidu v methanolu zabraňuje izomerizaci nenasycených MK a vzniku methoxy-artefaktů. Tento postup je však spojen s rizikem hydrolýzy vzniklých methylesterů. Alkalická esterifikace se vzácněji provádí s použitím amonných solí. Vázané MK se přemění na amonné soli, které podléhají v horkém portu injektoru plynového chromatografu pyrolýze za vzniku methylesterů. Výhodou této esterifikace je, že ji lze provádět při pokojové teplotě, je jednostupňová a není nutná extrakce vzniklých derivátů [24, 36].

Navzdory velké výhodě použití derivatizace při analýze MK existují také nevýhody tohoto postupu. První nevýhodou je, že derivatizace je časově náročná. Další nevýhodou je obtížné dosažení úplné transesterifikace MK a extrakce FAME. Lze obtížně zabránit rozkladu, izomerizaci a oxidaci některých nenasycených MK při vyšší teplotě. Během odpařování organického rozpouštědla použitého k extrakci methylesterů může docházet ke ztrátě vysoce těkavých FAME s krátkým řetězcem. Poslední nevýhodou je, že během procesu derivatizace snadno vznikají vedlejší produkty, které mohou následně rušit kvalitativní i kvantitativní analýzu. Vzhledem k uvedeným nevýhodám je snaha vyvinout jednoduché a rychlé metody stanovení MK bez nutnosti derivatizace [35].

V tabulce 1 jsou uvedena některá derivatizační činidla využívaná pro analýzu MK metodou GC.

*Tabulka 1 Vybraná derivatizační činidla využívaná při analýze mastných kyselin metodou plynové chromatografie*

<b>Derivatizační činidlo</b>	<b>Citace</b>
trifluorid boritý s methanolem	[37]
kyselina sírová s methanolem	[38]
kyselina chlorovodíková s methanolem	[38]
methoxid sodný s methanolem	[39]
hydroxid draselný s methanolem	[40]
acetylchlorid s methanolem	[39]
diazomethan	[38]
bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	[41]
trimethylchlorsilan s methanolem	[42]
tetramethylguanidin s methanolem	[43]

### **Extrakce mastných kyselin z biologických vzorků při jejich analýze metodou plynové chromatografie**

Mastné kyseliny se z biologických vzorků často extrahují technikou kapalina-kapalina za použití různých kombinací organických rozpouštědel. Nejrozšířenější jsou dva postupy [20].

První postup využívá směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v). K oddělení fází je ke směsi přidána voda nebo vodný roztok soli. Pro analýzu MK je odebrána spodní fáze. Tato metoda extrakce je při analýze lipidů považována za zlatý standard. Druhá z metod se obvykle používá pro analýzu MK v biologických vzorcích, které obsahují přibližně 80 % vody. K extrakci se používá směs chloroform/methanol/voda v poměru 2:2:1,8 (v/v/v). Výhodou této metody je nízká spotřeba rozpouštědel a zároveň vysoká výtěžnost extrakce. Použití chloroformu však vyvolává obavy kvůli jeho vysoké toxicitě [20, 34].

Z důvodu toxicity je chloroform často nahrazován jinými organickými rozpouštědly. Příkladem jsou methyl-*terc*-butylether, hexan a isopropanol. Použití hexanu a isopropanolu je ve srovnání s výše zmíněnou druhou metodou účinnější [20, 24, 44].

Při analýze MK v tkáních mohou být použity výše zmíněné metody extrakce. Po nich pak následují chromatografické separační techniky, jako je tenkovrstvá chromatografie nebo kapalinová chromatografie. Tato strategie je však časově náročná. Pro alternativní extrakci volných MK lze využít extrakci tuhou fází (SPE; z angl. solid phase extraction). Při stanovení vázaných MK je potřeba provést extrakci lipidů následovanou zmýdlením. Při analýze MK



v buněčných kulturách nebo primárních buňkách se pro extrakci používá směs methanolu a dichlormethanu [45].

Pro zvýšení rychlosti extrakce nebo snížení spotřeby rozpouštědel byly navrženy některé modifikované přístupy. K extrakci MK ze vzorků tkání je možno využít ultrazvuk. Tato metoda je srovnatelná s metodou extrakce kapalina-kapalina. Výhodou však je, že je šetrnější k životnímu prostředí díky nižší spotřebě rozpouštědel. Využívá se také mikrovlnné záření. Výhodou je opět rychlost metody a malá spotřeba rozpouštědla [20].

### **Stacionární fáze používané při analýze mastných kyselin metodou plynové chromatografie**

Získané deriváty MK se separují v kapilárních kolonách obsahujících nepolární stacionární fázi, středně polární fázi nebo vysoce polární fázi. Z nepolárních stacionárních fází se nejčastěji používají dimethylpolysilikonové a fenylmethylpolysilikonové fáze. Pro separaci *cis/trans* izomerů se upřednostňují vysoce polární biskyanopropylpolysiloxanové stacionární fáze (např. HP-88, CP Sil 88, SP 2340). Tyto fáze mají nízkou tepelnou stabilitu, a FAME jsou touto stacionární fází silně zadržovány [35, 46].

Kapilární kolony jsou komerčně dostupné s různými stacionárními fázemi různého chemického složení. Jak již bylo zmíněno, nejpoužívanější nepolární stacionární fázi jsou methylsilikonové fáze. Mezi jejich výhody patří vysoká tepelná stabilita, široký rozsah pracovních teplot a chemická inertnost. Nevýhodou je horší selektivita. Těmito kolonami lze separovat většinu FAME. Na nepolárních kolonách FAME eluují v pořadí podle bodu varu. Nenasycené FAME eluují před odpovídajícími nasycenými FAME o stejné délce uhlíkatého řetězce. Toto pořadí eluce je opačné než na kolonách se středně a vysoce polárními stacionárními fázemi [35, 47].

Deriváty MK se separují především na středně polárních fázích, zejména nitrilsilikonových. V důsledku nízké tepelné stability vysoce polárních fází a horší selektivity nepolárních fází se nejčastěji pro separaci FAME využívají středně polární fáze [35, 46].

### **Detektory používané při analýze mastných kyselin metodou plynové chromatografie**

Citlivost GC detektorů je poměrně vysoká. Běžně používaným detektorem je FID. FID je obecně velmi využívaným detektorem při detekci organických sloučenin. Analyzované látky jsou spáleny v plamenu vodíku a kyslíku (vzduchu) za vzniku iontů. Nosnými plyny jsou dusík, helium nebo vodík. Při použití vodíku je analýza rychlejší, také separace je lepší v porovnání

s ostatními nosnými plyny. Obvyklá citlivost FID je v rozmezí pikogramů FAME v nástřiku. [48, 49].

Pro získání informací o chemické struktuře analyzovaných MK se využívá MS detektor. Tento typ detekce také představuje potenciálně silný nástroj pro kvantitativní analýzu MK. Při analýze MK se kromě retenčních dat získává i hmotnostní spektrum, díky čemuž je umožněno rozlišit separované analyty v případě, že od sebe nejsou dostatečně odděleny. Při spojení MS s GC se nejčastěji používá elektronová ionizace. Tato technika ionizace generuje kladné ionty, které podléhají rozsáhlé fragmentaci. Je užitečná ve spojení se specializovanými derivatizačními technikami pro získání informací o struktuře, ale pro kvantitativní analýzu MK je méně účinná. Šetrnější formou ionizace s nízkým stupněm fragmentace, při níž zůstávají pseudomolekulární ionty karboxylových kyselin většinou neporušené, je chemická ionizace. Díky vysokému výtěžku iontů s hodnotou  $m/z$  blízkou hodnotě jednonásobně nabitého molekulárního iontu MK jsou techniky měkké chemické ionizace dobře použitelné pro kvantitativní analýzu [24, 45, 50].

### **3.1.3 Analýza mastných kyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se obecně používá k analýze sloučenin, které jsou málo těkavé, tepelně nestabilní nebo vysoce polární. Cílem přípravy vzorku pro analýzu MK je převést ho do formy vhodné pro analýzu metodou HPLC. Ideální je, když jsou MK rozpuštěné v mobilní fázi. Proto je většina postupů přípravy vzorků, nezávisle na původní matici, zaměřena na extrakci MK do kapaliny. Při přípravě vzorků pro stanovení MK se používá několik postupů, například extrakce kapalina-kapalina, SPE, precipitace proteinů, odpaření organického rozpouštědla použitého pro extrakci MK a filtrace. Konkrétní postupy závisí na matici a vlastnostech vzorku. V případě krevní plazmy je nutná precipitace proteinů [49, 51].

Většina MK neobsahuje chromofory, které by při metodě HPLC usnadnily detekci ve viditelné a ultrafialové oblasti či fluorofory pro fluorescenční detekci. Z tohoto důvodu se pro kvantifikaci MK využívá především metoda GC nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC) ve spojení s GC [49, 52].

#### **Extrakce mastných kyselin z biologických vzorků při jejich analýze metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie**

Nejběžnější formou přípravy vzorků pro stanovení MK v biologických vzorcích metodou HPLC je extrakce kapalina-kapalina. Protože maticí je obecně vodná fáze, používá se

k extrakci nepolární rozpouštědlo. Nejčastěji jsou volné mastné kyseliny ze vzorku krevní plazmy extrahovány směsí heptanu a isopropanolu, lze však použít také acetonitril, hexan, chloroform nebo diethylether. V případě potřeby se do extrakčního činidla přidává antioxidant, např. BHT [49, 53–55].

Pro extrakci MK dále stanovovaných metodou HPLC se nejčastěji používá směs chloroformu, heptanu a methanolu nebo isopropanolu a heptanu. Extrakce směsí isopropanolu a heptanu je ve srovnání s extrakcí směsí chloroformu, heptanu a methanolu výrazně rychlejší. Je třeba si uvědomit, že chloroform může v biologických vzorcích uvolňovat MK z fosfolipidů, a tím falešně zvyšovat hladinu volných MK. Z tohoto důvodu a také z důvodu vyšší účinnosti extrakce a reprodukovatelnosti a kratší doby zpracování je postup extrakce MK směsí isopropanolu a heptanu lepší. Obě metody extrakce mohou být dle potřeby různě modifikovány [49, 56].

### **Derivatizace mastných kyselin při jejich analýze v biologických vzorcích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie**

Většina lipidů absorbuje UV záření při vlnové délce 200 nm, při této vlnové délce však také absorbují organická rozpouštědla, která jsou součástí mobilní fáze. Z tohoto důvodu byla vyvinuta předkolonová a postkolonová derivatizace, která zvyšuje citlivost a selektivitu detekce MK. Tento krok je užitečný zejména pro analýzu stopového množství MK v biologických vzorcích, potravinách a vzorcích z životního prostředí. Pro HPLC analýzu MK v různých biologických vzorcích se používá řada derivatizačních činidel. Výslednými deriváty jsou například estery *p*-nitrobenzylu, *p*-bromfenacylu, *p*-methylthiobenzylu a 1-naftylaminu [24, 49, 52].

U většiny HPLC metod jsou před derivatizací MK nutné zdlouhavé purifikační postupy. Navzdory poměrně dlouhé době analýzy není většinou možné dosáhnout simultánního stanovení biologicky důležitých PUFA. Pro screeningové vyšetření velkého počtu vzorků je zapotřebí použít jednoduchou a rychlou metodu s dostatečnou separací derivátů MK. Takovou metodou je derivatizace MK 2-nitrofenylhydrazinhydrochloridem (2-NPH-HCl) bez předchozí purifikace vzorku a extrakce MK ze vzorku. Tato HPLC metoda je svou jednoduchostí, dostatečnou selektivitou a citlivostí srovnatelná s rutinními metodami GC a může být úspěšně použita pro stanovení MK v různých biologických vzorcích [52].

Vybraná derivatizační činidla využívaná při analýze mastných kyselin metodou HPLC jsou uvedena v tabulce 2.

**Tabulka 2** Vybraná derivatizační činidla využívaná při analýze mastných kyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

<b>Derivatizační činidlo</b>	<b>Citace</b>
2,4-dinitrofenylhydrazin	[57]
2-NPH-HCl	[52]
<i>p</i> -bromfenacyl	[58]
<i>p</i> -nitrobenzyl	[59]
<i>p</i> -methylthiobenzyl	[60]
1-naftylamin	[61]
2-hydrazinicholin	[62]
2-pikolyamin	[63]
4-bromo- <i>N</i> -methylbenzylamin	[64]
4-bromomethyl-6,7-methylendioxykumarin	[65]
9-anthryldiazomethan	[66]
luminol	[67]
isoluminol	[68]

2-NPH-HCl, 2-nitrofenylhydrazinhydrochlorid

### **Stacionární a mobilní fáze používané při analýze mastných kyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie**

Pro stanovení MK metodou HPLC jsou typickými separačními režimy reverzní fáze (RP) a normální fáze (NP). Režim NP je vhodný pro analýzu volných MK a dalších nepolárních lipidů. Většina analýz MK a jejich derivátů se provádí na RP s použitím kolon naplněných silikagelem, na který je vázána oktadecylová (C18) nebo oktylová (C8) fáze. Fáze C18 se díky vysokému rozlišení lipidů používá nejčastěji. Fáze C8 slouží především pro separaci polárnějších lipidů, fosfolipidů a nasycených MK s krátkým řetězcem [24, 51].

Izomery MK lze separovat na kolonách, které obsahují ionty stříbra. Separace je pak založena na počtu, konfiguraci a poloze dvojných vazeb a na skutečnosti, že *cis*-izomery jsou na koloně zadržovány výrazně silněji než *trans*-izomery. Ionty stříbra se v molekulách MK vážou ireverzibilně na dvojnou vazbu. Výsledkem je selektivně zvýšená retence takových MK na koloně [24, 49].

Pro separaci MK se často používá gradientová eluce. Mobilní fáze pro separaci volných MK na koloně s reverzní fází (C18) se od mobilní fáze pro separaci esterů liší. Pro separaci esterů se obvykle používá lineární nebo ternární gradient mobilní fáze obsahující vodu a organická rozpouštědla, jako je methanol nebo acetonitril. Výhodou acetonitrilu je, že jeho maximální viskozita je pouze o 20 % vyšší než viskozita čisté vody, zatímco viskozita methanolu je asi 1,8krát vyšší než viskozita čisté vody. Pro separaci volných MK se do mobilní fáze obvykle přidává kyselina octová jako supresor iontů [24, 69].

Pro zlepšení separace se v závislosti na typu detekce přidávají do mobilní fáze různé modifikátory, které zvyšují citlivost detekce. Například v případě elektrochemické detekce se k mobilní fázi přidávají různé elektrolyty (např. chloristan lithný a vitamin K nebo deriváty kumarinu). Při UV detekci se používají organické modifikátory, tj. ethanol, 2-propanol, dichlormethan nebo hexan [24].

### **Detektory používané při analýze mastných kyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií**

Při HPLC analýze MK se nejčastěji používá UV detektor, který umožňuje detegovat MK řádově ve stovkách  $\mu\text{mol/l}$ . Protože nasycené MK neabsorbují UV záření, je potřeba je přeměnit na vhodné deriváty, jako jsou fenacylestery, naftacylestery nebo 2-NPH-HCl estery. Jde o sloučeniny, které obsahují aromatické jádro [70–73].

Fluorescenční detekce vede ke zvýšení citlivosti a selektivity stanovení MK. V biologických vzorcích se vyskytují přirozeně fluoreskující sloučeniny, které emitují záření v rozmezí vlnových délek 300–400 nm. Z důvodu možné interference s těmito sloučeninami je potřeba převést MK na takové deriváty, které jsou charakterizované maximem fluorescence při vyšších vlnových délkách (přibližně 400–600 nm). Derivatizace MK, která vede k fluorescenční detekci, probíhá většinou v bezvodém prostředí. [24, 69, 74].

Při detekci derivátů MK chemiluminiscenčním detektorem se jako derivatizační činidla používají například luminol a isoluminol. Lze také použít specifické enzymy, např. acyl-S-CoA-syntetázu, nebo acyl-S-CoA-oxidázu. V přítomnosti ATP a koenzymu A se MK aktivuje na acyl-S-CoA, která je pak oxidována na 2,3-*trans*-enoyl-S-CoA, vzniká peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje s luminolem nebo isoluminolem. Chemiluminiscenční detekce je vysoce citlivá a selektivní [24].

Stejně jako GC, je možné HPLC kombinovat s hmotnostním spektrometrem. Nejčastěji jsou při těchto analýzách využívány ionizace elektrosprejem nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku ve spojení s kvadrupólem, případně iontová past ve spojení s analyzátozem doby letu. Hmotnostní spektrometr je skvělý nástroj pro určení struktury MK [24, 75].

V poslední době je pro detekci MK často používán odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD; z angl. evaporative light scattering detector). Tento detektor je schopný detegovat jakýkoliv analyt, který je méně těkavý než mobilní fáze. Jeho princip je založen na třech základních po sobě jdoucích procesech: zmlžení eluentu inertním plynem, odpaření mobilní

fáze a vytvoření částic méně těkavého solutu. Zmlžený eluent se solutem dopadá do odpařovací komůrky, kde se měří rozptyl světla na částicích solutu. Všeobecně je ELSD uznáván jako univerzální nástroj pro kapalinovou a superkritickou fluidní chromatografii, která využívá jako mobilní fázi superkritický oxid uhličitý s příměsí různých modifikátorů. ELSD se využívá k analýze látek, které účinně neabsorbují UV záření, proto je pro analýzu MK vhodný [76–78].

#### **4.1 Referenční rozmezí mastných kyselin v biologických vzorcích**

Stanovením koncentrace MK v biologických vzorcích se zabývala celá řada pracovišť, avšak referenční hodnoty se mezi laboratořemi poměrně liší. Faktorů, které ovlivňují koncentraci MK v biologických vzorcích, je mnoho. Nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími hladiny MK v biologických vzorcích jsou rozdílné stravovací návyky a životní styl testovaných jedinců, v neposlední řadě také různá onemocnění [79].

Hladiny MK v různých biologických vzorcích lidí sice mohou být použity jako potenciální biomarkery některých patologických stavů, avšak je zapotřebí znát koncentraci těchto MK u zdravých jedinců.

Hladiny MK u zdravých jedinců publikovány různými autory jsou shrnuty v tabulce (Příloha 1).

Většina studií, které se zabývají kvantitativním stanovením MK v biologických vzorcích, je zaměřena na zjišťování koncentrace MK v souvislosti s konkrétním onemocněním či problémem. Mezi tato onemocnění patří například diabetes, kolorektální karcinom nebo autismus [82–85].

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo zaměřit se na některé faktory ovlivňující kvantitativní analýzu vybraných MK ve vzorcích DBS a postupy přípravy vzorků DBS před samotnou GC-MS analýzou.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Vzorky

Vzorky krve byly odebírány z kubitální žíly do zkumavek obsahující EDTA kvalifikovaným zdravotnickým personálem. Odebrané vzorky krve byly bezprostředně po odběru pipetovány automatickou pipetou na odběrové karty (Whatman<sup>®</sup> 903 protein saver cards) tak, aby se špička nedotýkala filtračního papíru a krev byla nanášena formou kapky. Vzorky krve byly následně ponechány zaschnout při pokojové teplotě v horizontální poloze po dobu 3 hodin. Poté byly odběrové karty umístěny do hermeticky uzavíratelného polypropylenového sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Chemikálie

Acetylchlorid ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{OCl}$ ), Mr 78,50 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Butylovaný hydroxytoluen ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ), Mr 220,40 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Deuterovaná kyselina palmitová D31 ( $\text{CD}_3(\text{CD}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ ), Mr 287, 62 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), Mr 84,93 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), Mr 46,07 (Merck, Darmstadt, Německo)

Ethylacetát ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), Mr 88,11 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Fluorid boritý ( $\text{BF}_3$ ), 10% roztok v ethanolu, Mr 67, 81 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Hydrogenuhlíčitán draselný ( $\text{KHCO}_3$ ), Mr 100,12 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina arachidonová ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ), Mr 304, 47 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina arachidová ( $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ ), Mr 312, 53 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina behenová ( $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ ), Mr 340, 58 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina *cis*-vacenová ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), Mr 282, 46 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina dodekanová ( $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ), Mr 200, 32 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina dokosaheptaenová ( $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ), Mr 328, 49 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)



Kyselina dokosapentaenová ( $C_{22}H_{34}O_2$ ), Mr 330, 50 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina dokosatetraenová ( $C_{22}H_{36}O_2$ ), Mr 332, 53 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina dokosatrienová ( $C_{22}H_{38}O_2$ ), Mr 334, 54 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina eikosapentaenová ( $C_{20}H_{30}O_2$ ), Mr 302, 45(Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina eikosatrienová ( $C_{20}H_{34}O_2$ ), Mr 306, 48 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina elaidová ( $C_{18}H_{34}O_2$ ), Mr 282, 46 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina eruková ( $C_{22}H_{42}O_2$ ), Mr 338, 57 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina fytanová ( $C_{20}H_{40}O_2$ ), Mr 312, 54 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina heneikosanová ( $C_{21}H_{42}O_2$ ), Mr 326, 56 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina heptadekanová ( $C_{17}H_{34}O_2$ ), Mr 270, 45(Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina heptanová ( $C_7H_{14}O_2$ ), Mr 130,19 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina hexakosanová ( $C_{26}H_{52}O_2$ ), Mr 396, 70 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina linolelaidová ( $C_{18}H_{32}O_2$ ), Mr 280, 45 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina linolenová ( $C_{18}H_{30}O_2$ ), Mr 278, 43 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina linolová ( $C_{18}H_{32}O_2$ ), Mr 280, 46 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina myristolejová ( $C_{14}H_{26}O_2$ ), Mr 226, 35 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina myristová ( $C_{14}H_{28}O_2$ ), Mr 228, 37 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina nonadekanová ( $C_{19}H_{38}O_2$ ), Mr 298,50 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina nonanová ( $C_9H_{18}O_2$ ), Mr 158,23 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina olejová ( $C_{18}H_{34}O_2$ ), Mr 282, 47 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina palmitolejová ( $C_{16}H_{30}O_2$ ), Mr 254, 41 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina palmitová ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), Mr 256, 42 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina pentadekanová ( $C_{15}H_{30}O_2$ ), Mr 242,40 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina stearidonová ( $C_{18}H_{28}O_2$ ), Mr 276, 42 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina stearová (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), Mr 284, 48 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina tetrakosanová (C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>), Mr 368, 63 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina *trans*-vacenová (C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>) Mr 282, 46 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina tridekanová (C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>), Mr 214, 35 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina trikosanová (C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>), Mr 354, 61 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina undekanová (C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>), Mr 186, 29 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Kyselina  $\gamma$ -linolenová (C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), Mr 278, 43 (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

n-Hexan (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>), Mr 86,18 (Penta, Chrudim, ČR)

### 3.3 Pomůcky a přístrojové vybavení

Analytické váhy Adventurer™ Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Automatické pipety (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)

Centrifuga Sorvall TC6 (Sorvall Instruments, Newtown, CT, USA)

Hlubokomrazicí box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Ósaka, Japonsko)

Kapilární kolona HP-88, J&W, 100 m × 250  $\mu$ m × 0,25  $\mu$ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Kombinovaná chladnička s mrazákem (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Koncentrátor vzorků Termovap TV10 (Ecom, Praha, ČR)

Laboratorní sklo – odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky, lodička na vážení

Odběrová karta Whatman® Protein Saver Card (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Odběrové zkumavky s K<sub>3</sub>EDTA, 2 a 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)

Plynový chromatograf GCMS-QP2010 SE (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Polypropylenové (PP) mikrozkušavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Předvážky Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Pyrexové zkumavky se šroubovacím uzávěrem a teflonovým těsněním, 10 ml (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Velká Británie)

Skleněné vialky se šroubovacím a krimpovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné inserty ND8, 200 µl (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Termoblok PIERCE, model 18971 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Termoblok Reacti-Therm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Třepačka Reax Multi (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

### **3.4 Pracovní roztoky**

#### Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda ( $G = 0,055 \mu\text{S}$ ) byla připravena zařízením na úpravu vody Smart2pure a před použitím byla přefiltrována přes nylonový filtr o porozitě  $0,2 \mu\text{m}$ .

#### Příprava roztoku butylovaného hydroxytoluenu (asi 1% roztok)

Navážka 0,05 g BHT byla rozpuštěna v 6,27 ml ethanolu. Roztok byl uchováván při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  maximálně po dobu 2 týdnů.

#### Příprava roztoku hydrogenuhličitanu draselného (asi 6%)

Navážka 3,3 g hydrogenuhličitanu draselného byla rozpuštěna v 55 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu maximálně 1 týdne.

#### Příprava směsi ethanolu a acetylchloridu v poměru 5:1 (v/v)

Směs byla připravena například smícháním 5 ml ethanolu s 1 ml acetylchloridu. Směs byla připravována denně čerstvá.

#### Příprava zásobního roztoku deuterované kyseliny palmitové (vnitřní standard) o koncentraci asi 100 mg/l

Navážka 10 mg deuterované kyseliny palmitové [ $\text{CD}_3(\text{CD}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ ] byla rozpuštěna ve 100 ml ethanolu. Roztok byl pipetován po 1ml alikvotech a uchováván při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Příprava zásobních roztoků mastných kyselin

Zásobní roztoky jednotlivých MK byly připraveny rozpuštěním navážek (Tabulka 3) v 10 ml příslušného rozpouštědla. Roztoky byly pipetovány po 1ml alikvotech a uchovávány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabulka 3** Příprava zásobních roztoků mastných kyselin

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Navážka [g]</b>	<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Koncentrace [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>
Heptanová	C7:0	0,0051	ethanol	3917,7
Nonanová	C9:0	0,0026	ethanol	1643,1
Undekanová	C11:0	0,0025	ethanol	1342,0
Dodekanová	C12:0	0,0042	ethanol	2096,6
Tridekanová	C13:0	0,0024	ethanol	1119,7
Myristová	C14:0	0,0115	ethanol	5035,7
Myristolejová	C14:1 (n-5)	0,0026	ethanol	1148,6
Pentadekanová	C15:0	0,0024	ethanol	990,1
Palmitová	C16:0	0,1262	ethanol	49216,1
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	0,0030	ethanol	1179,2
Fytanová	3,7,11,15-tetramethyl-C16:0	0,0050	ethanol	1599,8
Heptadekanová	C17:0	0,0036	hexan	1331,1
Stearová	C18:0	0,0292	ethanol	10264,3
<i>cis</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>cis</i> )	0,0040	ethanol	1416,1
<i>trans</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>trans</i> )	0,0024	ethanol	849,7
Olejová	C18:1 (n-9 <i>cis</i> )	0,0843	ethanol	29844,9
Elaidová	C18:1 (n-9 <i>trans</i> )	0,0058	ethanol	2053,4
Linolová	C18:2 (n-6 <i>cis</i> )	0,1426	ethanol	50846,9
Linolelaidová	C18:2 (n-6 <i>trans</i> )	0,0050	ethanol	1782,8
Linolenová	C18:3 (n-3 <i>cis</i> )	0,0125	ethanol	4489,5
$\gamma$ -Linolenová	C18:3 (n-6 <i>cis</i> )	0,0100	ethanol	3591,6
Stearidonová	C18:4 (n-3 <i>cis</i> )	0,0010	ethanol	361,8
Nonadekanová	C19:0	0,0027	hexan	904,5
Arachidová	C20:0	0,0040	hexan	1279,9
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 <i>cis</i> )	0,0100	ethanol	3262,9
Arachidonová	C20:4 (n-6 <i>cis</i> )	0,0056	ethanol	1839,3
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 <i>cis</i> )	0,0100	ethanol	3306,3
Heneikosanová	C21:0	0,0027	hexan	826,8
Behenová	C22:0	0,0030	ethanol	880,9
Eruková	C22:1 (n-9 <i>cis</i> )	0,0032	hexan	945,2
Dokosatrienová	C22:3 (n-3 <i>cis</i> )	0,0048	ethanol	1434,8
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 <i>cis</i> )	0,0250	ethanol	7518,3
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 <i>cis</i> )	0,0100	ethanol	3025,7
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 <i>cis</i> )	0,0052	ethanol	1583,0
Trikosanová	C23:0	0,0030	hexan	846,0
Tetrakosanová	C24:0	0,0040	hexan	1085,1
Hexakosanová	C26:0	0,0025	hexan	630,2

### Příprava pracovních roztoků mastných kyselin o koncentraci asi 100 mg/l

Pracovní roztoky jednotlivých MK o koncentraci asi 100 mg/l byly připraveny naředěním zásobních roztoků ethanolem (tabulka 4). Roztoky byly pipetovány po 1ml alikvotech a uchovávány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jednotlivé pracovní roztoky MK byly smíchány tak, aby výsledná koncentrace MK v dané sadě (tabulka 5) měla koncentraci asi 20 mg/l. Do každé zkumavky bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku jednotlivé MK, v případě sady 8 bylo do zkumavky pipetováno 50  $\mu\text{l}$  kyseliny heptanové, 50  $\mu\text{l}$  kyseliny fytanové a 150  $\mu\text{l}$  ethanolu. MK v jednotlivých sadách (tabulka 5) byly analyzovány pro určení jejich retenčních časů a optimálních cílových a referenčních m/z.

**Tabulka 4a** Příprava pracovních roztoků mastných kyselin o koncentraci asi 100 mg/l

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Ethanol [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>
Heptanová	C7:0	100	400	102,0
Nonanová	C9:0	190	310	98,8
Undekanová	C11:0	200	300	100,0
Dodekanová	C12:0	120	380	100,8
Tridekanová	C13:0	210	290	100,8
Myristová	C14:0	40	460	92,0
Myristolejová	C14:1 (n-5)	190	310	98,8
Pentadekanová	C15:0	210	290	100,8
Palmitová	C16:0	10	490	252,4
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	170	330	102,0
Fytanová	3,7,11,15-tetramethyl-C16:0	100	400	100,0
Heptadekanová	C17:0	140	360	100,8
Stearová	C18:0	20	480	116,8
<i>cis</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>cis</i> )	130	370	104,0
<i>trans</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>trans</i> )	210	290	100,8
Olejová	C18:1 (n-9 <i>cis</i> )	10	490	168,6
Elaidová	C18:1 (n-9 <i>trans</i> )	90	410	104,4
Linolová	C18:2 (n-6 <i>cis</i> )	10	490	285,2
Linolelaidová	C18:2 (n-6 <i>trans</i> )	100	400	100,0
Linolenová	C18:3 (n-3 <i>cis</i> )	40	460	100,0
$\gamma$ -Linolenová	C18:3 (n-6 <i>cis</i> )	50	450	100,0
Stearidonová	C18:4 (n-3 <i>cis</i> )	500	0	100,0
Nonadekanová	C19:0	190	310	102,6
Arachidová	C20:0	130	370	104,0
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 <i>cis</i> )	50	450	100,0
Arachidonová	C20:4 (n-6 <i>cis</i> )	90	410	100,8
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 <i>cis</i> )	50	450	100,0
Heneikosanová	C21:0	190	310	102,6
Behenová	C22:0	170	330	102,0

**Tabulka 4b** Příprava pracovních roztoků mastných kyselin o koncentraci asi 100 mg/l

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok [μl]</b>	<b>Ethanol [μl]</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>
Eruková	C22:1 (n-9 <i>cis</i> )	160	340	102,4
Dokosatrienová	C22:3 (n-3 <i>cis</i> )	100	400	96,0
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 <i>cis</i> )	20	480	100,0
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 <i>cis</i> )	50	450	100,0
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 <i>cis</i> )	100	400	104,0
Trikosanová	C23:0	170	330	102,0
Tetrakosanová	C24:0	130	370	104,0
Hexakosanová	C26:0	200	300	100,0

**Tabulka 5** Přehled mastných kyselin v jednotlivých sadách

<b>sada 1</b>	nonanová	palmitová	elaidová	arachidová	dokosatrienová
<b>sada 2</b>	undekanová	palmitolejová	linolová	eikosatrienová	dokosatetraenová
<b>sada 3</b>	dodekanová	heptadekanová	linolelaidová	arachidonová	dokosapentaenová
<b>sada 4</b>	tridekanová	stearová	linolenová	eikosapentaenová	dokosahexaenová
<b>sada 5</b>	myristová	<i>cis</i> -vacenová	γ-linolenová	heneikosanová	trikosaná
<b>sada 6</b>	myristolejová	<i>trans</i> -vacenová	stearidonová	behenová	tetrakosanová
<b>sada 7</b>	pentadekanová	olejová	nonadekanová	eruková	hexakosanová
<b>sada 8</b>	heptanová	fytanová			

**Příprava směsného standardu mastných kyselin o koncentraci asi 10 mg/l**

Směsný standard MK o koncentraci asi 10 mg/l byl připraven smícháním zásobních roztoků jednotlivých MK (tabulka 6). Roztok byl pipetován po 1ml alikvotech a uchováván při -80 °C. Směsný standard MK byl použit k testování vhodných extrakčních činidel a určení odezvy jednotlivých ethylesterů mastných kyselin.

**Tabulka 6a** Příprava směsného standardu mastných kyselin o koncentraci asi 10 mg/l

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok[μl]</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>
Heptanová	C7:0	195	10,8
Nonanová	C9:0	385	10,9
Undekanová	C11:0	400	10,9
Dodekanová	C12:0	240	11,0
Tridekanová	C13:0	420	11,0
Myristová	C14:0	90	11,3
Myristolejová	C14:1 (n-5)	385	10,9
Pentadekanová	C15:0	420	11,0
Palmitová	C16:0	10	13,7
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	335	10,9
Fytanová	3,7,11,15-tetramethyl-C16:0	200	10,9
Heptadekanová	C17:0	280	11,0
Stearová	C18:0	35	11,1

**Tabulka 6b** Příprava směšného standardu mastných kyselin o koncentraci asi 10 mg/l

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok [μl]</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>
<i>cis</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>cis</i> )	250	10,9
<i>trans</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>trans</i> )	420	11,0
Olejová	C18:1 (n-9 <i>cis</i> )	12	11,0
Elaidová	C18:1 (n-9 <i>trans</i> )	170	10,7
Linolová	C18:2 (n-6 <i>cis</i> )	10	15,5
Linolelaidová	C18:2 (n-6 <i>trans</i> )	200	10,9
Linolenová	C18:3 (n-3 <i>cis</i> )	80	10,9
γ-Linolenová	C18:3 (n-6 <i>cis</i> )	100	10,9
Stearidonová	C18:4 (n-3 <i>cis</i> )	1000	10,9
Nonadekanová	C19:0	370	10,9
Arachidová	C20:0	250	10,9
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 <i>cis</i> )	100	10,9
Arachidonová	C20:4 (n-6 <i>cis</i> )	180	11,0
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 <i>cis</i> )	100	10,9
Heneikosanová	C21:0	370	10,9
Behenová	C22:0	335	10,9
Eruková	C22:1 (n-9 <i>cis</i> )	315	11,0
Dokosatrienová	C22:3 (n-3 <i>cis</i> )	210	11,0
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 <i>cis</i> )	40	10,9
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 <i>cis</i> )	100	10,9
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 <i>cis</i> )	190	10,8
Trikosanová	C23:0	335	10,9
Tetrakosanová	C24:0	250	10,9
Hexakosanová	C26:0	400	10,9

Příprava směšného standardu (S5) mastných kyselin

Směšný standard MK (S5) byl připraven smícháním zásobních roztoků jednotlivých MK (tabulka 7). Roztok byl pipetován po 1ml alikvotech a uchováván při -80 °C.

**Tabulka 7a** Příprava směšného standardu (S5) mastných kyselin

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok [μl]</b>	<b>Koncentrace [μmol/l]</b>
Heptanová	C7:0	20	7,1
Nonanová	C9:0	50	7,4
Undekanová	C11:0	60	7,3
Dodekanová	C12:0	300	56,8
Tridekanová	C13:0	80	8,1
Myristová	C14:0	400	181,9
Myristolejová	C14:1 (n-5)	160	16,6
Pentadekanová	C15:0	160	14,3
Palmitová	C16:0	400	1777,6
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	1000	106,5

**Tabulka 7b** Příprava směšného standardu (S5) mastných kyselin

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Zkrácený zápis</b>	<b>Zás. roztok [μl]</b>	<b>Koncentrace [μmol/l]</b>
Fytanová	3,7,11,15-tetramethyl-C16:0	60	8,7
Heptadekanová	C17:0	200	24,0
Stearová	C18:0	1000	926,8
<i>cis</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>cis</i> )	1000	127,9
<i>trans</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>trans</i> )	400	30,7
Olejová	C18:1 (n-9 <i>cis</i> )	700	1886,4
Elaidová	C18:1 (n-9 <i>trans</i> )	800	148,3
Linolová	C18:2 (n-6 <i>cis</i> )	400	1836,5
Linolelaidová	C18:2 (n-6 <i>trans</i> )	90	14,5
Linolenová	C18:3 (n-3 <i>cis</i> )	400	162,1
γ-Linolenová	C18:3 (n-6 <i>cis</i> )	280	90,8
Stearidonová	C18:4 (n-3 <i>cis</i> )	350	11,4
Nonadekanová	C19:0	110	9,0
Arachidová	C20:0	400	46,2
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 <i>cis</i> )	160	47,1
Arachidonová	C20:4 (n-6 <i>cis</i> )	800	132,9
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 <i>cis</i> )	150	44,8
Heneikosanová	C21:0	60	4,5
Behenová	C22:0	180	14,3
Eruková	C22:1 (n-9 <i>cis</i> )	110	9,4
Dokosatrienová	C22:3 (n-3 <i>cis</i> )	35	4,5
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 <i>cis</i> )	30	20,4
Dokosapentaenová.	C22:5 (n-6 <i>cis</i> )	120	32,8
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 <i>cis</i> )	300	42,9
Trikosanová	C23:0	60	4,6
Tetrakosanová	C24:0	90	8,8
Hexakosanová	C26:0	160	9,1

#### Příprava standardů pro konstrukci kalibrační křivky

Při přípravě standardů pro konstrukci kalibrační křivky byl odparek směšného standardu MK, S5 (odparek byl připraven odpařením 4 ml směšného standardu MK, S5, v atmosféře dusíku), prvně rozpuštěn ve 40 μl ethanolu a obsah zkumavky byl řádně promíchán na vortexu po dobu 2 minut. Poté bylo do zkumavky přidáno 960 μl krve a směs byla opatrně promíchána. Jednotlivé směšné standardy S0–S4 byly připraveny podle tabulky 8. Výsledné koncentrace jednotlivých MK ve standardech S1–S5 jsou uvedeny v tabulce 9. Padesát μl takto připravených standardů v plné krvi bylo pipetováno na odběrovou kartu Whatman #903 (předem ošetřenou BHT) a ty byly ponechány zaschnout za stejných podmínek jako v případě reálných vzorků.



**Tabulka 8** Příprava směsných standardů S0–S4

	Standard S5 [μl]	Krev [μl]
S0	0	300
S1	30	570
S2	30	270
S3	60	240
S4	150	150

**Tabulka 9a** Koncentrace mastných kyselin ve směsných standardech S1–S5

Mastná kyselina	Koncentrace S5 [μmol/l]	Koncentrace S4 [μmol/l]	Koncentrace S3 [μmol/l]	Koncentrace S2 [μmol/l]	Koncentrace S1 [μmol/l]
Heptanová	28,3	14,1	5,7	2,8	1,4
Nonanová	29,7	14,8	5,9	3,0	1,5
Undekanová	29,1	14,5	5,8	2,9	1,5
Dodekanová	227,2	113,6	45,4	22,7	11,4
Tridekanová	32,4	16,2	6,5	3,2	1,6
Myristová	727,5	363,8	145,5	72,8	36,4
Myristolejová	66,4	33,2	13,3	6,6	3,3
Pentadekanová	57,2	28,6	11,4	5,7	2,9
Palmitová	7110,2	3555,1	1422,0	711,0	355,5
Palmitolejová	425,9	212,9	85,2	42,6	21,3
Fytanová	34,8	17,4	7,0	3,5	1,7
Heptadekanová	96,2	48,1	19,2	9,6	4,8
Stearová	3707,2	1853,6	741,4	370,7	185,4
<i>cis</i> -Vacenová	511,6	255,8	102,3	51,2	25,6
<i>trans</i> -Vacenová	122,8	61,4	24,6	12,3	6,1
Olejová	7545,6	3772,8	1509,1	754,6	377,3
Elaidová	593,2	296,6	118,6	59,3	29,7
Linolová	7345,8	3672,9	1469,2	734,6	367,3
Linolelaidová	58,0	29,0	11,6	5,8	2,9
Linolenová	648,6	324,3	129,7	64,9	32,4
γ-Linolenová	363,2	181,6	72,6	36,3	18,2
Stearidonová	45,7	22,9	9,1	4,6	2,3
Nonadekanová	36,0	18,0	7,2	3,6	1,8
Arachidová	184,9	92,5	37,0	18,5	9,2
Eikosatrienová	188,6	94,3	37,7	18,9	9,4
Arachidonová	531,4	265,7	106,3	53,1	26,6
Eikosapentaenová	179,1	89,6	35,8	17,9	9,0
Heneikosanová	17,9	9,0	3,6	1,8	0,9
Behenová	57,3	28,6	11,5	5,7	2,9
Eruková	37,6	18,8	7,5	3,8	1,9
Dokosatrienová	18,1	9,1	3,6	1,8	0,9
Dokosatetraenová	81,5	40,7	16,3	8,1	4,1
Dokosapentaenová	131,1	65,6	26,2	13,1	6,6
Dokosahexaenová	171,5	85,8	34,3	17,2	8,6
Trikosanová	18,3	9,2	3,7	1,8	0,9

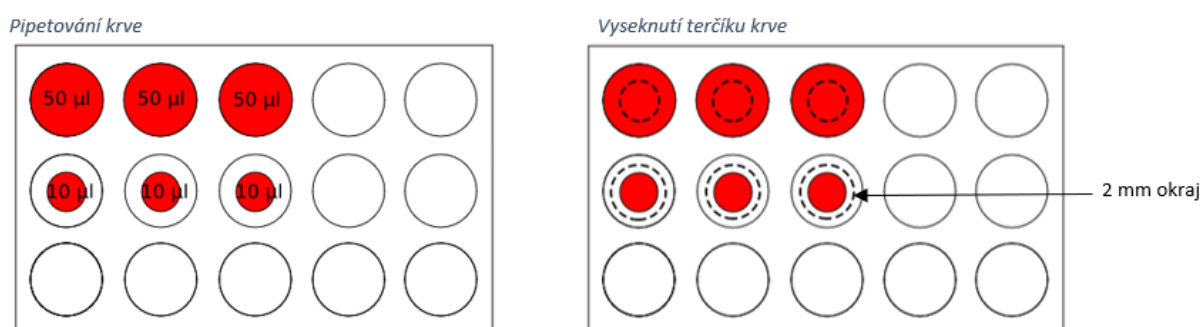
**Tabulka 9b** Koncentrace mastných kyselin ve směsných standardech S1–S5

Mastná kyselina	Koncentrace S5 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Koncentrace S4 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Koncentrace S3 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Koncentrace S2 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Koncentrace S1 [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Tetrakosanová	35,3	17,6	7,1	3,5	1,8
Hexakosanová	36,4	18,2	7,3	3,6	1,8

### 3.5 Příprava vzorků suché kapky krve

**Příprava vzorků suché kapky krve pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin, kdy byl terčík (6mm) vyseknut z krevní skvrny s objemem 50  $\mu\text{l}$  a celé krevní skvrny s objemem 10  $\mu\text{l}$**

Terčík o průměru 6 mm, vyseknutý ze vzorku DBS, odpovídá přibližně objemu 10  $\mu\text{l}$  krve. Vzorky DBS byly připraveny tak, že na odběrové karty, ošetřené 1% roztokem BHT, bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$  krve (obrázek 2). Vzorky byly připraveny v triplicátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí krve byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky, jak je znázorněno na obrázku 2.

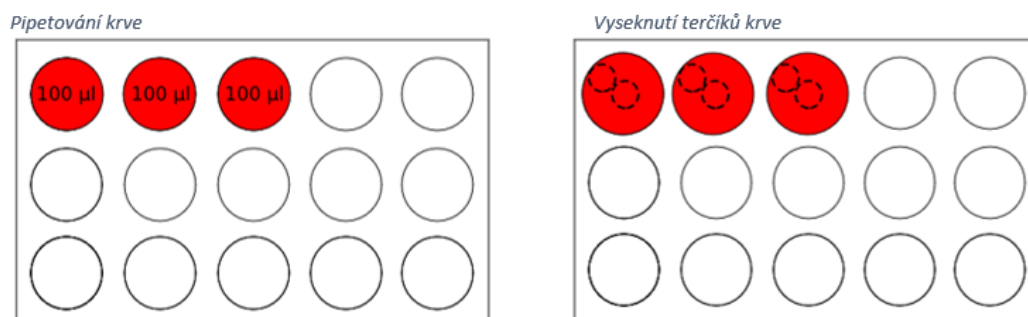


**Obrázek 2** Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin

**Příprava vzorků suché kapky krve pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin, kdy byl terčík (6mm) vyseknut uprostřed a na okraji krevní skvrny**

Vzorky DBS byly připraveny pipetováním 100  $\mu\text{l}$  krve na odběrové karty ošetřené 1% roztokem BHT (obrázek 3). Vzorky byly připraveny v triplicátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí krve byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku

a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky, jak je znázorněno na obrázku 3.



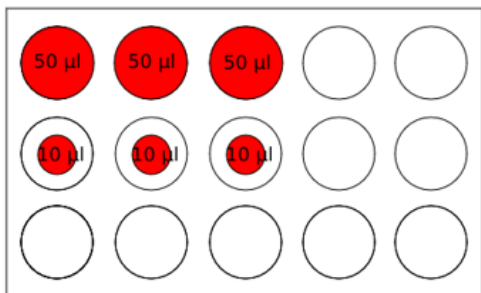
**Obrázek 3** Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčků ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných vybraných mastných kyselin

### **Příprava vzorků pro techniku zavádění vnitřního standardu ke vzorku suché kapky krve**

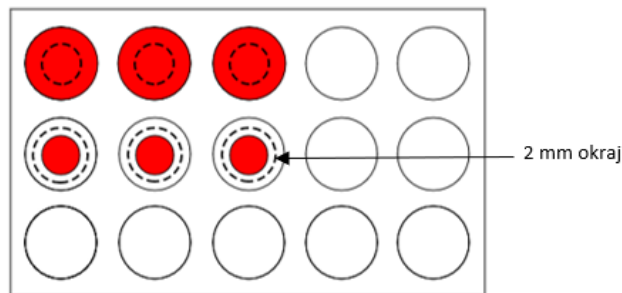
Vzorky DBS pro určení nejvhodnější techniky zavedení IS byly připraveny 5 různými způsoby.

1) Prvním a zároveň referenčním způsobem zavedení IS ke vzorku DBS bylo přidání IS do krve před jejím nanesením na odběrovou kartu. Roztok IS o koncentraci asi  $100\text{ mg/l}$  a objemu  $500\text{ }\mu\text{l}$  byl odpařen do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno  $20\text{ }\mu\text{l}$  ethanolu a směs byla následně po dobu 2 minut promíchána na vortexu. Po promíchání bylo ke směsi přidáno  $480\text{ }\mu\text{l}$  krve. Po opatrném promíchání byla krev pipetována na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT ( $50\text{ }\mu\text{l}$  a  $10\text{ }\mu\text{l}$ ; obrázek 4). Vzorky DBS byly připraveny v triplikátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí krve byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky (obrázek 4).

Pipetování směsi krve s vnitřním standardem



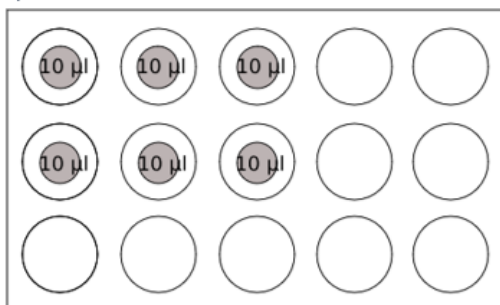
Vyseknutí terčíku směsi krve s vnitřním standardem



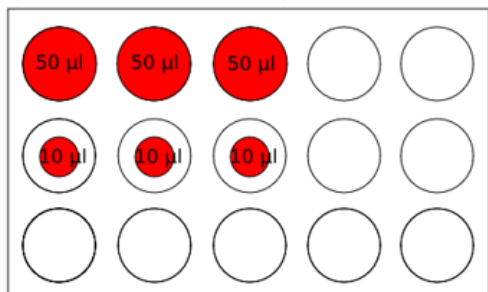
**Obrázek 4** Způsob pipetování krve na odběrovou kartu (vlevo) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů ploch piků jednotlivých mastných kyselin k ploše piků vnitřního standardu

2) Druhý způsob spočíval v pipetování roztoku IS na odběrovou kartu, kdy po zaschnutí byla na skvrnu zaschlého IS pipetována krev. Na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT bylo pipetováno 10 µl IS o koncentraci asi 100 mg/l. Na zaschlou skvrnu IS bylo následně pipetováno 50 µl nebo 10 µl krve (obrázek 5). Vzorky byly připraveny v triplicátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vysekнутy terčíky (obrázek 5).

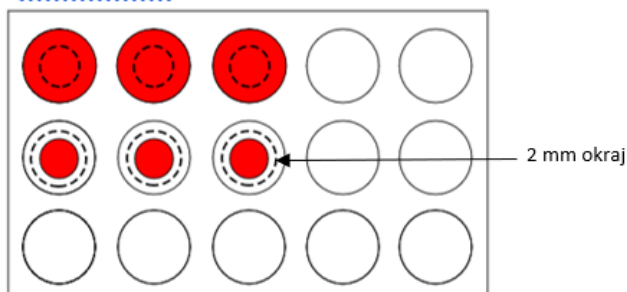
Pipetování vnitřního standardu



Pipetování krve na zaschlé skvrny vnitřního standardu

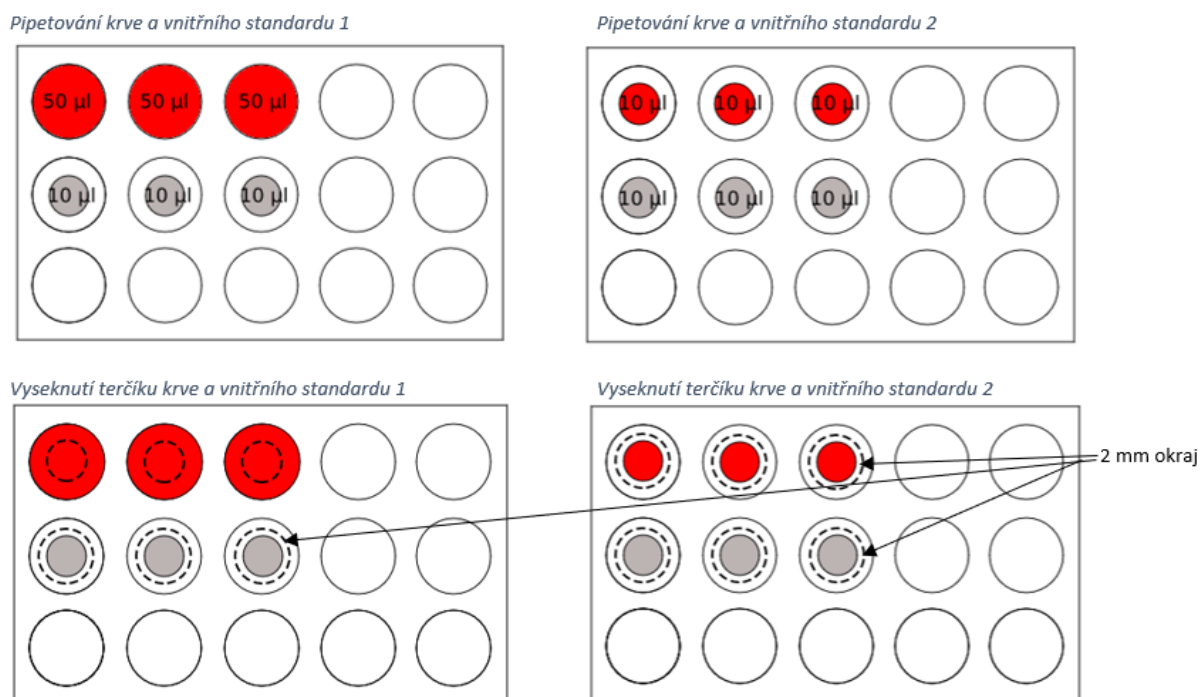


Vyseknutí terčíku vnitřního standardu s krví



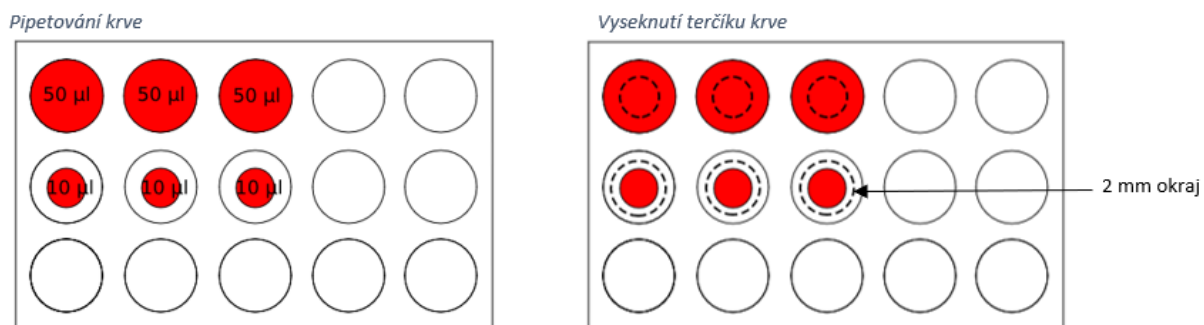
**Obrázek 5** Způsob pipetování roztoku vnitřního standardu (nahore vlevo) a krve (dole vlevo) na odběrovou kartu, a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (dole vpravo) pro porovnání poměrů ploch piků jednotlivých mastných kyselin k ploše piků vnitřního standardu

3) U třetí techniky byly roztok IS a krev nanášeny na odběrovou kartu odděleně. Na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT bylo pipetováno 10  $\mu$ l IS o koncentraci asi 100 mg/l, na stejnou kartu bylo vedle pipetováno 50  $\mu$ l nebo 10  $\mu$ l krve (obrázek 6). Vzorky byly připraveny v triplikátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20$  °C. Před analýzou byly ze vzorků DBS a IS vyseknuty terčíky (obrázek 6).



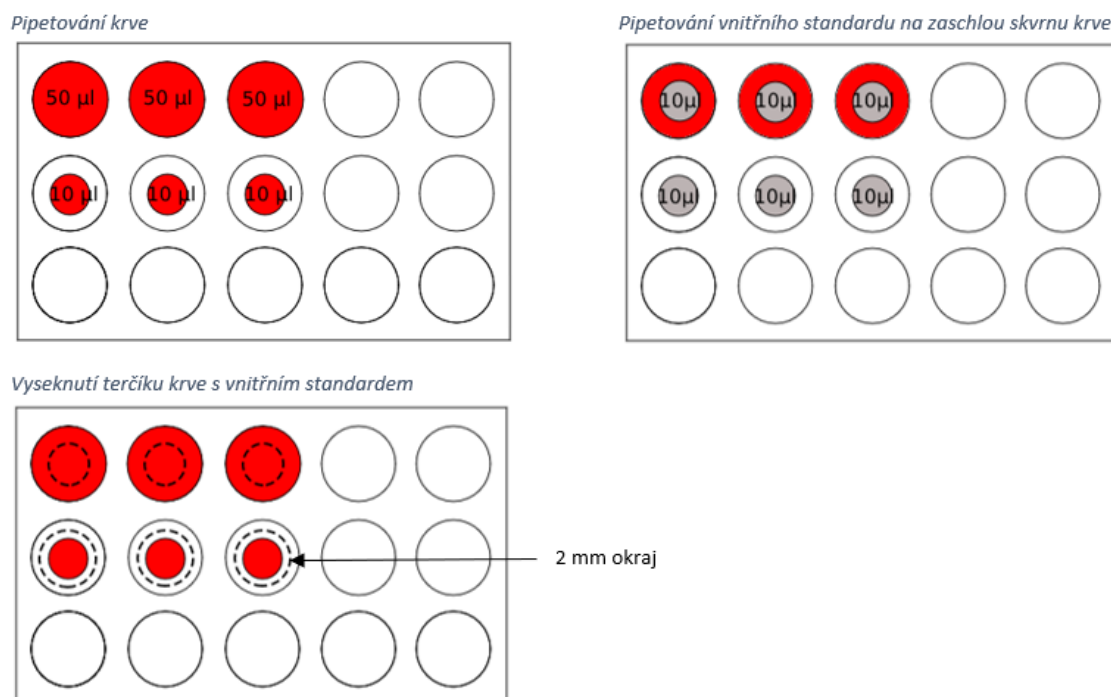
**Obrázek 6** Způsob pipetování roztoku vnitřního standardu (šedé kruhy nahoře) a krve (červené kruhy nahoře), a vyseknutí terčíku ze vzorku vnitřního standardu (šedé kruhy dole) a vzorku suché kapky krve (červené kruhy dole) pro porovnání poměrů ploch piku jednotlivých mastných kyselin k ploše piku vnitřního standardu

4) U čtvrté techniky byl IS obsažen v extrakčním činidle. Do zkumavky bylo pipetováno 100  $\mu$ l IS o koncentraci asi 100 mg/l, přidáno 4,9 ml ethanolu a směs byla promíchána na vortexu. Tato směs byla použita jako extrakční činidlo pro extrakci MK z terčíku vzorku DBS. Na odběrové karty ošetřené 1% roztokem BHT bylo pipetováno 50  $\mu$ l nebo 10  $\mu$ l krve (obrázek 7). Vzorky byly připraveny v triplikátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20$  °C. Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky (obrázek 7).



**Obrázek 7** Způsob pipetování krve (vlevo) a vyseknutí terčičku ze vzorku suché kapky krve (vpravo) pro porovnání poměrů ploch píku jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu

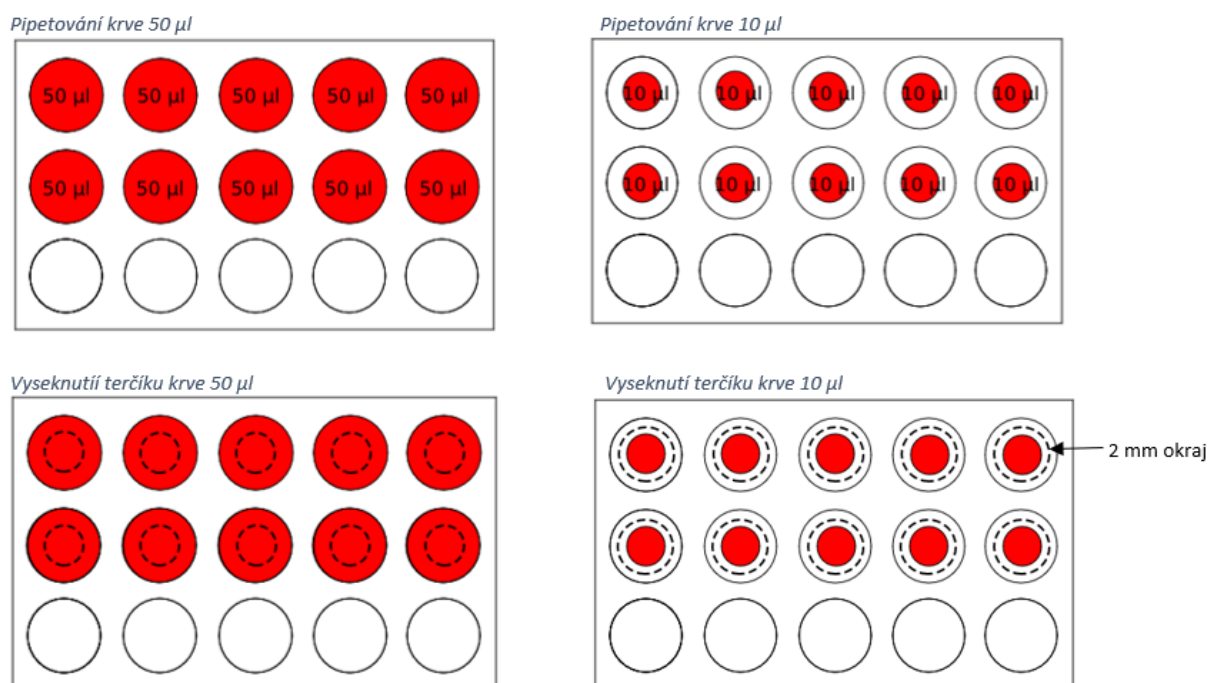
5) Pátá technika spočívala v pipetování krve, na níž byl po zaschnutí pipetován roztok IS. Na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT bylo pipetováno 50 µl nebo 10 µl krve. Po zaschnutí bylo na krevní skvrnu pipetováno 10 µl roztoku IS (obrázek 8). Vzorky byly připraveny v triplikátu (celkem 6 vzorků). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vysekнутy terčičky (obrázek 8).



**Obrázek 8** Způsob pipetování krve (vlevo nahoře), roztoku vnitřního standardu na vzorek zaschlé krve (vpravo nahoře) a vyseknutí terčičku ze vzorku suché kapky krve (vlevo dole) pro porovnání poměrů ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu

## Příprava vzorků suché kapky krve pro určení nepřesnosti metody stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve

Vzorky DBS byly připraveny pipetováním 50  $\mu\text{l}$  nebo 10  $\mu\text{l}$  krve na odběrové karty ošetřené 1% roztokem BHT (obrázek 9). Bylo připraveno celkem 10 vzorků DBS, kdy na odběrovou kartu bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  krve a 10 vzorků DBS, kdy na odběrovou kartu bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  krve. Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky tak, že v případě vzorků DBS, kde bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  krve, byl ze středu vyseknut 6mm terčík a v případě vzorků DBS, kde bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  krve, byl zpracován celý vzorek DBS (obrázek 9).

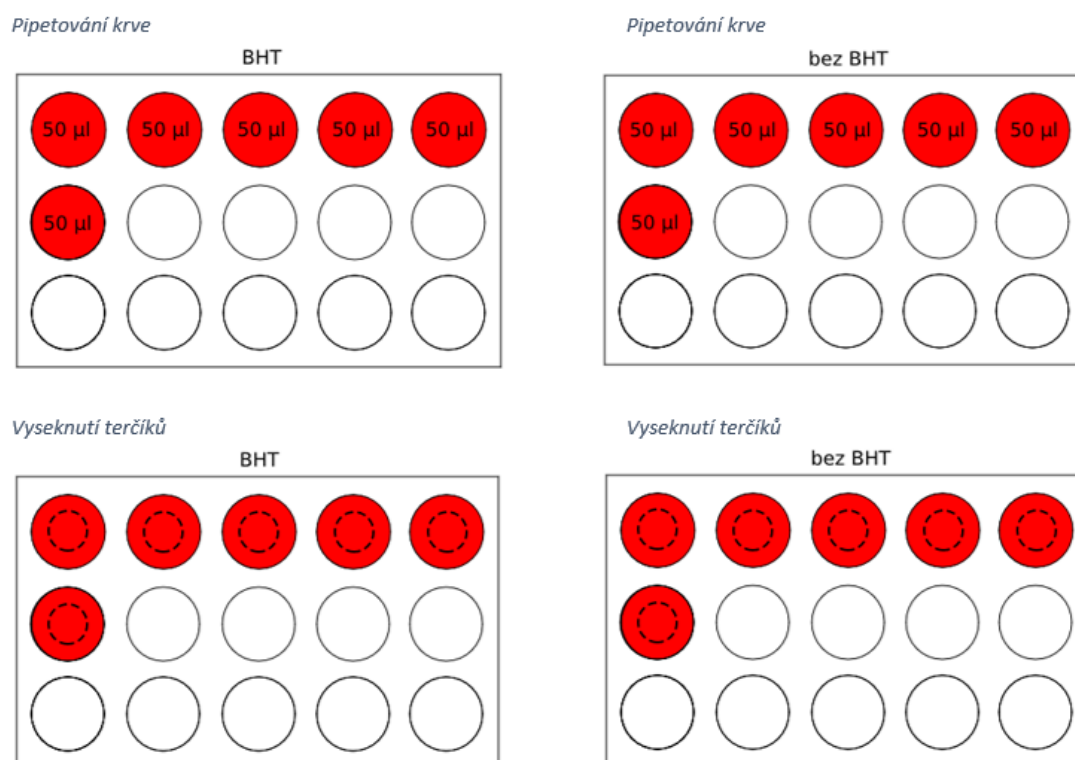


*Obrázek 9 Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení nepřesnosti metody stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve*

## Příprava vzorků suché kapky krve pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve

Bylo připraveno celkem 12 vzorků DBS tak, že na odběrovou kartu bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  krve. Z toho 6 vzorků krve bylo pipetováno na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT,

a 6 vzorků krve bylo pipetováno na neošetřenou odběrovou kartu (obrázek 10). Po zaschnutí byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky a analyzovány (obrázek 10).



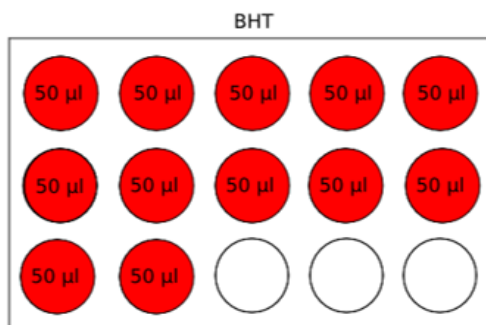
**Obrázek 10** Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčíku ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve

#### Sledování stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při pokojové teplotě

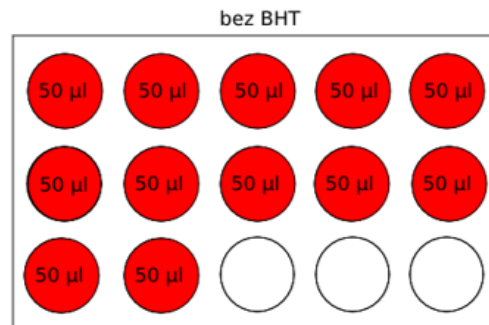
Bylo připraveno celkem 24 vzorků DBS tak, že na odběrové karty bylo pipetováno 50 µl krve. Z toho 12 vzorků krve bylo pipetováno na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT, a 12 vzorků krve bylo pipetováno na neošetřenou odběrovou kartu (obrázek 11). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku, uskladněny při pokojové teplotě a chráněny před přímým slunečním světlem. Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky (obrázek 11). Tyto vzorky DBS byly použity pro určení stability vybraných MK ve vzorcích DBS uchovávaných při pokojové teplotě po dobu 24 h, 48 h, 72 h a 1 týdnem.



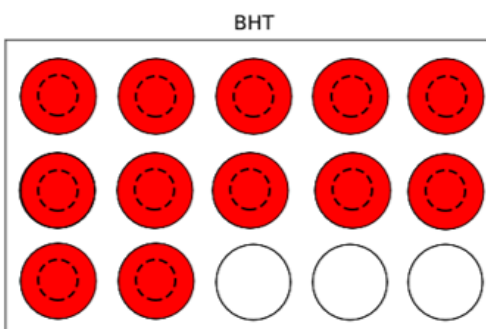
Pipetování krve



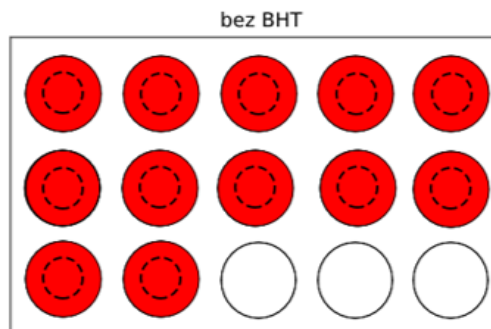
Pipetování krve



Vyseknutí terčků



Vyseknutí terčků

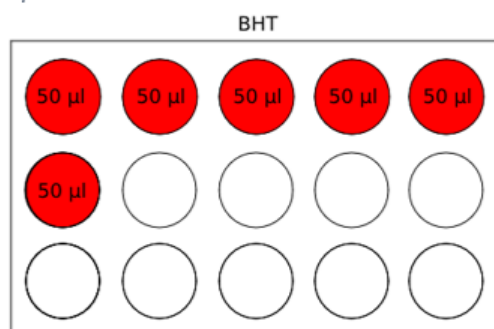


**Obrázek 11** Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčků ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při pokojové teplotě

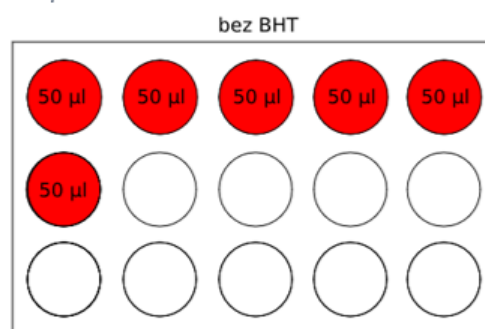
#### Sledování stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při 4 °C

Bylo připraveno celkem 12 vzorků DBS. Na odběrové karty bylo pipetováno 50 µl krve. Z toho 6 vzorků krve bylo pipetováno na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT a 6 vzorků krve bylo pipetováno na neošetřenou odběrovou kartu (obrázek 12). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při 4 °C. Před analýzou byly ze vzorků DBS vysekнутy terčičky (obrázek 12). Tyto vzorky DBS byly použity pro určení stability vybraných MK ve vzorcích DBS uchovávaných při teplotě 4 °C po dobu 1, 2 a 3 týdnů.

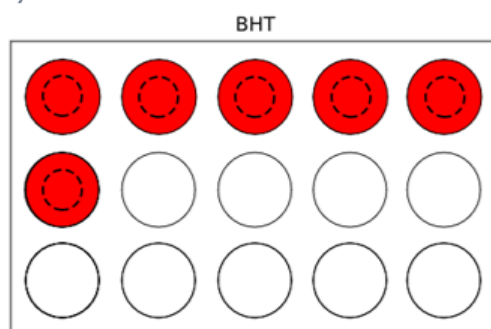
Pipetování krve



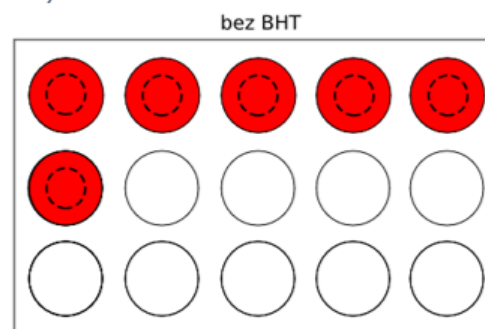
Pipetování krve



Vyseknutí terčů



Vyseknutí terčů

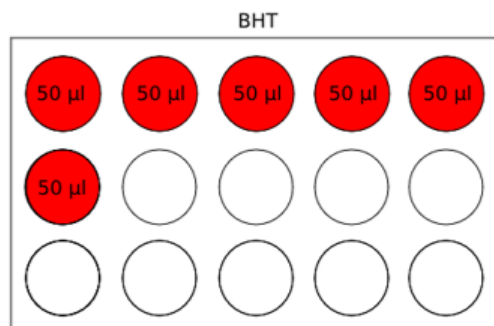


**Obrázek 12** Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčů ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při 4 °C

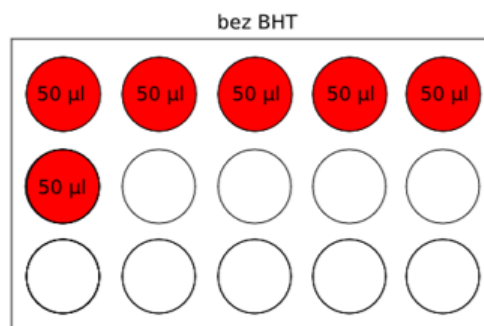
#### Sledování stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při -20 °C

Bylo připraveno celkem 12 vzorků DBS. Na odběrové karty bylo pipetováno 50 µl krve. Z toho 6 vzorků krve bylo pipetováno na odběrovou kartu ošetřenou 1% roztokem BHT a 6 vzorků krve bylo pipetováno na neošetřenou odběrovou kartu (obrázek 13). Po zaschnutí byly odběrové karty uloženy v hermeticky uzavíratelném polypropylenovém sáčku a uskladněny při -20 °C. Před analýzou byly ze vzorků DBS vyseknuty terčíky (obrázek 13). Tyto vzorky DBS byly použity pro určení stability vybraných MK ve vzorcích DBS uchovávaných při teplotě -20 °C po dobu 1, 2 a 3 týdnů.

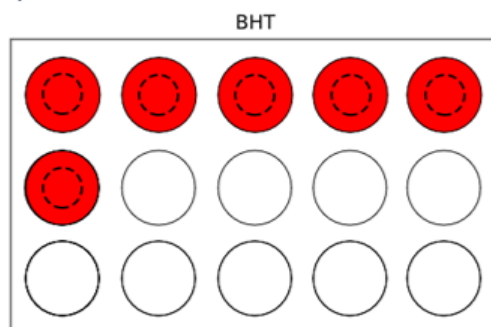
Pipetování krve



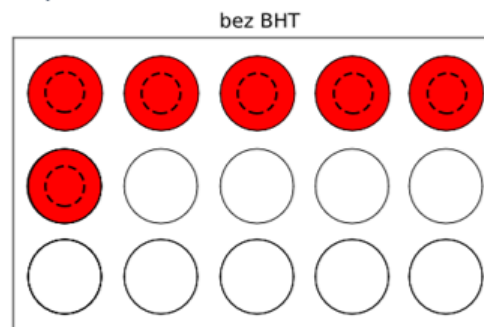
Pipetování krve



Vyseknutí terčků



Vyseknutí terčků



**Obrázek 13** Způsob pipetování krve (obrázky nahoře) a vyseknutí terčků ze vzorku suché kapky krve (obrázky dole) pro určení stability vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 3.6 Pracovní postupy stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

#### 3.6.1 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsných standardech o koncentraci asi 20 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu

Mastné kyseliny v jednotlivých sadách (tabulka 5) byly analyzovány pro určení jejich retenčních časů a optimálních cílových a referenčních m/z. Do zkumavky se šroubovacím uzávěrem a teflonovým těsněním (zkumavka Pyrex) bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  směsného standardu vybraných MK, 250  $\mu\text{l}$  směsi ethanolu s acetylchloridem v poměru 5:1 (v/v) a obsah zkumavky byl inkubován při 100  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Směs byla po ochlazení na okolní teplotu neutralizována přidáním 2 ml roztoku hydrogenuhličitanu draselného (asi 6%). Ethylestery mastných kyselin (FAEE; z angl. fatty acids ethyl esters) byly extrahovány n-hexanem. Ke směsi byly přidány 2 ml n-hexanu, obsah zkumavky byl třepán po dobu 5 minut (1200 rpm), poté odstředěn (1700  $\times$  g, 3 min) a hexanová vrstva byla přenesena do čisté zkumavky. Celý proces se opakoval, n-hexan byl opatrně odpařen v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  dichlormethanu, po důkladném promíchání bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  ethanolu a po dalším důkladném promíchání byla směs následně přenesena do insertu vialek.

### **3.6.2 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu S5**

Do zkumavky se šroubovacím uzávěrem a teflonovým těsněním (zkumavka Pyrex) bylo pipetováno 250 µl směsného standardu S5 a 250 µl směsi ethanolu s acetylchloridem v poměru 5:1 (v/v). Další postup byl stejný, jak je uvedeno v kapitole 3.6.1.

### **3.6.3 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu o koncentraci asi 10 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu**

Tento směsný standard byl použit pro přípravu směsného standardu FAEE. Směsný standard FAEE byl analyzován v každé dávce analyzovaných vzorků pro kontrolu retenčních časů jednotlivých FAEE stanovovaných MK. Do zkumavky se šroubovacím uzávěrem a teflonovým těsněním (zkumavka Pyrex) bylo pipetováno 500 µl směsného standardu vybraných MK, 50 µl IS o koncentraci asi 100 mg/l a 250 µl směsi ethanolu s acetylchloridem v poměru 5:1 (v/v). Další postup přípravy vzorku byl shodný jako v kapitole 3.6.1.

### **3.6.4 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu o koncentraci asi 10 mg/l pro jednotlivou mastnou kyselinu (příprava methylesterů mastných kyselin)**

Tento směsný standard byl použit pro přípravu směsného standardu FAME. Směsný standard FAME byl použit pro porovnání retenčních časů FAEE a FAME stanovovaných MK. Do zkumavky se šroubovacím uzávěrem a teflonovým těsněním (zkumavka Pyrex) bylo pipetováno 500 µl směsného standardu vybraných MK o koncentraci asi 10 mg/l, který byl opatrně odpařen v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 500 µl methanolu. Poté bylo přidáno 50 µl IS o koncentraci asi 100 mg/l a 250 µl směsi methanolu s acetylchloridem v poměru 5:1 (v/v). Další postup přípravy vzorku byl stejný jako v kapitole 3.6.1, jen odparek byl rozpuštěn ve směsi dichlormethanu a methanolu.

### **3.6.5 Pracovní postup stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve**

Ze vzorku DBS (vzorek dárce krve, standard) byl vyražen terčík o průměru 6 mm a vložen do zkumavky se šroubovacím víčkem a teflonovým těsněním (Pyrex). K terčíku bylo přidáno 500 µl roztoku IS v ethanolu (deuterovaná kyselina palmitová o koncentraci asi 2 mg/l), obsah zkumavky byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 1 h, po inkubaci byl terčík vyjmut. Do

zkumavky bylo přidáno 100 µl acetylchloridu a obsah zkumavky byl inkubován při 100 °C po dobu 1 hodiny. Další postup přípravy vzorku je stejný jako v kapitole 3.6.1.

### 3.6.6 Podmínky pro stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Split mód: 10:1

Teplota nástřiku: 250 °C

Kolona: HP-88, J&W, 100 m × 250 µm × 0,25 µm, stacionární fáze 88 % kyanopropylen a 12 % arylpolysiloxan

Teplotní gradient:

Změna hodnoty [°C/min]	Teplota [°C]	Čas [min]
–	75	3
10	200	0
0,8	230	5

Doba analýzy: 58 min

Průtok MF (helium): 3 ml/min

Teplota MS: 200 °C iontový zdroj

250 °C teplota rozhraní

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Technika DBS typicky spočívá v aplikaci malého objemu kapilární krve na speciální odběrové karty. Ve srovnání se vzorky plné krve nebo plazmy spočívá její výhoda ve skutečnosti, že odběr vzorku kapilární krve je méně invazivní, skladování a transport vzorků DBS je jednoduchý a v celé řadě případů nevyžaduje transport takovýchto vzorků chlazení.

Vzorky plné krve se klasicky získávají venepunkcí do odběrových zkumavek obsahujících antikoagulační činidlo. Během přepravy a skladování jsou vzorky chlazeny. Technika DBS spočívá v nanesení jen několika kapek kapilární krve, nejčastěji získané píchnutím do prstu ruky, na odběrovou kartu. Analyty jsou tak adsorbovány se složkami krve na pevnou matici na bázi celulózy. Adsorpce analytů a pevná povaha vzorků DBS činí analyty typicky méně reaktivní než v kapalně krvi. To je jedna z výhod techniky DBS. Analyty často vykazují vynikající stabilitu při laboratorní (okolní) teplotě, a to po dobu i několika dní. Navíc analyty nestabilní v biologických tekutinách lze stabilizovat přidávkem stabilizačního činidla. V praxi se to provádí tak, že odběrová karta je před nanesením vzorků krve ošetřena stabilizačním činidlem. Jelikož technika DBS vyžaduje pouze „píchnutí“ do prstu, není obtížné takový odběr krve provést a může se ho snadno naučit neškolený zdravotnický personál nebo dokonce i samotní pacienti, zatímco pro odběr žilní krve venepunkcí je zapotřebí školený personál. Objem odebrané krve je poměrně malý (typicky desítky mikrolitrů), zatímco standardní odběr krve venepunkcí vyžaduje objemy v jednotkách mililitrů. Technika DBS je tak významná v případech, kdy je objem odebírané krve omezený. V klinické praxi se to týká novorozenců nebo kriticky nemocných pacientů. Dalším příkladem jsou preklinické studie ve vývoji léčiv, kdy jsou ve studiích využívána malá laboratorní zvířata, například myši.

I když technika DBS vyžaduje jednoduchý odběr krve, nesprávný postup odběru může vést k velkým nesrovnalostem ve výsledcích. Před aplikací krve na odběrovou kartu je nutné zabránit jakémukoli kontaktu s místem, na které je krev aplikována. Místo vpichu se musí očistit alkoholem. První kapka krve se odstraní a následně další kapky krve se aplikují na odběrovou kartu. Kruhy vytištěné na odběrové kartě musejí být krví vyplněny úplně a homogenně. Vzorky krve nanesené na odběrovou kartu se nechají zaschnout při pokojové teplotě v horizontální poloze a chráněné před přímým slunečním světlem po dobu minimálně 3 hodin. Vzorky DBS by měly být do laboratoře dopraveny v hermeticky uzavíratelných sáčcích s vysoušedlem do 24 hodin. Před analýzou je vhodné vzorky DBS zkontrolovat, zda splňují kritéria vzhledu pro kvantitativní analýzu. Vzorky DBS, které vykazují nedostatečný

objem, kroužky séra, viditelné stopy hemolýzy, známky srážení, vrstvení a přesycení, musejí být vyřazeny. Celá řada získaných vzorků DBS od dárců krve či pacientů bývá ze studií vyřazena, což je velkou slabinou techniky DBS.

Na kvantitativní analýzu analytů ve vzorcích DBS má vliv celá řada faktorů, což je velkou výzvou pro analytické chemiky. Při vývoji metody je zapotřebí zohlednit všechny tyto faktory. Cílem této práce bylo zaměřit se na některé z těchto parametrů při stanovení vybraných MK v krvi získané technikou DBS. Při vývoji metody stanovení vybraných MK ve vzorcích DBS by bylo pro zohlednění všech možných faktorů ovlivňujících kvantitativní výsledky potřeba analyzovat několik tisíc vzorků DBS. Tato diplomová práce je první prací na našem pracovišti, která se zabývá faktory, jež ovlivňují kvantitativní výsledky stanovení vybraných MK ve vzorcích DBS. V důsledku toho je třeba ji považovat za první náhled do této problematiky, která bude v rámci dalšího výzkumu a několika budoucích diplomových prací dále řešena. Vycházeli jsme z metody stanovení MK v plazmě technikou GC-FID, kterou jsme v rámci této práce jen nepatrně modifikovali pro přechod na metodu GC-MS. V rámci řešení budoucích diplomových prací je v plánu metodu optimalizovat a validovat tak, aby byla vhodná pro klinické využití. Snahou bude především zkrátit dobu analýzy, rozšířit spektrum stanovovaných MK a vyřešit kvantifikaci MK konstrukcí vhodné kalibrační křivky.

Jak už bylo uvedeno výše, na kvantitativní výsledky analýz vzorků DBS má vliv celá řada faktorů. Pro pořádek zde uvedu hlavní faktory ovlivňující kvantitativní výsledky, i když celá řada jich v této práci z kapacitních a časových důvodů nebyla řešena. Nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími kvantitativní výsledky při stanovení celé řady analytů ve vzorcích DBS jsou chromatografické účinky, vliv hodnoty hematokritu, objemové účinky aplikované krve na odběrovou kartu a stabilita analytů ve vzorcích DBS. Důležité jsou také parametry související s designem experimentu jako je technika zavádění IS a způsob děrování (vysekávání) terčků (disků) ze vzorku DBS – zda částečně nebo úplně.

Ideální by bylo, kdyby se vzorek krve aplikovaný na odběrovou kartu rozprostřel na papíře homogenně, což nenastává, a tento stav se označuje jako chromatografické účinky. Jednoduše řečeno, koncentrace analytu je v různém místě vzorku DBS (skvrny krve) odlišná. Problémem pak je, jaký terčík ze vzorku DBS vyseknout, aby byl reprezentativní. My jsme porovnávali poměry plochy píku jednotlivých MK k ploše píku IS vybraných MK ve vzorcích DBS, z nichž byl terčík vyseknut ze středu a z periferie skvrny krve.

Dalším významným parametrem, který může ovlivnit kvantitativní výsledky, je hodnota hematokritu. Vzorek krve s vyšší hodnotou hematokritu má vyšší viskozitu a taková krev se méně rozšiřuje na papíře. Výsledkem je, že ve vyseknutých terčících vzorku DBS s vysokou hodnotou hematokritu je větší množství krve. Dalším aspektem, který je třeba zvážit, je různá distribuce analytu mezi erytrocyty a frakcí plazmy. Vliv hodnoty hematokritu na kvantitativní výsledky jsme v této práci netestovali.

Krev pro kalibrační standardy a vzorky kvality kontroly je obvykle nanášena na odběrové karty s definovaným objemem. Pokud je na odběrovou kartu aplikována krev z oblasti vpichu, nelze nanést přesně definovaný objem krve. Je tedy žádoucí určit, zda velikost aplikovaného objemu krve na odběrovou kartu má účinek na kvantitativní výsledky. Jsou porovnávány hladiny analytů v terčících vyseknutých ze středu vzorků DBS, kdy na odběrovou kartu byl nanášen různě velký objem stejného vzorku. Vliv velikosti aplikovaného objemu krve na odběrovou kartu na kvantitativní výsledky jsme v této práci netestovali.

Jak již bylo uvedeno výše, nespornou výhodou techniky DBS je vyšší stabilita analytů v porovnání s kapalnou krví. I tak existuje celá řada analytů, které mohou být v zaschlé krvi při okolní teplotě nestabilní. Řešením může být uchovávání vzorků DBS při nižší teplotě nebo stabilizace analytů vhodnými stabilizačními činidly. Odběrové karty mohou být stabilizačními činidly předem impregnovány, případně může být předtištěný kruh na odběrové kartě, kam je vzorek krve nanášen, ošetřen vhodným stabilizačním činidlem tak, že do jeho středu je pipetován daný objem roztoku stabilizačního činidla a před aplikací krve ponechán zaschnout. PUFA jsou obecně náchylné k oxidaci, proto jsme testovali vliv antioxidačního činidla, BHT, na jejich stabilitu.

#### **4.1. Určení retenčních časů ethylesterů mastných kyselin při separaci plynovou chromatografií**

Pro identifikaci vybraných MK ve vzorcích DBS jsme určili retenční časy odpovídajících FAEE. Pro určení retenčních časů jsme připravili 8 sad směsných standardů MK (7 sad po pěti MK a 1 sadu se dvěma MK). Směsné standardy byly analyzovány v módu „SCAN“. Simultánně jsme připravili a analyzovali FAME stejných MK. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 10. Na základě výsledků získaných v módu „SCAN“ jsme pro kvantifikaci MK ve vzorcích DBS vytvořili metodu „SIM“



**Tabulka 10** Retenční časy ethylesterů a methylesterů vybraných mastných kyselin, cílové a referenční m/z pro ethylestery mastných kyselin

Název MK	Zkrácený zápis	Retenční čas FAEE [min]	Cílový m/z FAEE	Referenční m/z FAEE	Retenční čas FAME [min]
Heptanová	C7:0	12,34	–	–	–
Nonanová	C9:0	14,61	88	55, 101	–
Undekanová	C11:0	16,59	88	55, 101	16,16
Dodekanová	C12:0	17,51	88	55, 101	17,11
Tridekanová	C13:0	18,41	88	55, 101	18,02
Myristová	C14:0	19,31	88	55, 101	18,92
Myristolejová	C14:1 (n-5)	20,02	55	69, 88	19,65
Pentadekanová	C15:0	20,24	88	55, 101	19,84
Palmitová	C16:0	21,23	88	55, 101	20,80
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	21,94	55	69, 88	21,52
Fytanová	3,7,11,15-tetramethyl-C16:0	21,98	115	88, 55	21,54
Heptadekanová	C17:0	22,30	88	55, 101	21,84
Stearová	C18:0	23,50	88	55, 101	22,98
Elaidová	C18:1 (n-9 <i>trans</i> )	24,01	55	69, 83	23,51
<i>trans</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>trans</i> )	24,08	55	69, 83	23,58
Olejová	C18:1 (n-9 <i>cis</i> )	24,28	55	69, 83	23,79
<i>cis</i> -Vacenová	C18:1 (n-7 <i>cis</i> )	24,41	55	69, 83	23,90
Nonadekanová	C19:0	24,85	88	55, 101	24,27
Linolelaidová	C18:2 (n-6 <i>trans</i> )	24,87	67	55, 81	24,37
Linolová	C18:2 (n-6 <i>cis</i> )	25,57	67	55, 81	25,06
Arachidová	C20:0	26,38	88	57, 101	25,74
$\gamma$ -Linolenová	C18:3 (n-6 <i>cis</i> )	26,55	79	55, 67	26,08
Linolenová	C18:3 (n-3 <i>cis</i> )	27,25	79	55, 67	26,71
Heneikosanová	C21:0	28,17	88	57, 101	27,39
Stearidonová	C18:4 (n-3 <i>cis</i> )	28,39	79	55, 67	28,46
Behenová	C22:0	30,18	88	57, 101	29,31
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 <i>cis</i> )	30,38	79	55, 67	29,74
Arachidonová	C20:4 (n-6 <i>cis</i> )	31,35	79	55, 67	30,65
Eruková	C22:1 (n-9 <i>cis</i> )	31,51	55	69, 83	30,82
Trikosanová	C23:0	32,50	88	57, 101	31,48
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 <i>cis</i> )	33,89	79	67, 91	33,35
Tetrakosanová	C24:0	35,08	88	57, 101	33,93
Dokosatrienová	C22:3 (n-3 <i>cis</i> )	36,37	79	55, 67	35,48
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 <i>cis</i> )	36,87	79	55, 67	36,13
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 <i>cis</i> )	37,91	79	67, 93	–
Hexakosanová	C26:0	41,19	88	57, 101	39,70
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 <i>cis</i> )	41,25	79	67, 91	40,65

MK, mastná kyselina; FAEE, ethylester mastné kyseliny; FAME, methylester mastné kyseliny.

FAME kyseliny heptanové, nonanové a dokosapentaenové nebyly detegovány.

## 4.2. Určení odezvy detektoru na koncentraci jednotlivých ethylesterů vybraných mastných kyselin

K určení odezvy detektoru na koncentraci jednotlivých FAEE byl použit směsný standard MK o koncentraci asi 10 mg/l. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

*Tabulka 11* Plochy píků ethylesterů mastných kyselin vztažených na  $\mu\text{mol/l}$

Název MK	Plocha píku	Koncentrace [mg/l]	Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	[pmol]	Plocha píku vztažená na $\mu\text{mol/l}$
Undekanová	6913	10,9	58,5	58,5	118,1
Dodekanová	8071	11,0	54,9	54,9	147,0
Tridekanová	8402	11,0	51,3	51,3	163,7
Myristová	13757	11,3	49,5	49,5	278,0
Myristolejová	10406	10,8	47,7	47,7	218,1
Pentadekanová	9716	11,0	45,4	45,4	214,1
Palmitová	15078	13,8	53,8	53,8	280,2
Palmitolejová	17922	10,8	42,5	42,5	422,2
Fytanová	10057	10,9	34,9	34,9	288,4
Heptadekanová	10477	11,0	40,7	40,7	257,6
Stearová	11467	9,6	33,7	33,7	339,8
Elaidová	7411	10,8	38,2	38,2	193,8
<i>trans</i> -Vacenová	10209	11,0	38,9	38,9	262,1
Olejová	6134	9,2	32,6	32,6	188,3
<i>cis</i> -Vacenová	10487	10,9	38,6	38,6	271,8
Nonadekanová	8576	10,9	36,5	36,5	234,9
Linolelaidová	9193	10,9	38,9	38,9	236,5
Linolová	11061	15,6	55,6	55,6	198,9
Arachidová	9717	10,9	34,9	34,9	278,6
$\gamma$ -Linolenová	5159	10,9	39,1	39,1	131,8
Linolenová	8353	10,9	39,1	39,1	213,4
Heneikosanová	10339	10,9	33,4	33,4	309,8
Stearidonová	9249	10,9	39,4	39,4	234,6
Behenová	8825	10,8	31,7	31,7	278,3
Eikosatrienová	3933	10,9	35,6	35,6	110,6
Arachidonová	6375	11	36,1	36,1	176,5
Eruková	8237	10,8	31,9	31,9	258,2
Trikosanová	9215	10,8	30,5	30,5	302,6
Eikosapentaenová	6745	10,9	36,0	36,0	187,2
Tetrakosanová	8561	10,9	29,6	29,6	289,5
Dokosatrienová	6279	11	32,9	32,9	191,0
Dokosatetraenová	5166	10,9	32,8	32,8	157,6
Dokosapentaenová	1273	10,9	33,0	33,0	38,6
Hexakosanová	5193	10,9	27,5	27,5	189,0
Dokosaheptaenová	8210	10,8	32,9	32,9	249,7

MK, mastná kyselina

### **4.3. Zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí**

Postup zpracování vzorků DBS vychází z postupu uvedeném v disertační práci Mgr. Lenky Laštovičkové, Ph.D. „Využitie separačných technik pre skriningové vyšetrenie stavu metabolizmu zo vzorky suchej kvapky krvi“. Příprava vzorků před analýzou je zcela zásadní. Zaměřili jsme se proto na některé kroky přípravy vzorků, u nichž lze předpokládat, že jsou pro správnou kvantifikaci a dostatečnou citlivost metody zásadní.

#### **4.3.1 Vyjmutí vyseknutého terčíku vzorku suché kapky krve před krokem derivatizace mastných kyselin**

Zjišťovali jsme, zda je vhodnější vyseknutý terčík vzorku DBS po extrakci MK ethanolem před derivatizací ponechat ve zkumavce nebo ho vyjmout. Když byl terčík vzorku DBS ponechán při derivatizačním kroku ve zkumavce, byla výtěžnost FAEE jen o něco vyšší (příloha 2 a 3). Problémem bylo, že při kroku derivatizace se ze vzorku DBS uvolnil do roztoku hem a obarvil ho dohněda. Barvivo bylo extrahováno také n-hexanem. Z obavy, aby takto kontaminované vzorky nevedly ke snížení životnosti kolony, jsme upřednostnili postup, kdy je terčík vzorku DBS před krokem derivatizace ze zkumavky vyjmut.

#### **4.3.2 Porovnání dvou typů derivatizačních činidel pro přípravu ethylesterů mastných kyselin**

Porovnávali jsme 2 typy derivatizačních činidel pro derivatizaci MK na odpovídající FAEE. Jedním typem byla směs ethanolu s acetylchloridem v poměru 5:1 (v/v) a druhým typem byl 10% roztok fluoridu boritého (BF<sub>3</sub>) v ethanolu. Derivatizace s roztokem BF<sub>3</sub> v ethanolu probíhala při 70 °C, zatímco derivatizace se směsí ethanolu a acetylchloridu (5:1, v/v) probíhala při 100 °C. Derivatizační činidlo 10% roztoku BF<sub>3</sub> v ethanolu se komerčně dodává připravené pro derivatizaci, směs ethanolu s acetylchloridem se připravuje těsně před derivatizačním krokem. Při přípravě této směsi je nutná obezřetnost, jelikož při smíchání ethanolu s acetylchloridem se směs silně zahřívá a může ze zkumavky „vyprsknout“. V případě použití roztoku BF<sub>3</sub> v ethanolu byla výtěžnost derivatizace většiny MK o něco málo vyšší v porovnání se směsí ethanolu a acetylchloridu, ovšem v případě derivatizace MK s krátkým řetězcem naopak výrazně nižší (přílohy 4–6). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky publikované Chiu *a kol.* [87], nicméně ve zmiňované studii byla doba derivatizace MK kratší. Rozdílná výtěžnost může být dána různou teplotou při kroku derivatizace.

### **4.3.3 Volba vhodného extrakčního činidla ethylesterů mastných kyselin z reakční směsi**

Pro extrakci FAEE z reakční směsi jsme testovali 2 organická rozpouštědla, n-hexan a ethylacetát. Ethylacetát jsme zvolili na základě studie [88] kvůli možnému zlepšení extrakce ethylesterů MK s krátkým řetězcem. Výsledky ukázaly, že ethylacetát je skutečně účinnějším extrakčním činidlem ethylesterů MK s krátkým řetězcem (příloha 7). S narůstajícím počtem uhlíků v řetězci MK se rozdíl ploch píků jednotlivých FAEE snižovaly (příloha 8 a 9). I přes to, že ethylacetát je v porovnání s n-hexanem pro extrakci FAEE účinnější, z důvodu více než dvakrát delší doby odpařování ethylacetátu jsme pro další postup zvolili jako extrakční činidlo n-hexan.

Ethylestery MK s krátkým řetězcem mohou při odpařování ze zkumavky vytékat. Testovali jsme proto, zda může přídavek ethanolu k n-hexanu před odpařením tyto ztráty snížit. Výsledky však ukázaly, že přidání ethanolu nemá na možné ztráty ethylesterů MK s krátkým řetězcem žádný vliv (příloha 10).

## **4.4 Testování vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky stanovení hladin vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve**

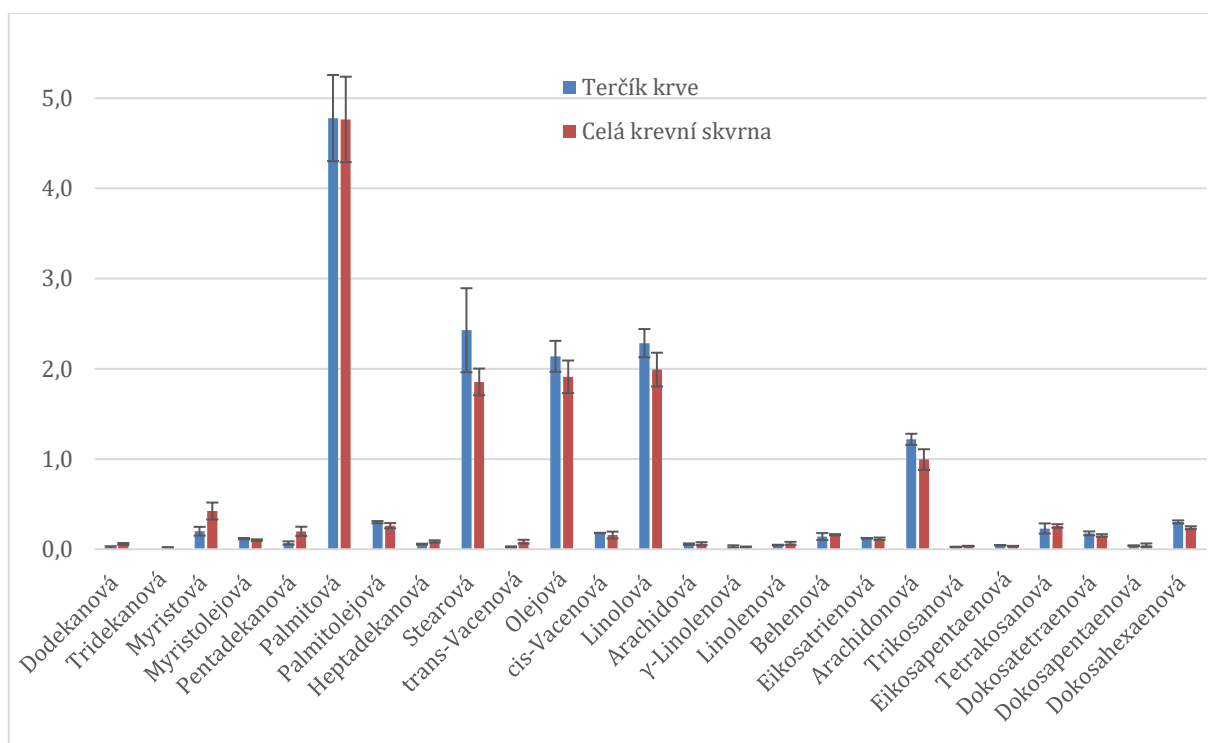
### **4.4.1 Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v celé krevní skvrně a vyseknutém terčíku vzorku suché kapky krve**

Porovnávali jsme poměry ploch píků jednotlivých MK k ploše píku IS vybraných MK ve vzorku DBS, který byl použit k analýze celý (na odběrovou kartu pipetováno 10  $\mu$ l krve) oproti stejnému vzorku DBS, z něhož byl vyseknut terčík ze středu (pipetováno 50  $\mu$ l krve) o průměru 6 mm, což odpovídá přibližně 10  $\mu$ l aplikované krve na odběrovou kartu. Pro porovnání bylo vybráno celkem 25 MK (tabulka 12 a graf 1). Zbýlých 10 MK nebylo ve vzorku DBS kvantifikováno.

**Tabulka 12** Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu z celé krevní skvrny a vyseknutém terčiku krevní skvrny stejného vzorku suché kapky krve ( $n = 3$ )

Název MK	Vyseknutý terčik		Celý vzorek	
	Průměr poměru plochy píku MK a IS	SD	Průměr poměru plochy píku MK a IS	SD
Dodekanová	0,020	0,013	0,059	0,011
Tridekanová	–	–	0,015	0,008
Myristová	0,200	0,048	0,424	0,094
Myristolejová	0,117	0,007	0,102	0,008
Pentadekanová	0,069	0,018	0,198	0,051
Palmitová	4,780	0,477	4,765	0,474
Palmitolejová	0,300	0,012	0,262	0,029
Heptadekanová	0,056	0,006	0,086	0,013
Stearová	2,428	0,466	1,856	0,148
<i>trans</i> -Vacenová	0,025	0,007	0,084	0,022
Olejová	2,139	0,172	1,912	0,181
<i>cis</i> -Vacenová	0,181	0,002	0,158	0,037
Linolová	2,284	0,157	1,992	0,187
Arachidová	0,057	0,008	0,062	0,017
$\gamma$ -Linolenová	0,030	0,013	0,027	0,004
Linolenová	0,046	0,004	0,065	0,017
Behenová	0,141	0,038	0,161	0,007
Eikosatrienová	0,121	0,002	0,117	0,013
Arachidonová	1,219	0,062	0,994	0,115
Trikosanová	0,024	0,004	0,035	0,003
Eikosapentaenová	0,044	0,003	0,034	0,004
Tetrakosanová	0,230	0,056	0,258	0,020
Dokosatetraenová	0,176	0,022	0,152	0,014
Dokosapentaenová	0,039	0,004	0,046	0,019
Dokosaheptaenová	0,303	0,017	0,238	0,017

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka



**Graf 1** Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu v celé krevní skvrně a ve vyseknutém terčiku vzorku suché kapky krve ( $n = 3$ )

Z uvedených výsledků je patrné, že v případě některých MK se poměry ploch píků k ploše píku IS výrazně liší, u jiných MK jsou srovnatelné. Kyselina tridekanová byla detegována pouze v celé krevní skvrně.

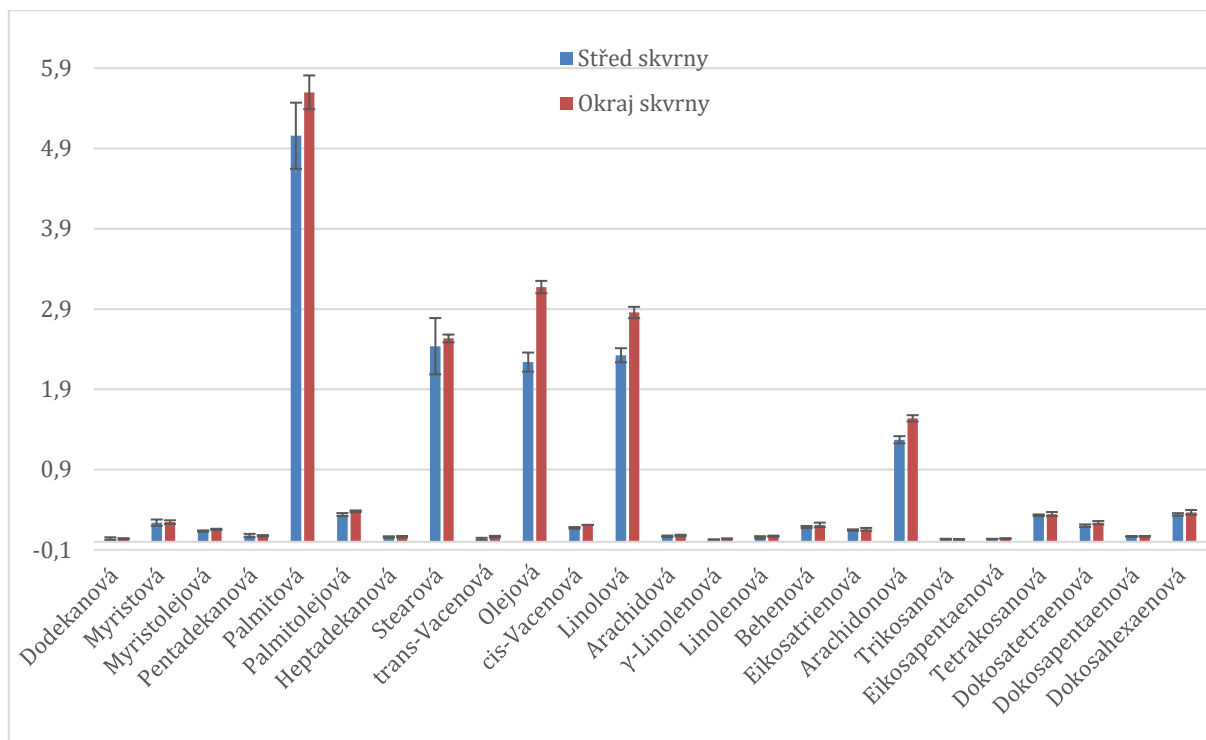
#### 4.4.2 Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčiku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve

Pro porovnání poměru ploch píků jednotlivých MK k ploše píku IS vybraných MK v terčiku vyseknutého ze středu a okraje krevní skvrny jsme vybrali celkem 24 MK (tabulka 13 a graf 2). Zbylé MK nebyly ve vzorcích DBS detegovány.

**Tabulka 13** Porovnání poměru ploch píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčíku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve ( $n = 3$ )

Název MK	<u>Střed krevní skvrny</u>		<u>Okraj krevní skvrny</u>	
	<b>Průměr poměru plochy píku MK a IS</b>	<b>SD</b>	<b>Průměr poměru plochy píku MK a IS</b>	<b>SD</b>
Dodekanová	0,040	0,016	0,038	0,008
Myristová	0,239	0,039	0,245	0,023
Myristolejová	0,134	0,008	0,155	0,008
Pentadekanová	0,078	0,021	0,075	0,009
Palmitová	5,059	0,412	5,600	0,210
Palmitolejová	0,340	0,018	0,380	0,011
Heptadekanová	0,060	0,009	0,064	0,009
Stearová	2,437	0,351	2,534	0,048
<i>trans</i> -Vacenová	0,036	0,014	0,064	0,010
Olejová	2,239	0,119	3,174	0,077
<i>cis</i> -Vacenová	0,174	0,010	0,211	0,001
Linolová	2,324	0,088	2,857	0,070
Arachidová	0,069	0,009	0,078	0,010
$\gamma$ -Linolenová	0,027	0,002	0,036	0,006
Linolenová	0,057	0,014	0,070	0,007
Behenová	0,185	0,012	0,211	0,028
Eikosatrienová	0,147	0,008	0,156	0,017
Arachidonová	1,271	0,045	1,539	0,039
Trikosanová	0,032	0,006	0,029	0,004
Eikosapentaenová	0,034	0,003	0,040	0,006
Tetrakosanová	0,331	0,010	0,344	0,027
Dokosatetraenová	0,202	0,016	0,238	0,021
Dokosapentaenová	0,067	0,005	0,068	0,005
Dokosahexaenová	0,341	0,015	0,368	0,029

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka



**Graf 2** Porovnání poměru ploch piků jednotlivých mastných kyselin k ploše piků vnitřního standardu vybraných mastných kyselin v terčíku vyseknutého ze středu a okraje stejného vzorku suché kapky krve ( $n = 3$ )

Výsledky naznačují mírné chromatografické účinky některých MK. Nejvýznamnější chromatografické účinky byly zaznamenány pro kyselinu palmitovou, olejovou, linolovou a arachidonovou.

#### 4.4.3 Technika zavádění vnitřního standardu u vzorků suché kapky krve

U kapalných vzorků, jako je krev nebo plazma, se IS přidává v malém objemu přímo ke vzorku, takže IS kompenzuje účinky při přípravě vzorku a účinky matrice. Je zde nutné podotknout, že v ideálním případě by měl být ke vzorku přidán pro každou stanovovanou MK její deuterovaný analog. To je finančně velmi náročné, náš odhad je stovky tisíc korun. Vzhledem k povaze vzorků DBS je technika přidávání IS skutečnou výzvou. Asi nejběžnější praxí je přidávání IS do extrakčního činidla, avšak tento způsob nekompensuje odchylky s přípravou vzorku. V praxi se obecně používají další čtyři způsoby zavedení IS. Ideální strategií je přidání IS do vzorku plné krve před jejím nanesením na odběrovou kartu. Tento přístup je v klinické praxi jen obtížně použitelný a v případě aplikace kapky krve přímo z místa vpichu nepoužitelný. Spíše se tato strategie dá využít jako referenční pro srovnání různých technik zavádění IS. Druhou technikou, kterou jsme testovali, je nanesení IS na odběrovou kartu před aplikací vzorku krve. Na odběrovou kartu jsme nanášeli roztok deuterované kyseliny palmitové v ethanolu. Jelikož je viskozita ethanolu daleko nižší než viskozita krve, aplikovaný objem



roztoku IS se na papíře rozprostře v daleko větší oblasti než krev. Na to je třeba myslet, a proto je nutno aplikovat takové množství krve, aby se rozprostřelo ve větší oblasti než roztok IS, nebo naopak objem aplikovaného IS musí být takový, aby se na papíře rozprostřel daleko méně než vzorek krve. Odběrová karta s aplikovaným IS musí být připravena v laboratoři a IS musí být po dobu, než je na odběrovou kartu aplikována krev, stabilní. Jinou technikou zavádění IS, kterou jsme testovali, je nanesení roztoku IS na vzorek DBS. Je nutné myslet na to, že roztok IS v ethanolu se šíří jinak na samotném papíře a jinak na krevní skvrně aplikované na odběrovou kartu, zde navíc méně homogenně a v nepravidelném tvaru. Použití vodných roztoků IS nelze doporučit vůbec, neboť to vede k opětovnému rozpuštění aplikované krve a redistribuci složek krve a analytů. Poslední technikou, kterou jsme testovali, je separátní aplikace vzorku krve a IS na stejnou odběrovou kartu. Po zaschnutí krve a roztoku IS jsme vyseknuté terčíky extrahovali společně.

Hodnotili jsme plochy píků IS a FAEE ve vyseknutém terčíku krevní skvrny a v celé krevní skvrně stejného vzorku DBS. Výsledky jsou uvedeny v přílohách 11–14.

Při technice, kdy byl nejdříve na odběrovou kartu aplikován IS a následně vzorek krve, byly v porovnání s referenční technikou ve vyseknutém terčíku vzorku DBS výrazně vyšší hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS (příloha 11). Při analýze celé krevní skvrny jsou však hodnoty nižší. Plocha píku IS byla ve vyseknutém terčíku vzorku DBS mnohem nižší než v případě celé krevní skvrny. Příčinou může být vytlačení IS na periferii vzorku DBS při aplikaci krve.

Při technice, kdy byl terčík IS zpracován spolu s terčíkem vzorku DBS, výsledky naznačují, že se jedná o techniku vhodnější, než je ta předešlá (příloha 12). Hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS byly pro vybrané MK ve vyseknutém terčíku i v celé krevní skvrně vzorku DBS převážně nižší než u referenční techniky. Plocha píku IS byla výrazně vyšší v obou případech.

Při technice, kdy byl IS součástí extrakčního činidla, byla plocha píku IS dle očekávání nejvyšší ze všech porovnávaných technik. Hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS byly pro vybrané MK ve vyseknutém terčíku vzorku DBS a vzorku celé krevní skvrny nižší než u referenční techniky (příloha 13).

Při technice, kdy byl na vzorek DBS aplikován IS, byly hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS pro vybrané MK ve vyseknutém terčíku vzorku DBS

a vzorku celé krevní skvrny nižší než u referenční techniky. Plocha píku IS byla naopak vyšší (příloha 14).

Lze tedy konstatovat, že žádná z daných technik není ideální. Nejvhodnější se jeví technika separátní aplikace vzorku krve a IS na stejnou odběrovou kartu. Praktičtější je však technika, kdy IS je součástí extrakčního činidla.

#### **4.4.4 Stabilita mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve při pokojové teplotě, 4 °C a –20 °C**

Testovali jsme stabilitu vybraných MK v přítomnosti a nepřítomnosti antioxidačního činidla, BHT, který by měl zabránit oxidaci PUFA. Dále jsme sledovali stabilitu vybraných MK ve vzorcích DBS při pokojové teplotě po dobu 24 h, 48 h, 72 h a 1 týdnů a ve vzorcích DBS uchovávaných při 4 °C a –20 °C po dobu 1 až 3 týdnů. Byly porovnávány poměry plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS celkem 22 MK.

Hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS pro všechny MK ve vzorcích DBS ošetřených BHT a uchovávané při pokojové teplotě po 24 a 48 hodinách byly zvýšeny (příloha 15). Po 72 hodinách hodnoty klesly, aby po týdnu uchovávání opět stouply. U vzorků DBS neošetřených BHT byly hodnoty po 24 hodinách sníženy, po 48 hodinách zvýšeny, a po 72 hodinách opět sníženy. Po týdnu byly hodnoty v podstatě neměnné (příloha 16).

U vzorků DBS ošetřených BHT a skladovaných při 4 °C byly hodnoty poměru plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS pro všechny MK po 1. i 2. týdnu zvýšeny, po 3. týdnu hodnoty pro některé MK sníženy a některé zvýšeny (příloha 17). U vzorků DBS neošetřených BHT byly hodnoty u většiny MK po týdnu sníženy, po druhém týdnu zvýšeny, aby po třetím týdnu byly opět sníženy (příloha 18). U vzorků DBS skladované při teplotě –20 °C byly výsledky obdobné (příloha 19, 20).

Výsledky naznačují, že BHT nemá vliv na stabilitu PUFA, což je v rozporu s výsledky Metherela *a kol.* [89].

#### **4.4.5 Analytické parametry metody**

##### **Nepřesnost v sérii**

Nepřesnost v sérii byla určena u 23 MK, které byly ve vzorcích DBS detegovány. Byly analyzovány terčíky vyseknuté ze vzorku DBS i celé skvrny stejného vzorku DBS (tabulka 14).

**Tabulka 14** Určení nepřesnosti v sérii pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ( $n = 10$ )

Název MK	Vyseknutý terčík			Celá skvrna		
	Průměr poměru plochy píku MK a IS	SD	CV	Průměr poměru plochy píku MK a IS	SD	CV
Dodekanová	0,073	0,044	59,63 %	0,187	0,092	49,03 %
Myristová	0,446	0,272	60,97 %	1,152	0,424	36,81 %
Myristolejová	0,253	0,157	62,21 %	0,481	0,076	15,75 %
Pentadekanová	0,154	0,089	57,67 %	0,466	0,234	50,21 %
Palmitová	9,336	5,765	61,74 %	19,067	1,825	9,57 %
Palmitolejová	0,624	0,370	59,36 %	1,265	0,175	13,85 %
Heptadekanová	0,116	0,074	63,75 %	0,248	0,097	39,06 %
Stearová	4,220	2,611	61,88 %	7,784	0,651	8,36 %
<i>trans</i> -Vacenová	0,163	0,142	87,25 %	0,395	0,109	27,61 %
Olejová	4,543	2,807	61,80 %	9,019	0,980	10,87 %
<i>cis</i> -Vacenová	0,374	0,249	66,59 %	0,709	0,081	11,49 %
Linolová	4,720	2,926	61,98 %	8,293	2,969	35,81 %
Arachidová	0,107	0,065	61,20 %	0,274	0,067	24,33 %
Linolenová	0,131	0,092	69,92 %	0,283	0,057	19,98 %
Behenová	0,299	0,199	66,56 %	0,680	0,121	17,72 %
Eikosatrienová	0,285	0,178	62,42 %	0,489	0,178	36,45 %
Arachidonová	2,541	1,553	61,11 %	4,514	0,608	13,46 %
Trikosanová	0,059	0,032	55,16 %	0,133	0,037	28,00 %
Eikosapentaenová	0,095	0,066	69,26 %	0,170	0,044	25,86 %
Tetrakosanová	0,531	0,366	68,86 %	1,079	0,195	18,06 %
Dokosatetraenová	0,420	0,274	65,31 %	0,719	0,121	16,76 %
Dokosapentaenová	0,129	0,105	81,13 %	0,206	0,037	17,83 %
Dokosahexaenová	0,637	0,401	62,99 %	1,097	0,136	12,43 %

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka

Výsledky ukazují, že nepřesnost metody je velká a pro bioanalýzy nepřijatelná. Přijatelné jsou variační koeficienty do 15 %.

### Linearita (kalibrační křivka) metody stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve

Při bioanalýze se vzorky DBS pro kalibraci pipetují v předem definovaném objemu na odběrovou kartu. V žádném případě se špička pipety nesmí dotýkat odběrové karty, aby nedošlo k nehomogennímu šíření krve.

Příprava standardů S0–S5 pro sestavení kalibrační křivky je popsána v experimentální části. Poměry plochy píků jednotlivých MK k ploše píku IS byly vypočítány dvojím způsobem.

U prvního způsobu byl výpočet dle vztahu v rovnici 1.

$$\frac{\text{průměr ploch píků S5 (S4, S3, S2, S1)} - \text{průměr ploch píků S0}}{\text{průměr ploch píků vnitřního standardu}}$$

*Rovnice 1 První způsob výpočtu poměru plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu*

U druhého způsobu byl výpočet dle vztahu v rovnici 2.

$$\left( \frac{\text{průměr ploch píků S5 (S4, S3, S2, S1)}}{\text{průměr ploch píků vnitřního standardu}} \right) - \left( \frac{\text{průměr ploch píků S0}}{\text{průměr ploch píků vnitřního standardu}} \right)$$

*Rovnice 2 Druhý způsob výpočtu poměru plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu*

*Tabulka 15 Parametry kalibračních křivek pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (poměr plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu počítaný prvním způsobem)*

Název MK	Zkrácený název	k	q	R <sup>2</sup>
Dodekanová	C12:0	0,0009	-0,0068	0,9992
Myristová	C14:0	0,0023	-0,0323	0,9930
Myristolejová	C14:1 (n-5)	0,0015	0,0039	0,8984
Pentadekanová	C15:0	0,0021	-0,0065	0,9651
Palmitová	C16:0	0,0024	0,4654	0,9756
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	0,0018	0,0090	0,9874
Heptadekanová	C17:0	0,0021	0,0252	0,9754
Stearová	C18:0	0,0027	0,1662	0,9709
Olejová	C18:1 (n-9 cis)	0,0013	0,1991	0,9986
cis-Vacenová	C18:1 (n-7 cis)	0,0020	0,0377	0,9966
Linolová	C18:2 (n-6 cis)	0,0016	-0,2977	0,9991
Arachidová	C20:0	0,0028	0,0229	0,9925
γ-Linolenová	C18:3 (n-6 cis)	0,0008	-0,0054	0,9923
Linolenová	C18:3 (n-3 cis)	0,0012	-0,0156	0,9988
Behenová	C22:0	0,0019	0,0555	0,8131
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 cis)	0,0011	0,0633	0,9949
Arachidonová	C20:4 (n-6 cis)	0,0018	0,2436	0,9667
Trikosanová	C23:0	0,0040	0,0321	0,9898
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 cis)	0,0010	-0,0104	0,9966
Tetrakosanová	C24:0	0,0005	0,0906	0,1546
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 cis)	0,0006	0,0186	0,6310
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 cis)	0,0003	0,0130	0,8141
Dokosahexaenová	C22:6 (n-3 cis)	0,0013	0,0422	0,9689

MK, mastná kyselina

**Tabulka 16** Parametry kalibračních křivek pro stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (poměr plochy píku jednotlivé mastné kyseliny k ploše píku vnitřního standardu počítaný druhým způsobem)

Název MK	Zkrácený název	k	q	R <sup>2</sup>
Dodekanová	C12:0	0,0009	-0,0109	0,9995
Myristová	C14:0	0,0023	-0,0621	0,9925
Myristolejová	C14:1 (n-5)	0,0014	-0,0174	0,9987
Pentadekanová	C15:0	0,0020	-0,0201	0,9218
Palmitová	C16:0	0,0023	-0,4194	0,9980
Palmitolejová	C16:1 (n-7)	0,0018	-0,0534	0,9966
Heptadekanová	C17:0	0,0020	0,0165	0,9976
Stearová	C18:0	0,0026	-0,2714	0,9972
Olejová	C18:1 (n-9 cis)	0,0013	-0,5225	0,9985
cis-Vacenová	C18:1 (n-7 cis)	0,0020	-0,0659	0,9965
Linolová	C18:2 (n-6 cis)	0,0016	-0,6416	0,9995
Arachidová	C20:0	0,0028	0,0116	0,9929
γ-Linolenová	C18:3 (n-6 cis)	0,0008	-0,0096	0,9941
Linolenová	C18:3 (n-3 cis)	0,0012	-0,0240	0,9990
Behenová	C22:0	0,0018	0,0351	0,7973
Eikosatrienová	C20:3 (n-6 cis)	0,0011	0,0479	0,9939
Arachidonová	C20:4 (n-6 cis)	0,0017	-0,0033	0,9646
Trikosanová	C23:0	0,0040	0,0321	0,9898
Eikosapentaenová	C20:5 (n-3 cis)	0,0010	-0,0262	0,9983
Tetrakosanová	C24:0	0,0004	0,0563	0,0420
Dokosatetraenová	C22:4 (n-6 cis)	0,0005	-0,0099	0,5600
Dokosapentaenová	C22:5 (n-6 cis)	0,0003	0,0066	0,6937
Dokosaheptaenová	C22:6 (n-3 cis)	0,0013	-0,0076	0,8840

MK, mastná kyselina

Z výsledků je patrné, že hodnota R<sup>2</sup> je pro celou řadu MK pod hodnotou 0,99. Většinou se jedná o MK, jejichž hladina v krvi je nízká, a tedy i kalibrační standardy mají nízkou koncentraci, jsou tudíž obtížně kvantifikovány. Řešením by mohlo být zvýšení citlivosti metody.

## 5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zaměřit se na některé faktory ovlivňující kvantitativní analýzu vybraných MK ve vzorcích DBS a postupy přípravy vzorků DBS před samotnou GC-MS analýzou. Práce byla zaměřena především na přípravu vzorku před analýzou, částečně byla modifikována metoda GC. Z parametrů ovlivňujících kvantitativní výsledky byly testovány chromatografické účinky analytů v krvi po jejím nanesením na odběrovou kartu. Porovnávány byly také poměry plochy píku jednotlivé MK k ploše píku IS mezi vzorky získanými výsekem terčíku vzorku DBS a analýzou stejného celého vzorku DBS. Testovali jsme 5 různých technik zavádění IS ke vzorku DBS. Nejvhodnějším způsobem se jeví separátní extrakce terčíku vzorku DBS a terčíku s IS aplikovaným na stejnou odběrovou kartu v blízkosti vzorku DBS. Z praktického hlediska je nejvhodnější extrahovat MK ze vzorku DBS organickým rozpouštědlem obsahující IS. Z analytických parametrů metody stanovení MK ve vzorku DBS metodou GC-MS jsme testovali linearitu a nepřesnost v sérii. Výsledky ukazují, že tato metoda není v současné době použitelná pro analýzu vzorků krve získaných technikou suché kapky. Bude zapotřebí zvýšit citlivost metody, testovat další parametry ovlivňující kvantitativní analýzu a pokud možno zkrátit dobu analýzy použitím kratší kapilární kolony s vyšší účinností separace.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOUTEN S. M, VIOLANTE S, VENTURA F. V, a WANDERS R. J. A. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*. 2016, **78**(1), 23-44.
- [2] DEMIREV P. A. Dried Blood Spots: Analysis and Applications. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(2), 779-789.
- [3] FREEMAN J. D, ROSMAN L. M, RATCLIFF J. D, STRICKLAND P. T, GRAHAM D. R a SILBERGELD E. K. State of the Science in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*. 2018, **64**(4), 656-679.
- [4] WAGNER M, TONOLI D, VARESIO E a HOPFGARTNER G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016, **35**(3), 361-438.
- [5] MALSAGOVA K, KOPYLOV A, STEPANOV A, BUTKOVA T, IZOTOV A a KAYSHEVA A. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics*. 2020, **10**(4).
- [6] NYS G, KOK M. G.M, SERVAIS A a FILLET M. Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017, **97**, 326-332.
- [7] SAMSONOVA J. V, SAUSHKIN N. Y a OSIPOV A. P. Dried Blood Spots technology for veterinary applications and biological investigations: technical aspects, retrospective analysis, ongoing status and future perspectives. *Veterinary Research Communications*. 2022, **46**(3), 655-698.
- [8] BALASHOVA E. E, TRIFONOVA O. P, MASLOV D. L a LOKHOV P. G. Application of dried blood spot for analysis of low molecular weight fraction (metabolome) of blood. *Health and Primary Care*. 2018, **2**(5).
- [9] AMSTERDAM P. van, WALDROP C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis*. 2010, **2**(11), 1783-1786.
- [10] CRIMMINS E. M, ZHANG Y. S, KIM J. K, FROCHEN S, KANG H, SHIM H, AILSHIRE J, POTTER A, COFFEREN J, FAUL J. Dried blood spots: Effects of less than optimal collection, shipping time, heat, and humidity. *American Journal of Human Biology*. 2020, **32**(5).
- [11] BÖRSCH-SUPAN A, WEISS L. M, BÖRSCH-SUPAN M, POTTER A. J, COFFEREN J a KERSCHNER E. Dried blood spot collection, sample quality, and fieldwork conditions: Structural validations for conversion into standard values. *American Journal of Human Biology*. 2021, **33**(4).
- [12] YOUHNOVSKI N, BERGERON A, FURTADO M a GAROFOLO F. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit

- impact. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011, **25**(19), 2951-2958.
- [13] JI Q. C, LIU G, D'ARIENZO C. J, OLAH T. V a ARNOLD M. E. What is next for dried blood spots?. *Bioanalysis*. 2012, **4**(16), 2059-2065.
- [14] ODOARDI S, ANZILLOTTI L a STRANO-ROSSI S. Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC–MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic Science International*. 2014, **243**, 61-67.
- [15] WILHELM A. J, DEN BURGER J. C. G a SWART E. L. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014, **53**(11), 961-973.
- [16] MCDADE T. W, WILLIAMS S a SNODGRASS J. J. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*. 2007, **44**(4), 899-925.
- [17] HAHN S. H. Population screening for Wilson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014, **1315**(1), 64-69.
- [18] WIESINGER T, MECHTLER T, SCHWARZ M, XIE X, GROSSE R, NIEVES COBOS P, KASPER D a LUKACS Z. Investigating the suitability of high-resolution mass spectrometry for newborn screening: identification of hemoglobinopathies and  $\beta$ -thalassemias in dried blood spots. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020, **58**(5), 810-816.
- [19] JINKS D. C, MINTER M, TARVER D. A, VANDERFORD M, HEJTMANCIK J. F a MCCABE E. R. B. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Human Genetics*. 1989, **81**(4), 363-366.
- [20] CHIU H a KUO Ch. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2020, **28**(1), 60-73.
- [21] AMUSQUIVAR E, SCHIFFNER S a HERRERA E. Evaluation of two methods for plasma fatty acid analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011, **113**(6), 711-716.
- [22] KIEŁBASA A, BUSZEWSKI B a GADZAŁA-KOPCIUCH R. A novel non-derivatization HPLC/UV method for the determination of some n-3 free fatty acids in breast milk matrix. *Microchemical Journal*. 2022, **181**.
- [23] RYAN J. P. Determination of volatile fatty acids and some related compounds in ovine rumen fluid, urine, and blood plasma, by gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 1980, **108**(2), 374-384.



- [24] BIELAWSKA K, DZIAKOWSKA I a ROSZKOWSKA-JAKIMIEC W. Chromatographic determination of fatty acids in biological material. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010, **20**(9), 526-537.
- [25] CONQUER J. A, TIERNEY M. C, ZECEVIC J, BETTGER W. J a FISHER R. H. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*. 2000, **35**(12), 1305-1312.
- [26] BARTOLUCCI G, PALLECCHI M, MENICATTI M, MORACCI L, PUCCIARELLI S, AGOSTINI M a CROTTI S. A method for assessing plasma free fatty acids from C2 to C18 and its application for the early detection of colorectal cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022, **215**.
- [27] LI X a FRANKE A. A. Improved LC–MS Method for the Determination of Fatty Acids in Red Blood Cells by LC–Orbitrap MS. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**(8), 3192-3198.
- [28] YAO J. K, VAN KAMMEN D. P a GURKLIS J. Red blood cell membrane dynamics in schizophrenia. III. Correlation of fatty acid abnormalities with clinical measures. *Schizophrenia Research*. 1994, **13**(3), 227-232.
- [29] BU B, ASHWOOD P, HARVEY D, KING I. B, WATER J van de a JIN L.-W. Fatty acid compositions of red blood cell phospholipids in children with autism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2006, **74**(4), 215-221.
- [30] NEYRAUD E, CABARET S, BRIGNOT H, CHABANET C, LABOURÉ H, GUICHARD E a BERDEAUX O. The basal free fatty acid concentration in human saliva is related to salivary lipolytic activity. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1).
- [31] GELZO M, IACOTUCCI P, CARNOVALE V, CASTALDO A, COMEGNA M, CERNERA G, CORSO G a CASTALDO G. Impaired Ratio of Unsaturated to Saturated Non-Esterified Fatty Acids in Saliva from Patients with Cystic Fibrosis. *Diagnostics*. 2020, **10**(11).
- [32] NUNOME Y, TSUDA T a KITAGAWA K. Determination of Fatty Acids in Human Sweat during Fasting Using GC/MS. *Analytical Sciences*. 2010, **26**(8), 917-919.
- [33] KANĎÁR R, DRÁBKOVÁ P, ANDRLOVÁ L, KOSTELNÍK A a ČEGAN A. Determination of selected fatty acids in dried sweat spot using gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*. 2016, **39**(22), 4377-4383.
- [34] SEPPÄNEN-LAAKSO T, LAAKSO I a HILTUNEN R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 39-62.
- [35] WEI G-L a ZENG E. Y. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011, **30**(9), 1429-1436.

- [36] INGELS A-S. M. E, SADONES N, DE KESEL P. M. M, LAMBERT W. E a STOVE CH. P. Derivatization Techniques in Dried Blood Spot Analysis. *Dried Blood Spots*. Hoboken, NJ, USA, 2014, 344-354.
- [37] AL MAKDESSI S, ANDRIEU J-L, BACCONIN A, FUGIER J-C, HERILIER H a FAUCON G. Assay of lipids in dog myocardium using capillary gas chromatography and derivatization with boron trifluoride and methanol. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1985, **339**, 25-34.
- [38] ANTOLÍN E. M, DELANGE D. M a CANAVACIOLO V. G. Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids (C24: 0–C36). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, **46**(1), 194-199.
- [39] CARVALHO A. P a MALCATA F. X. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Marine Lipids: Insight Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(13), 5049-5059.
- [40] OSTERMANN A. I, MÜLLER M, WILLENBERG I a SCHEBB N. H. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014, **91**(6), 235-241.
- [41] NIMZ E. L a MORGAN S. L. On-Line Derivatization for Complex Fatty Acid Mixtures by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 1993, **31**(4), 145-149.
- [42] MALAVOLTI M, BRANDI A, SALVINI A a GIOMI D. Transesterification of castor oil with trimethylchlorosilane: simultaneous formation of fatty acid alkyl esters and  $\alpha$ -monochlorohydrin. *RSC Advances*. 2015, **5**(94), 77341-77347.
- [43] SPITZER V, MARX F, MAIA J. G. S a PFEILSTICKER K. Identification of conjugated fatty acids in the seed oil of *Acioa edulis* (Prance) syn. *Couepia edulis* (Chrysobalanaceae). *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1991, **68**(3), 183-189.
- [44] GUCKERT J. B a WHITE D. C. Evaluation of a hexane/isopropanol lipid solvent system for analysis of bacterial analysis of bacterial phospholipids and application to chloroform-soluble Nuclepore (polycarbonate) membranes with retained bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1988, **8**(3), 131-137.
- [45] QUEHENBERGER O, ARMANDO A. M a DENNIS E. A. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011, **1811**(11), 648-656.
- [46] SÁNCHEZ-ÁVILA N, MATA-GRANADOS J. M, RUIZ-JIMÉNEZ J a LUQUE DE CASTRO M. D. Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography–mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(40), 6864-6872.

- [47] SHANTHA N.C a NAPOLITANO G. E. Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 1992, **624**(1-2), 37-51.
- [48] BRONDZ I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 1-37.
- [49] LIMA E.S a ABDALLA D.S.P. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 81-91.
- [50] DODDS E. D, MCCOY M.R, REA L. D a KENNISH J. M. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. Electron impact mass spectrometry. *Lipids*. 2005, **40**(4), 419-428.
- [51] SAJIKI J a YONEKUBO J. Determination of free polyunsaturated fatty acids and their oxidative metabolites by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 417-426.
- [52] MIWA H. High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids and esterified fatty acids in biological materials as their 2-nitrophenylhydrazides. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 237-255.
- [53] NISSEN H. P a KREYSEL H. W. The use of HPLC for the determination of lipids in biological materials. *Chromatographia*. 1990, **30**(11-12), 686-690.
- [54] FUSE T, KUSU F a TAKAMURA K. Determination of higher fatty acids in oils by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 1997, **764**(2), 177-182.
- [55] KOTANI A, FUSE T a KUSU F. Determination of Plasma Free Fatty Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*. 2000, **284**(1), 65-69.
- [56] BROWNE R. W a ARMSTRONG D. HPLC Analysis of Lipid-derived Polyunsaturated Fatty Acid Peroxidation Products in Oxidatively Modified Human Plasma. *Clinical Chemistry*. 2000, **46**(6), 829-836.
- [57] MENDELOWITZ A a RILEY J. P. The spectrophotometric determination of long-chain fatty acids containing ketonic groups. With particular reference to licanic acid. *The Analyst*. 1953, **78**(933).
- [58] DEAN H. G, BONSER J. C a GENT J. P. HPLC analysis of brain and plasma for octanoic and decanoic acids. *Clinical Chemistry*. 1989, **35**(9), 1945-1948.
- [59] BANDI Z.L a REYNOLDS E. S. Adsorption and reversed-phase high-performance liquid chromatography of p-nitrobenzyl esters of monohydroxy fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 1985, **329**, 57-63.
- [60] WILLETT J. D, BRODY E. P a KNIGHT M. M. The analysis of fatty alcohols and acids as p -(methylthio)-benzoate esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1982, **59**(7), 273-277.

- [61] IKEDA M, SHIMADA K a SAKAGUCHI T. High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids with 1-naphthylamine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1983, **272**, 251-259.
- [62] LU Y, YAO D a CHEN CH. 2-Hydrazinoquinoline as a Derivatization Agent for LC-MS-Based Metabolomic Investigation of Diabetic Ketoacidosis. *Metabolites*. 2013, **3**(4), 993-1010.
- [63] HIGASHI T, ICHIKAWA T, INAGAKI S, MIN J. Z, FUKUSHIMA T a TOYO'OKA T. Simple and practical derivatization procedure for enhanced detection of carboxylic acids in liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **52**(5), 809-818.
- [64] MARQUIS B. J, LOUKS H. P, BOSE CH, WOLFE R. R a SINGH S. P. A New Derivatization Reagent for HPLC–MS Analysis of Biological Organic Acids. *Chromatographia*. 2017, **80**(12), 1723-1732.
- [65] NAGANUMA H a KAWAHARA Y. Sensitive fluorescence labelling for analysis of carboxylic acids with 4-bromomethyl-6,7-methylenedioxy coumarin. *Journal of Chromatography A*. 1989, **478**, 149-158.
- [66] ICHINOSE N, NAKAMURA K, SHIMIZU CH, KUROKURA H a OKAMOTO K. High-performance liquid chromatography of 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid in fatty acids (C18 and C20) by labelling with 9-anthryldiazomethane as a fluorescent agent. *Journal of Chromatography A*. 1984, **295**, 463-469.
- [67] NÄSLUND B. M. A, BERNSTRÖM K, LUNDIN A a ARNER P. Free fatty acid determination by peroxidase catalysed luminol chemiluminescence. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 1989, **3**(3), 115-124.
- [68] YUKI H, AZUMA Y, MAEDA N a KAWASAKI H. High-performance liquid chromatographic determination of eicosapentaenoic acid in serum by a chemiluminescence labeling method. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1988, **36**(5), 1905-1908.
- [69] CHEN S-H a CHUANG Y-J. Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**(1-2), 145-155.
- [70] LYKKESFELDT J. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*. 2001, **47**(9), 1725-1727.
- [71] ZAITSEVA I, AJMAL M a CERSOSIMO E. Application of high-performance liquid chromatography of plasma fatty acids as their phenacyl esters to evaluate splanchnic and renal fatty acid balance in vivo. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999, **727**(1-2), 15-22.
- [72] RIOUX V, CATHELINE D, BOURIEL M a LEGRAND P. High performance liquid chromatography of fatty acids as naphthacyl derivatives. *Analisis*. 1999, **27**(2), 186-193.

- [73] MIWA H, YAMAMOTO M, FUTATA T, KAN K a ASANO T. Thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the assay of fatty acid compositions of individual phospholipids in platelets from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients: effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester administration. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996, **677**(2), 217-223.
- [74] TOYO'OKA T. Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, **671**(1-2), 91-112.
- [75] VOGESER M a SEGER CH. A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments. *Clinical Biochemistry*. 2008, **41**(9), 649-662.
- [76] MEGOULAS N. C a KOUPPARIS M. A. Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2005, **35**(4), 301-316.
- [77] LUCENA R, CÁRDENAS S a VALCÁRCEL M. Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, **388**(8), 1663-1672.
- [78] TAYLOR L.T. Supercritical Fluid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(12), 4925-4935.
- [79] KURIKI K, NAGAYA T, TOKUDOME Y, IMAEDA N, FUJIWARA N, SATO J, GOTO CH, IKEDA M, MAKI S, TAJIMA K, TOKUDOME S. Plasma Concentrations of (n-3) Highly Unsaturated Fatty Acids Are Good Biomarkers of Relative Dietary Fatty Acid Intakes: A Cross-Sectional Study. *The Journal of Nutrition*. 2003, **133**(11), 3643-3650.
- [80] PSYCHOGIOS N, HAU D. D, PENG J, GUO A. CH, MANDAL R, BOUATRA S, SINELNIKOV I, KRISHNAMURTHY R, EISNER R, GAUTAM B, YOUNG N, XIA J, KNOX C, DONG E, HUANG P, HOLLANDER Z, PEDERSEN T. L, SMITH S. R, BAMFORTH F, GREINER R, MCMANUS B, NEWMAN J. W, Theodore GOODFRIEND, David S. WISHART. The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE*. 2011, **6**(2).
- [81] ABDELMAGID S. A, CLARKE S. E, NIELSEN D. E, BADAWI A, EL-SOHEMY A, MUTCH D. M, MA D. W. L a ASPICHUETA P. Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults. *PLOS ONE*. 2015, **10**(2).
- [82] EL-ANSARY A. K, BEN BACHA A. G a AL-AYAHDI L. Y. Plasma fatty acids as diagnostic markers in autistic patients from Saudi Arabia. *Lipids in Health and Disease*. 2011, **10**(1).
- [83] MOUGIOS V, RING S, PETRIDOU A a NIKOLAIDIS M. G. Duration of coffee- and exercise-induced changes in the fatty acid profile of human serum. *Journal of Applied Physiology*. 2003, **94**(2), 476-484.
- [84] BARÓ L, HERMOSO J-C, NÚÑEZ M-C, JIMÉNEZ-RIOS J-A a GIL A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 1998, **77**(11), 1978-1983.

- [85] YI L-Z, HE J, LIANG Y-Z, YUAN D-L a CHAU F-T. Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA. *FEBS Letters*. 2006, **580**(30), 6837-6845.
- [86] BICALHO B, DAVID F, RUMPLEL K, KINDT E a SANDRA P. Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1211**(1-2), 120-128.
- [87] CHIU H. H, TSAI S-J, TSENG Y. J, WU M-S, LIAO W-Ch, HUANG Ch-S a KUO Ch-H. An efficient and robust fatty acid profiling method for plasma metabolomic studies by gas chromatography–mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, **451**, 183-190.
- [88] GARCÍA-VILLALBA R, GIMÉNEZ-BASTIDA J. A, GARCÍA-CONESA M. T, TOMÁS-BARBERÁN F. A, CARLOS ESPÍN J a LARROSA M. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *Journal of Separation Science*. 2012, **35**(15), 1906-1913.
- [89] METHEREL A. H, HOGG R. C, BUZIKIEVICH L. M a STARK K. D. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids in Health and Disease*. 2013, **12**(1).

## 7 PŘÍLOHY

<b>Příloha 1</b> Hladiny vybraných mastných kyselin [ $\mu\text{mol/l}$ ] v plazmě zdravých jedinců publikované různými autory .....	81
<b>Příloha 2</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve.....	82
<b>Příloha 3</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 2).....	83
<b>Příloha 4</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu .....	84
<b>Příloha 5</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu .....	85
<b>Příloha 6</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu .....	86
<b>Příloha 7</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu .....	87
<b>Příloha 8</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 7) .....	88
<b>Příloha 9</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 7) .....	89
<b>Příloha 10</b> Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu .....	90
<b>Příloha 11</b> Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (na odběrovou kartu prvně aplikován vnitřní standard, poté krev) .....	91
<b>Příloha 12</b> Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (vnitřní standard a vzorek krve aplikovány na odběrovou kartu odděleně, ale zpracovány společně).....	92
<b>Příloha 13</b> Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (vnitřní standard v extrakčním činidle) .....	93
<b>Příloha 14</b> Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (prvně na odběrovou kartu aplikována krev a na vzorek suché kapky krve aplikován vnitřní standard) .....	94

<b>Příloha 15a</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě.....	95
<b>Příloha 15b</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě.....	96
<b>Příloha 16a</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě ...	96
<b>Příloha 16b</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě ...	97
<b>Příloha 17</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při 4 °C .....	98
<b>Příloha 18</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při 4 °C .....	99
<b>Příloha 19</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při –20 °C.....	100
<b>Příloha 20</b> Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při –20 °C.....	101

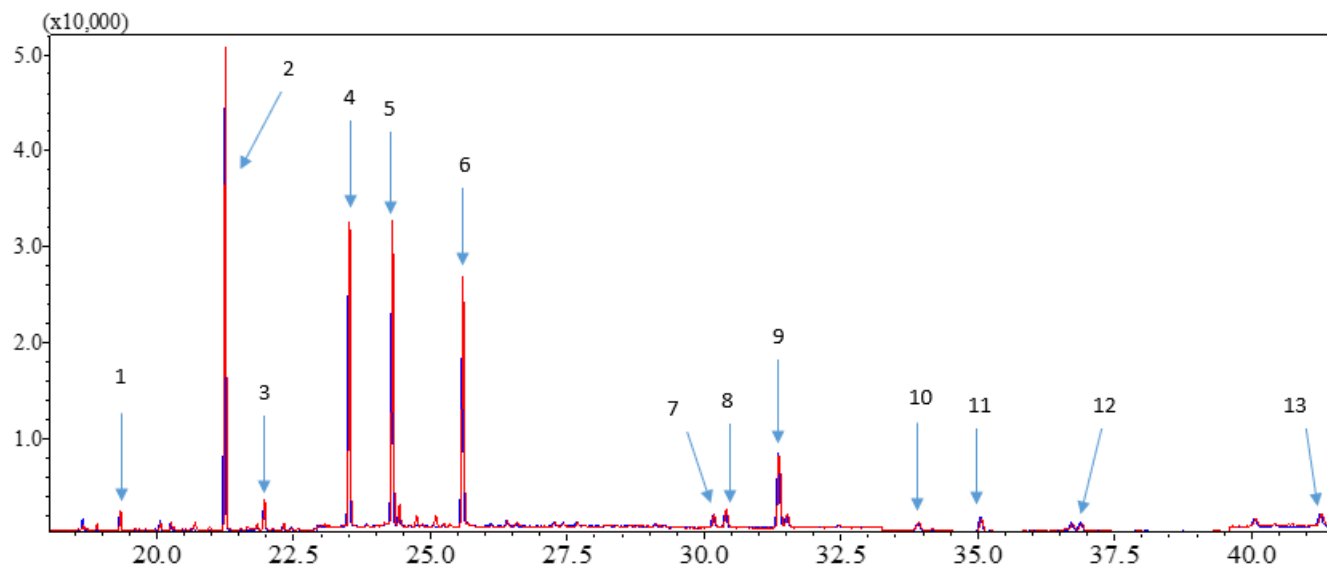


**Příloha 1** Hladiny vybraných mastných kyselin [ $\mu\text{mol/l}$ ] v plazmě zdravých jedinců publikované různými autory

Název MK	[80] Volné MK	[79]	[81]	[82]	[83] Volné MK	[84]
C14:0 (myristová)	7,16±3,00	90±20	63,6±37,1		12±2	
C15:0 (pentadecylová)	1,34±0,91		17,8±6,7			
C16:0 (palmitová)	122±48	2360±430	1631,1±459,3	1905±537	144±21	2187,04±97,11
C16:1 n-7 (palmitoleová)	1,97±1,40	250±70	133,0±67,2		14±3	
C18:0 (stearová)	48,8±21,0	770±110	489,5±124,3	1219±315	430±5	661,86±21,44
C18:1 n-9 cis (olejová)	122±56	2170±600	1285,5±416,7	1212±518	1640±21	2249,56±114,69
C18:2 n-6 cis (linolová)	83,8±38,0	3250±600	2233,8±622,6	359±162	64±11	3330,96±538,52
C18:3 n-3 (linolenová)	5,11±3,80	100±40	54,4±25,1	354±119	2±0	34,84±2,16
C18:4 n-3 (stearidonová)	0,408±0,4 00		0,2±0,5			
C20:4 n-6 (arachidonová)	14±12	50±120	393,0±119,1	574±202	7±2	699,84±40,07
C20:5 n-3 (eikosapentaenová)	1,09±0,72	200±110	40,3±28,3	328±112		96,53±19,83
C22:4 n-6 (dokosatetraenová)	1,01±0,48		15,4±23,0			
C22:5 n-6 (dokosapentaenová)	0,953±0,5 10		8,0±5,9			
C22:6 n-3 (dokosaheptaenová)	4,66±3,30	420±110	88,8±36,8	754±340		272,45±15,53

**Příloha 2** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve

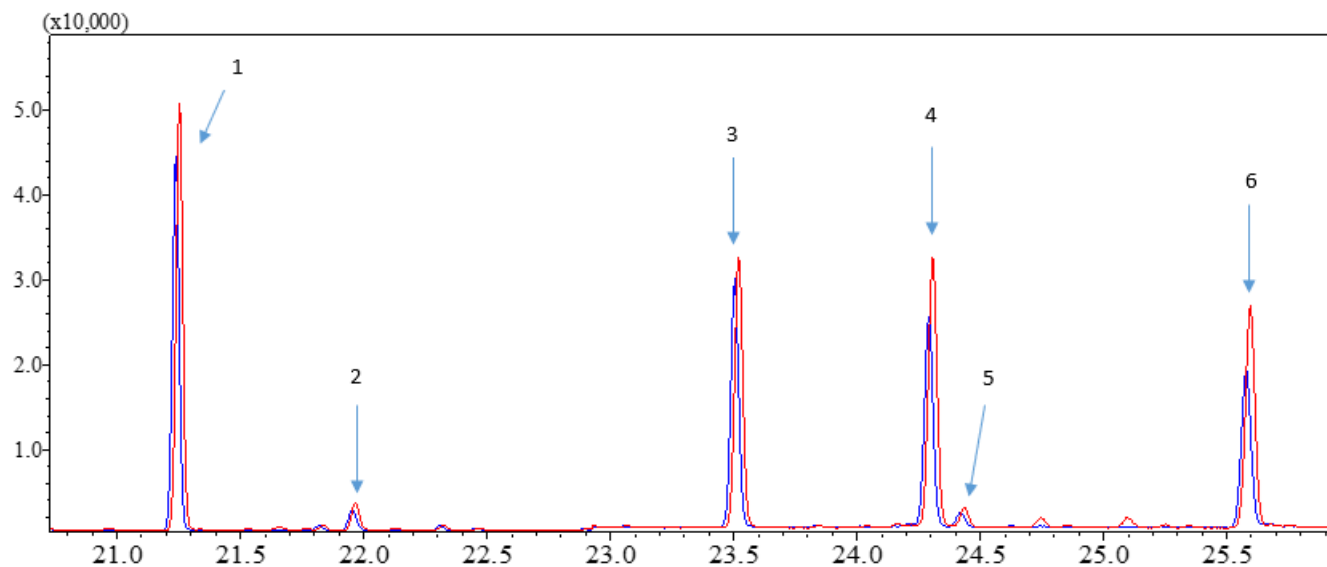
Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy vyseknutý terčík ze vzorku suché kapky krve byl při derivatizaci ponechán ve zkumavce. Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy vyseknutý terčík suché kapky krve byl před derivatizací vyjmut ze zkumavky.



Píky: **1** – myristová, **2** – palmitová, **3** – palmitolejová, **4** – stearová, **5** – olejová, **6** – linolová, **7** – behenová, **8** – eikosatrienová, **9** – arachidonová, **10** – eikosapentaenová, **11** – tetrakosanová, **12** – dokosatetraenová, **13** – dokosaheptaenová

**Příloha 3** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve vzorku suché kapky krve (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 2)

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy vyseknutý terčík ze vzorku suché kapky krve byl při derivatizaci ponechán ve zkumavce. Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy vyseknutý terčík suché kapky krve byl před derivatizací vyjmut ze zkumavky.

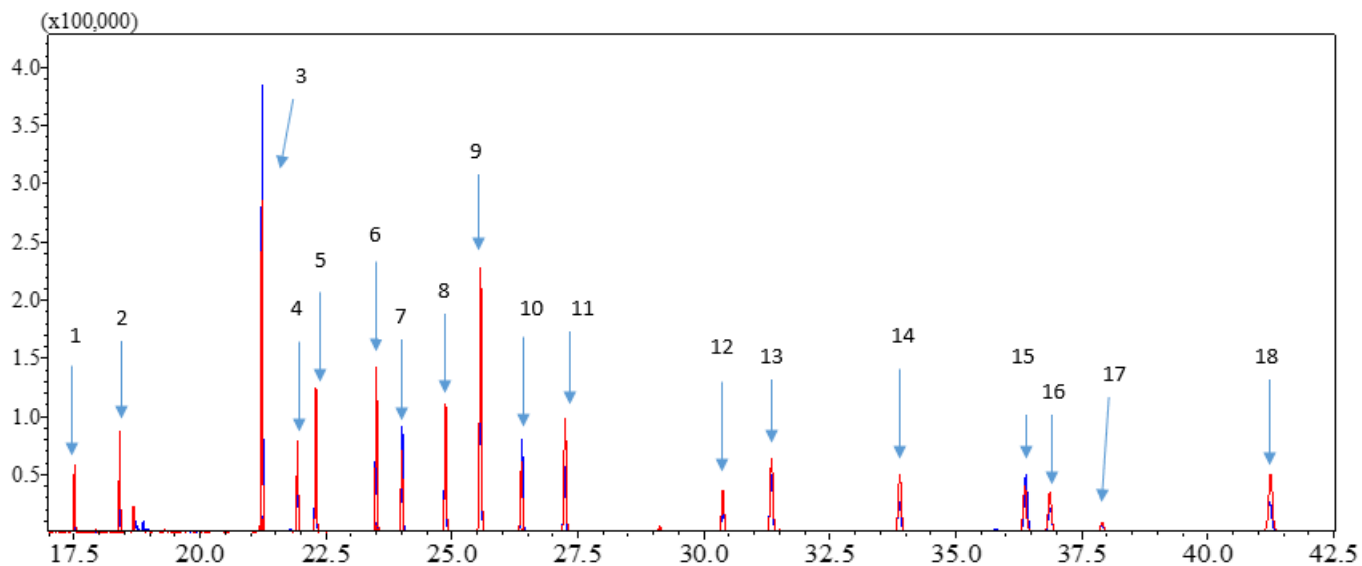


Píky: **1** – palmitová, **2** – palmitolejová, **3** – stearová, **4** – olejová, **5** – *cis*-vacenová, **6** – linolová

**Příloha 4** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byla použita směs ethanolu a acetylchloridu (5:1, v/v).

Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byl použit 10% fluorid boritý v ethanolu.

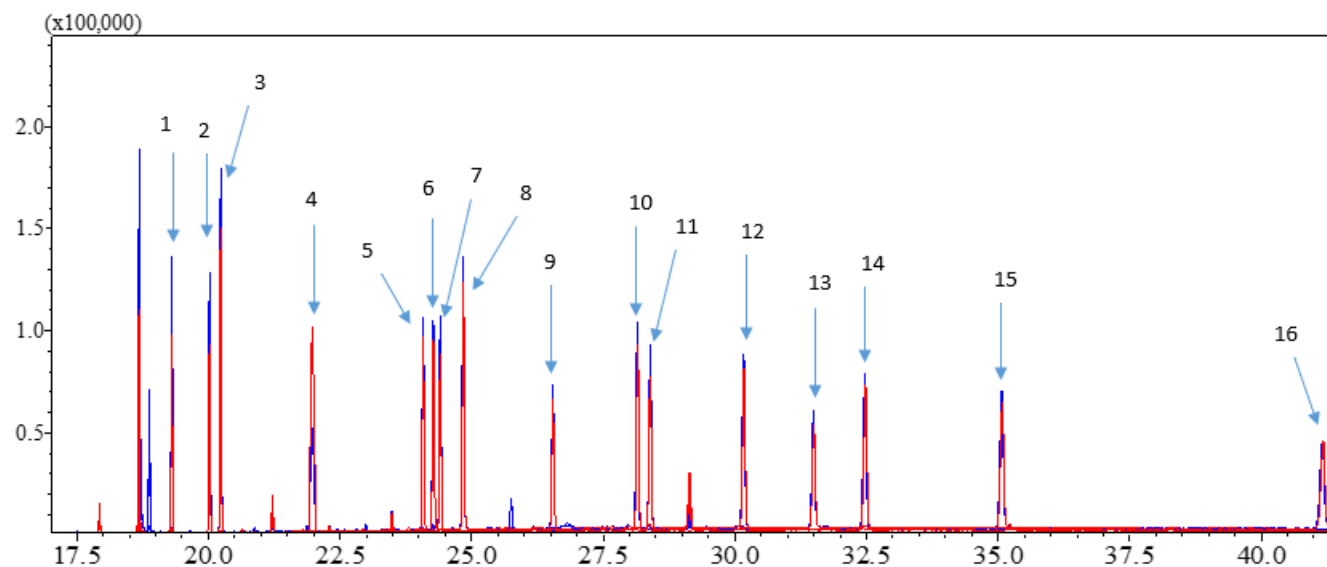


Píky: **1** – dodekanová, **2** – tridekanová, **3** – palmitová, **4** – palmitolejová, **5** – heptadekanová, **6** – stearová, **7** – elaidová, **8** – linolelaidová, **9** – linolová, **10** – arachidová, **11** – linolenová, **12** – eikosatrienová, **13** – arachidonová, **14** – eikosapentaenová, **15** – dokosatrienová, **16** – dokosatetraenová, **17** – dokosapentaenová, **18** – dokosahexaenová

**Příloha 5** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byla použita směs ethanolu a acetylchloridu (5:1, v/v).

Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byl použit 10% fluorid boritý v ethanolu.

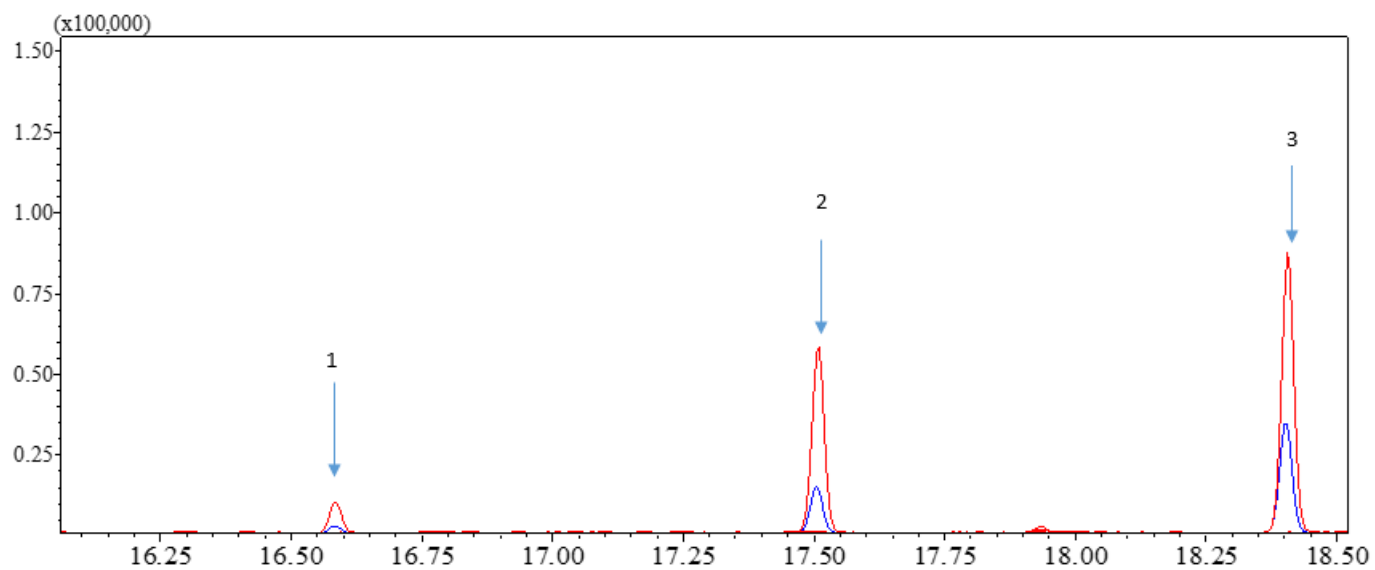


Píky: **1** – myristová, **2** – myristolejová, **3** – pentadekanová, **4** – fytanová, **5** – *trans*-vacenová, **6** – olejová, **7** – *cis*-vacenová, **8** – nonadekanová, **9** –  $\gamma$ -linolenová, **10** – heneikosanová, **11** – stearidonová, **12** – behenová, **13** – eruková, **14** – trikosanová, **15** – tetrakosanová, **16** – hexakosanová

**Příloha 6** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byla použita směs ethanolu a acetylchloridu (5:1, v/v).

Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy při derivatizaci byl použit 10% fluorid boritý v ethanolu.

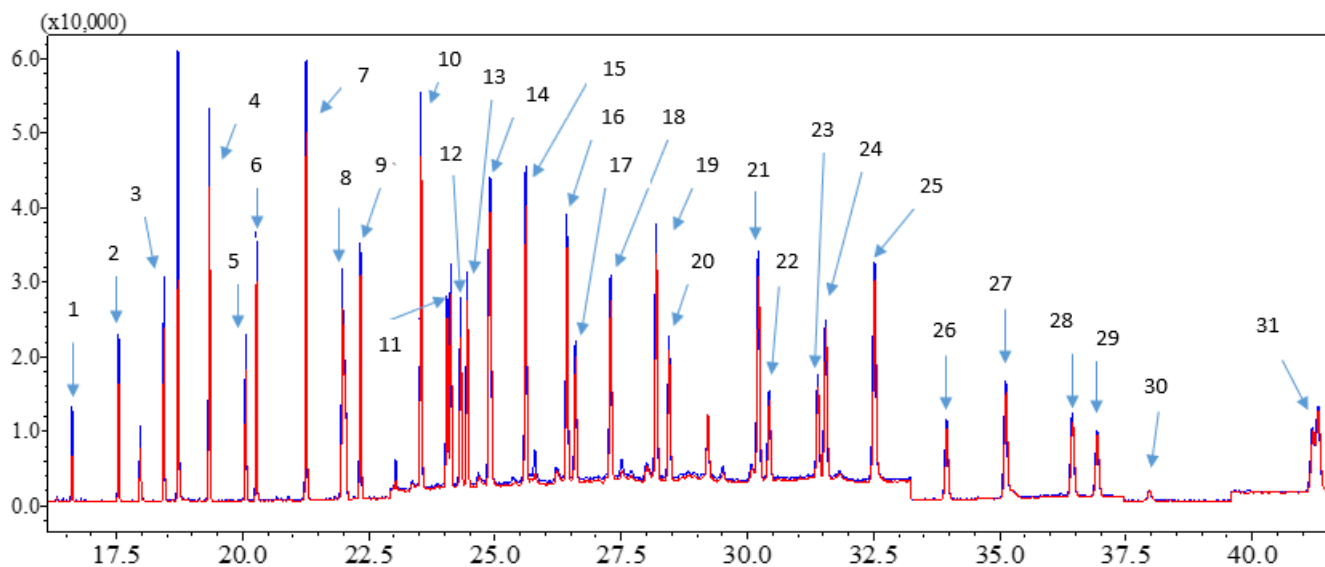


Píky: **1** – undekanová, **2** – dodekanová, **3** – tridekanová

**Příloha 7** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány n-hexanem.

Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány ethylacetátem.

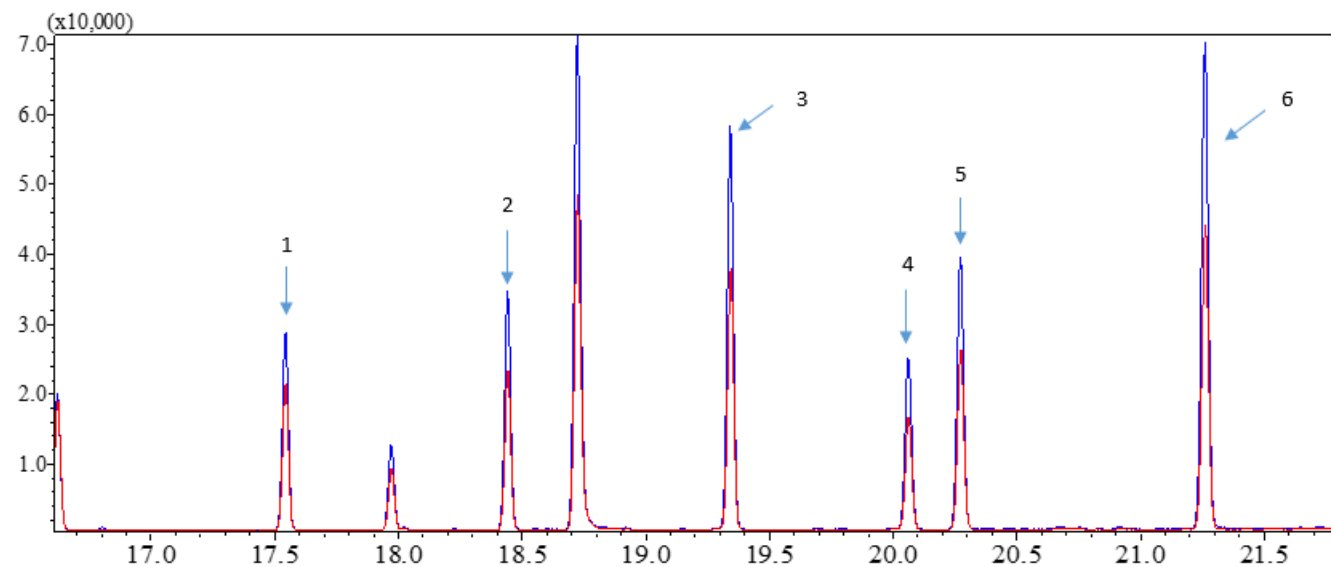


Píky: **1** – undekanová, **2** – dodekanová, **3** – tridekanová, **4** – myristová, **5** – myristolejová, **6** – pentadekanová, **7** – palmitová, **8** – palmitolejová/fytanová, **9** – heptadekanová, **10** – stearová, **11** – elaidová/trans-vacenová, **12** – olejová, **13** – cis-vacenová, **14** – nonadekanová/linolelaidová, **15** – linolová, **16** – arachidová, **17** –  $\gamma$ -linolenová, **18** – linolenová, **19** – heneikosanová, **20** – stearidonová, **21** – behenová, **22** – eikosatrienová, **23** – arachidonová, **24** – eruková, **25** – trikosanová, **26** – eikosapentaenová, **27** – tetrakosanová, **28** – dokosatrienová, **29** – dokosatetraenová, **30** – dokosapentaenová, **31** – hexakosanová/dokosaheptaenová

**Příloha 8** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 7)

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány n-hexanem.

Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány ethylacetátem.

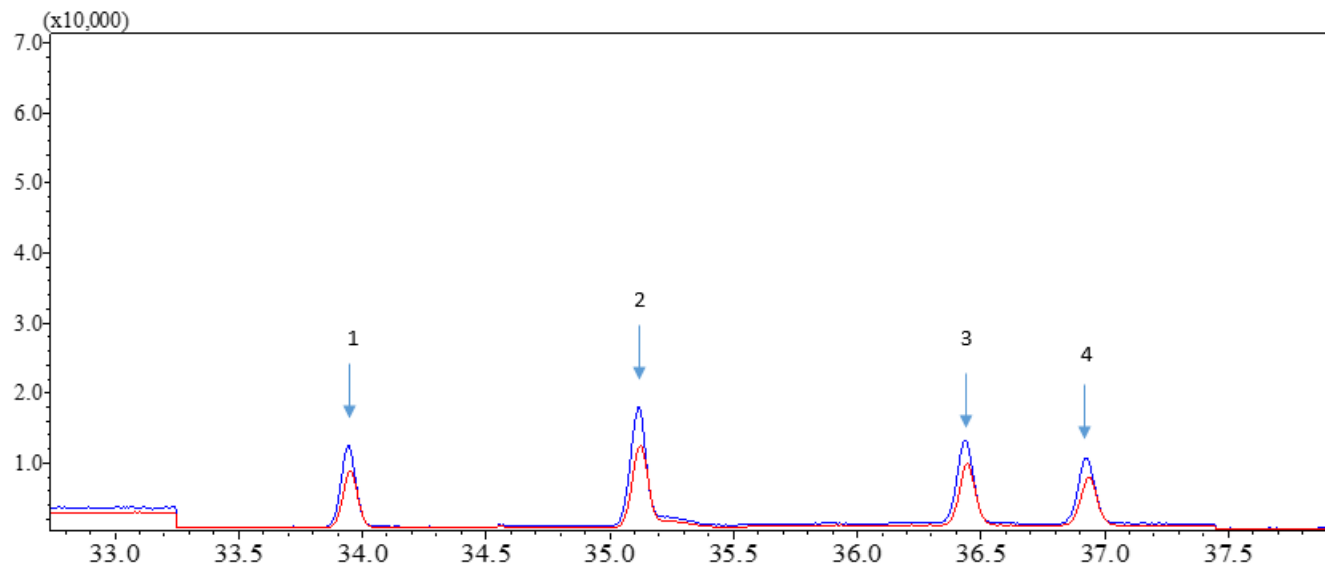


Píky: **1** – dodekanová, **2** – tridekanová, **3** – myristová, **4** – myristolejová, **5** – pentadekanová, **6** – palmitová



**Příloha 9** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu (přiblížení chromatografického záznamu uvedeného v příloze 7)

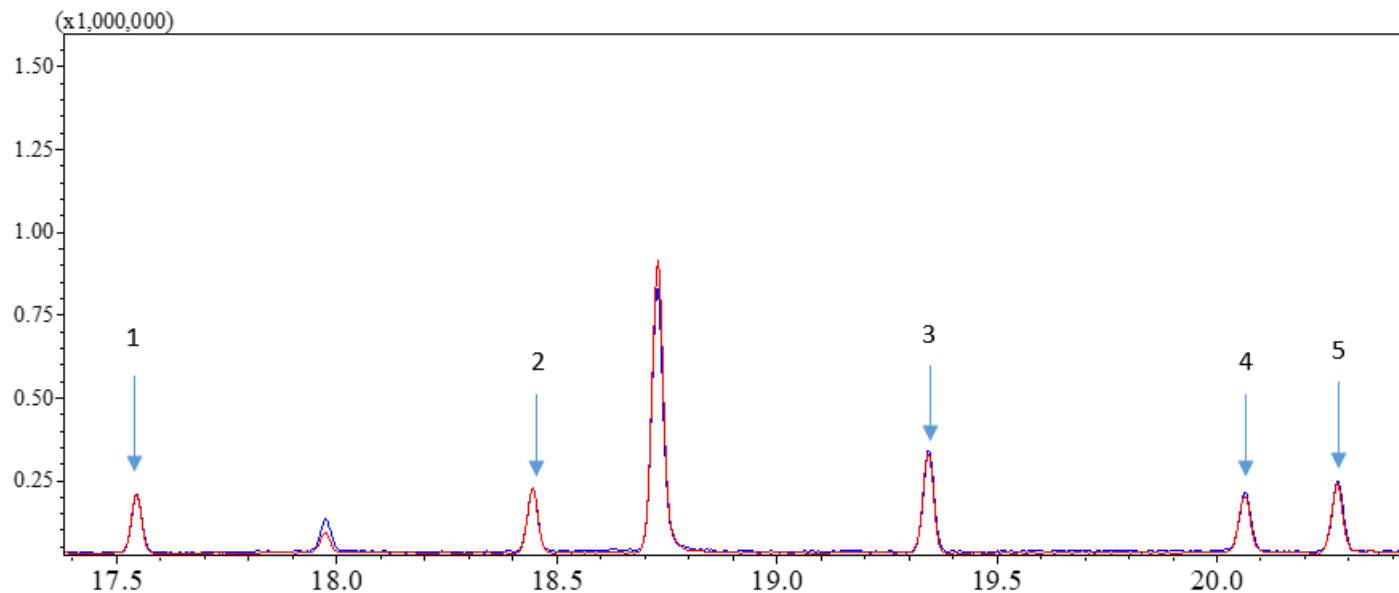
Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány n-hexanem. Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy ethylestery mastných kyselin byly extrahovány ethylacetátem.



Píky: **1** – eikosapentaenová, **2** – tetrakosanová, **3** – dokosatrienová, **4** – dokosatetraenová

**Příloha 10** Chromatografický záznam stanovení vybraných mastných kyselin ve směsném standardu

Chromatografický záznam (červeně) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy organické rozpouštědlo bylo po extrakci ethylesterů mastných kyselin odpařeno v atmosféře dusíku (organickým rozpouštědlem byl n-hexan, ke kterému před odpařením nebyl přidán ethanol). Chromatografický záznam (modře) odpovídá stanovení vybraných mastných kyselin, kdy organické rozpouštědlo bylo po extrakci ethylesterů mastných kyselin odpařeno v atmosféře dusíku (organickým rozpouštědlem byl n-hexan, ke kterému před odpařením byl přidán ethanol).



Píky: **1** – dodekanová, **2** – tridekanová, **3** – myristová, **4** – myristolejová, **5** – pentadekanová

**Příloha 11** Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (na odběrovou kartu prvně aplikován vnitřní standard, poté krev)

Název MK	Krev s vnitřním standardem				Prvně IS, poté krev			
	Vyseknutý terčik Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Celý vzorek Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Vyseknutý terčik Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Celý vzorek Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,073	0,020	0,134	0,021	0,359	0,086	0,095	0,010
Myristová	0,589	0,104	0,669	0,012	2,277	0,098	0,514	0,072
Myristolejová	0,404	0,034	0,356	0,078	1,571	0,123	0,242	0,003
Pentadekanová	0,210	0,027	0,251	0,023	0,812	0,039	0,230	0,052
Palmitová	13,342	0,309	10,813	0,150	49,733	1,110	8,436	0,252
Palmitolejová	1,088	0,064	0,724	0,037	3,773	0,286	0,532	0,002
Heptadekanová	0,197	0,049	0,161	0,027	0,624	0,083	0,116	0,016
Stearová	6,623	0,165	4,835	0,211	25,008	0,391	3,757	0,132
Olejová	7,388	0,246	5,091	0,126	25,579	0,677	3,979	0,237
cis-Vacenová	0,630	0,053	0,445	0,031	2,188	0,130	0,334	0,013
Linolová	7,988	0,285	5,348	0,183	26,593	0,773	3,948	0,045
Arachidová	0,151	0,032	0,184	0,013	0,745	0,068	0,144	0,038
Linolenová	0,135	0,086	0,182	0,038	0,782	0,186	0,067	0,048
Behenová	0,563	0,097	0,463	0,031	1,807	0,313	0,337	0,050
Eikosatrienová	0,465	0,036	0,315	0,014	1,901	0,168	0,246	0,037
Arachidonová	4,270	0,172	2,678	0,084	15,452	0,153	2,167	0,073
Eikosapentaenová	0,074	0,052	0,123	0,017	0,610	0,125	0,060	0,033
Tetrakosanová	0,852	0,140	0,632	0,057	3,198	0,576	0,577	0,023
Dokosatetraenová	0,718	0,036	0,485	0,051	2,875	0,144	0,357	0,030
Dokosapentaenová	0,114	0,060	0,127	0,009	0,770	0,239	0,065	0,012
Dokosahexaenová	1,222	0,163	0,748	0,128	4,267	0,096	0,546	0,042
Vnitřní standard	616,667	38,422	834,667	67,613	211,000	13,491	1043,667	79,939

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka

**Příloha 12** Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (vnitřní standard a vzorek krve aplikovány na odběrovou kartu odděleně, ale zpracovány společně)

Název MK	Krev s vnitřním standardem				IS a krev aplikovány odděleně			
	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,073	0,020	0,134	0,021	0,118	0,014	0,160	0,014
Myristová	0,589	0,104	0,669	0,012	0,430	0,036	0,615	0,145
Myristolejová	0,404	0,034	0,356	0,078	0,230	0,030	0,265	0,020
Pentadekanová	0,210	0,027	0,251	0,023	0,176	0,024	0,274	0,055
Palmitová	13,342	0,309	10,813	0,150	7,486	0,586	8,341	0,626
Palmitolejová	1,088	0,064	0,724	0,037	0,500	0,024	0,460	0,023
Heptadekanová	0,197	0,049	0,161	0,027	0,108	0,011	0,134	0,013
Stearová	6,623	0,165	4,835	0,211	3,377	0,187	3,410	0,277
Olejová	7,388	0,246	5,091	0,126	3,559	0,136	3,392	0,171
<i>cis</i> -Vacenová	0,630	0,053	0,445	0,031	0,281	0,044	0,287	0,054
Linolová	7,988	0,285	5,348	0,183	3,693	0,244	3,332	0,086
Arachidová	0,151	0,032	0,184	0,013	0,095	0,006	0,126	0,021
Linolenová	0,135	0,086	0,182	0,038	0,085	0,018	0,139	0,049
Behenová	0,563	0,097	0,463	0,031	0,278	0,062	0,379	0,037
Eikosatrienová	0,465	0,036	0,315	0,014	0,208	0,039	0,191	0,023
Arachidonová	4,270	0,172	2,678	0,084	1,844	0,049	0,056	0,020
Eikosapentaenová	0,074	0,052	0,123	0,017	0,053	0,008	0,529	0,038
Tetrakosanová	0,852	0,140	0,632	0,057	0,457	0,069	0,350	0,027
Dokosatetraenová	0,718	0,036	0,485	0,051	0,328	0,006	0,074	0,008
Dokosapentaenová	0,114	0,060	0,127	0,009	0,060	0,007	0,411	0,020
Dokosahexaenová	1,222	0,163	0,748	0,128	0,452	0,047	0,546	0,042
Vnitřní standard	616,667	38,422	834,667	67,613	1494,333	154,931	1166,333	157,525

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka

**Příloha 13** Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (vnitřní standard v extrakčním činidle)

Název MK	Krev s vnitřním standardem				IS v extrakčním činidle			
	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,073	0,020	0,134	0,021	0,034	0,005	0,062	0,019
Myristová	0,589	0,104	0,669	0,012	0,236	0,003	0,389	0,069
Myristolejová	0,404	0,034	0,356	0,078	0,132	0,008	0,141	0,028
Pentadekanová	0,210	0,027	0,251	0,023	0,070	0,003	0,159	0,029
Palmitová	13,342	0,309	10,813	0,150	5,082	0,078	5,779	0,684
Palmitolejová	1,088	0,064	0,724	0,037	0,375	0,020	0,354	0,035
Heptadekanová	0,197	0,049	0,161	0,027	0,068	0,016	0,079	0,014
Stearová	6,623	0,165	4,835	0,211	2,372	0,041	2,427	0,271
Olejová	7,388	0,246	5,091	0,126	2,510	0,033	2,621	0,419
<i>cis</i> -Vacenová	0,630	0,053	0,445	0,031	0,196	0,011	0,216	0,053
Linolová	7,988	0,285	5,348	0,183	2,562	0,039	2,582	0,327
Arachidová	0,151	0,032	0,184	0,013	0,067	0,002	0,078	0,011
Linolenová	0,135	0,086	0,182	0,038	0,052	0,014	0,062	0,000
Behenová	0,563	0,097	0,463	0,031	0,188	0,010	0,198	0,028
Eikosatrienová	0,465	0,036	0,315	0,014	0,136	0,001	0,144	0,022
Arachidonová	4,270	0,172	2,678	0,084	1,449	0,025	1,315	0,219
Eikosapentaenová	0,074	0,052	0,123	0,017	0,038	0,003	0,041	0,009
Tetrakosanová	0,852	0,140	0,632	0,057	0,335	0,016	0,328	0,054
Dokosatetraenová	0,718	0,036	0,485	0,051	0,232	0,005	0,195	0,027
Dokosapentaenová	0,114	0,060	0,127	0,009	0,076	0,011	0,063	0,013
Dokosahexaenová	1,222	0,163	0,748	0,128	0,414	0,005	0,355	0,058
Vnitřní standard	616,667	38,422	834,667	67,613	2498,000	68,196	2071,333	191,893

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka

**Příloha 14** Porovnání poměru plochy píků jednotlivých mastných kyselin k ploše píku vnitřního standardu při technice zavádění vnitřního standardu (prvně na odběrovou kartu aplikována krev a na vzorek suché kapky krve aplikován vnitřní standard)

Název MK	Krev s vnitřním standardem				Prvně krev, poté IS			
	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Vyseknutý terčík</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	<i>Celý vzorek</i> Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,073	0,020	0,134	0,021	0,114	0,032	0,060	0,014
Myristová	0,589	0,104	0,669	0,012	0,480	0,084	0,386	0,045
Myristolejová	0,404	0,034	0,356	0,078	0,209	0,047	0,116	0,021
Pentadekanová	0,210	0,027	0,251	0,023	0,190	0,083	0,180	0,041
Palmitová	13,342	0,309	10,813	0,150	8,219	0,874	5,759	0,363
Palmitolejová	1,088	0,064	0,724	0,037	0,462	0,011	0,323	0,040
Heptadekanová	0,197	0,049	0,161	0,027	0,112	0,033	0,109	0,014
Stearová	6,623	0,165	4,835	0,211	3,645	0,490	2,247	0,144
Olejová	7,388	0,246	5,091	0,126	3,821	0,269	2,399	0,192
<i>cis</i> -Vacenová	0,630	0,053	0,445	0,031	0,313	0,061	0,232	0,028
Linolová	7,988	0,285	5,348	0,183	4,305	0,370	2,582	0,170
Arachidová	0,151	0,032	0,184	0,013	0,126	0,028	0,098	0,011
Linolenová	0,135	0,086	0,182	0,038	0,169	0,052	0,073	0,024
Behenová	0,563	0,097	0,463	0,031	0,242	0,021	0,168	0,023
Eikosatrienová	0,465	0,036	0,315	0,014	0,204	0,029	0,136	0,022
Arachidonová	4,270	0,172	2,678	0,084	1,460	0,087	0,874	0,086
Eikosapentaenová	0,074	0,052	0,123	0,017	0,107	0,011	0,035	0,009
Tetrakosanová	0,852	0,140	0,632	0,057	0,332	0,032	0,279	0,033
Dokosatetraenová	0,718	0,036	0,485	0,051	0,207	0,042	0,149	0,006
Dokosapentaenová	0,114	0,060	0,127	0,009	0,067	0,056	0,053	0,038
Dokosahexaenová	1,222	0,163	0,748	0,128	0,390	0,051	0,185	0,032
Vnitřní standard	616,667	38,422	834,667	67,613	757,000	155,957	1202,667	57,069

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka

**Příloha 15a** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě

Název MK	0 h		24 h		48 h		72 h		1 týden	
	1% roztok BHT									
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a plochy IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,029	0,004	0,035	0,007	0,124	0,015	0,041	0,003	0,036	0,006
Myristová	0,211	0,016	0,233	0,007	0,829	0,047	0,255	0,045	0,673	0,055
Myristolejová	0,134	0,011	0,154	0,014	0,511	0,032	0,144	0,015	0,416	0,039
Pentadekanová	0,068	0,013	0,076	0,010	0,244	0,013	0,083	0,013	0,223	0,063
Palmitová	4,836	0,263	5,309	0,113	18,368	0,974	5,252	0,337	15,846	0,948
Palmitolejová	0,358	0,016	0,396	0,027	1,330	0,055	0,375	0,026	1,074	0,034
Heptadekanová	0,058	0,008	0,067	0,007	0,233	0,033	0,056	0,004	0,158	0,020
Stearová	2,331	0,088	2,599	0,050	8,358	0,433	2,433	0,097	7,413	0,407
Olejová	2,427	0,158	2,649	0,175	10,149	1,989	2,578	0,169	7,594	0,439
<i>cis</i> -Vacenová	0,213	0,026	0,203	0,019	0,769	0,090	0,189	0,026	0,613	0,034
Linolová	2,483	0,177	2,718	0,158	9,102	0,322	2,569	0,132	7,432	0,323
Arachidová	0,070	0,008	0,072	0,003	0,251	0,029	0,067	0,010	0,175	0,006
Linolenová	0,069	0,008	0,075	0,004	0,262	0,011	0,066	0,013	0,175	0,053
Behenová	0,193	0,014	0,168	0,011	0,692	0,033	0,176	0,023	0,527	0,039
Eikosatrienová	0,159	0,017	0,171	0,016	0,562	0,060	0,150	0,002	0,431	0,044
Arachidonová	1,410	0,093	1,485	0,065	4,905	0,050	1,436	0,017	4,147	0,204
Trikosanová	0,033	0,011	0,035	0,005	0,122	0,033	0,033	0,013	0,121	0,011
Eikosapentaenová	0,042	0,008	0,044	0,009	0,155	0,027	0,043	0,012	0,132	0,018
Tetrakosanová	0,328	0,029	0,310	0,033	1,142	0,096	0,304	0,007	1,001	0,031
Dokosatetraenová	0,224	0,023	0,236	0,019	0,798	0,100	0,215	0,006	0,668	0,085

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen

**Příloha 15b** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě

Název MK	0 h		24 h		48 h		72 h		1 týden	
	1% roztok BHT									
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a plochy IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dokosapentaenová	0,048	0,007	0,062	0,014	0,162	0,001	0,073	0,007	0,123	0,010
Dokosahexaenová	0,362	0,041	0,393	0,028	1,205	0,031	0,371	0,027	1,045	0,027

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen

**Příloha 16a** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě

Název MK	0 h		24 h		48 h		72 h		1 týden	
	bez BHT									
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,042	0,010	0,034	0,011	0,114	0,007	0,035	0,009	0,039	0,009
Myristová	0,233	0,039	0,221	0,023	0,787	0,040	0,696	0,041	0,232	0,049
Myristolejová	0,134	0,012	0,114	0,009	0,486	0,032	0,391	0,045	0,127	0,005
Pentadekanová	0,081	0,020	0,068	0,008	0,276	0,043	0,211	0,029	0,085	0,018
Palmitová	4,989	0,232	4,880	0,152	15,968	0,458	15,079	0,400	4,979	0,353
Palmitolejová	0,347	0,019	0,329	0,004	1,137	0,049	0,934	0,056	0,334	0,026
Heptadekanová	0,059	0,015	0,056	0,006	0,197	0,022	0,179	0,015	0,059	0,004
Stearová	2,532	0,161	2,459	0,103	7,539	0,261	6,956	0,232	2,370	0,115

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen



**Příloha 16b** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při pokojové teplotě

Název MK	0 h		24 h		48 h		72 h		1 týden	
	bez BHT									
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Olejová	2,339	0,094	2,304	0,029	7,683	0,137	7,032	0,279	2,272	0,091
cis-Vacenová	0,188	0,004	0,178	0,011	0,645	0,035	0,603	0,057	0,194	0,035
Linolová	2,368	0,133	2,284	0,059	7,580	0,063	6,895	0,343	2,178	0,091
Arachidová	0,071	0,009	0,070	0,005	0,225	0,021	0,173	0,036	0,068	0,012
Linolenová	0,068	0,018	0,048	0,010	0,183	0,030	0,160	0,029	0,064	0,016
Behenová	0,178	0,008	0,160	0,018	0,610	0,048	0,502	0,067	0,189	0,021
Eikosatrienová	0,157	0,021	0,145	0,010	0,510	0,078	0,422	0,046	0,164	0,007
Arachidonová	1,318	0,083	1,323	0,010	4,277	0,015	3,858	0,252	1,347	0,060
Trikosanová	0,032	0,014	0,022	0,001	0,100	0,030	0,039	0,002	0,027	0,008
Eikosapentaenová	0,050	0,010	0,039	0,010	0,116	0,035	0,135	0,027	0,034	0,003
Tetrakosanová	0,343	0,023	0,278	0,018	1,061	0,037	0,872	0,051	0,382	0,032
Dokosatetraenová	0,207	0,025	0,203	0,018	0,704	0,059	0,587	0,044	0,228	0,010
Dokosapentaenová	0,059	0,017	0,049	0,024	0,142	0,043	0,132	0,040	0,048	0,006
Dokosahehexaenová	0,333	0,031	0,322	0,009	1,023	0,062	0,998	0,068	0,347	0,048

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen

**Příloha 17** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytolenem, které byly skladovány při 4 °C

Název MK	0 týdnů		1 týden		2 týdny		3 týdny	
	1% roztok BHT							
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,029	0,004	0,038	0,008	0,093	0,031	0,093	0,007
Myristová	0,211	0,016	0,256	0,008	0,425	0,060	0,511	0,124
Myristolejová	0,134	0,011	0,146	0,002	0,245	0,010	0,292	0,046
Pentadekanová	0,068	0,013	0,092	0,009	0,176	0,029	0,233	0,032
Palmitová	4,836	0,263	5,400	0,138	7,382	0,554	7,311	0,546
Palmitolejová	0,358	0,016	0,385	0,023	0,579	0,076	0,579	0,065
Heptadekanová	0,058	0,008	0,071	0,013	0,098	0,013	0,148	0,008
Stearová	2,331	0,088	2,533	0,057	3,375	0,244	3,200	0,185
Olejová	2,427	0,158	2,656	0,044	3,861	0,307	3,895	0,313
cis-Vacenová	0,213	0,026	0,224	0,019	0,372	0,051	0,303	0,045
Linolová	2,483	0,177	2,626	0,057	3,821	0,262	3,640	0,292
Arachidová	0,070	0,008	0,080	0,014	0,127	0,018	0,134	0,023
Linolenová	0,069	0,008	0,074	0,005	0,083	0,003	0,116	0,011
Behenová	0,193	0,014	0,214	0,029	0,299	0,019	0,245	0,079
Eikosatrienová	0,159	0,017	0,171	0,018	0,245	0,019	0,260	0,029
Arachidonová	1,410	0,093	1,425	0,044	2,352	0,149	2,092	0,168
Trikosanová	0,033	0,011	0,045	0,007	0,067	0,002	–	–
Eikosapentaenová	0,042	0,008	0,044	0,005	0,120	0,004	0,124	0,020
Tetrakosanová	0,328	0,029	0,361	0,017	0,468	0,069	0,502	0,021
Dokosatetraenová	0,224	0,023	0,232	0,026	0,374	0,042	0,371	0,013
Dokosapentaenová	0,048	0,007	0,062	0,007	–	–	0,300	0,053
Dokosahexaenová	0,362	0,041	0,397	0,026	0,656	0,087	0,586	0,032

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytolen

**Příloha 18** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při 4 °C

Název MK	0 týdnů		1 týden		2 týdny		3 týdny	
	bez BHT							
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,042	0,010	0,038	0,007	0,127	0,031	0,078	0,011
Myristová	0,233	0,039	0,230	0,011	0,467	0,121	0,110	0,014
Myristolejová	0,134	0,012	0,121	0,003	0,248	0,010	0,073	0,004
Pentadekanová	0,081	0,020	0,079	0,006	0,184	0,053	0,045	0,012
Palmitová	4,989	0,232	4,796	0,100	7,304	0,554	1,901	0,086
Palmitolejová	0,347	0,019	0,311	0,003	0,486	0,051	0,133	0,010
Heptadekanová	0,059	0,015	0,063	0,011	0,161	0,021	0,032	0,010
Stearová	2,532	0,161	2,317	0,079	3,209	0,258	0,874	0,031
Olejová	2,339	0,094	2,242	0,052	3,575	0,171	1,011	0,035
cis-Vacenová	0,188	0,004	0,185	0,014	0,350	0,060	0,089	0,010
Linolová	2,368	0,133	2,222	0,059	3,420	0,127	0,900	0,068
Arachidová	0,071	0,009	0,065	0,011	0,186	0,040	0,040	0,003
Linolenová	0,068	0,018	0,062	0,014	0,147	0,024	0,036	0,008
Behenová	0,178	0,008	0,179	0,019	0,317	0,062	0,085	0,007
Eikosatrienová	0,157	0,021	0,141	0,009	0,336	0,021	0,068	0,001
Arachidonová	1,318	0,083	1,315	0,059	2,197	0,163	0,587	0,061
Trikosanová	0,032	0,014	0,023	0,004	0,070	0,050	0,032	0,001
Eikosapentaenová	0,050	0,010	0,050	0,011	0,051	0,073	0,025	0,006
Tetrakosanová	0,343	0,023	0,284	0,023	0,480	0,007	0,124	0,008
Dokosatetraenová	0,207	0,025	0,220	0,024	0,394	0,015	0,109	0,008
Dokosapentaenová	0,059	0,017	0,045	0,009	–	–	0,059	0,002
Dokosahexaenová	0,333	0,031	0,341	0,011	0,667	0,031	0,149	0,019

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen

**Příloha 19** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve ošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při –20 °C

Název MK	0 týdnů		1 týden		2 týdny		3 týdny	
	1% roztok BHT							
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,029	0,004	0,038	0,009	0,087	0,009	0,108	0,027
Myristová	0,211	0,016	0,229	0,019	0,427	0,032	0,456	0,063
Myristolejová	0,134	0,011	0,137	0,007	0,261	0,026	0,213	0,033
Pentadekanová	0,068	0,013	0,073	0,010	0,217	0,056	0,201	0,061
Palmitová	4,836	0,263	5,223	0,135	7,586	0,439	7,121	0,172
Palmitolejová	0,358	0,016	0,349	0,023	0,645	0,080	0,510	0,029
Heptadekanová	0,058	0,008	0,052	0,003	0,136	0,036	0,116	0,010
Stearová	2,331	0,088	2,457	0,046	3,394	0,154	2,210	1,550
Olejová	2,427	0,158	2,464	0,076	4,027	0,275	3,516	0,165
cis-Vacenová	0,213	0,026	0,196	0,010	0,367	0,014	0,328	0,009
Linolová	2,483	0,177	2,595	0,083	4,113	0,298	3,542	0,150
Arachidová	0,070	0,008	0,075	0,014	0,132	0,001	0,127	0,038
Linolenová	0,069	0,008	0,072	0,011	0,227	0,054	0,119	0,032
Behenová	0,193	0,014	0,180	0,033	0,320	0,043	0,290	0,033
Eikosatrienová	0,159	0,017	0,167	0,013	0,255	0,054	0,243	0,006
Arachidonová	1,410	0,093	1,438	0,003	2,394	0,160	1,964	0,126
Trikosanová	0,033	0,011	0,031	0,005	–	–	–	–
Eikosapentaenová	0,042	0,008	0,050	0,013	0,110	0,007	0,096	0,016
Tetrakosanová	0,328	0,029	0,345	0,004	0,477	0,027	0,406	0,070
Dokosatetraenová	0,224	0,023	0,219	0,028	0,389	0,068	0,342	0,015
Dokosapentaenová	0,048	0,007	0,054	0,008	–	–	0,155	0,090
Dokosahexaenová	0,362	0,041	0,379	0,014	0,723	0,010	0,555	0,032

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen

**Příloha 20** Stabilita vybraných mastných kyselin ve vzorcích suché kapky krve neošetřených butylovaným hydroxytoluenem, které byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Název MK	0 týdnů		1 týden		2 týdny		3 týdny	
	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD	Průměr poměru plochy píků MK a píku IS	SD
Dodekanová	0,042	0,010	0,026	0,004	0,092	0,031	0,073	0,019
Myristová	0,233	0,039	0,202	0,002	0,335	0,046	0,202	0,100
Myristolejová	0,134	0,012	0,108	0,012	0,232	0,013	0,071	0,004
Pentadekanová	0,081	0,020	0,056	0,008	0,132	0,034	0,087	0,066
Palmitová	4,989	0,232	4,615	0,119	6,278	0,379	2,489	0,352
Palmitolejová	0,347	0,019	0,310	0,007	0,525	0,036	0,178	0,007
Heptadekanová	0,059	0,015	0,055	0,006	0,106	0,012	0,047	0,016
Stearová	2,532	0,161	2,239	0,085	3,005	0,145	1,018	0,059
Olejová	2,339	0,094	2,177	0,114	3,452	0,255	1,183	0,033
<i>cis</i> -Vacenová	0,188	0,004	0,180	0,003	0,296	0,073	0,094	0,003
Linolová	2,368	0,133	2,186	0,135	3,393	0,152	1,178	0,053
Arachidová	0,071	0,009	0,072	0,013	0,149	0,007	0,047	0,012
Linolenová	0,068	0,018	0,052	0,004	0,159	0,001	0,048	0,005
Behenová	0,178	0,008	0,168	0,009	0,316	0,051	0,091	0,016
Eikosatrienová	0,157	0,021	0,152	0,022	0,267	0,043	0,078	0,005
Arachidonová	1,318	0,083	1,276	0,066	2,019	0,044	0,697	0,021
Trikosanová	0,032	0,014	0,031	0,006	–	–	–	–
Eikosapentaenová	0,050	0,010	0,037	0,009	0,110	0,036	0,033	0,006
Tetrakosanová	0,343	0,023	0,287	0,013	0,421	0,017	0,156	0,012
Dokosatetraenová	0,207	0,025	0,200	0,016	0,389	0,052	0,128	0,021
Dokosapentaenová	0,059	0,017	0,054	0,025	–	–	0,036	0,001
Dokosahexaenová	0,333	0,031	0,281	0,007	0,574	0,050	0,174	0,003

MK, mastná kyselina; IS, vnitřní standard; SD, směrodatná odchylka; BHT, butylovaný hydroxytoluen