

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stabilita lipidómu ľudskej plazmy v závislosti na skladovacích podmienkach  
a manipulácii so vzorkou

Diplomová práca

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

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Minarechová**  
Osobní číslo: **C20529**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Stabilita lipidomu lidské plazmy v závislosti na skladovacích podmínkách a manipulaci se vzorkem**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na správné skladovací podmínky lidské plazmy a kritické kroky při přípravě lipidomického extraktu.
2. V experimentální části ověřte vliv skladovacích podmínek a manipulace se vzorkem se zaměřením na cholesterol estery, glycerolipidy, fosfolipidy a sfingolipidy s využitím vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a navrhněte správný postup pro skladování vzorků.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultanti diplomové práce: **Ing. Ondřej Peterka, Ph.D.**  
**Ing. Michaela Chocholoušková, Ph.D.**

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prehlasujem:

Prácu s názvom Stabilita lipidómu ľudskej plazmy v závislosti na skladovacích podmienkach a manipulácii so vzorkou som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidlá pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 2. 5. 2022

Bc. Zuzana Minarechová

## **POĎAKOVANIE**

Svoju vďačnosť by som chcela vyjadriť vedúcemu tejto diplomovej práce, prof. Ing. Michalovi Holčapkovi, Ph.D., za jeho odborné vedenie a osobný prístup. Moja veľká vďaka patrí tiež Ing. Ondřejovi Peterkovi, Ph.D. za jeho ochotu, ústretovosť, vedenie najmä pri práci v laboratóriu a odborné rady, ktoré mi výrazne pomáhali pri realizácii tejto diplomovej práce. V neposlednej rade ďakujem mojej rodine za ich podporu v celej dobe štúdia.

## **ANOTÁCIA**

Diplomová práca je zameraná na štúdium stability vybraných tried lipidov v ľudskej plazme spojením ultravysokoúčinnnej superkritickej fluidnej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie. V teoretickej časti je priblížená štruktúra, rozdelenie a funkcie lipidov. Popísaný je odber biologického materiálu, v tomto prípade najmä ľudskej plazmy a jeho následné spracovanie pre lipidomickú analýzu. Charakterizované sú tiež separačné techniky využívané pre analýzu lipidov rovnako ako techniky hmotnostnej spektrometrie. Cieľom práce bolo stanovenie koncentračných zmien vybraných tried lipidov vo vzorkách zmesi interných štandardov a plazmy pri rôznych skladovacích podmienkach a počte rozmrazovacích cyklov.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

lipidomika, extrakcia, chromatografia, hmotnostná spektrometria, stabilita

## **TITLE**

Stability of human plasma lipids depending on the storage conditions and sample manipulation

## **ANNOTATION**

The diploma thesis is focused on the stability study of chosen lipid classes of human plasma using ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled to the mass spectrometry. In the theoretical part, the structure, classification and functions of lipids are elucidated. Biological material sampling, in this case primarily human plasma and its treatment for lipidomic analysis is described. Characterised are also separation techniques and techniques of mass spectrometry used for lipid analysis. The aim of this work was to define concentration changes of chosen lipid classes in mixture of internal standards and plasma samples stored under different conditions and number of freeze-thawing cycles.

## **KEYWORDS**

lipidomic, extraction, chromatography, mass spectrometry, stability

# OBSAH

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK .....	10
ZOZNAM GRAFOV .....	11
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK .....	14
1 TEORETICKÁ ČASŤ .....	18
1.1 Lipidy.....	18
1.1.1 Rozdelenie a názvoslovie lipidov .....	18
1.1.2 Vlastnosti a funkcie lipidov .....	23
1.1.3 Lipidy a zdravie človeka.....	23
1.1.3.1 Lipidy ako biomarkery .....	24
1.2 Lipidomika.....	24
1.2.1 Odber a spracovanie biologického materiálu.....	25
1.2.2 Skladovanie vzorky biologického materiálu.....	26
1.2.3 Príprava vzorky pre lipidomickú analýzu .....	26
1.2.4 Separáčné techniky v lipidomike.....	27
1.2.4.1 Kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami.....	28
1.2.4.2 Kvapalinová chromatografia s normálnymi fázami .....	28
1.2.4.3 Chromatografia hydrofilných interakcií .....	29
1.2.4.4 Superkritická fluidná chromatografia.....	29
1.2.4.4.1 Mobilné fázy .....	31
1.2.4.4.2 Kolóny.....	31
1.2.4.4.3 Spojenie SFC a MS .....	32
1.2.5 Hmotnostná spektrometria.....	33
1.2.5.1 Ionizačné techniky .....	33
1.2.5.2 Analyzátory .....	34
1.2.5.3 Detektory .....	36
1.2.5.4 Hmotnostne-spektrometrické zobrazovanie .....	36

1.2.5.5	Priama infúzia.....	37
1.2.6	Identifikácia a kvantifikácia lipidov .....	37
1.2.6.1	Voľba a použitie interných štandardov.....	38
2	PRAKTICKÁ ČASŤ .....	39
2.1	Zoznam použitých chemikálií a štandardov .....	39
2.2	Prístroje a zariadenia.....	39
2.3	Príprava zmesi interných štandardov .....	40
2.3.1	Príprava podielov IS MIX.....	41
2.4	Príprava podielov plazmy .....	41
2.5	Príprava vzoriek.....	42
2.5.1	Príprava kontroly kvality .....	42
2.5.2	Príprava vzorky IS MIX .....	42
2.5.2.1	Krátkodobá stabilita IS MIX .....	43
2.5.2.2	Stabilita IS MIX v priebehu rozmrazovacích cyklov .....	43
2.5.2.3	Dlhodobá stabilita IS MIX .....	43
2.5.3	Príprava lipidomického extraktu.....	43
2.5.3.1	Krátkodobá stabilita plazmy .....	44
2.5.3.2	Stabilita plazmy v priebehu rozmrazovacích cyklov.....	44
2.5.3.3	Skladovacie podmienky extraktu .....	44
2.5.3.4	Stabilita v autosampleri .....	45
2.6	UHPSFC podmienky .....	46
2.7	MS podmienky.....	47
2.8	Spracovanie nameraných dát .....	47
2.8.1	Vyhodnotenie kontrol kvality .....	48
2.8.2	Výpočet chyby kvantifikácie .....	48
2.8.3	Vyhodnocovanie jednotlivých analýz.....	48
3	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	49

3.1	Voľba štandardov.....	49
3.2	Porovnanie koncentrácie lipidov s publikáciami .....	50
3.3	Normalizácia dát .....	50
3.4	Vyhodnotenie výsledkov .....	51
3.4.1	Krátkodobá stabilita.....	53
3.4.2	Stabilita v priebehu rozmrazovacích cyklov.....	54
3.4.3	Dlhodobá stabilita IS MIX.....	55
3.4.4	Stabilita extraktu .....	57
3.4.5	Stabilita extraktov v autosampleri .....	58
	ZÁVER .....	59
	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	61
	PRÍLOHY .....	71

## ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

Obrázok 1: Štruktúra kyseliny a) steárovej, b) olejovej .....	19
Obrázok 2: Štruktúra 1-stearoyl-2-palmitoylglycerolu.....	19
Obrázok 3: Štruktúra 1-palmitoyl-2-olejyl-sn-glycero-3-fosfátu .....	20
Obrázok 4: Štruktúra N-palmitoyl-sfinganín-1-fosfocholínu .....	20
Obrázok 5: Štruktúra cholesterolu .....	21
Obrázok 6: Štruktúra koenzýmu Q10 .....	21
Obrázok 7: Štruktúra 6'-O-palmitoylsacharózy .....	22
Obrázok 8: Štruktúra erytromycínu .....	22
Obrázok 9: Princíp chromatografickej separácie lipidov .....	30
Obrázok 10: Schéma zostavy SFC a hmotnostného spektrometru .....	31
Obrázok 11: Schematické spojenie SFC a MS detekcie .....	33
Tabuľka 1: Koncentrácie štandardov v zásobných roztokoch a v IS MIX.....	40
Tabuľka 2: Zoznam vzoriek plazmy použitých pre prípravu zmesnej vzorky .....	42
Tabuľka 3: Prehľad jednotlivých experimentov .....	46
Tabuľka 4: Vybrané lipidy pre posúdenie stability plazmatických lipidov.....	53
Tabuľka P 1: Priemerné koncentrácie a relatívne odchýlky jednotlivých štandardov, červene sú značené štandardy, podľa ktorých boli stanovované koncentrácie ostatných IS .....	71
Tabuľka P2: Porovnanie stanovených koncentrácií lipidov s publikáciami.....	72

## ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Stability signálu CE 16:0 d7 pre QC vzorky .....	51
Graf 2: Stability signálu SM 36:2 d9 pre QC vzorky .....	51
Graf 3: Vyjadrenie koncentračných zmien pomocou závislosti plochy píku na čase .....	52
Graf 4: Vyjadrenie koncentračných zmien pomocou závislosti intenzity píku na čase .....	52
Graf 5: Krátkodobá stabilita TG v IS MIX.....	54
Graf 6: Krátkodobá stabilita vybraných TG v plazme.....	54
Graf 7: Stabilita CE v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX.....	55
Graf 8: Stabilita vybraných MG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy .....	55
Graf 9: Dlhodobá stabilita CE v IS MIX po normalizácii dát .....	56
Graf 10: Dlhodobá stabilita SM v IS MIX po normalizácii dát.....	56
Graf 11: Dlhodobá stabilita TG v IS MIX po normalizácii dát .....	56
Graf 12: Stabilita DG 36:2 d5 v extrakte.....	57
Graf 13: Stabilita TG v autosampleri.....	58
Graf P 1: Stability signálu CE 19:0 pre QC vzorky .....	78
Graf P 2: Stability signálu Cer 35:1 pre QC vzorky .....	78
Graf P 3: Stability signálu Cer 36:1 d7 pre QC vzorky .....	78
Graf P 4: Stability signálu Cer 30:1 pre QC vzorky .....	78
Graf P5: Stability signálu DG 36:2 d5 pre QC vzorky .....	79
Graf P 6: Stability signálu DG 28:0 pre QC vzorky .....	79
Graf P 7: Stability signálu DG 33:1 d7 pre QC vzorky .....	79
Graf P 8: Stability signálu LPC 17:0 pre QC vzorky .....	79
Graf P 9: Stability signálu MG 19:1 pre QC vzorky .....	80
Graf P 10: Stability signálu MG 18:1 d7 pre QC vzorky .....	80
Graf P 11: Stability signálu PC 33:1 d7 pre QC vzorky .....	80
Graf P 12: Stability signálu PC 28:0 pre QC vzorky .....	80
Graf P 13: Stability signálu PC 44:2 pre QC vzorky .....	81
Graf P 14: Stability signálu SM 30:1 pre QC vzorky .....	81
Graf P 15: Stability signálu TG 48:1 d7 pre QC vzorky .....	81

Graf P 16: Stability signálu TG 57:3 pre QC vzorky .....	81
Graf P 17: Krátkodobá stabilita CE v IS MIX.....	82
Graf P 18: Krátkodobá stabilita Cer v IS MIX .....	82
Graf P 19: Krátkodobá stabilita DG v IS MIX .....	82
Graf P 20: Krátkodobá stabilita LPC v IS MIX.....	82
Graf P 21: Krátkodobá stabilita MG v IS MIX .....	83
Graf P 22: Krátkodobá stabilita PC v IS MIX .....	83
Graf P 23: Krátkodobá stabilita SM v IS MIX .....	83
Graf P 24: Krátkodobá stabilita vybraných CE v plazme.....	83
Graf P 25: Krátkodobá stabilita vybraných Cer v plazme .....	84
Graf P 26: Krátkodobá stabilita vybraných DG v plazme .....	84
Graf P 27: Krátkodobá stabilita vybraných LPC v plazme .....	84
Graf P 28: Krátkodobá stabilita vybraných MG v plazme .....	84
Graf P 29: Krátkodobá stabilita vybraných PC v plazme.....	85
Graf P 30: Krátkodobá stabilita vybraných plazmalogénov v plazme .....	85
Graf P 31: Krátkodobá stabilita vybraných SM v plazme .....	85
Graf P 32: Stabilita Cer v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX.....	85
Graf P 33: Stabilita DG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX.....	86
Graf P 34: Stabilita LPC v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX .....	86
Graf P 35: Stabilita MG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX .....	86
Graf P 36: Stabilita PC v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX.....	86
Graf P 37: Stabilita SM v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX.....	87
Graf P 38: Stabilita TG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX .....	87
Graf P 39: Stabilita vybraných CE v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy .....	87
Graf P 40: Stabilita vybraných Cer v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy.....	87
Graf P 41: Stabilita vybraných DG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy.....	88
Graf P 42: Stabilita vybraných LPC v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy .....	88
Graf P 43: Stabilita vybraných PC v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy .....	88
Graf P 44: Stabilita vybraných plazmalogénov v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy ...	88
Graf P 45: Stabilita vybraných SM v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy.....	89
Graf P 46: Stabilita vybraných TG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy .....	89

Graf P 47: Dlhodobá stabilita Cer po normalizácii dát.....	89
Graf P 48: Dlhodobá stabilita DG po normalizácii dát.....	89
Graf P 49: Dlhodobá stabilita LPC po normalizácii dát .....	90
Graf P 50: Dlhodobá stabilita MG po normalizácii dát .....	90
Graf P 51: Dlhodobá stabilita PC po normalizácii dát.....	90
Graf P 52: Stabilita CE 16:0 d7 v extrakte .....	90
Graf P 53: Stabilita CE 19:0 v extrakte .....	91
Graf P 54: Stabilita Cer 30:1 v extrakte.....	91
Graf P 55: Stabilita Cer 35:1 v extrakte.....	91
Graf P 56: Stabilita Cer 36:1 d7 v extrakte.....	91
Graf P 57: Stabilita DG 28:0 v extrakte.....	92
Graf P 58: Stabilita DG 33:1 d7 v extrakte.....	92
Graf P 59: Stabilita LPC 17:0 v extrakte .....	92
Graf P 60: Stabilita MG 19:1 v extrakte .....	92
Graf P 61: Stabilita PC 33:1 d7 v extrakte.....	93
Graf P 62: Stabilita PC 28:0 v extrakte.....	93
Graf P 63: Stabilita PC 44:2 v extrakte.....	93
Graf P 64: Stabilita SM 30:1 v extrakte.....	93
Graf P 65: Stabilita SM 36:2 d9 v extrakte.....	94
Graf P 66: Stabilita TG 48:1 d7 v extrakte .....	94
Graf P 67: Stabilita TG 57:3 v extrakte .....	94
Graf P 68: Stabilita CE v autosampleri.....	94
Graf P 69: Stabilita Cer v autosampleri .....	95
Graf P 70: Stabilita DG v autosampleri .....	95
Graf P 71: Stabilita LPC v autosampleri .....	95
Graf P 72: Stabilita MG v autosampleri .....	95
Graf P 73: Stabilita PC v autosampleri .....	96
Graf P 74: Stabilita SM v autosampleri .....	96

## ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

*U skratiek prevzatých z anglosaskej literatúry je uvedené pôvodné znenie v zátvorke*

<b>APCI</b>	Chemická ionizácia za atmosférického tlaku (Atmospheric-pressure chemical ionization)
<b>APPI</b>	Fotoionizácia za atmosférického tlaku (Atmospheric-pressure photoionization)
<b>BMI</b>	Index telesnej hmotnosti (Body mass index)
<b>BPR</b>	Regulátor spätného tlaku (Back pressure regulator)
<b>BuOH</b>	Butanol (Buthanol)
<b>CE</b>	Cholesterolestery (Cholesterolesters)
<b>Cer</b>	Ceramidy (Ceramides)
<b>DART</b>	Priama analýza v reálnom čase (Direct analysis in real time)
<b>DESI</b>	Desorpčná ionizácia elektrosprejom (Desorption electrospray ionization)
<b>DG</b>	Diacylglyceroly (Diacylglycerols)
<b>DI</b>	Priama infúzia (Direct infusion)
<b>ESI</b>	Ionizácia elektrosprejom (Electrospray ionization)
<b>FA</b>	Mastné acyly (Fatty acyls)
<b>FFA</b>	Voľné mastné kyseliny (Free fatty acids)
<b>FT</b>	Fourierová transformácia (Fourier transform)
<b>GC</b>	Plynová chromatografia (Gas chromatography)
<b>GL</b>	Glycerolipidy (Glycerolipids)
<b>GP</b>	Glycerofosfolipidy (Glycerophospholipids)
<b>Hex</b>	Hexán (Hexane)
<b>HILIC</b>	Chromatografia hydrofilných interakcií (Hydrophilic-interaction liquid chromatography)
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High performance liquid chromatography)
<b>ICR</b>	Iónová cyklotrónová rezonancia (Ion cyclotron resonance)
<b>IPA</b>	2-propanol (2-propanol)
<b>IS</b>	Vnútorý štandard (Internal standard)
<b>IS MIX</b>	Zmes vnútorných štandardov (Mixture of internal standards)

<b>K<sub>2</sub>EDTA</b>	Didraselná soľ kyseliny diamíntetraoctovej (Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>LPC</b>	Lysofosfatidylcholíny (Lysophosphatidylcholine)
<b>MALDI</b>	Desorpcia a ionizácia laserom za účasti matrice (Matrix assisted laser desorption/ionization)
<b>MeOH</b>	Metanol (Methanol)
<b>MG</b>	Monoacylglyceroly (Monoacylglycerols)
<b>MS</b>	Hmotnostná spektrometria (Mass spectrometry)
<b>MSI</b>	Hmotnostne-spektrometrické zobrazovanie (Mass spectrometry imaging)
<b>MTBE</b>	Metyltercbutyléter (Methyl tert-butyl ether)
<b>NP-LC</b>	Kvapalinová chromatografia s normálnymi fázami (Normal phase liquid chromatography)
<b>PA</b>	Fosfatidové kyseliny (Glycerophosphatic acid)
<b>PC</b>	Glycerofosfocholíny (Glycerophosphocholines)
<b>PE</b>	Glycerofosfoetanolamíny (Glycerophosphoethanolamines)
<b>PI</b>	Glycerofosfoinositoly (Glycerophosphoinositols)
<b>PK</b>	Polyketidy (Polyketides)
<b>PR</b>	Prenolové lipidy (Prenol lipids)
<b>PS</b>	Glycerofosfoseríny (Glycerophosphoserines)
<b>QqQ</b>	Trojité kvadrupól (Triple quadrupole)
<b>QC</b>	Kontrola kvality (Quality control)
<b>RP-LC</b>	Kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami (Reversed phase liquid chromatography)
<b>RSD</b>	Relatívna smerodajná odchýlka (Relative Standard Deviation)
<b>SFC</b>	Superkritická fluidná chromatografia (Supercritical fluid chromatography)
<b>SL</b>	Sacharolipidy (Saccharolipids)
<b>SM</b>	Sfingomyelíny (Sphingomyelins)
<b>SP</b>	Sfingolipidy (Sphingolipids)
<b>SPE</b>	Extrakcia tuhou fázou (Solid phase extraction)
<b>ST</b>	Sterolové lipidy (Sterol lipids)
<b>TOF</b>	Analyzátor doby letu (Time of flight)

<b>TG</b>	Triacylglyceroly (Triacylglycerols)
<b>UHPSFC</b>	Ultravysokoúčinná superkritická fluidná chromatografia (Ultra-high performance supercritical fluid chromatography)
<b>UV</b>	Ultrafialový (Ultraviolet)

## ÚVOD

Lipidy sú biomolekuly s rozmanitou štruktúrou, na základe ktorej je možné ich delenie do kategórií, od čoho sa odvíja aj ich názvoslovie a skrátene pomenovania. V živých organizmoch zohrávajú radu úloh, medzi tie najznámejšie patrí tvorba tukových zásob, zdroj energie, izolácia, tvorba membrán a signálnych molekúl. Vzhľadom k množstvu funkcií dochádza po prekročení fyziologického rozmedzia lipémie k rôznym zdravotným ťažkostiam. Lipidy sú tak využívané ako biomarkery, konkrétne pri diagnostike rakoviny ide o tumormarkery, ktoré indikujú prítomnosť maligného procesu v organizme. Na tieto biomolekuly je zameraný vedný odbor nazývaný lipidomika. Zaoberá sa analýzou spektra lipidov v tkanive, plazme, či inom biologickom materiáli [1; 2].

V tejto práci je popísaný odber biologického materiálu, konkrétne krvi, jej spracovanie pre získanie plazmy a následná úprava pre lipidomickú analýzu. Zásadným krokom prípravy vzorky je extrakcia. Pre lipidomickú analýzu je často využívaná kvapalinová extrakcia podľa Folcha, ďalej Bligha a Dyera a Matyasha. Možné je tiež využitie extrakcie tuhú fázou, ktorá spočíva v hydrofóbných interakciách lipidov so sorbentom. Kľúčovou analytickou technikou v lipidomike je hmotnostná spektrometria. V praxi je využívaná buďto samostatne, teda v režime priamej infúzie, známej tiež pod názvom shotgun, kedy je vzorka zavádzaná priamo do spektrometru, prípadne s využitím desorpčných ionizačných techník, ktoré majú uplatnenie mimo iného v hmotnostne-spektrometrickom zobrazovaní. Väčšia pozornosť však bude venovaná spojeniu s chromatografickými technikami. V lipidomike má uplatnenie najmä kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami, ktorá zabezpečuje separáciu lipidov na jednotlivé druhy, ďalej chromatografia hydrofilných interakcií a superkritická fluidná chromatografia deliaca lipidy do tried. Toto spojenie poskytuje pre správnu identifikáciu informácie o retenčných časoch a hodnoty  $m/z$ , čo zabezpečuje vysokú mieru spoľahlivosti. Pri kvantifikácii je dôležitá voľba vhodných interných štandardov a ich súčasná ionizácia s analytmi. Vzhľadom k významnému využitiu lipidov ako tumormarkerov je v lipidomike kladený dôraz na správnu identifikáciu a stanovenie obsahu lipidov vo vzorkách biologického materiálu [3].

# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Lipidy

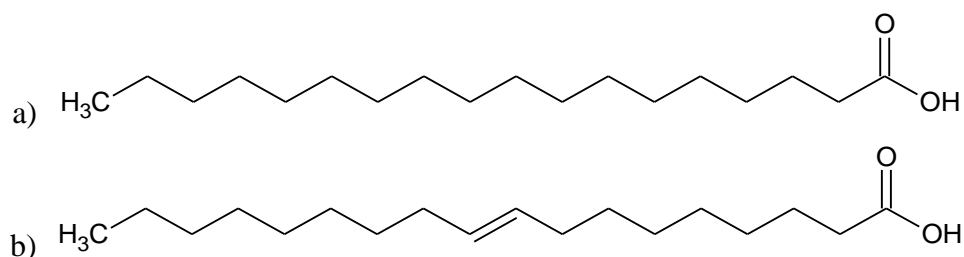
Lipidy sú z chemického hľadiska štruktúrne rozmanité biomolekuly, skladajúce sa primárne z vyšších mastných kyselín a alkoholu. Na rozdiel od rady ostatných biomolekúl nevytvárajú polyméry, ale môžu sa zoskupovať do útvarov ako micely, či plazmatické membrány [4]. Vďaka ich štruktúrnej rozmanitosti ich možno deliť do rôznych skupín podľa určitých kritérií. Základné rozdelenie lipidov je na tieto skupiny: jednoduché a zložené. Jednoduché lipidy obsahujú v molekule len alkohol a karboxylovú kyselinu, kým zložené obsahujú aj ďalšiu zložku, ako napríklad kyselinu fosforečnú, etanolamín, serín, či sacharidy [5]. Z praktických dôvodov však lipidomická komunita využíva delenie lipidov do ôsmich kategórií podľa Lipid Maps [6].

### 1.1.1 Rozdelenie a názvoslovie lipidov

Na základe ich štruktúrnych vlastností sa môžu lipidové kategórie deliť na nepolárne (mastné acyly, glycerolipidy, steroly, prenoly) a polárne (fosfolipidy, sacharolipidy, sfingolipidy a polyketidy). Jednotlivé kategórie sú delené do lipidových tried, niekoľko príkladov je uvedených v nasledujúcom rozdelení [7]:

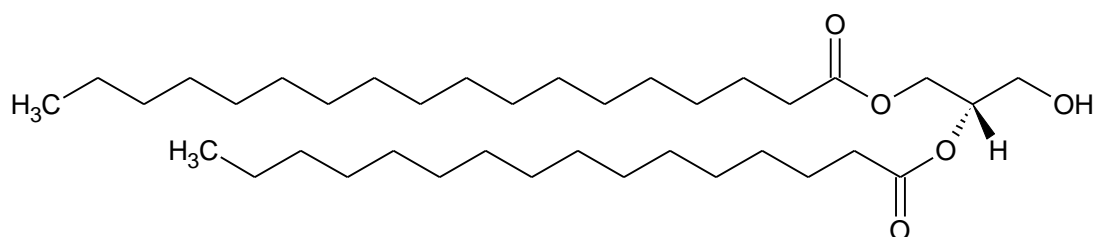
- Mastné acyly (FA)
  - Voľné mastné kyseliny (FFA)
  - Oxylipíny
  - Estery mastných kyselín
- Glycerolipidy (GL)
  - Monoacylglyceroly (MG)
  - Diacylglyceroly (DG)
  - Triacylglyceroly (TG)
- Glycerofosfolipidy (GP)
  - Fosfatidové kyseliny (PA)
  - Glycerofosfocholíny (PC)
  - Glycerofosfoetanolamíny (PE)
  - Glycerofosfoseríny (PS)
- Sfingolipidy (SP)
  - Ceramidy (Cer)
  - Sfingomyelíny (SM)
- Sterolové lipidy (ST)
  - Steroly
  - Steroidy
  - Žlčové kyseliny
- Prenolové lipidy (PR)
  - Izoprenoidy
  - Chinóny a hydrochinóny
- Sacharolipidy (SL)
- Polyketidy (PK)

Mastné kyseliny predstavujú samostatnú triedu, ktoré môžu byť voľné, alebo súčasťou molekúl iných lipidov. Ich štruktúra sa skladá z dlhého uhlíkového reťazca zvyčajne s párnym počtom atómov uhlíka (najčastejšie 12 – 20) s hydrofilnou funkčnou skupinou – karboxylovou kyselinou. Ďalej sa môžu deliť na nasýtené a nenasýtené podľa výskytu dvojitej väzby v rámci uhlíkového reťazca. V prípade nenasýtených mastných kyselín u ľudí je takmer vždy ich konfigurácia *cis*. Príkladom nasýtenej mastnej kyseliny je kyselina steárová (Obr. 1a), ktorá je bohato zastúpená v ľudskom organizme. Mastné kyseliny možno skráteno zapísať pomocou ich počtu uhlíkov a počtu dvojitých väzieb, pre spomínanú kyselinu je to FA 18:0, teda jej reťazec pozostáva z 18 uhlíkov a neobsahuje žiadnu dvojitú väzbu. Pre nenasýtené kyseliny, napr. kyselinu olejovú (Obr. 1b) je zápis analogický. V prípade znalosti sa pridáva lokalizácia a konformácia dvojitej väzby uvedená v zátvorke: FA 18:1(9Z) [1].



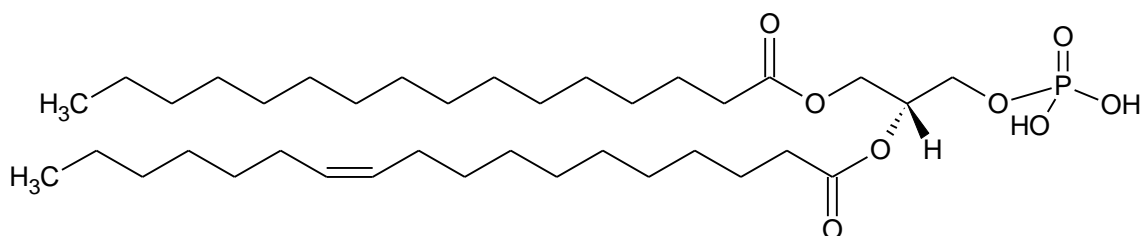
Obrázok 1: Štruktúra kyseliny a) steárovej, b) olejovej

Glycerolipidy sú estery trojsýtného alkoholu glycerolu a mastných kyselín. Podľa ich počtu sa ďalej delia na mono-, di- a triacylglyceroly. Väčšinou sa v molekule nevyskytujú rovnaké kyseliny, ale sú zmiešané. Pri základnom označení lipidového druhu sa používa skratka vyjadrujúca počet mastných kyselín (MG, DG, TG) a ich počet uhlíkov a dvojitých väzieb, napr. DG 34:0. Ak je známe zloženie acylových reťazcov, ale nie ich poloha, sú vo vzorci používané podčiarkovníky, v tomto prípade DG 16:0\_18:0. Pri vyjadrovaní úplnej štruktúry molekuly je používané lomítko na oddelenie polohy jednotlivých reťazcov – DG 18:0/16:0/0:0, slovné 1-stearoyl-2-palmitoylglycerol (Obr. 2) [7; 8].



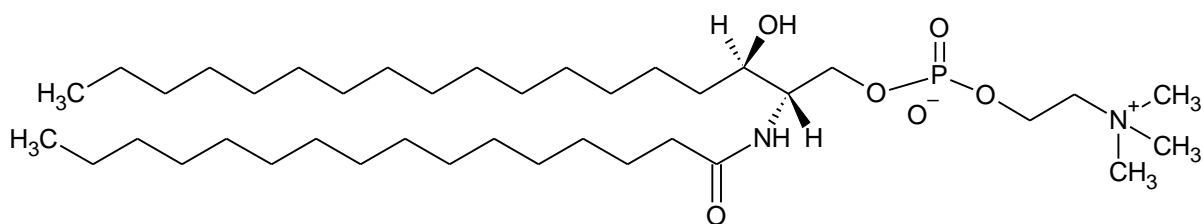
Obrázok 2: Štruktúra 1-stearoyl-2-palmitoylglycerolu

Glycerofosfolipidy, niekedy skrátene fosfolipidy, pozostávajú v základe z alkoholu (glycerolu), jednej (označované *lyso*) alebo dvoch mastných kyselín a fosfátu naviazaného na voľnú hydroxylovú skupinu glycerolu. Názvoslovie je principiálne podobné glycerolipidom, za skratkou označujúcou triedu fosfolipidov je počet atómov uhlíka a počet dvojitých väzieb, napr. PA 34:1. O úroveň vyššie je uvedenie zloženia acylových reťazcov bez ich polohy, PA 16:0\_18:1 a pri poznaní plnej štruktúry je uvedená okrem polohy reťazcov aj poloha dvojitých väzieb, PA 16:0/18:1(11Z) (Obr. 3). Fosfát predstavuje v molekule polárnu „hlavu“, vo vodnom prostredí vytvárajú dvojvrstvy v dôsledku reakcie na polárne prostredie, ktoré sú základom bunkových membrán [7; 9]. Naviazaný fosfát môže byť esterifikovaný druhým alkoholom, napríklad cholínom (glycerofosfocholíny), etanolamínom (glycerofosfoetanolamíny), serínom (glycerofosfoseríny), či inositolom (glycerofosfoinositoly) [1].



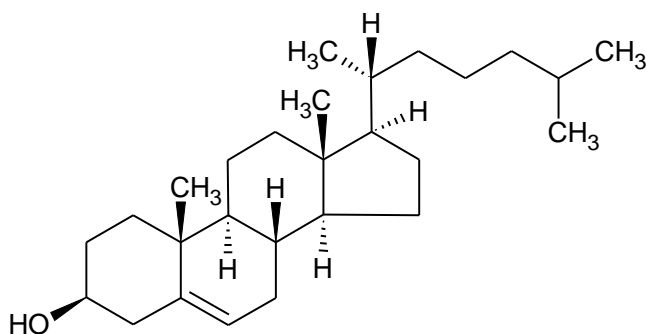
Obrázok 3: Štruktúra 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfátu

Základom sfingolipidov je aminoalkohol sfingozín, na ktorý sa viaže mastná kyselina cez amidovú väzbu. Takáto molekula sa nazýva ceramid (Cer). Po naviazaní fosforylcholínu na voľnú hydroxylovú skupinu vzniká sfingomyelín (SM), ktorý predstavuje najdôležitejší lipid v myelínovej pošve nervových vlákien. Názvoslovie je obdobné ako u vyššie uvedených tried, ide o skratku triedy a sumu uhlíkových atómov, dvojitých väzieb a kyslíkových atómov, SM 34:0;O2. Ďalej vyjadrenie dĺžok reťazcov, prvé číslo určuje počet atómov uhlíku v sfingoidnej báze, druhé dĺžku mastnej kyseliny – SM 18:0;O2/16:0. Štruktúra je znázornená na Obrázku 4 [1; 7].



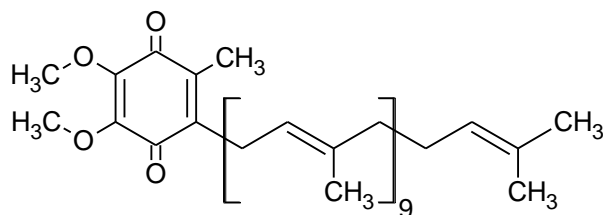
Obrázok 4: Štruktúra N-palmitoyl-sfinganín-1-fosfocholínu

Sterolové lipidy predstavujú štruktúrne výrazne rozdielnu triedu lipidov. Ich základom je molekula zložená z troch šesťčlenných a jedného päťčlenného kruhu. Najznámejší je cholesterol, ktorý predstavuje súčasť membrán a taktiež materiál pre syntézu niektorých hormónov (napr. kortikoidy, testosterón, estradiol) a žľových kyselín. Jeho štruktúra je uvedená na Obrázku 5 [1]. U húb je rozšírený ergosterol, ktorý predstavuje pre živočíchov a ľudí provitamín vitamínu D<sub>2</sub> [10]. Po naviazaní mastnej kyseliny na hydroxylovú skupinu cholesterolu vznikajú cholesterolestery (CE), ktoré sú menej polárne oproti samotnému cholesterolu a sú jeho zásobnými a transportnými formami. Nie sú súčasťou membránových štruktúr, ale nachádzajú sa najmä vo vnútri buniek a predstavujú hlavnú zložku aterosklerotického plátu. Ďalej sem patria oxysteroly, ktoré sú oxidovanými derivátmi cholesterolu a iných prekurzorov jemu štruktúrne blízky. Časť z nich má vitálnu funkciu, kým ostatné predstavujú medziprodukty katabolizmu, či biosyntézy steroidných hormónov a žľových kyselín [11].



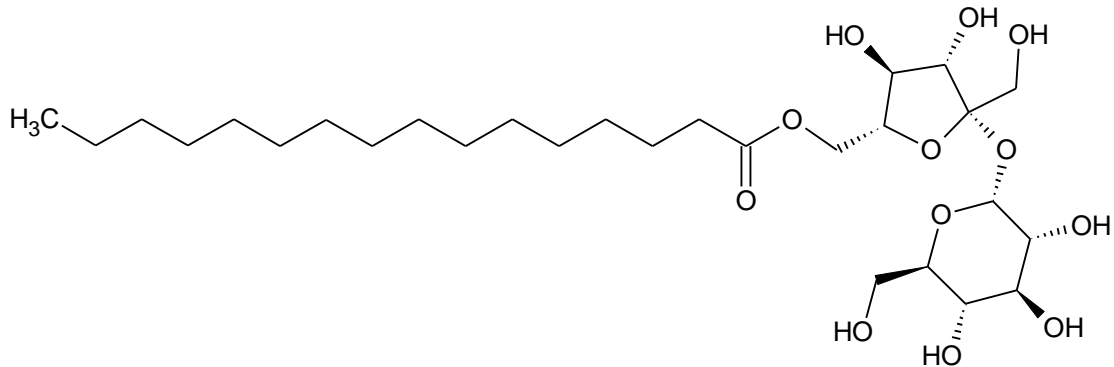
Obrázok 5: Štruktúra cholesterolu

Základom prenolových lipidov je alkohol prenol a do tejto triedy patria polyprenoly, isoprenoidy, chinóny a hydrochinóny. Polyprenoly a ich fosforylované deriváty majú významnú úlohu pri transporte oligosacharidov cez membrány. Väčšina isoprenoidov je rastlinného pôvodu a predstavuje štruktúrne najrozmanitejšiu skupinu metabolitov v tejto ríši. Medzi chinóny a hydrochinóny patrí vitamín E a K, ďalej ubichinóny, spomedzi ktorých je najznámejší koenzým Q10 (Obr. 6). Jeho hlavnou funkciou je prenos elektrónov a protónov v dýchacom reťazci [12; 13].



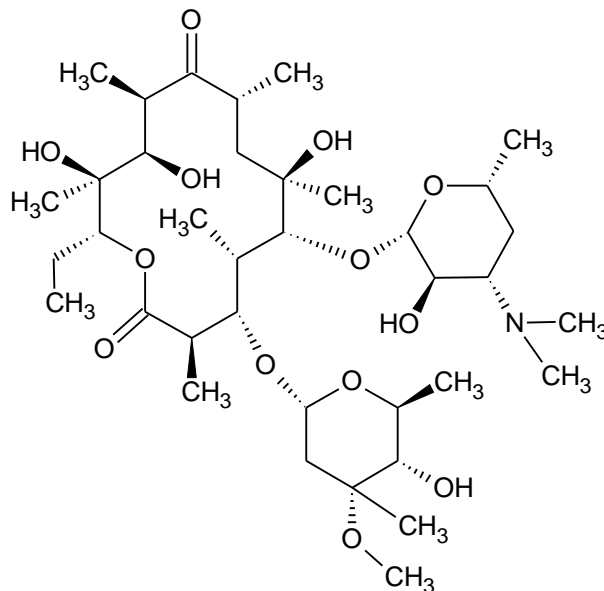
Obrázok 6: Štruktúra koenzýmu Q10

V molekulách sacharolipidov je glycerol nahradený cukrom, napríklad glukózou, či sacharózou (Obr. 7) a masné kyseliny sú tak naviazané priamo na sacharid, prípadne môžu byť ďalej fosforylované. Najčastejšie sa vyskytujú v mikroorganizmoch, napríklad ako prekurzory lipidových komponentov v gramnegatívnych baktériách [12].



Obrázok 7: Štruktúra 6'-O-palmitoylsacharózy

Polyketidy a ich deriváty sú využívané vďaka antimikrobiotickým a antiparazitickým vlastnostiam ako účinné zložky liečiv. Významnými sú najmä erytromycín (Obr. 8) a tetracyklíny, ale iné polyketidy môžu byť pre človeka toxické. Kostra polyketidov býva často ďalej modifikovaná glykosiláciou, metyláciou, či oxidáciou [12].



Obrázok 8: Štruktúra erytromycínu

### 1.1.2 Vlastnosti a funkcie lipidov

Štruktúra lipidov je často definovaná ako polárna, hydrofilná „hlava“ spojená s nepolárnym, teda hydrofóbnym „chvostom“. Hydrofilné časti lipidov tak interagujú s vodným prostredím na rozdiel od nepolárnych chvostov, čo vytvára amfipatický (amfifilný) charakter týchto molekúl. Tvoria tak útvary ako micely, či dvojvrstvy. Väčšina lipidov je vďaka svojmu prevažne hydrofóbnemu charakteru obmedzene rozpustná vo vodnom prostredí a teda aj v extracelulárnej tekutine, okrem iného aj v krvnej plazme. Transport je umožnený vo forme spomínaných micel, či po väzbe na proteín albumín, čím vznikajú lipoproteíny [1; 9]. Mimo organizmu sú lipidy dobre rozpustné v organických rozpúšťadlách [8].

V ľudskom tele zastávajú niekoľko funkcií [14]:

- zdroj energie, či už okamžitej, alebo sú uložené do zásoby v podobe tukového tkaniva
- tukové zásoby slúžia tiež ako tepelný izolátor
- mechanická ochrana pred nárazmi a tlakom
- elektrická izolácia nervových vlákien pre rýchlejší prenos vzruchu (sfingomyelíny)
- tvorba membrán (najmä fosfolipidy) oddeľujúcich vodné prostredia na bunecnej úrovni v organizme
- signálne molekuly
- východzie látky pre tvorbu niektorých hormónov, či žlčových kyselín.

### 1.1.3 Lipidy a zdravie človeka

Vzhľadom k početným funkciám lipidov dochádza po prekročení ich fyziologických hodnôt k rôznym zdravotným problémom. Hodnota lipémie (obsahu lipidov v krvnej plazme) závisí na rade faktorov, ako je napr. vek, pohlavie, stravovacie návyky [14]. Zmeny hladiny lipidov v tele môžu mať mnoho príčin. K zníženiu týchto hodnôt najčastejšie dochádza pri poruchách absorpcie, ku ktorej vedie napr. nedostatok žlčových kyselín, či pankreatitída. Tento stav býva sprevádzaný aj nedostatkom vitamínov rozpustných v tukoch (vitamín A, D, E, K). Lipidóza je metabolická porucha spôsobujúca hromadenie najmä cholesterolu, sulfatidov, či gangliosidov v bunkách v dôsledku nedostatku určitých enzýmov [15]. V rámci bežných vyšetrení je z krvnej plazmy, či séra sledovaná okrem iného aj hladina cholesterolu a lipoproteínov, ktoré predstavujú jeho transportnú formu. Celkový cholesterol predstavuje hlavný rizikový faktor pre kardiovaskulárne ochorenia. Jeho hladinu je možné korigovať

medikáciou. Využívané sú statiny, ktoré primárne inhibujú hlavný enzým biosyntézy cholesterolu. Ďalej je bežne sledovaná tiež hladina triacylglycerolov, ktoré majú významný vplyv na rozvoj týchto typov ochorenia, avšak ťažký stupeň hypertriacylglycerolémie zvyšuje riziko rozvoja pankreatídy. Medikácia pozostáva rovnako primárne zo statínov, prípadne ich kombinácie s fenofibrátom [16].

### **1.1.3.1 Lipidy ako biomarkery**

Odhaľovanie nových biomarkerov pre včasnú diagnostiku ochorenia je neustále predmetom klinických a biochemických výskumov. Popri iných metabolitoch, ako sú aminokyseliny, či sacharidy, sú v posledných rokoch sledované aj lipidy, ktorých hladiny v plazme sa významne líšia medzi vzorkami zdravých jedincov a pacientov [17].

Lipidy sú významné pri diagnostike rakoviny, neurodegeneratívnych a kardiovaskulárnych ochorení vzhľadom k ich početným funkciám. V prípade rakoviny postihnuté bunky pozmeňujú bunkový metabolizmus, ktorý zahŕňa okrem iného syntézu, uskladnenie a degradáciu lipidov [18]. Tie slúžia ako zdroj energie potrebnej pre nekontrolovateľné množenie buniek, materiál pre stavbu nových membrán, či tvorbu signálnych molekúl [19]. Štatisticky významné rozdiely v plazmatických koncentráciách onkologických pacientov a zdravých kontrol sú pozorované hlavne u cholesterolu, sfingolipidov a fosfolipidov. Napríklad dysregulovaná CE 16:0 môže byť významným zdrojom kyseliny palmitovej pre rakovinotvorné bunky, nakoľko je využiteľná pre syntézu viacerých lipidov (fosfolipidy, sfingolipidy atď.). Sfingolipidy zohrávajú dôležitú úlohu pri signalizácii, regulujú bunkový rast, smrť, či pohyb. Rakovinotvorné bunky môžu ovplyvňovať reguláciu ich metabolizmu vyúsťujúcu do potlačenia apoptózy. Výhodou použitia lipidov ako biomarkerov je najmä dobrá znalosť ich úlohy v patogenéze a existencia validovaných metód pre ich analýzu [15; 20; 21].

## **1.2 Lipidomika**

Lipidomika je dynamicky sa rozvíjajúci vedný odbor zameraný na štúdium lipidov, ich charakterizáciu a biologický význam. Zaoberá sa analýzou lipidómu, teda kompletného spektra lipidov v tkanive, telovej tekutine, organele, či membráne. Dodržanie podmienok pre spracovanie biologického materiálu je podstatné, pretože pri nesprávnom zaobchádzaní dochádza k degradácii lipidových komplexov, či vzniku oxidovaných a hydrolyzovaných artefaktov [4; 22].

Správna identifikácia lipidov je pomerne náročná vzhľadom k rôznorodosti tejto skupiny – jednotlivé triedy, dĺžky alkylových reťazcov, či stupeň a pozícia ich nenasýtenosti. Je teda nutná dôsledná práca so vzorkou, voľba analytickej techniky a interných štandardov pre kvantitatívnu analýzu [23].

### 1.2.1 Odber a spracovanie biologického materiálu

Nakoľko sa lipidomika zaoberá štúdiom lipidov v živých systémoch, vzorky sú prevažne biologického pôvodu a vo všeobecnosti zahŕňajú najmä krv (plazma, sérum), mozgomiešny mok, moč a tkanivá. Bližšie popísaná bude hlavne izolácia plazmy a spracovanie tkanív vzhľadom k širokému využitiu týchto materiálov. Zvyčajne je odoberaná venózna krv do nádoby s vhodným objemom antikoagulantu, teda látky brániacej zrážaniu krvi [2; 15]. Často je využívaný heparin lítny, citrát trisodný alebo didraselná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej ( $K_2EDTA$ ). Citrát a  $K_2EDTA$  viažu  $Ca^{2+}$  do chelátov (vápnik je kritickým faktorom pre zrážanie krvi), zatiaľ čo heparin sa viaže na antitrombín, čím aktivuje tento inhibítor trombínu a ďalších hemokoagulačných enzýmov [24; 25]. Prípadný transport musí byť dostatočne rýchly a vzorky nesmú byť vystavené vysokej teplote. Následne je krv odstredená na centrifuge, po čom je možné odobrať hornú fázu – plazmu. Je to žltkastá tekutina tvorená vo veľkej miere vodou, ďalej obsahuje anorganické ióny (minerály) a organické zložky, kam patria okrem množstva iných látok aj lipidy. Plazma je ďalej skladovaná alebo spracovávaná podľa extrakčných postupov vedúcich k získaniu lipidového extraktu [3; 15].

V prípade analýzy tkanív je nevyhnutná ich homogenizácia s následnou extrakciou lipidov. Po navážení tkanív sú vzorky zmiešané s internými štandardami a organickými rozpúšťadlami, vložené do ultrazvukového kúpeľa, vortexované a centrifugované. Odobraný supernatant je ďalej spracovaný podľa požiadaviek konkrétnej analýzy [26]. Tkanivá však možno analyzovať aj bez ich homogenizácie, takýto postup je vhodný pre hmotnostne-spektrometrické zobrazovacie techniky. Úvodným krokom prípravy vzoriek je narezanie tkanív/orgánov na tenké pláty a umiestnenie na podložku z vhodného materiálu. Podľa podmienok jednotlivých analýz sú vzorky ďalej obmývané (napr. po skladovaní v parafíne), prípadne je aplikovaná matrica pre desorpciu a ionizáciu laserom za účasti matrice (MALDI) [27].

### 1.2.2 Skladovanie vzorky biologického materiálu

Pre zachovanie nezmenených koncentračných hladín lipidov a ďalších látok v plazme je v rámci skladovania kritická teplota a počet rozmrazovacích cyklov. Ak vzorka nie je okamžite po získaní ďalej spracovaná alebo zmrazená, pokračujúce enzymatické a chemické procesy môžu viesť k falošným výsledkom. Viacero metabolitov nie je stabilných v plazme pri teplote vyššej ako  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , odporúčaná je teda teplota  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ak je to možné aj nižšia. Nádoby pre skladovanie by mali byť uspostobené tak, aby nedochádzalo k odparovaniu, čo by zapríčiňovalo tiež koncentračné zmeny. Rozmrazovacie cykly rovnako ovplyvňujú hladiny určitých lipidových tried a teda je potrebné znížiť ich počet na minimum. Je možné ich eliminovať prípravou viacerých podielov z pôvodnej vzorky plazmy pred jej zamrazením. Ďalej môže dochádzať k oxidácii lipidov obsahujúcich vo svojej molekule mastné kyseliny s viacerými dvojitými väzbami, či oxidovaných lipidov (oxylipíny, oxysteroly). Riešením môže byť prídanie antioxidantu priamo po získaní plazmy, prípadne pred extrakciou alebo skladovanie vzorky pod inertným plynom (napr. argónom), čo môže rovnako limitovať *ex vivo* oxidáciu lipidov [28; 29].

Tkanivá možno tiež skladovať pre neskoršie použitie, čo vyžaduje viacero krokov pred zamrazením. Napríklad vzorka pečene musí byť najskôr zbavená krvi vrátane buniek, lipoproteínových častíc a albumínu a až následne je rezaná na tenké pláty. Tkanivá sú skladované analogicky, teda pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prípadne v kvapalnom dusíku [3].

### 1.2.3 Príprava vzorky pre lipidomickú analýzu

Dôležitým krokom prípravy vzorky je extrakcia. Vo všeobecnosti sa jedná o izoláciu analytov z komplexnej matrice a je významná tiež pre prevedenie analytov zo vzorky na formu kompatibilnú s analytickou metódou zvolenou pre daný postup. V lipidomike je podstatná tiež precipitácia plazmatických proteínov pred analýzou, ktoré by mohli poškodiť časti analytických zariadení (napr. kolónu chromatografu). Kvôli hydrofobicite lipidov sú ďalej s výhodou využívané nepolárne organické rozpúšťadlá, čím je zabezpečené ich rozdelenie [30]. V rámci postupu prípravy extraktu je možné tiež využívať chladenú centrifugáciu s teplotou  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  za účelom eliminácie koncentračných zmien lipidov vo vzorke. V tomto prípade sú chladené aj používané chemikálie [31]. Najčastejšie sú využívané postupy podľa Folcha [32], Bligha a Dyera [33] a Matyasha [34]. Nakoniec je možné rozpúšťadlo úplne odpariť a vzorku rozpustiť v solvente s požadovaným objemom a kompatibilnom s použitou analytickou metódou [30].

Extrakcia podľa Folcha využíva zmes metanolu a chloroformu v pomere objemov 1:2 (v/v) a následný prídavok vody. Vrstva chloroformu s extrahovanými lipidmi sa vďaka svojej vyššej hustote nachádza pod fázou metanolu a vody obohatenou o hydrofilné zložky plazmy a teda je potrebná zvýšená opatrnosť pri jej odbere. Na rozhraní týchto vrstiev sa nachádza biely prstenec precipitovaných proteínov [31; 32; 35].

Postup so zníženou spotrebou chloroformu vzhľadom k jeho toxicite opísali Bligh a Dyer, pričom využili zmes s obráteným pomerom metanolu a chloroformu, teda 2:1 (v/v). Zvyšok je analogický s predošlým postupom [33; 36].

V extrakcii podľa Matyasha je chloroform nahradený metyltercbutyléterom (MTBE), ktorý je k vzorke pridaný po metanole a po centrifugácii je odobraná horná vrstva. Táto fáza obsahujúca lipidy je oproti metanolovej fáze ľahšia, čo umožňuje automatizáciu kolekcie extraktu a celkové spracovanie vzorky plazmy je jednoduchšie [34].

Pri porovnávaní efektivity extrakčných techník je sledovaná najmä extrakčná výťažnosť, ktorá udáva vhodnosť protokolu pre danú lipidovú triedu [37]. Najvyššia výťažnosť bola zistená pri extrakcii podľa Folcha pre nepolárne lipidy a tento postup vyniká tiež vo vysokej presnosti [38]. Metóda podľa Matyasha poskytuje nízku výťažnosť a výsledky vykazujú vyššie variačné koeficienty s porovnaním Folchovej techniky [39].

Popri postupoch pre kvapalinovú extrakciu je možné v lipidomike využiť aj extrakciu tuhú fázou (SPE). V prípravnom kroku je potrebné zo vzorky odstrániť proteíny, nakoľko by tieto makromolekuly mohli blokovať póry v sorbentoch, čím by zamedzili sorpciu lipidov. Pre ich precipitáciu je možné využiť organické rozpúšťadlá, napríklad acetonitril, či metanol. Na rozdiel od bežných kvapalinových extrakcií s rozpúšťadlom nemiesiteľným s vodou, je v tomto kroku nevyhnutná homogenita vzorky. Na analýzu je možné použiť aj precipitovanú vzorku, po filtrácii vyzrážaných proteínov, avšak v tomto prípade je jednoduchosť extrakcie na úkor zvýšených matričných efektov. Princíp samotnej SPE spočíva v zachytení lipidov a ich následnom uvoľnení pomocou zvoleného rozpúšťadla. Sorpcia lipidov je založená na ich hydrofóbných interakciách so sorbentom. Táto technika je využívaná prevažne pre selektívnu extrakciu lipidovej triedy alebo pre jej zakoncentrovanie [40 – 42].

#### **1.2.4 Separačné techniky v lipidomike**

Kľúčovou technikou v lipidomickej analýze je hmotnostná spektrometria, vďaka ktorej sú získavané tiež informácie o štruktúre analytov, čo je zásadné pre správnu identifikáciu a kvantifikáciu. Vzorky sú do hmotnostného spektrometru privádzané po predchádzajúcej

separácii na chromatografickej kolóne, prípadne bez separácie priamou infúziou alebo použitím desorpčných ionizačných techník [3].

Chromatografia poskytuje rozdelenie komplexnej zmesi lipidov na základe ich chemických a fyzikálnych vlastností, vďaka čomu sú rozdielne retenčné časy ďalším užitočným parametrom pri identifikácii. V lipidomike je využívaná kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami (RP-LC), kvapalinová chromatografia s normálnymi fázami (NP-LC), chromatografia hydrofilných interakcií (HILIC) a superkritická fluidná chromatografia (SFC), ktorá bude popísaná detailnejšie vzhľadom k jej využitiu v praktickej časti tejto práce [3].

#### **1.2.4.1 Kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami**

Kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami používa chromatografickú lôžku pozostávajúcu z nepolárnej náplne, teda stacionárnej fázy, najčastejšie C18 a polárnej mobilnej fázy. K separácii dochádza na základe rozdielnej hydrofobicity analytov vzhľadom k prevažne nepolárnemu charakteru lipidov, ktorá závisí na dĺžke reťazcov mastných kyselín, stupni nasýtenosti a polohe dvojitých väzieb. Lipidy sú tak rozdelené na jednotlivé lipidové druhy s vyšším počtom identifikovaných lipidov vrátane separácie izomérov, vďaka čomu je technika menej náchylná k presýteniu detektoru oproti technikám separujúcim podľa lipidových tried. Nevýhodou tejto techniky je potreba použitia viacerých štandardov a s tým spojená komplikovanejšia kvantifikácia [3; 41; 42]. Špeciálnym prístupom je chirálna separácia, ktorá umožňuje aj rozdelenie stereoizomérov niektorých lipidov. Princíp spočíva v použití chirálnych fáz chromatografie, často polysacharidov [43].

#### **1.2.4.2 Kvapalinová chromatografia s normálnymi fázami**

Historicky staršia a v dnešnej dobe už výnimočne používaná technika, ktorá využíva polárnu stacionárnu fázu s nepolárnou mobilnou, čím dochádza k separácii lipidov na základe ich polárnych častí a tak sú delené podľa jednotlivých lipidových tried. Nevýhodou tejto techniky je separácia len nepolárnych lipidov a negatívny vplyv na ionizáciu pri použití spojenia s hmotnostnou spektrometriou spôsobujúci nízku citlivosť a nižšiu reprodukovateľnosť z dôvodu komplikovanej prípravy mobilnej fázy [43]. Pre detailnú analýzu je možné spojenie týchto chromatografií (NP a RP) v dvojdimenzionálnej separácii – v prvom kroku sú lipidy rozdelené do tried a následne na jednotlivé druhy [44].

### 1.2.4.3 Chromatografia hydrofilných interakcií

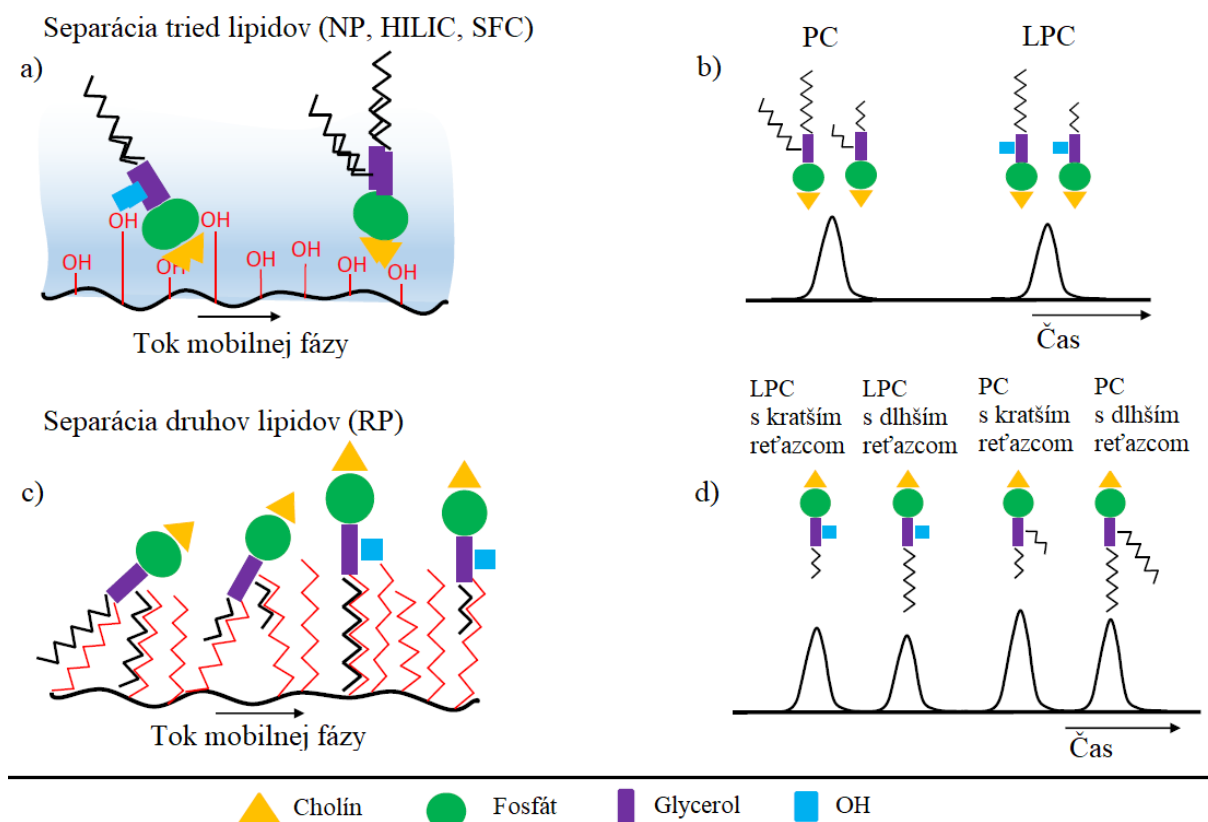
Chromatografia hydrofilným interakcií je založená na rozdielnej distribúcii analytov medzi vodnú mobilnú fázu s vysokým obsahom organickej zložky a polárnu stacionárnu fázu, ktorej základom býva silikagel, prípadne polárne viazané fázy. Vzhľadom k vyššej hydrofilite stacionárnej fázy dochádza k viazaniu vody z fázy mobilnej, ktorá sa stáva jej súčasťou. Retencia tak závisí na polárnych častiach molekúl lipidov, nepolárne majú len malý vplyv. Dochádza teda k separácii podľa lipidových tried, pričom nepolárne lipidy nie sú zadržované vôbec a eluujú v mŕtvom objeme. V prípade separácie kyslých lipidov (napr. fosforylovaných) zvyčajne dochádza k chvostovaniu píkov vzhľadom k ich nešpecifickým interakciám s chromatografickou lôžou, problémový môže byť tiež ich výskyt v rôznych ionizovaných formách [45]. Tento jav môže byť potlačený použitím kolón s technológiou hybridných povrchov navrhnutou pre bioanalytické separácie [46].

### 1.2.4.4 Superkritická fluidná chromatografia

Superkritická fluidná chromatografia je technika inštrumentálne blízka kvapalinovej chromatografii. Hlavným rozdielom je použitie oxidu uhličitého, ktorý slúži v nadkritickom stave ako mobilná fáza. Na základe voľby polarít stacionárnej fázy a použitia modifikátoru inak nepolárneho oxidu uhličitého možno SFC uplatniť v dvoch módoch: separácia podľa lipidových tried a druhov. Delenie lipidov do tried prebieha na základe interakcií ich polárnych hláv s polárnou stacionárnou fázou podobne ako pri technike HILIC, avšak v tomto prípade je možné separovať polárne lipidy spolu s nepolárnymi. Ďalšou výhodou je kratšia doba analýzy s vyšším rozlíšením vďaka väčšiemu prietoku mobilnej fázy z dôvodu nižšieho spätného tlaku [50 – 52].

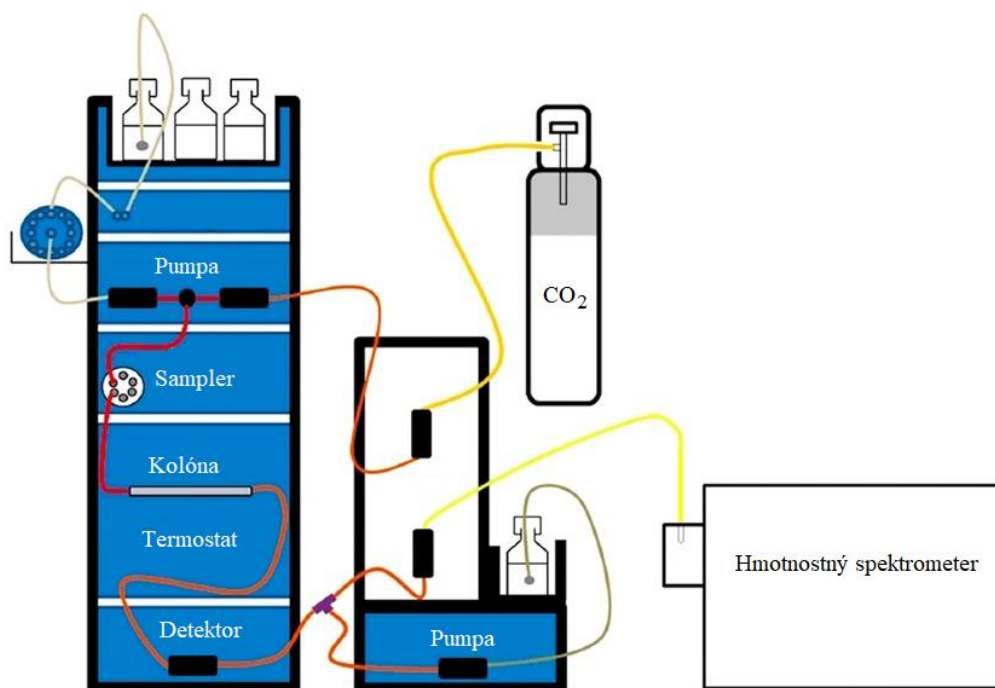
Princípy jednotlivých separačných techník sú znázornené na Obrázku 9:

- a) Schematické znázornenie separácie podľa lipidových tried (NP-LC, HILIC, SFC)
- b) Parciálna separácia lipidov v závislosti na dĺžke acylového reťazca (NP-LC, HILIC a SFC)
- c) Schematické znázornenie separácie podľa lipidových druhov (RP-LC)
- d) Vplyv dĺžky acylového reťazca na retenčný čas (RP-LC)



Obrázok 9: Princíp chromatografickej separácie lipidov [40]

Srdcom SFC zostavy je binárna pumpa určená pre čerpanie mobilnej fázy ( $\text{CO}_2$ ) a modifikátoru (zmes organických rozpúšťadiel a aditív). Vzorka je dávkovaná pomocou automatického dávkovača, ktorá je následne unášaná mobilnou fázou na kolónu, kde dochádza k separácii. Kolóna je vyhrievaná pomocou termostatu kvôli zníženiu tlaku a zvýšeniu účinnosti separácie. Za kolónou môže byť zaradený detektor, pričom SFC je vo všeobecnosti kompatibilná s radou detektorov – spektrofotometrický, odparovací detektor rozptylu svetla a aerosólový detektor nabitých častíc [47]. V lipidomike je využívaný výhradne hmotnostne-spektrometrický detektor, ktorému bude venovaná väčšia pozornosť v ďalšej podkapitole [3]. Pri spojení SFC a MS je nutné zaradiť pumpu pre prídavnú kvapalinu (tzv. make-up). Jedná sa o kvapalinu s nízkym prietokom a zvyčajne podobným zložením ako modifikátor, ktorá zvyšuje účinnosť ionizácie. Schéma tejto zostavy je na Obrázku 10 [48].



Obrázok 10: Schéma zostavy SFC a hmotnostného spektrometru [49]

#### 1.2.4.4.1 Mobilné fázy

Mobilnou fázou v tomto type chromatografie je kvapalina v nadkritickom stave, teda pri teplote a tlaku nad ich kritickou hodnotou. Hustota látky v takomto stave je blízka kvapaline, viskozita zase plynu a difuzivita na pomedzí týchto skupenstiev. Vďaka týmto vlastnostiam je technika SFC radená na pomedzí kvapalinovej chromatografie a plynovej chromatografie (GC). Najčastejšie používanou mobilnou fázou býva oxid uhličitý vďaka nízkym kritickým hodnotám (7,3 MPa, 31 °C) a vlastnostiam – je nehorľavý, netoxický, chemicky inertný a miešateľný s väčšinou organických roztokov. Tie môžu byť pridané za účelom optimalizácie separácie kvôli nízkej polarite CO<sub>2</sub> a často využívaný je napríklad metanol, etanol a acetonitril s prídavkom aditív. Tieto modifikátory zvyšujú selektivitu skrze dipól-dipólové interakcie a umožňujú separáciu aj polárnych látok. Pridaním modifikátoru zvyčajne rastie hodnota kritického tlaku a teploty (napr. po pridaní 5 % metanolu stúpnu na 10,5 MPa a 51 °C), preto sa v priebehu analýzy možno presunúť zo superkritickej do subkritickej oblasti [50; 51].

#### 1.2.4.4.2 Kolóny

Kolóny pre SFC sú obdobné ako pre LC, vo všeobecnosti ich plnenie závisí na potrebách analýzy. Môžu obsahovať polárnu stacionárnu fázu, v náplňových kolónach je využívaný najmä silikagel s chemicky viazaným 2-etylpyridínom, ktorý redukuje kontakt

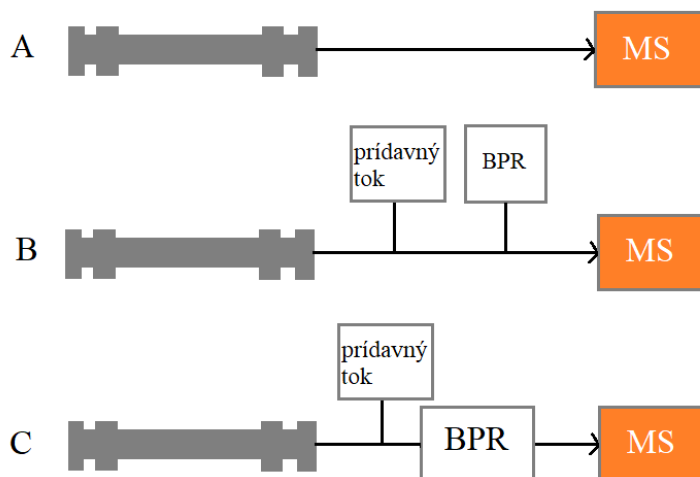
analytov so silanolovými skupinami ich stérickým tienením. Ďalej môžu byť na silikagel viazané dioly, aminopropyl, či aromatické polyméry, napríklad polystyrén-divinylbenzén. Pridaním modifikátoru dochádza k zvýšeniu polarita mobilnej fázy, čo prináša možnosť využitia aj menej polárnych stacionárnych fáz. Medzi nepolárne stacionárne fázy patrí bežne používaný oktadecylsilikagel a fenypropylsilikagel [52]. Pre SFC je možné použiť tiež kolóny s povrchovo poréznymi časticami, ktorých výhodou je postačujúci nižší tlak pre dosiahnutie porovnateľných výsledkov ako pri separácii na plne porézných časticách s menším priemerom [51; 53; 54].

#### 1.2.4.4.3 Spojenie SFC a MS

V lipidomike je často využívané spojenie separačných techník a hmotnostnej spektrometrie, ktorých kombinácia poskytuje záznam bohatý na informácie o vzorke. Popri retenčných časoch plynúcich z chromatografickej separácie prináša táto technika informácie o molekulovej hmotnosti, čo umožňuje identifikáciu jednotlivých lipidov a ich následnú kvantifikáciu. Konštrukčne je spektrometer zaradený za spätným regulátorom tlaku kvôli reprodukovateľnosti separácie [55].

Pre spojenie SFC a hmotnostného spektrometru je nutné použiť správny interface, schematické znázornenie je na Obrázku 11. Prvá konštrukcia vychádzala z priameho spojenia (A), nasledovalo začlenenie restriktoru, ale v súčasnosti je využívaný interface s prídavným tokom a rozdeľovačom pred regulátorom tlaku (back pressure regulator, BPR) (B), prípadne bez rozdeľovača (C). Spojenie je sprostredkované v závislosti na výrobcovi, pričom konfiguráciu s rozdeľovačom toku využíva firma Waters, systém bez rozdeľovaču firma Agilent [55].

Pri zostave s deličom je časť eluentu vedená do hmotnostného spektrometru a prebytočný tok odvádzaný regulátorom tlaku. Chromatografická účinnosť separácie zostáva zachovaná. V prípade posledného uvedeného usporiadania je eluent rovnako miešaný s prídavným tokom, ale do detektoru je privádzaný celý objem bez jeho rozdeľovania. Prídavný tok môže pozostávať z organických rozpúšťadiel dôležitých pre zlepšenie ionizácie bez ovplyvnenia chromatografickej separácie [55; 56].



Obrázok 11: Schematické spojenie SFC a MS detekcie

## 1.2.5 Hmotnostná spektrometria

Samotný hmotnostný spektrometer pozostáva z troch hlavných častí: iónový zdroj, hmotnostný analyzátor a detektor [57].

### 1.2.5.1 Ionizačné techniky

V lipidomickej analýze sú využívané ionizačné techniky za atmosférického tlaku, teda ionizácia elektrosprejom (ESI), chemická ionizácia (APCI) a fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI), ionizácia laserom za účasti matrice (MALDI), desorpčná ionizácia elektrosprejom (DESI) a priama analýza v reálnom čase (DART). Ionizácia elektrosprejom je vhodná pre látky stredne polárne až iónové a umožňuje ionizáciu aj väčších a neprchavých substancií. Roztok vzorky je pumpovaný pri nízkom prietoku (0,1 – 1 ml/min) kapilárrou, na ktorú je vkladané napätie (1,5 – 5 kV), vďaka čomu je na vznikajúce kvapôčky prenášaný náboj. Napätie môže nadobúdať kladné aj záporné hodnoty. Vyparovaním rozpúšťadla sa zvyšuje ich hustota a po dosiahnutí Rayleighovho limitu dochádza ku Coulombickej explózii, teda pôvodné kvapôčky prechádzajú na viacero menších s distribuovanými nábojmi. Tento proces sa opakuje až do vzniku iónov [58; 59]. Chemická ionizácia za atmosférického tlaku je vhodná pre látky menej polárne, jej princíp je založený na ionizácii pomocou koronového výboja. Eluát je na výstupe z chromatografického systému rozprášený a vo vyhrievanej zóne rýchlo odparený. Koronový výboj z ihly, na ktorú je vkladané vysoké napätie (3 – 4 kV), ionizuje najskôr molekuly mobilnej fázy a následne analytu. Fotoionizácia za atmosférického tlaku je analogickou technikou, v ktorej je výbojová ihla nahradená zdrojom UV žiarenia [3]. Pri ionizácii laserom za účasti matrice je vzorka zmiešaná s matricou, teda malou organickou

molekulou (napr. 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, 1,5-diaminonaftalén) a nanosená na MALDI terčík. Na túto zmes je aplikovaný krátky laserový pulz, ktorý desorbuje analyty a matricu. Vo vzniknutom oblaku matrica predáva absorbovanú energiu analytom, čím ich ionizuje. Tieto ióny sú akcelerované do hmotnostného analyzátoru [60]. Desorpčná ionizácia elektrosprejom vyžaduje minimálnu prípravu vzorky a jej výhodou je tiež nedeštruktívny charakter, vďaka čomu môže byť dané tkanivo ďalej analyzované aj histologicky. Ionizácia spočíva v pôsobení prúdu elektricky nabitých kvapiek organického roztoku na analyzovaný povrch, z ktorého sú extrahované komponenty ďalej vedené do analyzátoru [61]. Podobnou je technika priamej analýzy v reálnom čase, ktorá využíva pre ionizáciu vzorky v ľubovoľnom skupenstve metastabilné častice vznikajúce pôsobením výboju na molekuly reakčného plynu a ich následnou interakciou so vzorkou [62].

### 1.2.5.2 Analyzátory

Vzniknuté ióny sú optikou vedené do analyzátoru. Ich transport a zaostrenie je zabezpečené elektrickými elementmi s vloženým vhodným napätím, často sú využívané iónové lieviky. Na prstencové elektródy, ktorých vnútorný priemer sa v priebehu dĺžky postupne znižuje, je vložené jednosmerné napätie s gradientom za účelom poháňania iónov v danom smere, pulzmi striedavého napätia sú sústredované pozdĺž osi optiky [63; 64]. Hlavnou úlohou analyzátoru je separácia iónov na základe pomeru ich hmoty a náboja ( $m/z$ ). V lipidomike je často využívaný trojitý kvadrupól (QqQ), analyzátor doby letu (TOF), iónová cyklotrónová rezonancia (ICR) a orbitálna pasca (tzv. Orbitrap) [61; 65].

Základom analyzátoru doby letu je meranie času, za ktorý ióny preletia určitú vzdialenosť v letovej trubici, ktorá predstavuje oblasť bez poľa. Na jej začiatku sú ióny urýchlené krátkym pulzom, teda všetky majú približne rovnakú hodnotu potenciálnej energie, ktorá sa mení na kinetickú. Z rovníc popisujúcich tento vzťah (1, 2) teda vyplýva, že ióny s menším pomerom  $m/z$  nadobudnú vyššiu rýchlosť a tak dopadnú na detektor na konci analyzátoru za kratší čas [66].

$$E_k = e \cdot z \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (1)$$

$$t = \frac{L}{\sqrt{2 \cdot e \cdot U}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (2)$$

$E_k$  ... kinetická energia

$e$  ... elementárny náboj

$t$  ... čas

$m$  ... hmotnosť iónu

$z$  ... náboj iónu

$L$  ... letová dĺžka trubice

$v$  ... rýchlosť letu iónov

$U$  ... napätie

TOF analyzátor patrí do skupiny s vysokou rozlišovacou schopnosťou a určenie správnej hmoty je menšie ako 5 ppm. Tiež sa vyznačuje veľkým hmotnostným rozsahom rýchlou skenovacou rýchlosťou, preto je ideálny pre spojenie so separačnými technikami. Za účelom predĺženia dráhy letu a teda aj získania lepšieho rozlíšenia sa často využíva tzv. reflektón, teda iónové zrkadlo pozostávajúce zo série prstencových elektród s vysokým napätím. Ióny s rozdielnou kinetickou energiou prechádzajú rozdielne hlboko do reflektónu, pričom rýchlejšie ióny sa ponárajú viac, teda strávia v ňom viac času, vďaka čomu je predĺžená dráha letu a ióny sú zároveň zafokusované. V praxi je však viac využívaný hybridný analyzátor QTOF, kde je predradený kvadrupól umožňujúci MS/MS experimenty [67].

Medzi analyzátory s ultravysokou rozlišovacou schopnosťou využívajúce Fourierovu transformáciu patrí iónová cyklotrónová rezonancia (ICR-FT) a Orbitrap. V ICR pôsobí na ióny silné magnetické pole (až do 21 Tesla, najčastejšie 7 Tesla) a elektrický potenciál, čo vedie k cirkulárnemu pohybu iónov v tomto analyzátore zloženom z detekčných a excitačných elektród. Excitáciou iónov širokopásmovým rádiovým pulzom sa zvyšuje polomer dráhy iónov, čím sú približované k detekčným elektródam. V poli s konštantnou hodnotou magnetickej indukcie je cyklotrónová frekvencia závislá len na obrátenom pomere  $m/z$ . Výsledný záznam je superpozíciou frekvencií všetkých iónov, čo je upravené Fourierovou transformáciou [68]. Orbitrap pozostáva z troch elektród, z dvoch vonkajších a jednej stredovej. Vložené napätie vytvára elektrické pole, pôsobením ktorého ióny rotujú okolo a pozdĺž centrálnej elektródy s tvarom vretena. Frekvencia oscilácie iónov je nepriamo úmerná odmocnine pomeru  $m/z$ . Hmotnostné spektrum je opäť získané až po transformácii dát. Výhoda hmotnostných spektrometrov s ultravysokým rozlíšením spočíva hlavne v štruktúrnej analýze, avšak spojenie so separačnými technikami nie je príliš vhodné kvôli nízkej skenovacej rýchlosti [69].

Trojité kvadrupól (QqQ) pozostáva z troch kvadrupólov, radených za seba, pričom každý je zložený zo štyroch valcových elektród uložených rovnobežne okolo strednej osi. Na prvý a posledný kvadrupól je vkladané jednosmerné napätie (na protihľad kladné, zvyšné dve záporné) a vysokofrekvenčné striedavé napätie. Elektrické pole slúži na selektívnu stabilizáciu oscilácie iónov s určitým pomerom  $m/z$ , ktoré prechádzajú analyzátorom ďalej smerom k detektoru. Výber iónov je tak závislý na napätí aplikovanom na elektródy, pričom sa postupne mení, čím dochádza k selektívnemu prepúšťaniu iónov. Prostredný kvadrupól slúži ako kolízna cela pre fragmentáciu iónov vybraných prvým kvadrupólom, v poslednom

sú tieto fragmenty analyzované. Toto usporiadanie je základom pre tandemovú hmotnostnú spektrometriu prinášajúcu benefity najmä v cieľenej kvantitatívnej analýze [70].

### 1.2.5.3 Detektory

Po separácii v analyzátoch prechádzajú ióny do detektoru, ktorého hlavnou úlohou je ich záznam v podobe prevodu na merateľný signál. Ich princípy sú založené na tvorbe sekundárnych iónov alebo indukcii prúdu. Bežne využívaný je elektrónový násobič, Faradayov pohár, či scintilačný fotonásobič. Elektrónový násobič predstavuje sériu dynód, ktoré zosilňujú prúd iónov do podoby merateľného prúdu elektrónov. Ióny vstupujúce do tohto detektoru sú zachytené na prvej konverznej dynóde, z ktorej sú následne uvoľnené elektróny. Tie sú zachytené nasledujúcou dynódou, ktorá uvoľní ďalšie elektróny. Tento proces sa v sérii dynód ďalej opakuje, pričom sa množstvo elektrónov neustále zvyšuje, čo zabezpečuje vysokú citlivosť tohto detektoru. Na poslednej elektróde je náboj meraný ako napäťový impulz. Ďalším typom je tzv. Faradayov pohár, ktorý predstavuje relatívne jednoduché a lacné zariadenie. Ióny narážajúce na dutú elektródu, pripomínajúcu svojím tvarom pohár, spôsobujú tok elektrónov. Vznikajúci prúd je následne zosilnený a zaznamenaný [71]. Scintilačný fotonásobičový detektor prevádza ióny analytu na merateľný signál prostredníctvom svetelného žiarenia. Po dopade iónov na scintilačnú vrstvu dochádza k vzniku fotónov, ktoré sú ďalej spracované systémom dynód do podoby elektrického prúdu [72].

### 1.2.5.4 Hmotnostne-spektrometrické zobrazovanie

Hmotnostne-spektrometrické zobrazovanie (MSI) slúži na analýzu tkanív, primárne narezaných na tenké pláty. Prostredníctvom ionizačných techník ako je MALDI, či DESI, sú ionizované komponenty na povrchu vzorky a privádzané do analyzátoru, najčastejšie TOF. Pre zvýšenie hmotnostného rozlíšenia a presnosti je v tomto prípade využívaná oneskorená extrakcia. Po ionizácii je aplikovaný extrakčný potenciál až po uplynutí určitého času so zámerom zjednotiť ióny s rovnakým pomerom  $m/z$  v jednej rovine pred ich urýchlením do letovej trubice [60; 73]. Možno analyzovať popri lipidoch tiež aminokyseliny, nukleotidy, peptidy, či liečivá. Okrem prítomnosti jednotlivých látok vo vzorke poskytuje táto technika informácie aj o ich distribúcii v rámci analyzovaného rozsahu tkaniva. Takýto obrazec je vytvorený z veľkého množstva dát získaných z každého analyzovaného bodu. V klinickej praxi predstavuje táto technika veľký potenciál pri operáciách karcinómov [74]. Porovnanie s konvenčnými histologickými obrazcami môže poukázať na rozdielne molekulové zloženie,

ktoré by signalizovalo prítomnosť rakovinových buniek, tumorov. Významnú úlohu v tomto zohrávajú práve lipidy ako tumormarkery, keďže je ich abnormálny metabolizmus charakteristický pre nádorové bunky. Hmotnostná spektrometria umožňuje stanoviť elementárne zloženie a následnú štruktúru analytov s vysokou presnosťou, čo vedie k ohraničeniu patologických častí v zdravom tkanive [20].

#### **1.2.5.5 Priama infúzia**

Ďalším prístupom využitia hmotnostnej spektrometrie v lipidomike je priama infúzia (DI), známa tiež pod názvom shotgun MS. Výhodou je predovšetkým kratší čas potrebný na analýzu a dostačujúce použitie jedného interného štandardu pre každú triedu lipidov, nakoľko dochádza k ionizácii analytu a štandardu v rovnaký čas. Technika spočíva v priamom zavedení vzorky do hmotnostného spektrometru prostredníctvom pumpy, prípadne na báze čipu. Najbežnejšie je použitie trojitého kvadrupólu pre tandemovú hmotnostnú spektrometriu využívajúcu sken prekursorových iónov, neutrálnych strát a sken jednej alebo viacerých iónových reakcií. Nevýhodou sú izobarické interferencie vzhľadom k dávkovaniu celej zmesi naraz. Riešením pri analýze komplexnejších vzoriek môže byť použitie analyzátorov s vysokým rozlíšením a presnosťou, teda iónovej cyklotrónovej rezonancie s Fourierovou transformáciou alebo Orbitrapu [75 – 77].

#### **1.2.6 Identifikácia a kvantifikácia lipidov**

Ako bolo zmienené skôr, v lipidomickej analýze sú rozlišované dva prístupy s využitím separačných techník: separácia podľa lipidových tried a druhov. Pri separácii podľa lipidových tried je identifikácia aj kvantifikácia jednoduchšia, nakoľko všetky lipidy z danej triedy eluujú v jednom píku. Avšak dochádza k čiastočnej separácii v rámci jedného píku v závislosti na dĺžke acylového reťazca a počte dvojitých väzieb. Tento prístup je najčastejšie spojený s vysokorozlišujúcou MS a identifikácia je založená na presnosti určenia  $m/z$ . Po chromatografickej separácii nadkritickou kvapalinou sú najmenej zadržované cholesterolestery, glycerolipidy, fosfolipidy a ako posledné eluujú sfingomyelíny a lysofosfatidylcholíny. Pri delení podľa lipidových druhov je retencia závislá na polarite analytov, ktorá je v rámci triedy vyjadrená pomerom počtu uhlíkov a dvojitých väzieb, tzv. ekvivalentné uhlíkové číslo. Jednotlivé lipidy eluujú v širokých časových intervaloch, pričom sa jednotlivé triedy navzájom prekrývajú, čo komplikuje ich identifikáciu. Identifikácia analytov je založená na porovnávaní zaznamenaných hodnôt  $m/z$  a tabuľkových a sledovaní charakteristických fragmentových iónov. Tandemová hmotnostná spektrometria je významná

najmä pri izotopických prekryvoch, teda keď sumárne vzorce dvoch molekúl sú identické, avšak ich štruktúra je rozdielna (napr. PC 33:1 a PE 36:1,  $C_{41}H_{80}NO_8P$ ). Cennou pomôckou pre identifikáciu s vysokou presnosťou je aj využitie retenčných závislostí (závislosť retenčného času na dĺžke acylového reťazca, prípadne počte dvojitých väzieb), pričom lipidy tvoria logické rady [3; 78].

Pre presnú kvantifikáciu je zásadná súčasná ionizácia analytov a interných štandardov jednotlivých tried, respektíve podtried. Pri chromatografickej separácii lipidov do tried je táto podmienka splnená vďaka štruktúrnej podobnosti analytov a interných štandardov, čím je zabezpečená ich relatívne spoločná ionizácia. Koncentrácia analytu je potom vypočítaná z pomeru intenzity analytu a interného štandardu, ktorý je vynásobený známou koncentráciou IS. V tomto prístupe je nutné tiež zohľadnenie izotopických prekryvov, pri ktorých by mohlo dochádzať k falošne vyšším koncentráciám. Tento efekt možno korigovať na základe vypočítaného izotopického vzoru (izotopická korekcia II. typu). V prípade separácie lipidov na jednotlivé druhy je potrebné použitie väčšieho množstva štandardov, najlepšie aby došlo k pokrytiu celého retenčného okna, čo je výrazne finančne náročnejšie. Menší počet IS môže byť čiastočne kompenzovaný aplikáciou odozvočných faktorov. Nevýhodou je tiež komplikované vyhodnocovanie výsledkov, ktoré nemožno ľahko automatizovať na rozdiel od predchádzajúceho prístupu [3; 78].

### **1.2.6.1 Voľba a použitie interných štandardov**

Pre správnu kvantifikáciu je kľúčová voľba vhodných interných štandardov a ich pridanie k vzorke pred jej spracovaním. Pre správnu kvantifikáciu je nutné použiť aspoň jeden interný štandard pre každú triedu a vopred zistiť, či daný lipid nie je prirodzene zastúpený vo vzorke. V lipidomike sú často využívané deuterované interné štandardy, ktorých výhodou je podobnosť s analyzovanými lipidmi, čo zabezpečuje rovnaké správanie v priebehu analýzy. Vďaka nahradeniu vhodného počtu vodíkov deutériom zároveň nedochádza k interferencii s lipidmi prirodzene sa vyskytujúcimi v biologických materiáloch. Častou voľbou sú komplexné zmesi interných štandardov od spoločnosti Avanti [79], či Sciex [80], ktoré obsahujú viac IS pre danú lipidovú triedu. Nevýhodou však je vysoká cena týchto štandardov, navyše pre niektoré triedy zatiaľ ani nie sú dostupné. Ďalšou možnosťou je použitie lipidov štruktúrne podobných s analyzovanými, s kratšími (PC 28:0), či dlhšími reťazcami (PC 44:2), než majú sledované látky, prípadne s nepárnym počtom uhlíkov v reťazci (MG 19:1) za predpokladu, že sa prirodzene nevyskytujú vo vzorke [23; 81]. Výhodou je použitie viacerých štandardov v rámci jednej triedy, čo umožňuje výpočet chyby stanovenia [3].

## 2 PRAKTICKÁ ČASŤ

### 2.1 Zoznam použitých chemikálií a štandardov

- 2-propanol (IPA) - LC-MS čistota,  $\geq 99,9$  %, Honeywell (Seelze, Nemecko)
- Deionizovaná voda – Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, Francúzsko)
- Hexán (Hex) – LC-MS čistota, Fluka (Buchs, Švajčiarsko)
- Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) – LC-MS čistota, Merck (Darmstadt, Nemecko)
- Methanol (MeOH) – LC-MS čistota,  $\geq 99,9$  %, Honeywell (Seelze, Nemecko)
- Octan amónny –  $\geq 99,9$  %, Honeywell (Seelze, Nemecko)
- Oxid uhličitý – 99,995 %, Messer Group GmbH (Bad Soden, Nemecko)
- Uhličitan amónny –  $\geq 99,999$  %, Honeywell (Seelze, Nemecko)
- Interné štandardy (viď Tabuľka 1) – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Nuclechek Prep (Elysian, MN, USA)

### 2.2 Prístroje a zariadenia

- Analytická váha ABT 120-5DM – Kern & Sohn GmbH (Balingen, Nemecko)
- Dávkovač Multipipette M4 – Eppendorf (Hamburg, Nemecko)
- Hmotnostný spektrometer Synapt G2-Si QTOF – Waters (Milford, MA, USA)
- Koncentrátor vzorky NDK200-2N – MIULAB (Hangzhou, Zhejiang, Čína)
- Laminárny box MSC-Advantage II. triedy – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Mechanické pipety s nastaviteľným objemom – Sartorius (Goettingen, Nemecko)
- Minitrepačka IKA KS 130 (Staufen, Nemecko)
- Odstredivka Hettich EBA 20 – Hettich (Tuttlingen, Nemecko)
- Pasteurove pipety sklené – Thermo Fisher Scientific (Bremen, Nemecko)
- Ultravysokoúčinný superkritický fluidný chromatograf Acquity UPC<sup>2</sup> – Waters (Milford, MA, USA)
- Ultrazvukový kúpeľ FB Fisherbrand 15061H – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

## 2.3 Príprava zmesi interných štandardov

Zásobné roztoky interných štandardov boli pripravené v požadovaných koncentráciách podľa Tabuľky 1 ich navážením a rozpustením v príslušnom objeme zmesi chloroform/metanol (1:1, v/v). Následne boli pipetované vypočítané objemy pre vytvorenie zmesi interných štandardov (IS MIX) a pre doplnenie objemu bolo použité rovnaké rozpúšťadlo, teda zmes chloroformu a metanolu (1:1, v/v). Tá bola pridávaná k vzorkám za účelom kvantifikácie lipidov, prípadne boli pripravené vzorky samotných štandardov podľa požiadaviek jednotlivých pokusov.

Tabuľka 1: Koncentrácie štandardov v zásobných roztokoch a v IS MIX

Štandard	Koncentrácia zásobného roztoku [µg/µl]	Pipetovaný objem [µl]	Koncentrácia v IS MIX [µg/ml]	Koncentrácia v plazme [µg/ml]	Koncentrácia v plazme [nmol/ml]
CE 16:0 d7	6	237.0	284	228	360
CE 19:0	6	250.0	300	240	360
Cer 30:1	2	3.0	1	1	2
Cer 35:1	2	4.0	2	1	2
Cer 36:1 d7	1	8.0	2	1	2
DG 28:0	2	9.0	4	3	6
DG 36:2 d5	1	22.5	5	4	6
DG 33:1 d7	1	21.0	4	3	6
LPC 17:0	2	55.0	22	18	35
MG 19:1	4	6.5	5	4	11
MG 18:1 d7	1	26.0	5	4	11
PC 33:1 d7	1	352.0	70	56	75
PC 28:0	4	79.0	63	51	75
PC 44:2	2	210.0	84	67	75
SM 30:1	2	70.0	28	22	35
SM 36:2 d9	1	160.0	32	26	35
TG 48:1 d7	1	290.0	58	46	57
TG 57:3	6	55.0	66	53	57
Rozpúšťadlo	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1:1 (v/v)	3142			
Celkový objem		5000			

### **2.3.1 Príprava podielov IS MIX**

Vzhľadom k zameraniu experimentu na vplyv skladovacích podmienok boli zo zmesi štandardov pripravené jednotlivé podiely, ktoré boli skladované pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

- 0. podiel: 500  $\mu\text{l}$  IS MIX pre kontrolu kvality (QC)
- 1. podiel: 500  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie krátkodobej stability štandardov
- 2. podiel: 500  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie stability štandardov v priebehu rozmrazovacích cyklov
- 3. podiel: 5x100  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie dlhodobej stability štandardov
- 4. podiel: 500  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie krátkodobej stability plazmy
- 5. podiel: 5x100  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie stability plazmy v priebehu rozmrazovacích cyklov
- 6. podiel: 1 500  $\mu\text{l}$  IS MIX pre sledovanie stability extraktu plazmy

### **2.4 Príprava podielov plazmy**

Vzorky plazmy boli získané od dobrovoľníkov vo Fakultnej nemocnici Olomouc, Transfúzne oddelenie. Štúdia bola schválená etickou komisiou a všetky subjekty podpísali informovaný súhlas. Základné informácie o subjektoch sú zhrnuté v Tabuľke 2, ďalej uviedli, že nedodržiavajú nijaké diétne opatrenia a nefajčia. Z týchto vzoriek bola pripravená zmesná vzorka plazmy pipetovaním 200  $\mu\text{l}$  z každej, dohromady 4 000  $\mu\text{l}$ . Následne boli pripravené tieto podiely a boli skladované pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

- 0. podiel: 500  $\mu\text{l}$  pre kontrolu kvality (QC)
- 1. podiel: 500  $\mu\text{l}$  pre sledovanie krátkodobej stability
- 2. podiel: 500  $\mu\text{l}$  pre sledovanie stability plazmy v priebehu rozmrazovacích cyklov
- 3. podiel: 2 000  $\mu\text{l}$  pre sledovanie stability extraktu plazmy

Tabuľka 2: Zoznam vzoriek plazmy použitých pre prípravu zmesnej vzorky

Číslo subjektu	Vek (v dobe odberu)	Výška (cm)	Hmotnosť (kg)	BMI	Pohlavie
1	53	182	82	24.76	Muž
2	63	186	81	23.41	Muž
3	53	175	85	27.76	Muž
4	62	168	78	27.64	Žena
5	49	163	68	25.59	Žena
6	57	163	67	25.22	Žena
7	50	187	89	25.45	Muž
8	51	168	76	26.93	Žena
9	50	189	86	24.08	Muž
10	50	170	74	25.61	Muž
11	52	156	52	21.37	Žena
12	51	168	58	20.55	Žena
13	50	170	73	25.26	Muž
14	61	180	82	25.31	Muž
15	50	164	63	23.42	Žena
16	50	168	67	23.74	Žena
17	50	178	80	25.25	Muž
18	55	163	70	26.35	Žena
19	51	169	72	25.21	Muž
20	57	170	75	25.95	Žena

## 2.5 Príprava vzoriek

### 2.5.1 Príprava kontroly kvality

Za účelom kontroly kvality v priebehu dlhodobého merania bola pripravená zmes extraktov zmesnej vzorky plazmy. Bolo prevedených celkom 17 extrakcií zmesnej plazmy podľa Folcha. Po odparení a rozpustení v zmesi chloroform/metanol (1:1, v/v) boli jednotlivé podiely spojené za účelom vytvorenia zásobného roztoku QC, ktorý bol začlenený do merania pre všetky nasledujúce analýzy a využitý pre normalizáciu dát.

### 2.5.2 Príprava vzorky IS MIX

Pre sledovanie stability interných štandardov boli pripravené ich vzorky samovoľným rozmrazením príslušného podielu IS MIX pri laboratórnej teplote. 20 µl IS MIX bolo pipetovaných do 1,5ml vialiek a zriedených 480 µl zmesi chloroform/metanol (1:1, v/v), čo bolo ďalej riedené v pomere 1:5 rovnakým rozpúšťadlom.

### **2.5.2.1 Krátkodobá stabilita IS MIX**

Pre prípravu vzoriek bol použitý prvý podiel IS MIX, ktorý nebol zmrazený a teda bol eliminovaný rozmrazovací cyklus. Zriedením podľa návodu boli pripravené celkom tri vzorky a určené k okamžitému meraniu. Po dvoch hodinách ponechania IS MIX pri laboratórnej teplote boli rovnakým spôsobom pripravené ďalšie tri vzorky, opäť okamžite zmerané. Tento postup bol ešte dvakrát opakovaný, teda celkovo boli prevedené 4 série meraní po troch vzorkách, ktorých účelom bolo zistiť vplyv laboratórnych podmienok na IS MIX (simulácia 8-hodinového pracovného dňa).

### **2.5.2.2 Stabilita IS MIX v priebehu rozmrazovacích cyklov**

Pre tieto analýzy bol použitý druhý podiel IS MIX. Prvé tri vzorky boli pripravené z čerstvo pripraveného podielu (bez rozmrazovacieho cyklu) zriedením podľa návodu. Tie boli ihneď zmerané. Pôvodný podiel IS MIX bol opäť zamrazený pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po 24 hodinách bol postup zopakovaný (1 rozmrazovací cyklus), Tento postup bol ešte trikrát zopakovaný, teda celkovo bolo prevedených 5 sérií analýz po 3 vzorkách. Experiment mal simulovať vplyv opätovného uskladnenia IS MIX v priebehu pracovného týždňa.

### **2.5.2.3 Dlhodobá stabilita IS MIX**

IS MIX bol rozpipetovaný do viacerých vialiek z dôvodu zjednotenia rozmrazovacích cyklov (len jeden cyklus pre každý IS MIX). Po rozmrazení bol prvý podiel z rady tretích alikvotov zriedený podľa návodu a ihneď zmeraný. Po týždni bol postup zopakovaný s ďalším podielom z rovnakej rady. Postup bol opakovaný znovu po dvoch, troch a piatich týždňoch od prvého merania, vždy s novým podielom. Celkovo teda bolo prevedených 5 sérií analýz po 3 vzorkách. Experiment mal simulovať dlhodobé uskladnenie zmesi štandardov po dobu 5 týždňov.

## **2.5.3 Príprava lipidomického extraktu**

Plazma bola extrahovaná modifikovaným postupom podľa Folcha. Do 4ml sklenenej vialky bolo pipetovaných 25  $\mu\text{l}$  plazmy, 20  $\mu\text{l}$  IS MIX, 2 ml chloroformu a 1 ml metanolu. Takto pripravená zmes bola homogenizovaná v ultrazvukovom kúpeli po dobu 15 minút pri teplote  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následne bolo pridaných 600  $\mu\text{l}$  250 mmol/l vodného roztoku uhličitanu amónneho, obsah vialky bol miešaný na trepačke pri 400 ot/min po dobu 5 minút a následne 3 minúty odstredovaný pri 3 000 ot/min. Sklenenými Pasteurovými pipetami bola opatrne odobraná organická (spodná) fáza do 8ml vialky. K pôvodnému obsahu boli pridané ďalšie

2 ml chloroformu a zmes bola opäť trepaná po dobu 5 minút pri 400 ot/min a potom odstredovaná 3 minúty pri 3 000 ot/min. Spodná vrstva bola rovnako odobraná a pridaná k prvému podielu. Organické rozpúšťadlo bolo z takto pripraveného extraktu odparované pod jemným prúdom dusíka pri teplote 35 °C do sucha. Ak to jednotlivé postupy nevyžadovali inak, vzorka bola rozpustená v 500 µl zmesi chloroform/metanol (1:1, v/v), 30 sekúnd trepaná na minitrepačke a následne zriedená v pomere 1:5 pomocou rozpúšťadla vzorky [38].

### **2.5.3.1 Krátkodobá stabilita plazmy**

Vzorky boli pripravené v rovnaký deň ako zmesná vzorka plazmy, teda aby neprebehol rozmrazovací proces. Bol použitý prvý podiel plazmy a štvrtý podiel IS MIX. Lipidové extrakty boli pripravené podľa extrakčného postupu a okamžite analyzované. Po dvoch, štyroch a šiestich hodinách ponechania plazmy pri laboratórnej teplote bol celý postup zopakovaný. Celkovo boli pripravené 4 série po troch vzorkách. Experiment mal simulovať 8-hodinový pracovný deň, kedy je plazma pripravená na stole k extrakcii.

### **2.5.3.2 Stabilita plazmy v priebehu rozmrazovacích cyklov**

2. podiel plazmy pre prípravu prvých vzoriek bol použitý bez rozmrazovacieho kroku. Extrakciou podľa Folcha za použitia štandardov z piatej rady podielov IS MIX a príslušným riedením boli pripravené tri extrakty. Plazma bola vrátená späť do mrazničky, kde bola skladovaná pri teplote -80 °C. Postup bol opakovaný po 1, 2, 3 a 4 dňoch, teda dohromady 5 sérií meraní po 3 vzorkách. Experiment mal simulovať opätovnú analýzu rovnakej vzorky uloženej v mrazničke.

### **2.5.3.3 Skladovacie podmienky extraktu**

Z 3. podielu plazmy a 6. podielu IS MIX bolo prevedených 60 extrakcií vyššie uvedeným postupom podľa Folcha. Po odparení rozpúšťadla a rozpustení boli tieto extrakty zliate dokopy, premiešané na minitrepačke a rozdelené do 42 podielov po 500 µl. Skladované boli pri nasledujúcich podmienkach:

- 1. podiel (7 vialiek) po odparení rozpúšťadla do sucha pri -80 °C
- 2. podiel (7 vialiek) vo forme kvapalného extraktu pri -80 °C
- 3. podiel (7 vialiek) po odparení rozpúšťadla do sucha pri -20 °C
- 4. podiel (7 vialiek) vo forme kvapalného extraktu pri -20 °C
- 5. podiel (7 vialiek) po odparení rozpúšťadla do sucha pri +4 °C
- 6. podiel (7 vialiek) vo forme kvapalného extraktu pri +4 °C

Ďalej boli pripravené 3 vzorky k okamžitej analýze zriedením pôvodného extraktu kvôli porovnaniu bez skladovacieho kroku. Ostatné podiely boli ponechané pri daných podmienkach po dobu 24 hod, potom bol z každej skupiny pripravený jeden podiel pre analýzu. Vzorky boli pripravené ďalej po 2, 3 a 4 dňoch, potom po 1, 3 a 5 týždňoch skladovania pri uvedených podmienkach. Dohromady úvodné meranie troch vzoriek, potom 7 sérií po 18 vzoriek (6 rôznych skladovacích podmienok, z každej skupiny tri vzorky). Experiment mal ukázať správnu teplotu skladovania extraktu a vplyv uchovania v roztoku alebo suchom stave.

#### **2.5.3.4 Stabilita v autosampleri**

Zo zmesnej vzorky plazmy a pripraveného IS MIX boli vyššie uvedeným postupom pre extrakciu pripravené 4 extrakty a následne zmiešané. Bolo pripravených 7 vzoriek zriedením, aby bol eliminovaný vplyv odparenia rozpúšťadla z dôvodu prepichnutia septa a boli umiestnené do autosampleru pre analýzu v čase 0, 2, 4, 6, 8, 10 a 12 hod, z každej vzorky po tri nástreky. Experiment mal simulovať sekvenciu merania, kedy vzorka čaká v autosampleri na analýzu.

Pre prehľadnosť plánovaných experimentov boli jednotlivé analýzy zhrnuté v Tabuľke 3:

Tabuľka 3: Prehľad jednotlivých experimentov

Názov analýzy	Označenie	Krátky popis	Počet sérií	Počet analýz
Krátkodobá stabilita IS MIX	IS-STTS	riedenie IS MIX po dvoch hodinách ponechania pri lab. podmienkach	4 (0, 2, 4, 6 hod)	12 (4 x 3 vzorky)
Stabilita IS MIX v priebehu rozmrazovacích cyklov	IS-FTS	riedenie IS MIX skladovanie pri -80 °C, opakovať po 24 hod	5 (1., 2., 3., 4., 5. deň)	15 (5 x 3 vzorky)
Dlhodobá stabilita IS MIX	IS-LTS	riedenie IS MIX, skladovanie pri -80 °C, opakovať po týždni až dvoch	5 (1. deň, po 1, 2, 3, 5 týždňoch)	15 (5 x 3 vzorky)
Krátkodobá stabilita plazmy	P-STTS	príprava extraktu po dvoch hodinách ponechania pri lab. podmienkach	4 (0, 2, 4, 6 hod)	12 (4 x 3 vzorky)
Stabilita plazmy v priebehu rozmrazovacích cyklov	P-FTS	príprava extraktu, skladovanie pri -80 °C, rozmrazenie po 24 hod	5 (1., 2., 3., 4., 5. deň)	15 (5 x 3 vzorky)
Stabilita extraktu	P-SCS	príprava extraktov, rozdelenie podľa skladovacích podmienok, analýza po 24 hod a po týždni až dvoch	7 (1., 2., 3., 4., 5. deň, po 1, 3, 5 týždňoch)	129 (7 x 18 vzoriek + 3 počiatkové)
Stabilita v autosampleri	autosampler	príprava zmesného extraktu, uloženie do autosampleru v 7 vialkách, meranie po dvoch hodinách	7 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 hod)	21 (7 x 3 vzorky)

## 2.6 UHPSFC podmienky

Acquity UPC<sup>2</sup> s kolónou Viridis BEH (100×3 mm; 1,7 µm) bol použitý pre analýzy pripravených vzoriek. Kolóna bola vyhrievaná na 60 °C. Ako mobilná fáza A bol použitý oxid uhličitý v nadkritickom stave a modifikátorom (mobilná fáza B) bol metanol s 30 mmol/l octanom amónnym a 1 % deionizovanej vody. Bola použitá gradientová elúcia: 0 min – 1 % B; 1,5 min – 16 % B; 4 min – 51 % B; 7 min – 51 % B; 7,51 min – 1 % B.

Celkový čas analýzy bol 8 minút vrátane ekvibrácie kolóny. Automatický regulátor spätného tlaku bol nastavený na 1 800 psi, tok 1,9 ml/min, dávkovaný objem vzorky 1  $\mu$ l. Injekčná ihla bola premytá po každom nástreku zmesou hexán–2-propanol–deionizovaná voda (2:2:1, v/v/v). Teplota autosampleru bola nastavená na 4 °C.

## 2.7 MS podmienky

UHPSFC bol spojený s hmotnostným spektrometrom použitím komerčného interface kitu (Waters). Make-up roztok mal rovnaké zloženie ako modifikátor mobilnej fázy (metanol, 30 mmol/l octan amónny, 1 % H<sub>2</sub>O), nastavený tok bol 0,25 ml/min. Bol zvolený kontinuálny mód pre záznam analýzy so skenovacím časom 0,1 s a ako referenčná hmota (Lock Mass) bol použitý roztok leucín enkefalínu. Pre meranie boli použité nasledovné nastavenia:

- kladná ionizácia elektrosprejom
- režim citlivosti
- $m/z$  rozsah 150 – 1200
- napätie aplikované na kapiláru 3 kV
- napätie na vstupnej elektróde 20 V
- zdrojový offset 90 V
- teplota zdroja 150 °C
- teplota sušiaceho plynu 500 °C
- tok plynu v zdroji 50 l/hod
- tok sušiaceho plynu 1 000 l/hod
- tlak zmlžujúceho plynu 4 bar

## 2.8 Spracovanie nameraných dát

Dáta z analýz jednotlivých vzoriek boli získané pomocou programu MassLynx. V prvom kroku bol redukovaný šum pomocou nástroja Waters Compression and Archival tools, čo viedlo k zníženiu pravdepodobnosti chybnjej identifikácie a tiež k zmenšeniu veľkosti súborov. Za účelom lepšej presnosti hmoty bola prevedená korekcia využívajúca lock mass zahrňujúca prevedenie spektra z kontinuálneho na centroidálne využitím nástroja Accurate Mass Measure v programe MassLynx. Integrácia píkov interných štandardov bola prevedená pomocou nástroja QuanLynx, z ktorých bola získaná ich výška a plocha. Správnosť integrácie bola manuálne skontrolovaná a výsledky boli exportované do textového súboru. Pre prevedenie záznamu do textového súboru bol použitý nástroj MarkerLynx, kde boli najskôr vytvorené vhodné metódy na základe rozsahov scanov pre jednotlivé triedy lipidov: CE (80 – 120), Cer (195 – 220), DG (133 – 155), MG (160 – 185), PC (400 – 420), SM a LPC (425 – 455), TG (105 – 140).

Ich aplikáciou boli identifikované všetky hodnoty  $m/z$  s danými intenzitami. Výsledné tabuľky boli exportované do macro skriptu v Exceli, tzv. LipidQuantu [82] za účelom

automatickej kvantifikácie. Automatická identifikácia bola prevedená porovnávaním jednotlivých  $m/z$  s databázou s toleranciou  $\pm 10$  mDa. Automatická kvantifikácia bola prevedená na základe pomerov intenzít jednotlivých lipidov a interných štandardov pre dané triedy vzťahnutých k známym koncentráciám. Automaticky bola prevedená prípadná izotopická korekcia II. typu pre všetky druhy lipidov.

### **2.8.1 Vyhodnotenie kontrol kvality**

Za účelom sledovania stability odozvy hmotnostného spektrometru a prípadnej normalizácie boli každý deň pri meraní použité QC vzorky. Dáta boli spracované vyššie uvedeným postupom, pričom jednotlivé intenzity získané pomocou QuanLynxu boli znázornené grafmi (závislosť intenzity odozvy na poradí QC, vid' Graf 1 – 2, Graf P 1 – P 16) so zámerom sledovania zmien v odozve vzhľadom k časovej rozsiahlosti experimentov. Pri zmenách intenzity vyplývajúcich z grafov boli dáta normalizované. Intenzity jednotlivých štandardov v QC meraných v jednotlivých dňoch boli dané do pomeru s intenzitami daných štandardov v QC z prvého dňa, týmto faktorom bola následne násobená intenzita štandardu.

### **2.8.2 Výpočet chyby kvantifikácie**

IS MIX obsahoval viacero štandardov pre takmer každú triedu lipidov. To umožňuje výpočet chyby kvantifikácie, kedy je počítaná koncentrácia jedného IS pomocou druhého a obrátene. Za týmto účelom bola prevedená analýza QC vzorky (10 nástrekov) a bola vypočítaná chyba kvantifikácie vo forme relatívnej smerodajnej odchýlky (Tabuľka P 1). Následne boli vybrané tie IS, pri použití ktorých boli zaznamenané najpresnejšie výsledky. Tie boli používané pre kvantifikáciu v priebehu štúdie. Ďalej boli stanovené koncentrácie jednotlivých lipidov v plazme na základe zvolených IS pre porovnanie s koncentraciami lipidov v plazme v rámci nedávno publikovaných štúdií [38; 83; 84]. Tieto porovnania sú uvedené v Tabuľke P2.

### **2.8.3 Vyhodnocovanie jednotlivých analýz**

Dáta z analyzovaných vzoriek boli prevedené do Excelu vo forme intenzít, prípadne koncentrácií daných lipidov a následne vynesené do grafov v závislosti na čase. V prípade časovo rozsiahlejších analýz bola aplikovaná normalizácia popísaná vyššie. Vplyv jednotlivých faktorov (teplota, forma a dĺžka skladovania) boli posudzované na základe relatívnych smerodajných odchýlok.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hlavná časť práce je zameraná na sledovanie stability vybraných lipidov pri rôznych skladovacích podmienkach zmesi štandardov, ďalej plazmy a lipidového extraktu. V rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce bola porovnaná chyba kvantifikácie pre triedy lipidov so zámerom selekcie tých, ktoré poskytujú najpresnejšie výsledky pre ďalšiu kvantifikáciu identifikovaných lipidov. Pomocou zvolených štandardov boli kvantifikované lipidy v extrakte plazmy a ostatné IS slúžili na pozorovanie stability systému.

#### 3.1 Voľba štandardov

Zmes IS MIX obsahovala viacero štandardov pre takmer všetky triedy (okrem LPC). Pre kvantifikáciu boli zvolené tie, čo poskytovali čo najpresnejšie výsledky. Za týmto účelom bolo analyzovaných 10 nástrekov zmesnej vzorky lipidového extraktu plazmy. Namerané údaje boli spracované vyššie uvedeným postupom do podoby textového súboru obsahujúceho hodnoty  $m/z$  a ich intenzity. Koncentrácie boli vypočítané automaticky pomocou LipidQuantu. Štandardy, podľa ktorých boli počítané koncentrácie boli postupne striedané, čím bola počítaná koncentrácia jedného IS pomocou druhého. Výsledné koncentrácie stanovovaných štandardov boli navzájom porovnané, hlavným kritériom boli relatívne odchýlky od známej koncentrácie. Výsledné koncentrácie spolu s odchýlkami sú uvedené v Tabuľke P 1.

Pre sfingomyelíny bol zvolený štandard SM 36:2 d9. Vzhľadom k závislosti retencie na dĺžke uhlíkového reťazca v rámci triedy je výhodnejší, nakoľko eluuje približne v tretine všetkých sfingomyelínov. Ionizácia bude prebiehať súčasne s väčším počtom ďalších lipidov z tejto triedy, na rozdiel od druhého štandardu využívajúceho princíp kratšieho reťazca, ktorý v rámci parciálnej separácie eluuje skôr. Relatívne odchýlky (RSD) boli porovnateľné pre oba štandardy, preto by bolo možné použiť pre kvantifikáciu aj druhý IS.

Spomedzi štandardov pre ceramidy bol zvolený Cer 36:1 d7, ktorý spolu s Cer 35:1 vykazovali najnižšie hodnoty RSD a bolo by teda možné použiť aj tento IS. Deuterovaný štandard je výhodnejší, pretože endogénne ceramidy obsahujú prevažne dlhšie reťazce a Cer 36:1 d7 je im štruktúrne bližšie. Na druhú stranu, Cer 30:1 vykazuje veľkú chybu kvantifikácie, zrejme kvôli rozdielnemu matričnému efektu a pre kvantifikáciu nie je vhodný, ale pre sledovanie stability systému je postačujúci.

Pre fosfolipidy boli testované 3 typy IS (s krátkym reťazcom, deuterovaný a s dlhým acylovým reťazcom). Opäť bol zvolený deuterovaný štandard, v tomto prípade PC 33:1 d7.

Ďalšie dva IS sú vhodné skôr na kontrolu stability systému. Žiaľ, pre LPC bol v zmesi iba jeden IS a nebolo možné chybu kvantifikácie vypočítať. Tento IS je však používaný v mnohých iných laboratóriách, preto je predpokladaná jeho aplikácia pre kvantitatívnu analýzu.

Pre cholesterolestery, diacylglyceroly a triacylglyceroly boli z vyššie popísaných dôvodov opäť použité deuterované IS vo všetkých prípadoch, teda CE 16:0 d7, DG 33:1 d7 a TG 48:1 d7.

Monoacylglyceroly vykazovali výsledky podobné ako ceramidy. Oba IS v tejto triede sú si štruktúrne podobné a bolo by možné použitie oboch, avšak na základe vyššie uvedených dôvodov bol zvolený deuterovaný IS MG 18:1 d7.

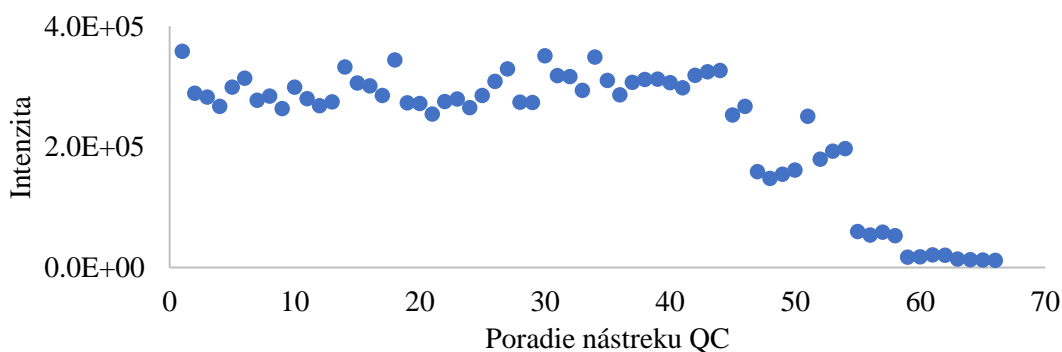
### **3.2 Porovnanie koncentrácie lipidov s publikáciami**

Za účelom kontroly správnosti stanovených lipidov boli ich koncentrácie porovnané s niektorými doteraz uverejnenými publikáciami (Tabuľka P2). Použitím štandardov zvolených v predošlej podkapitole boli stanovené lipidy v čerstvo pripravenom lipidovom extrakte plazmy pomocou softwaru LipidQuant. Následne boli koncentrácie porovnané s publikáciami využívajúcimi rovnakú techniku, pričom koncentrácie jednotlivých lipidov boli porovnateľné. Najvyššia zhoda medzi stanovenými lipidmi bola u sfingomyelínov a glycerofosfatidylcholínov. Isté rozdiely medzi plazmatickými koncentraciami stanovovaných lipidov mohli byť zapríčinené najmä použitím vzoriek plazmy od rôznych dobrovoľníkov, nakoľko obsah jednotlivých lipidov závisí v značnej miere na životnom štýle, pohlaví, či užívaných liekoch daných ľudí [85]. To bolo možné eliminovať použitím reprezentatívnej plazmy, napríklad ľudská plazma NIST SRM 1950, avšak tento referenčný materiál je pre toto porovnanie príliš drahý.

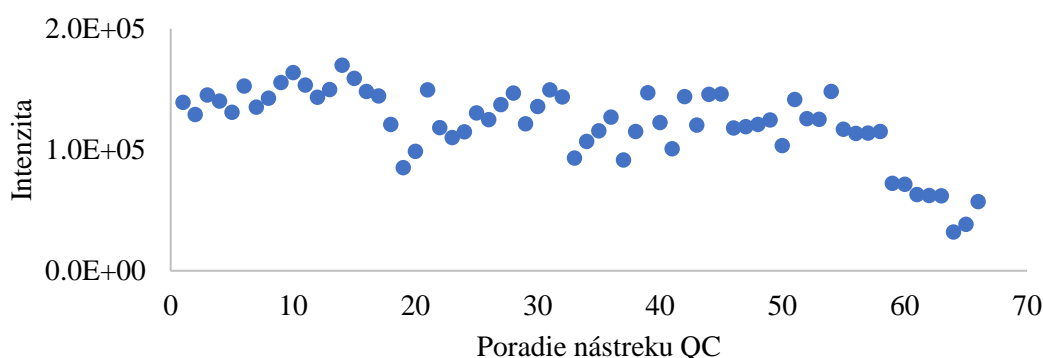
### **3.3 Normalizácia dát**

Vzhľadom k časovej rozsiahlosti tejto štúdie boli použité vzorky kontroly kvality, konkrétne zmes lipidomických extraktov, za účelom sledovania stability podmienok v prístroji. Tie boli zaradené každý deň merania, vždy na začiatku a konci, v prípade rozsiahlejšej sekvencie po každých 20 nástrekoch. Spracované dáta boli vynesené do grafov v podobe závislosti intenzity píku na poradí kontroly kvality. Z priebehu väčšiny záznamov je jasne vidno klesajúca odozva. Tá bola zapríčinená klesajúcou citlivosťou prístroja vzhľadom k jeho kontaminácii.

Výraznejšie zmeny intenzity boli zaznamenané po desiatich dňoch merania, teda približne po 40 nástrekoch QC, pretože potom bol prístroj používaný aj pre analýzy ďalších kolegov. Dáta boli normalizované na základe pomerov intenzít daných štandardov v QC prvého a daného dňa analýzy, výsledným faktorom boli násobené jednotlivé intenzity analytov. Normalizácia bola použitá pre dlhodobé experimenty, aby nedochádzalo k umelým skresleniam výsledkov. Na Grafe 1 a 2 sú vybrané štandardy znázorňujúce pokles intenzity v závislosti na poradí QC, ostatné sú uvedené v prílohe (Graf P 1 – P 16).



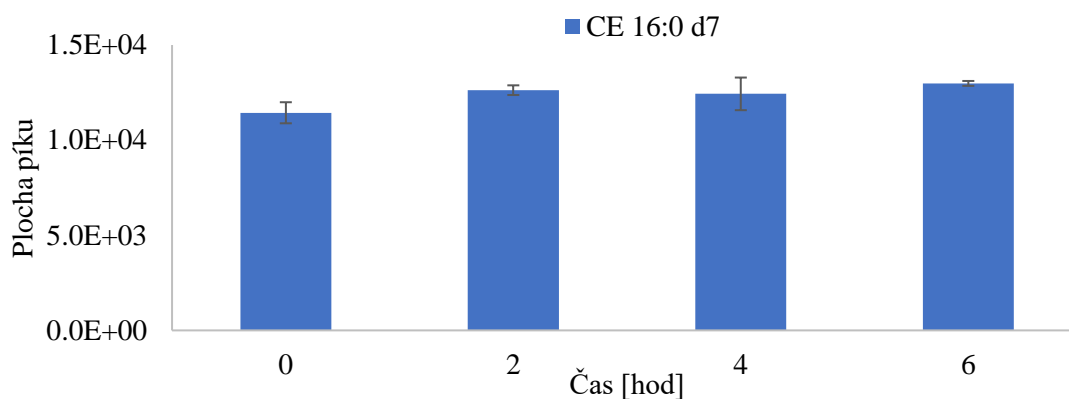
*Graf 1: Stability signálu CE 16:0 d7 pre QC vzorky*



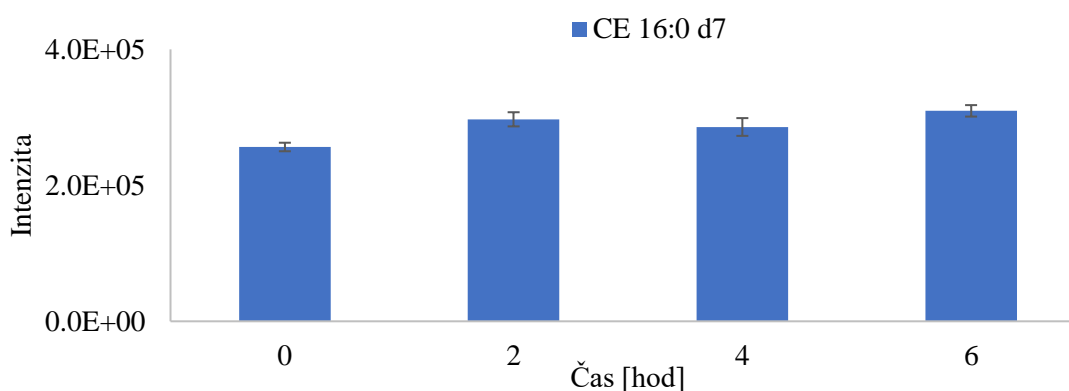
*Graf 2: Stability signálu SM 36:2 d9 pre QC vzorky*

### 3.4 Vyhodnotenie výsledkov

Lipidy boli po chromatografickej separácii rozdelené do lipidových tried, ako to znázorňuje vzorový chromatogram QC vzorky v prílohe (Obrázok P 1). Dáta získané z analýzy boli spracované do podoby plochy pod píkom a jeho intenzity (výšky) pre jednotlivé lipidové štandardy a vybrané lipidy a výsledné hodnoty boli porovnané (viď Graf 3 a 4). Pre vyhodnocovanie experimentov boli zvolené intenzity píkov z dôvodu nižšej RSD, nakoľko sa pri tomto parametre prejaví nedokonalá integrácia píku menej, inak prinášali tieto parametre (intenzita a plocha píku) porovnateľné výsledky.



Graf 3: Vyjadrenie koncentračných zmien pomocou závislosti plochy píku na čase



Graf 4: Vyjadrenie koncentračných zmien pomocou závislosti intenzity píku na čase

Vplyv skladovacích podmienok a manipulácie so vzorkou plazmy bol vyhodnocovaný na základe koncentračných zmien vybraných lipidov. Tie mali predstavovať reprezentatívne zastúpenie sledovaných lipidových tried v plazme, v rámci ktorých boli z každej vybrané druhy s krátkym a dlhým acylovým reťazcom, s nízkym a vyšším počtom dvojitých väzieb. Ich prehľad je uvedený v Tabuľke 4.

Kritériom pre posúdenie vplyvu času a skladovacích podmienok na koncentračné zmeny, respektíve intenzitu píkov vybraných lipidov bola relatívna smerodajná odchýlka. V prípade presiahnutia hranice 20 % bola zmena vyhodnotená ako významná.

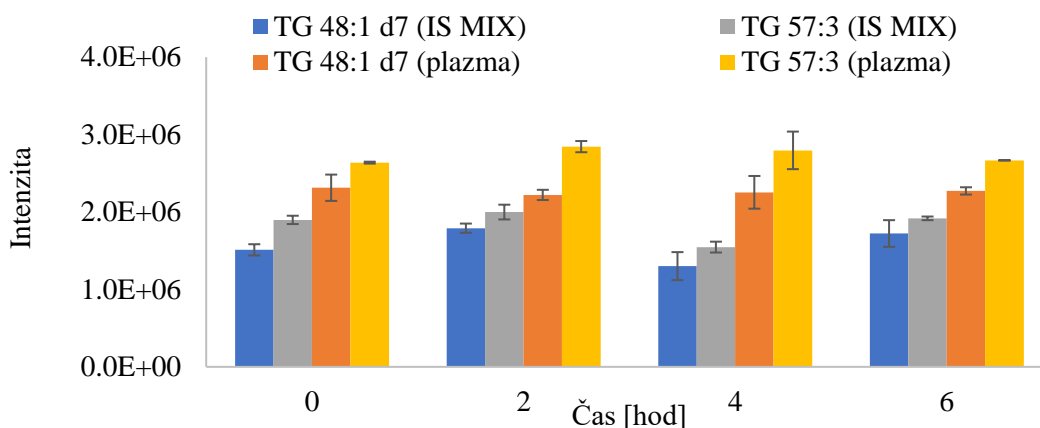
Tabuľka 4: Vybrané lipidy pre posúdenie stability plazmatických lipidov

<b>CE</b>	CE 16:0	CE 18:1	CE 22:6		
<b>TG</b>	TG 48:1	TG 52:3	TG 56:6		
<b>DG</b>	DG 32:0	DG 34:1	DG 36:3		
<b>MG</b>	MG 16:0	MG 18:0	MG 18:1		
<b>Cer</b>	Cer 41:1	Cer 42:1	Cer 42:2		
<b>PC</b>	PC 32:0	PC 36:2	PC 38:4	PC O-34:2/P-34:1	PC O-38:5/P-38:4
<b>LPC</b>	LPC 16:0	LPC 18:1	LPC 20:4		
<b>SM</b>	SM 34:1	SM 38:1	SM 42:2		

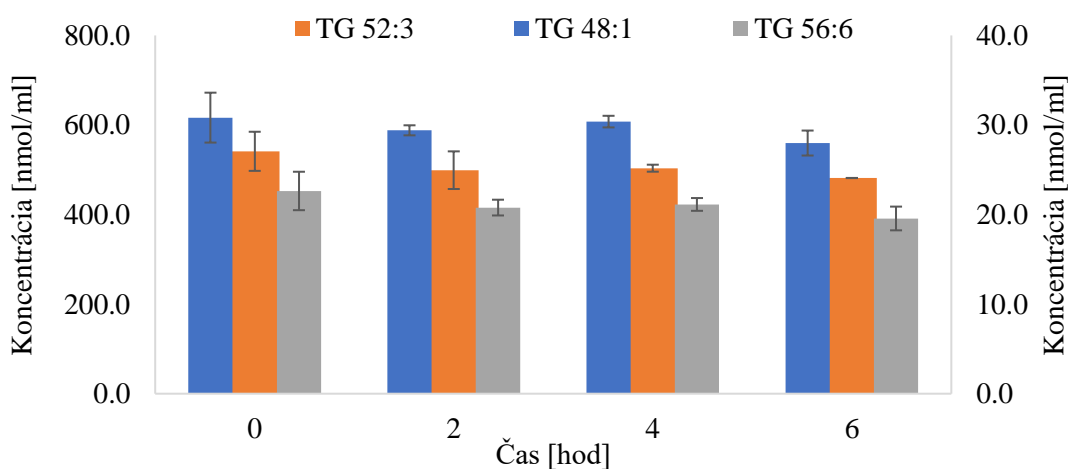
### 3.4.1 Krátkodobá stabilita

Sledovanie krátkodobej stability štandardov v zmesi IS MIX prebiehalo v rozpätí šiestich hodín, teda normalizácia dát nebola potrebná vzhľadom ku krátkemu časovému úseku a analýze menšieho počtu vzoriek. V rámci jednotlivých štandardov boli vypočítané relatívne smerodajné odchýlky, pričom žiadna z nich nepresiahla hodnotu 20 %, teda interné štandardy v pripravenej zmesi vykazovali dostatočnú stabilitu v priebehu šiestich hodín skladovania pri laboratórnej teplote (Graf 5, pre ostatné IS Graf P 17 – P 23). Dáta označené ako plazma zohľadňujú vplyv matrice, ale nie vplyv plazmy na IS, pretože IS MIX a plazma boli zmiešané vždy tesne pred extrakciou. Vplyv enzýmov na IS v priebehu niekoľkých hodín nebol testovaný, pretože k tejto situácii v laboratóriu nedochádzalo, nakoľko je extrakcia prevádzaná v čo najkratšej dobe.

Podobne krátkodobá stabilita plazmy bola sledovaná v priebehu šiestich hodín ponechania pri laboratórnych podmienkach, dáta rovnako nepožadovali normalizáciu. Boli vypočítané relatívne odchýlky, ktoré opäť nevykazovali významné rozdiely v koncentračných hladinách lipidov, teda boli nižšie ako 20 % s výnimkou monoacylglycerolov. Tie vykazovali kolísavé hladiny koncentrácií, ktoré vzhľadom k ich nízkym hodnotám mohli byť spôsobené chybným stanovením. Hladiny LPC vykazovali mierne rastúci trend, avšak v danom časovom rozsahu nie dostatočne významný. Ukážka koncentračných zmien TG v plazme je uvedená v Grafe 6, ostatné triedy lipidov sú uvedené v prílohe (Graf P 24 – P 30).



Graf 5: Krátkodobá stabilita TG v IS MIX



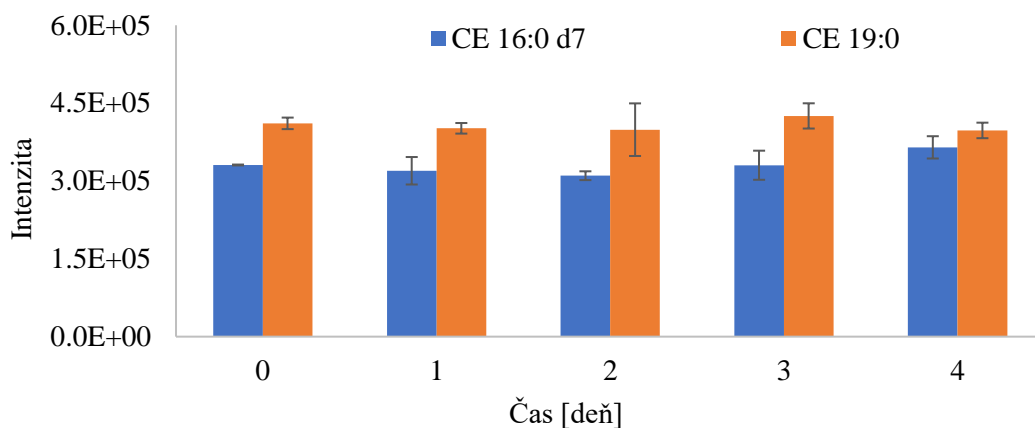
Graf 6: Krátkodobá stabilita vybraných TG v plazme

### 3.4.2 Stabilita v priebehu rozmrazovacích cyklov

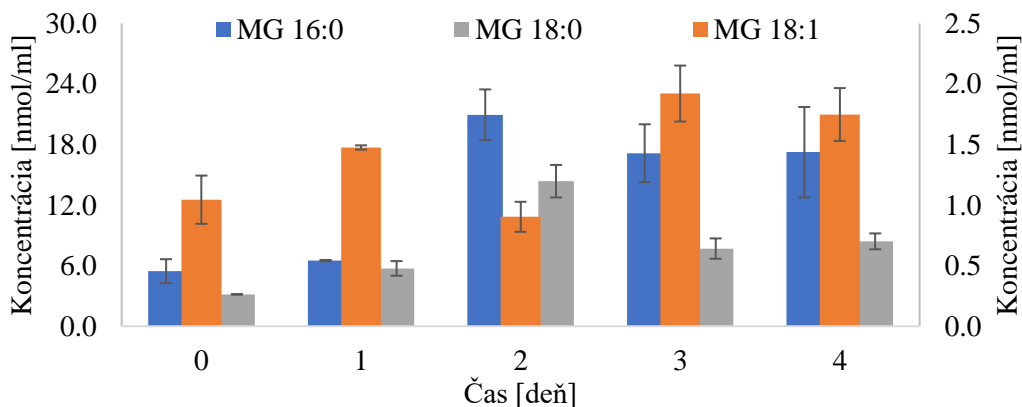
IS MIX aj plazma boli skladované pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a v priebehu piatich dní rozmrazované a analyzované denne v rovnakom čase. Vzhľadom k relatívne krátkemu časovému úseku a stabilným hodnotám intenzít jednotlivých štandardov u kontrol kvality nebola normalizácia dát potrebná. Dáta boli opäť spracované do podoby grafov (vzorový Graf 7, ďalej Graf P 32 – P 38) a boli vypočítané RSD pre porovnanie. Hodnoty boli pod hranicou 20 %, teda znovu vykazovali dostatočnú stabilitu v danom časovom rozsahu.

Podobne bola sledovaná stabilita vybraných lipidov v plazme za rovnakých podmienok. Opäť boli takmer všetky triedy dostatočne stabilné v danom časovom rozsahu, teda neboli pozorované významné rozdiely až na monoacylglyceroly. Tie vykazovali stúpajúce hodnoty koncentrácie, čo mohlo byť zapríčinené enzymatickou degradáciou iných lipidov, ktoré poskytovali tieto lipidy ako degradačné produkty. Napr. DG a TG vykazovali jemne klesajúci trend, navyše vzhľadom k rádovému rozdielom v koncentráciách medzi MG a TG môže aj

nepatrná degradácia TG spôsobiť výrazné zmeny v koncentrácii MG. Na Grafe 8 je uvedený nárast koncentrácií sledovaných MG. Ďalšie grafy vid' príloha (Graf P 39 – P 46).



Graf 7: Stabilita CE v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX

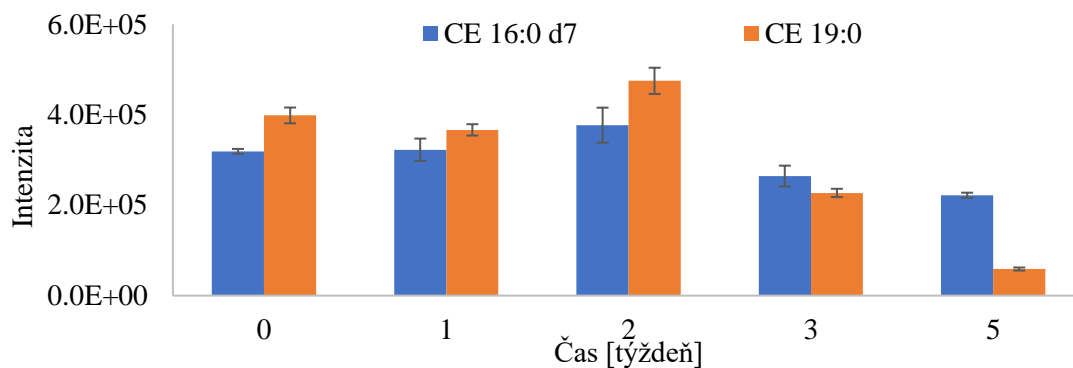


Graf 8: Stabilita vybraných MG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy

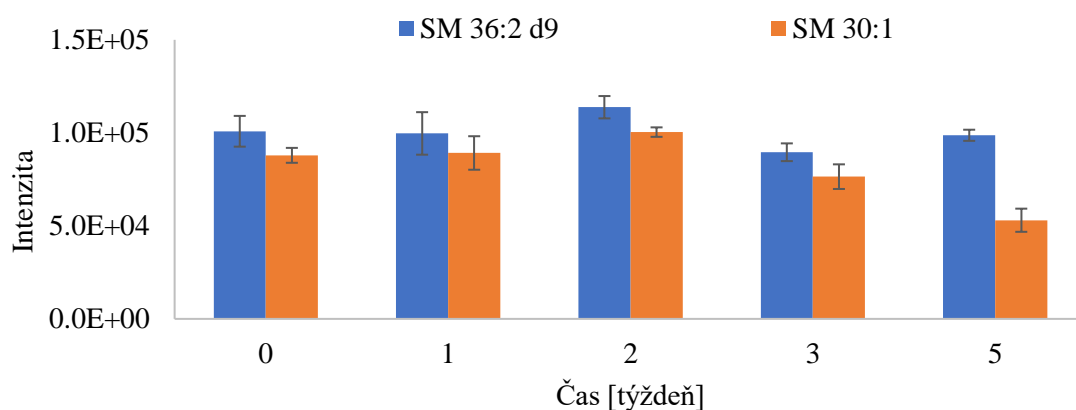
### 3.4.3 Dlhodobá stabilita IS MIX

IS MIX bol skladovaný pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 týždňov. Vzhľadom k časovej rozsiahlosti a klesajúcej intenzite štandardov QC bola potrebná normalizácia dát podľa vyššie uvedeného postupu. Výsledky boli opäť graficky znázornené a boli vypočítané RSD intenzít. Väčšina štandardov vykazovala dostatočnú stabilitu aj v tomto časovom rozsahu, zaznamenaných bolo len niekoľko výnimiek. CE 19:0 vykazoval významné zmeny intenzity aj odhliadnuc od pravdepodobne chybnnej vyššej hodnoty v druhom týždni merania. Táto odchýlka od inak klesajúcej intenzity mohla byť spôsobená poklesom signálu, ktorý je zrejмый aj na skokovom poklese v grafe pre kontrolu stability (Graf 1) a normalizácia ho už plne nevykompenzovala. Nakoľko aj štandard CE 16:0 d7 vykazoval rovnaký priebeh, možno predpokladať aj čiastočnú degradáciu IS, pretože pokles signálu pre CE 19:0 bol v 5. týždni výrazne vyšší (Graf 9). Ďalej aj SM 30:1 naznačoval významné zmeny v intenzite v priebehu

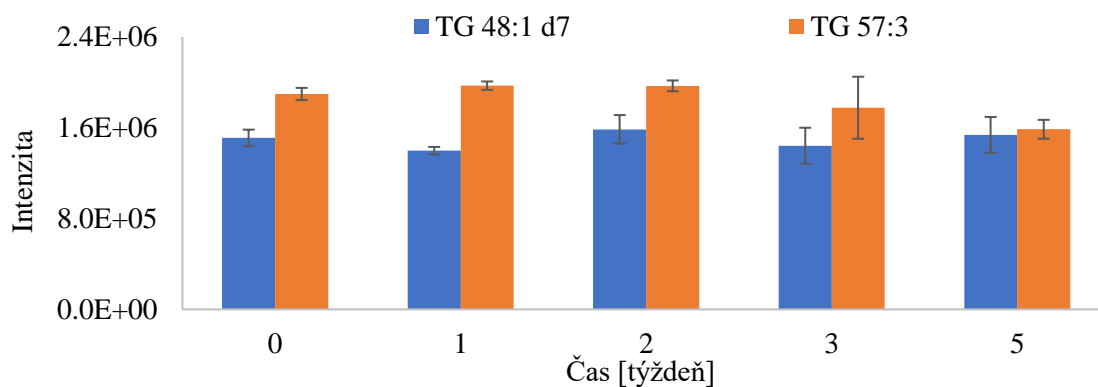
času, na rozdiel od deuterovaného IS, ktorý vykazoval len malé zmeny (Graf 10). Ostatné štandardy preukázali dostatočnú stabilitu pri skladovaní pri teplote  $-80\text{ °C}$  v priebehu 5 týždňov (Graf P 47 – P 51). Stabilné výsledky vykazovali hlavne IS pre triacylglyceroly (Graf 11), kde boli jedni z najmenších RSD.



Graf 9: Dlhodobá stabilita CE v IS MIX po normalizácii dát



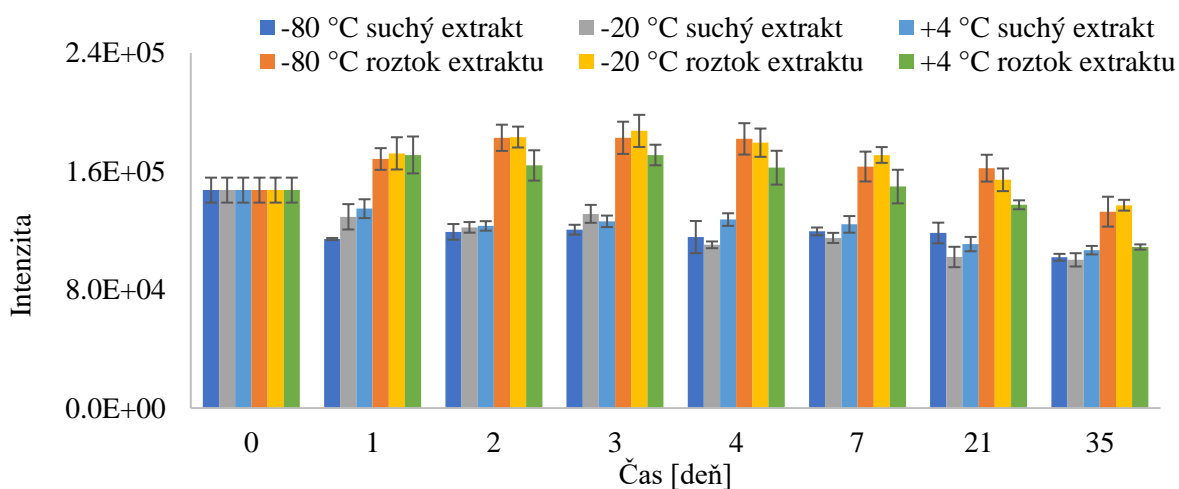
Graf 10: Dlhodobá stabilita SM v IS MIX po normalizácii dát



Graf 11: Dlhodobá stabilita TG v IS MIX po normalizácii dát

### 3.4.4 Stabilita extraktu

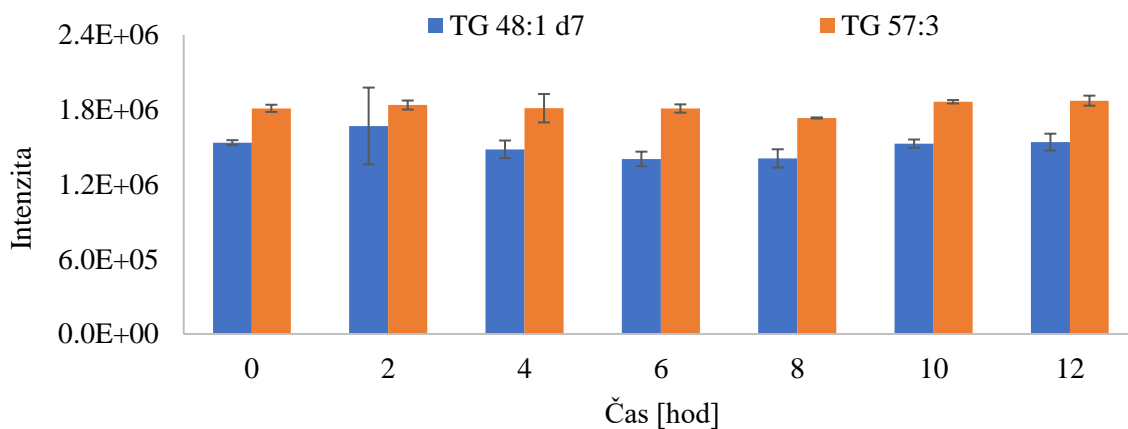
Lipidomický extrakt pripravený z plazmy bol skladovaný pri rôznych podmienkach (teplota -80 °C, -20 °C, +4 °C) a skupenstve (odparok a roztok). Dáta boli opäť normalizované a spracované do grafických závislostí intenzít štandardov na čase a boli sledované jednotlivé hodnoty RSD. Pri tomto type analýzy bolo pozorované väčšie množstvo rozdielov pre jednotlivé skladovacie podmienky. Výrazné zmeny sa prejavili u DG, najlepšie pozorovateľné boli u DG 36:2 d5 (Graf 12). Na prvý pohľad je zrejmy pokles intenzity pre extrakty skladované v podobe odparok. Vzhľadom k stabilným hodnotám v priebehu času pravdepodobne nepôjde o degradáciu tohto štandardu. Tieto rozdiely boli spôsobené vybraným aduktom pre vyhodnocovanie. DG boli stanovované vo forme  $[M+H-H_2O]^+$ , avšak identifikované boli tiež ako  $[M+Na]^+$  a  $[M+NH_4]^+$ , pričom po odparení rozpúšťadla mohli tieto adukty byť výraznejšie v porovnaní s pôvodným, čo pri vyhodnocovaní môže viesť k poklesom intenzít. Ďalším pozorovaným rozdielom bola klesajúca tendencia intenzít s rastúcou teplotou skladovania. V rámci suchých extraktov rozdielna teplota skladovania mala len malý vplyv, na rozdiel od roztokov extraktov, kde s rastúcou teplotou skladovania klesali intenzity výraznejšie. Z toho vyplýva, že výhodnejšie skladovanie extraktu je v podobe odparku (nižší vplyv teploty), avšak je potrebné zohľadnenie aj ďalších aduktov. Skladovanie pri chladničковой teplote, teda +4 °C sa ukázalo ako nevyhovujúce napr. u DG a SM, kde hodnoty RSD označili pokles intenzít za významný. Ostatné štandardy lipidov vykazovali dostatočnú stabilitu v rozsahu tejto štúdie (Graf P 52 – P 67), hoci ich priebeh naznačoval v niektorých prípadoch klesajúci charakter, ktorý by sa významnejšie mohol prejavovať pri dlhšom skladovaní.



Graf 12: Stabilita DG 36:2 d5 v extrakte

### 3.4.5 Stabilita extraktov v autosampleri

Extraktory plazmy boli umiestnené do autosampleru chromatografu a analyzované vždy po dvoch hodinách, celkovo po dobu 12 hodín. Vzhľadom ku krátkemu časovému rozsahu analýzy a stabilite odozvy pre QC nebola potrebná normalizácia. Jednotlivé lipidy vykazovali dostatočnú stabilitu, nakoľko intenzity žiadneho analytu nepresiahli hodnotu relatívnej odchýlky 20 %. Najvyššiu stabilitu opäť dosahovali triacylglyceroly (Graf 13), ďalšie sú uvedené v prílohe (Graf P 68 – P 74).



Graf 13: Stabilita TG v autosampleri

## ZÁVER

V tejto práci bola sledovaná stabilita vybraných lipidov v zmesi štandardov, ľudskej plazmy a jej lipidovom extrakte pri rôznych skladovacích podmienkach a po rôzne dlhú dobu. Vzorky plazmy boli extrahované modifikovanou technikou podľa Folcha, pričom bola použitá dvojitá extrakcia. Následne boli vzorky analyzované pomocou ultravysokoúčinnnej superkritickej fluidnej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou.

Pre spracovanie dát bol využívaný software MassLynx a LipidQuant. Úvodom boli zvolené interné štandardy pre kvantifikáciu na základe porovnania presnosti stanovenia, pričom dosahovali lepšie výsledky prevažne deuterované štandardy. Vzhľadom k časovej rozsiahlosti boli niektoré dáta normalizované pomocou výsledkov vzoriek kontroly kvality, ktoré boli zaradené z dôvodu sledovania stability podmienok v prístroji. Pre správne vyhodnocovanie dát je tento krok kritický, najmä v prípade porovnávania výsledkov v časovo rozsiahlejšom okne. Výsledky samotných analýz boli graficky znázornené v podobe závislosti intenzity vybraných lipidov na čase. Stabilita lipidov bola posudzovaná na základe hodnoty relatívnej smerodajnej odchýlky intenzít, pričom hraničná hodnota bola 20 %.

Zmes interných štandardov poskytovala vo väčšine prípadov uspokojivú stabilitu. V rámci štúdie dlhodobej stability IS MIX boli zistené významné poklesy intenzít iba u niektorých nedeuterovaných štandardov, konkrétne u CE 19:0 a MG 19:1. Deuterované štandardy sa teda ukázali ako stabilnejšie, nakoľko ich intenzity klesali len v malej miere. V rámci väčšieho časového rozsahu analýzy je teda voľba deuterovaných štandardov vhodnejšia.

V rámci sledovania krátkodobej stability plazmy a jej stability v priebehu rozmrazovacích cyklov boli pozorované významné zmeny u lipidov triedy MG, ktoré boli pravdepodobne dôsledkom degradácie lipidov poskytujúcich MG ako produkty. Pre túto triedu lipidov je teda nevhodné dlhšie ponechanie vzoriek plazmy pri laboratórnych podmienkach a tiež viacnásobné rozmrazovanie.

Sledovanie stability lipidov v extrakte pri rôznych skladovacích podmienkach prinieslo viacero zistení. V prípade DG bol zaznamenaný výrazný pokles intenzít v rámci času pri skladovaní v podobe roztoku, pričom sa tieto rozdiely prehlbovali s rastúcou teplotou. Tieto podmienky skladovania bol nevyhovujúce tiež pre SM. Extrakty uložené v podobe odparku vykazovali len malé rozdiely v závislosti na teplote skladovania. Ostatné lipidy vykazovali dostatočnú stabilitu v danom časovom rozsahu, avšak prevažne klesajúca tendencia intenzít naznačuje prípadné významné koncentračné rozdiely pri časovo rozsiahlejšom uchovaní.

Na základe uvedených poznatkov je pre časovo náročnejšie analýzy vhodnejšia voľba deuterovaných interných štandardov, nakoľko vykazovali lepšiu stabilitu. Pri práci s plazmou je potrebná dostatočne rýchla manipulácia vzhľadom ku koncentračným zmenám niektorých lipidov spôsobených pravdepodobne aktiváciou enzýmov. Vyššiu stabilitu lipidov možno dosiahnuť ich prevedením z plazmy do podoby extraktu, ideálne jeho suchej podoby a skladovaním pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Spojením absencie vplyvu matrice a nízkej teploty možno dosiahnuť najstabilnejších výsledkov aj v dlhších časových rozsahoch.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Lipids. BETTELHEIM, Frederick A., William H. BROWN, Mary K. CAMPBELL, Shawn O. FARREL, Omar J. TORRES a Sara K. MADSEN. *Introduction to General, Organic, and Biochemistry*. 12th ed. Boston: STM, 2019, s. 555-575. ISBN 978-1-337-57135-7.
- [2] PERROTTI, Francesca, Consuelo ROSA, Ilaria CICALINI, Paolo SACCHETTA, Piero DEL BOCCIO, Domenico GENOVESI a Damiana PIERAGOSTINO. Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(12). doi:10.3390/ijms17121992
- [3] HOLČAPEK, Michal, Gerhard LIEBISCH a Kim EKROOS. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(7), 4249-4257. doi:10.1021/acs.analchem.7b05395
- [4] Lipidomika. In: Lipidomická sekce České společnosti pro biochemii a molekulární biologii [online]. Praha, 2014. <http://lipidomics.uochb.cas.cz/lipidomika.html>
- [5] Lipidy, izoprenoidy, polyketidy - ich štruktúra a metabolizmus. FERENČÍK, Miroslav, Bohumil ŠKÁRKA, Michal NOVÁK a Ladislav TURECKÝ. *Biochémiá*. 1. vydanie. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000, s. 159-198. ISBN 80-88908-58-2.
- [6] LIPID MAPS® structure database [online]. 2006. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/browse>
- [7] LIEBISCH, Gerhard, Eoin FAHY, Junken AOKI. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of Lipid Research* [online]. 2020, **61**(12), 1539-1555. doi:10.1194/jlr.S120001025
- [8] Lipidy a biologické membrány. KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015, s. 152-160. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [9] Lipids, fats and oils. BUCKBERRY, Linda D. a Paul H. TEESDALE. *Essentials of biological chemistry*. 1st ed. Eastbourne: John Wiley and Sons, 2005, s. 4-6. ISBN 0-471-48904-2.
- [10] Lipidy. DOBROTA, Dušan. *Lekárska biochémiá*. 1. vydanie. Martin: Osveta, 2012, s. 43-80. ISBN 978-80-8063-293-9.

- [11] Lipid Essentials. In: Lipid maps [online]. 2022. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/lipids.html>
- [12] FAHY, Eoin, Shankar SUBRAMANIAM, H. Alex BROWN. A comprehensive classification system for lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2005, **107**(5), 337-364. ISSN 1438-7697. doi:10.1002/ejlt.200405001
- [13] NOWICKA, Beatrycze a Jerzy KRUK. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2010, **1797**(9), 1587-1605. doi:10.1016/j.bbabi.2010.06.007
- [14] Definice a úloha lipidů a steroidů v těle. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2004, s. 155-160. Lange medical book. ISBN 80-246-0851-0.
- [15] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
- [16] VRABLÍK, Michal, Jan PÍTHA, Vladimír BLÁHA. Stanovisko výboru České společnosti pro aterosklerózu k doporučením ESC/EAS pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií z roku 2019. *AtheroRev* [online]. 2019, **4**(3), 126-137.
- [17] GIL-DE-GÓMEZ, Luis, David BALGOMA a Olimpio MONTERO. Lipidomic-Based Advances in Diagnosis and Modulation of Immune Response to Cancer. *Metabolites* [online]. 2020, **10**(8). doi:10.3390/metabo10080332
- [18] LUO, Xiangjian, Can CHENG, Zheqiong TAN, Namei LI, Min TANG, Lifang YANG a Ya CAO. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Molecular Cancer* [online]. 2017, **16**(1). doi:10.1186/s12943-017-0646-3
- [19] RAY, Upasana a Sib Sankar ROY. Aberrant lipid metabolism in cancer cells – the role of oncolipid-activated signaling. *The FEBS Journal* [online]. 2017, **285**(3), 432-443. doi:10.1111/febs.14281
- [20] CLARK, Amanda R., David CALLIGARIS a Michael S. REGAN. Rapid discrimination of pediatric brain tumors by mass spectrometry imaging. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. 2018, **140**(2), 269-279. doi:10.1007/s11060-018-2978-2
- [21] WOLRAB, Denise, Robert JIRÁSKO, Ondřej PETERKA a Michal HOLČAPEK. Plasma lipidomic profiles of kidney, breast and prostate cancer patients differ from healthy controls. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1). doi:10.1038/s41598-021-

- [22] ULMER, Candice, Jeremy KOELMEL, Christina JONES, Timothy GARRETT, Juan ARISTIZABAL-HENAO, Hubert VESPER a John BOWDEN. A Review of Efforts to Improve Lipid Stability during Sample Preparation and Standardization Efforts to Ensure Accuracy in the Reporting of Lipid Measurements. *Lipids* [online]. 2021, **56**(1), 3-16. doi:10.1002/lipd.12263
- [23] WEI, Fang, Santosh LAMICHHANE, Matej OREŠIČ a Tuulia HYÖTYLÄINEN. Lipidomes in health and disease: Analytical strategies and considerations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **120**. doi:10.1016/j.trac.2019.115664
- [24] GONZALEZ-COVARRUBIAS, Vanessa, *Adrie DANE*, *Thomas HANKEMEIER* a Rob J. VREEKEN. The influence of citrate, EDTA, and heparin anticoagulants to human plasma LC–MS lipidomic profiling. *Metabolomics* [online]. 2013, **9**(2), 337-348. doi:10.1007/s11306-012-0450-4
- [25] Fyziologie krve. KITTNAR, Otoman. *Lékařská fyziologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011, s. 121-154. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [26] BUZATTO, Adriana Zardini, Abeer MALKAWI, Essa M. SABI, Ahmed H. MUJAMAMMI, Liang LI a Anas M. ABDEL RAHMAN. Tissue Lipidomic Alterations Induced by Prolonged Dexamethasone Treatment. *Journal of Proteome Research* [online]. 2021, **20**(3), 1558-1570. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00759
- [27] DENTI, Vanna, Isabella PIGA a Sonia GUARNERIO. Antigen Retrieval and Its Effect on the MALDI-MSI of Lipids in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2020, **31**(8), 1619-1624. doi:10.1021/jasms.0c00208
- [28] BURLA, Bo, Makoto ARITA a Masanori ARITA. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. *Journal of Lipid Research* [online]. 2018, **59**(10), 2001-2017. doi:10.1194/jlr.S087163
- [29] ZÜLLIG, Thomas, Martin TRÖTZMÜLLER a Harald C. KÖFELER. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(10), 2191-2209. doi:10.1007/s00216-019-02241-y
- [30] ALDANA, Julian, Adriana ROMERO-OTERO a Mónica CALA. Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis.

- Metabolites* [online]. 2020, **10**(6). doi:10.3390/metabo10060231
- [31] LI, Peng a Michael LÄMMERHOFER. Isomer Selective Comprehensive Lipidomics Analysis of Phosphoinositides in Biological Samples by Liquid Chromatography with Data Independent Acquisition Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2021, **93**(27), 9583-9592. doi:10.1021/acs.analchem.1c01751
- [32] FOLCH, Jordi, M. LEES a G. H. SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [online]. 1956, (226), 497-509.
- [33] BLIGH, E. G. a W. J. DYER. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* [online]. 1959, 37(8), 911-917.
- [34] MATYASH, Vitali, Gerhard LIEBISCH, Teymuras KURZCHALIA, Andrej SHEVCHENKO a Dominik SCHWUDKE. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* [online]. 2008, **49**(5), 1137-1146. doi:10.1194/jlr.D700041-JLR200
- [35] BANG, Dae, Seul BYEON a Myeong MOON. Rapid and simple extraction of lipids from blood plasma and urine for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1331, 19-26. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.024
- [36] GIL, Andres, Wenxuan ZHANG, Justina WOLTERS. One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(23), 5859-5870. doi:10.1007/s00216-018-1200-x
- [37] ZHANG, Huizhen, Yue GAO, Jiahong SUN. Optimization of lipid extraction and analytical protocols for UHPLC-ESI-HRMS-based lipidomic analysis of adherent mammalian cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, **409**(22), 5349-5358. doi:10.1007/s00216-017-0483-7
- [38] WOLRAB, Denise, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Robert JIRÁSKO, Ondřej PETERKA a Michal HOLČAPEK. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography–mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(10), 2375-2388. doi:10.1007/s00216-020-02473-3

- [39] WONG, Matthew Wai Kin, Nady BRAIDY, Russell PICKFORD, Perminder Singh SACHDEV a Anne POLJAK. Comparison of Single Phase and Biphasic Extraction Protocols for Lipidomic Studies Using Human Plasma. *Frontiers in Neurology* [online]. 2019, **10**(879). doi:10.3389/fneur.2019.00879
- [40] HOLČAPEK, Michal, Robert JIRÁSKO, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ a Ondřej PETERKA. Lipidomic analysis. Pardubice, 2021.
- [41] GILES, Corey, Ryusuke TAKECHI, Virginie LAM, Satvinder DHALIWAL a John MAMO. Contemporary lipidomic analytics: opportunities and pitfalls. *Progress in Lipid Research* [online]. 2018, **71**, 86-100. doi:10.1016/j.plipres.2018.06.003
- [42] RAMPLER, Evelyn, Harald SCHOENY, Bernd MITIC, Yasin EL ABIEAD, Michaela SCHWAIGER a Gunda KOELLENSPERGER. Simultaneous non-polar and polar lipid analysis by on-line combination of HILIC, RP and high resolution MS. *The Analyst* [online]. 2018, **143**(5), 1250-1258. doi:10.1039/C7AN01984J
- [43] OLIVEIRA, Regina V., Ana Valéria C. SIMIONATO a Quezia B. CASS. Enantioselectivity Effects in Clinical Metabolomics and Lipidomics. *Molecules* [online]. 2021, **26**(17). doi:10.3390/molecules26175231
- [44] LI, Min, Xunliang TONG, Pu LV. A not-stop-flow online normal-/reversed-phase two-dimensional liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for comprehensive lipid profiling of human plasma from atherosclerosis patients. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1372**, 110-119. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.094
- [45] LANGE, Mike a Maria FEDOROVA. Evaluation of lipid quantification accuracy using HILIC and RPLC MS on the example of NIST® SRM® 1950 metabolites in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(15), 3573-3584. doi:10.1007/s00216-020-02576-x
- [46] ISAAC, Giorgis, Ian D WILSON a Robert S. PLUMB. Application of hybrid surface technology for improving sensitivity and peak shape of phosphorylated lipids such as phosphatidic acid and phosphatidylserine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2022, **1669**(462921). doi:10.1016/j.chroma.2022.462921
- [47] E.LESELLIER, A. VALARCHÉ, C. WEST a M. DREUX. Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical

- fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1250**, 220-226. doi:10.1016/j.chroma.2012.04.065
- [48] BERNAL, José, María MARTÍN a Laura TORIBIO. Supercritical fluid chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, **1313**(81), 24-36. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.022
- [49] DONATO, Paola, Veronica INFERRERA, Danilo SCIARRONE a Luigi MONDELLO. Supercritical fluid chromatography for lipid analysis in foodstuffs. *Journal of Separation Science* [online]. 2017, **40**(1), 361-382. doi:10.1002/jssc.201600936
- [50] YAMAMOTO, Kazuhiro, Koichi MACHIDA, Akira KOTANI a Hideki HAKAMATA. Emerging Separation Techniques in Supercritical Fluid Chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2021, **69**(10), 970-975. doi:10.1248/cpb.c21-00306
- [51] GALEA, Charlene, Debby MANGELINGS a Yvan VANDER HEYDEN. Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, (886), 1-15. doi:10.1016/j.aca.2015.04.009
- [52] HARTMANN, Anja a Markus GANZERA. Supercritical Fluid Chromatography – Theoretical Background and Applications on Natural Products. *Planta Medica* [online]. 2015, **81**(17), 1570-1581. doi:10.1055/s-0035-1545911
- [53] POOLE, Colin F. Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1250**, 157-171. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.040
- [54] SILVA, Carla a Carol COLLINS. Super/subcritical fluid chromatography with packed columns: state of the art and applications. *Química Nova* [online]. 2014, **37**(6), 1047-1057. 10.5935/0100-4042.20140158
- [55] VAN DE VELDE, Bas, Davy GUILLARME a Isabelle KOHLER. Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry in metabolomics: Past, present, and future perspectives. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1161**(1224444). doi:10.1016/j.jchromb.2020.122444
- [56] TARAFDER, Abhijit. Designs and methods for interfacing SFC with MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, **1091**, 1-13. doi:10.1016/j.jchromb.2018.05.003
- [57] HINZ, Klaus-Peter a Bernhard SPENGLER. Instrumentation, data evaluation and quantification in on-line aerosol mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*

- [online]. 2007, **42**(7), 843-860. doi:10.1002/jms.1262
- [58] CECH, Nadja B. a Christie G. ENKE. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2001, **20**(6), 362-387. doi:10.1002/mas.10008
- [59] PARR, Maria Kristina, Bernhard WÜST, Juliane TEUBEL a Jan Felix JOSEPH. Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, **1091**, 67-78. doi:10.1016/j.jchromb.2018.05.017
- [60] FLENSBURG, John, Daniel HAID, Johan BLOMBERG, Jacek BIELAWSKI a Daniel IVANSSON. Applications and performance of a MALDI-ToF mass spectrometer with quadratic field reflectron technology. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2004, **60**(3), 319-334. doi:10.1016/j.jbbm.2004.01.010
- [61] ABBASSI-GHADI, Nima, Emrys A. JONES, Maria GOMEZ-ROMER. A Comparison of DESI-MS and LC-MS for the Lipidomic Profiling of Human Cancer Tissue. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2016, **27**(2), 255-264. doi:10.1007/s13361-015-1278-8
- [62] SISCO, Edward a Thomas P. FORBES. Forensic applications of DART-MS: A review of recent literature. *Forensic Chemistry* [online]. 2021, **22**(100294) doi:10.1016/j.forc.2020.100294
- [63] CHEN, Tsung-Chi, Ian K. WEBB, Spencer A. PROST, Marques B. HARRER, Randolph V. NORHEIM, Keqi TANG, Yehia M. IBRAHIM a Richard D. SMITH. Rectangular Ion Funnel: A New Ion Funnel Interface for Structures for Lossless Ion Manipulations. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(1), 716-722. doi:10.1021/ac503564c
- [64] GUO, Teng, Zhen PENG, Hui ZHU, Li XU, Jun-Guo DONG, Zheng-Xu HUANG, Ping CHENG a Zhen ZHOU. Research Progress and Application of Ion Funnel Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019, **47**(1), 13-22. doi:10.1016/S1872-2040(18)61133-8
- [65] LE FAOUDER, Pauline, Julia SOULLIER, Marie TREMBLAY-FRANCO. Untargeted Lipidomic Profiling of Dry Blood Spots Using SFC-HRMS. *Metabolites* [online]. 2021, **11**(5). doi:10.3390/metabo11050305
- [66] STAUB, Aline, Julie SCHAPPLER, Serge RUDAZ a Jean-Luc VEUTHEY. CE-

- TOF/MS: Fundamental concepts, instrumental considerations and applications. *Electrophoresis* [online]. 2009, **30**(10), 1610-1623. doi:10.1002/elps.200800782
- [67] MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: Creative proteomics [online]. New York, 2022. <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
- [68] Fourier Transform Spectrometers. SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th edition. Canada: Quebecor World Versailles, 2007, s. 571-573. ISBN 978-0-495-01201-6.
- [69] ZUBAREV, Roman A. a Alexander MAKAROV. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(11), 5288-5296. doi:10.1021/ac4001223
- [70] THOMAS, Stefani N. Mass spectrometry. Contemporary Practice in Clinical Chemistry. *Elsevier* [online]. 2019, 171-185. doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7
- [71] Types of Ion Detector for Mass Spectrometry. In: Technology Networks [online]. Sudbury, 2021. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890>
- [72] WINTER, B., S. J. KING, M. BROUARD a C. VALLANCE. A fast microchannel plate-scintillator detector for velocity map imaging and imaging mass spectrometry. *Review of Scientific Instruments* [online]. 2014, **85**(2). doi:10.1063/1.4866647
- [73] MOSKOVETS, E. a B. L. KARGER. Mass calibration of a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer including the rise time of the delayed extraction pulse. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2003, **17**(3), 229-237. doi:10.1002/rcm.898
- [74] YANG, Xihu, Xiaowei SONG, Xiaoxin ZHANG. In situ DESI-MSI lipidomic profiles of mucosal margin of oral squamous cell carcinoma. *EBioMedicine* [online]. 2021, **70**(103529). doi:10.1016/j.ebiom.2021.103529
- [75] GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R., T. GARCÍA-BARRERA a J.L. GÓMEZ-ARIZA. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **98**, 321-326. doi:10.1016/j.jpba.2014.05.023
- [76] ANAND, Swati, SydneyA. YOUNG, M. Sean ESPLIN. Detection and confirmation of serum lipid biomarkers for preeclampsia using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* [online]. 2016, **57**(4), 687-696. doi:10.1194/jlr.P064451

- [77] KÖFELER, Harald C., Alexander FAULAND, Gerald N. RECHBERGER a Martin TRÖTZMÜLLER. Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms. *Metabolites* [online]. 2012, **2**(1), 19-38 doi:10.3390/metabo2010019
- [78] KÖFELER, Harald C., Robert AHRENDTS, Erin S. BAKER. Recommendations for good practice in MS-based lipidomics. *Journal of Lipid Research* [online]. 2021, **62** doi:10.1016/j.jlr.2021.100138
- [79] UltimateSPLASH™ ONE Individual Components. In: Avanti polar lipids [online]. 2022 <https://avantilipids.com/product-category/lipidomics/lipidomix-standards/ultimate-splash-one-individual-components>
- [80] Lipidyzer Platform Kits. In: Sciex [online]. 2022. <https://sciex.com/products/consumables/lipidyzer-platform-kits>
- [81] DROTLEFF, Bernhard a Michael LÄMMERHOFER. Guidelines for Selection of Internal Standard-Based Normalization Strategies in Untargeted Lipidomic Profiling by LC-HR-MS/MS. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91**(15), 9836-9843 doi:10.1021/acs.analchem.9b01505
- [82] WOLRAB, Denise, Eva CÍFKOVÁ, Pavel ČÁŇ, Miroslav LÍSA, Ondřej PETERKA, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Robert JIRÁSKO a Michal HOLČAPEK. LipidQuant 1.0: automated data processing in lipid class separation - mass spectrometry quantitative workflows. *Bioinformatics* [online]. 2021, **37**(4591). doi:10.5281/zenodo.5151201
- [83] WOLRAB, Denise, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Robert JIRÁSKO, Ondřej PETERKA, Vladimíra MUŽÁKOVÁ, Hana ŠTUDENTOVÁ, Bohuslav MELICHAR a Michal HOLČAPEK. Determination of one year stability of lipid plasma profile and comparison of blood collection tubes using UHPSFC/MS and HILIC-UHPLC/MS. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2020, **1137**, 74-84. 10.1016/j.aca.2020.08.061
- [84] CHOCHOLOUŠKOVÁ, Michaela, Denise WOLRAB, Robert JIRÁSKO, Hana ŠTUDENTOVÁ, Bohuslav MELICHAR a Michal HOLČAPEK. Intra-laboratory comparison of four analytical platforms for lipidomic quantitation using hydrophilic interaction liquid chromatography or supercritical fluid chromatography coupled to quadrupole - time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2021, **231**(122367). doi:10.1016/j.talanta.2021.122367

[85] SALES, Susanne, Juergen GRAESSLER, Sara CIUCCI. Gender, Contraceptives and Individual Metabolic Predisposition Shape a Healthy Plasma Lipidome. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1). doi:10.1038/srep27710

## PRÍLOHY

Tabuľka P 1: Priemerné koncentrácie a relatívne odchýlky jednotlivých štandardov, červené sú značené štandardy, podľa ktorých boli stanovované koncentrácie ostatných IS

<b>Koncentrácia IS [nmol/ml plazmy] (RSD)</b>			
<b>Sfingomyelíny</b>			
	<b>SM 30:1</b>	<b>SM 36:2 d9</b>	
<b>SM 30:1</b>	X	34 (-3 %)	
<b>SM 36:2 d9</b>	36 (+3 %)	X	
<b>Ceramidy</b>			
	<b>Cer 30:1</b>	<b>Cer 35:1</b>	<b>Cer 36:1 d7</b>
<b>Cer 30:1</b>	X	1 (-50 %)	1 (-50 %)
<b>Cer 35:1</b>	3 (+50 %)	X	2 (0 %)
<b>Cer 36:1 d7</b>	3 (+50 %)	2 (0 %)	X
<b>Fosfatidylcholíny</b>			
	<b>PC 28:0</b>	<b>PC 33:1 d7</b>	<b>PC 44:2</b>
<b>PC 28:0</b>	X	130 (+73 %)	119 (+59 %)
<b>PC 33:1 d7</b>	43 (-43 %)	X	69 (-8 %)
<b>PC 44:2</b>	47 (-37 %)	82 (+9 %)	X
<b>Monoacylglyceroly</b>			
	<b>MG 19:1</b>	<b>MG 18:1 d7</b>	
<b>MG 19:1</b>	X	17 (+54 %)	
<b>MG 18:1 d7</b>	6 (-45 %)	X	
<b>Cholesterolestery</b>			
	<b>CE 16:0 d7</b>	<b>CE 19:0</b>	
<b>CE 16:0 d7</b>	X	321 (-10 %)	
<b>CE 19:0</b>	404 (+12 %)	X	
<b>Diacylglyceroly</b>			
	<b>DG 28:0</b>	<b>DG 36:2 d5</b>	<b>DG 33:1 d7</b>
<b>DG 28:0</b>	X	8 (+33 %)	9 (50 %)
<b>DG 36:2 d5</b>	4 (-33 %)	X	6 (0 %)
<b>DG 33:1 d7</b>	4 (-33 %)	6 (0 %)	X
<b>Triacylglyceroly</b>			
	<b>TG 57:3</b>	<b>TG 48:1 d7</b>	
<b>TG 57:3</b>	X	88 (+54 %)	
<b>TG 48:1 d7</b>	37 (-35 %)	X	

Tabuľka P2: Porovnanie stanovených koncentrácií lipidov s publikáciami

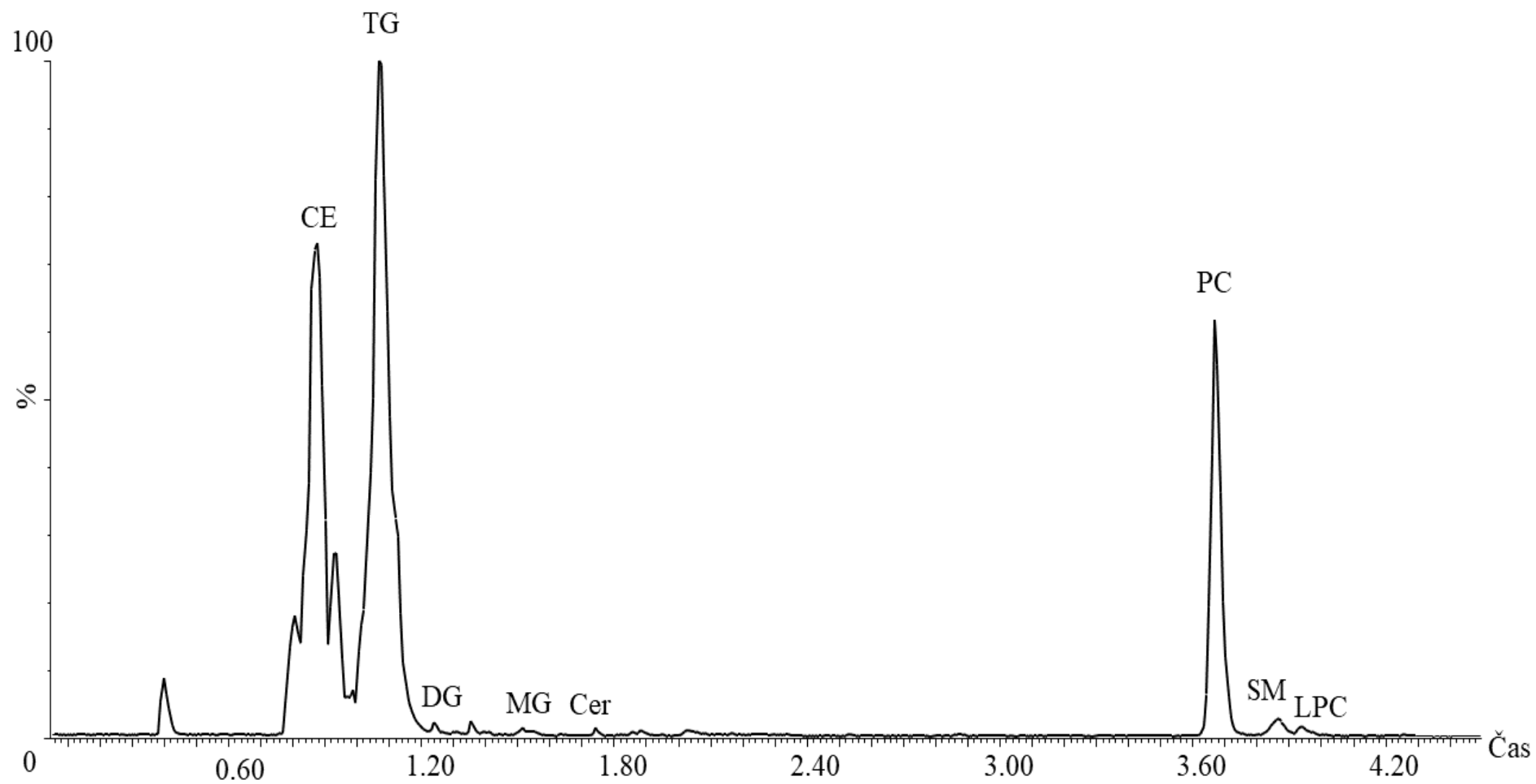
Lipidový druh	Stanovený obsah [nmol/ml]			Koncentrácie z literatúry [nmol/ml] [38; 83; 84]		
	CE 16:0 d7	CE 19:0				
CE 16:1	512.63	439.21		309.42	246.99	
CE 16:0	671.78	512.60		513.72	409.80	
CE 18:3	552.03	508.07		188.11		
CE 18:2	12483.55	12579.00		3754.43	2940.18	
CE 18:1	1957.89	3124.65		1047.01	826.55	
CE 20:5	800.70	664.08		191.65	177.99	
CE 20:4	4794.78	3922.18		1604.30	1255.44	
CE 20:3	183.46	180.06		35.76		
CE 20:2	9.48	9.70				
CE 22:6	346.64	288.21		78.82	77.20	
	TG 48:1 d7	TG 57:3				
TG 44:3	0.08	0.08				
TG 44:2	0.33	0.34				0.10
TG 44:1	0.34	0.37		0.48		0.40
TG 44:0	0.12	0.43				0.20
TG 45:2	0.02					
TG 46:4	0.15	0.14				
TG 46:3	0.46	0.49		0.46		0.20
TG 46:2	2.72	2.70		3.24	1.57	1.20
TG 46:1	7.76	7.00		7.71		2.80
TG 46:0	2.49	2.50		3.03	1.46	1.00
TG 47:2	0.13	0.27		0.25		0.10
TG 48:5	0.25	0.23				
TG 48:4	1.65	1.63		0.67		0.30
TG 48:3	8.16	8.09		5.04	3.04	3.20
TG 48:2	24.43	22.98		21.20	12.57	14.50
TG 48:1	33.70	28.74		31.94	19.05	21.70
TG 48:0	5.87	5.49		7.34	4.89	4.50
TG 49:3	0.49	0.41		0.38		0.20
TG 49:2	22.34	23.29		8.42	8.02	4.70
TG 50:5	2.15	2.60		0.90		0.60
TG 50:4	18.29	16.87		7.57		6.00
TG 50:3	88.55	78.83		38.64	28.58	31.70
TG 50:2	221.42	198.11		99.21	71.14	80.70
TG 50:1	154.64	149.16		78.99	57.84	65.50
TG 51:4	2.60	1.80		1.07		0.40
TG 51:3	5.91	5.01		3.20		2.30
TG 51:2	12.27	10.63		5.83		4.50

<b>TG 51:1</b>	3.18	3.23		2.42		1.20
<b>TG 52:7</b>	0.36	0.35		0.16		0.10
<b>TG 52:6</b>	4.73	4.05		1.94		1.50
<b>TG 52:5</b>	37.47	31.25		15.42	13.09	
<b>TG 52:4</b>	200.69	171.65		77.56	66.42	
<b>TG 52:3</b>	566.53	504.97		208.54	172.59	202.60
<b>TG 52:2</b>	643.55	571.74		230.72	184.23	208.50
<b>TG 52:1</b>	44.35	23.18		15.88		14.30
<b>TG 53:3</b>	4.55	3.80		2.52		2.20
<b>TG 53:2</b>	9.50	8.88		4.42		1.70
<b>TG 54:8</b>	0.43	0.51		0.34		0.20
<b>TG 54:7</b>	7.82	6.53		3.29		3.20
<b>TG 54:6</b>	35.45	29.06		15.81		
<b>TG 54:5</b>	82.69	68.11		36.16	32.73	38.20
<b>TG 54:4</b>	136.35	113.75		54.13	48.48	49.60
<b>TG 54:3</b>	153.65	129.77		56.20	49.76	50.70
<b>TG 54:2</b>	34.99	32.58		13.05		12.40
<b>TG 54:1</b>		5.65				
<b>TG 56:9</b>	1.36	1.25		0.34		0.10
<b>TG 56:8</b>	8.04	6.65		3.35		2.60
<b>TG 56:7</b>	22.60	18.16		9.79	8.69	
<b>TG 56:6</b>	24.01	19.12		11.37	9.87	15.10
<b>TG 56:5</b>	13.34	10.83		6.68	5.95	6.40
<b>TG 56:4</b>	2.60	1.93		1.47		1.60
<b>TG 56:3</b>	1.60	1.61		0.65		0.60
<b>TG 56:2</b>	0.40	0.55		0.26		
<b>TG 58:11</b>	0.57	0.53				
<b>TG 58:9</b>	2.38	2.02		0.44		
<b>TG 58:8</b>	2.62	2.18		0.77		
<b>TG 58:7</b>	15.23	15.78		3.36		
<b>TG 58:6</b>		1.36				0.50
<b>TG 60:12</b>		0.40				
<b>TG 60:11</b>		0.48				
<b>TG 60:10</b>	0.42	0.38		0.09		
	<b>DG 28:0</b>	<b>DG 36:2 d5</b>	<b>DG 33:1 d7</b>			
<b>DG 30:1</b>	0.23	0.34	0.34			
<b>DG 30:0</b>	1.04	0.98	1.01	0.38	0.35	
<b>DG 32:2</b>	0.57	0.48	0.49		0.17	
<b>DG 32:1</b>	3.36	2.56	2.64	1.19	1.02	
<b>DG 32:0</b>	2.86	2.58	2.65	1.50	1.51	0.46
<b>DG 34:3</b>	1.27	1.11	1.14	0.24	0.26	
<b>DG 34:2</b>	7.76	6.58	6.79	2.71	2.72	0.48

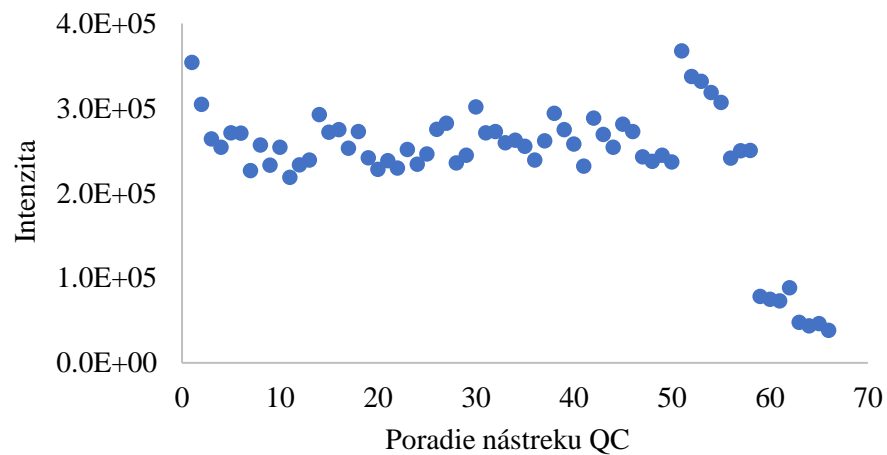
<b>DG 34:1</b>	<i>13.17</i>	<i>9.67</i>	<i>9.96</i>	<i>7.67</i>	<i>7.53</i>	<i>1.44</i>
<b>DG 34:0</b>	<i>0.80</i>	<i>0.49</i>	<i>0.50</i>	<i>0.64</i>	<i>0.92</i>	
<b>DG 36:4</b>	<i>3.56</i>	<i>3.05</i>	<i>3.13</i>	<i>1.11</i>	<i>1.33</i>	
<b>DG 36:3</b>	<i>9.10</i>	<i>8.17</i>	<i>8.41</i>	<i>2.76</i>	<i>2.95</i>	<i>0.39</i>
<b>DG 36:2</b>	<i>9.91</i>	<i>9.31</i>	<i>9.59</i>	<i>5.42</i>	<i>5.39</i>	<i>0.78</i>
<b>DG 36:0</b>	<i>0.20</i>	<i>0.17</i>	<i>0.18</i>	<i>0.25</i>	<i>0.47</i>	<i>0.14</i>
<b>DG 38:6</b>	<i>1.52</i>	<i>1.41</i>	<i>1.45</i>	<i>0.76</i>	<i>0.76</i>	
<b>DG 38:5</b>	<i>1.36</i>	<i>1.17</i>	<i>1.20</i>	<i>1.15</i>	<i>1.13</i>	
<b>DG 38:4</b>	<i>0.00</i>	<i>0.87</i>	<i>0.89</i>	<i>0.57</i>		
<b>DG 38:2</b>	<i>1.66</i>	<i>1.66</i>	<i>1.72</i>	<i>3.04</i>	<i>3.93</i>	
<b>DG 40:8</b>	<i>0.00</i>	<i>1.26</i>	<i>1.30</i>			
<b>DG 40:7</b>	<i>1.66</i>	<i>1.49</i>	<i>1.54</i>	<i>0.65</i>	<i>0.63</i>	
<b>DG 40:6</b>	<i>0.84</i>	<i>0.68</i>	<i>0.70</i>	<i>0.71</i>	<i>0.62</i>	
	<b>MG 18:1 d7</b>	<b>MG 19:1</b>				
<b>MG 16:0</b>	<i>9.39</i>	<i>6.68</i>		<i>8.31</i>	<i>16.51</i>	<i>45.30</i>
<b>MG 18:1</b>	<i>1.04</i>	<i>0.25</i>		<i>0.87</i>	<i>1.81</i>	
<b>MG 18:0</b>	<i>6.67</i>	<i>2.94</i>		<i>19.56</i>	<i>45.71</i>	<i>30.20</i>
	<b>Cer 36:1 d7</b>	<b>Cer 35:1</b>	<b>Cer 30:1</b>			
<b>Cer 34:1</b>	<i>0.33</i>	<i>0.28</i>	<i>1.04</i>	<i>0.16</i>	<i>0.15</i>	<i>0.10</i>
<b>Cer 36:1</b>	<i>0.10</i>	<i>0.09</i>	<i>0.34</i>			
<b>Cer 38:1</b>	<i>0.19</i>	<i>0.17</i>	<i>0.65</i>	<i>0.10</i>		
<b>Cer 40:2</b>	<i>0.24</i>	<i>0.18</i>	<i>0.69</i>	<i>0.10</i>		
<b>Cer 40:1</b>	<i>1.03</i>	<i>0.87</i>	<i>3.29</i>	<i>0.60</i>	<i>0.50</i>	<i>0.40</i>
<b>Cer 41:1</b>	<i>1.05</i>	<i>0.84</i>	<i>3.18</i>	<i>0.53</i>	<i>0.45</i>	<i>0.40</i>
<b>Cer 42:2</b>	<i>2.00</i>	<i>1.58</i>	<i>5.71</i>	<i>1.05</i>	<i>0.97</i>	
<b>Cer 42:3</b>	<i>0.22</i>	<i>0.20</i>	<i>0.73</i>	<i>0.12</i>		
<b>Cer 42:1</b>	<i>4.11</i>	<i>3.09</i>	<i>11.52</i>	<i>2.24</i>	<i>2.05</i>	<i>1.60</i>
<b>Cer 43:1</b>	<i>0.00</i>	<i>0.22</i>	<i>0.74</i>	<i>0.18</i>		<i>0.10</i>
	<b>PC 33:1 d7</b>	<b>PC 28:0</b>	<b>PC 44:2</b>			
<b>PC 30:0</b>	<i>4.45</i>	<i>2.71</i>	<i>4.30</i>	<i>1.47</i>	<i>1.37</i>	<i>6.50</i>
<b>PC O-32:2/P-32:1</b>		<i>0.11</i>	<i>0.18</i>			
<b>PC O-32:1/P-32:0</b>	<i>3.32</i>	<i>1.92</i>	<i>3.05</i>			<i>2.70</i>
<b>PC 32:2</b>	<i>4.42</i>	<i>3.03</i>	<i>4.81</i>	<i>1.52</i>	<i>1.53</i>	<i>6.60</i>
<b>PC 32:1</b>	<i>27.72</i>	<i>17.81</i>	<i>28.24</i>	<i>11.45</i>	<i>10.77</i>	<i>55.20</i>
<b>PC 32:0</b>	<i>19.09</i>	<i>10.91</i>	<i>17.28</i>	<i>8.00</i>	<i>7.78</i>	<i>41.50</i>
<b>PC O-34:3/P-34:2</b>	<i>11.41</i>	<i>6.31</i>	<i>10.00</i>	<i>2.76</i>	<i>3.32</i>	<i>11.40</i>
<b>PC O-34:2/P-34:1</b>	<i>16.69</i>	<i>10.06</i>	<i>15.95</i>	<i>5.13</i>		
<b>PC 34:3</b>	<i>24.30</i>	<i>13.57</i>	<i>21.50</i>	<i>7.79</i>	<i>8.38</i>	<i>40.70</i>
<b>PC 34:2</b>	<i>1348.68</i>	<i>797.45</i>	<i>1265.35</i>	<i>506.44</i>	<i>534.84</i>	<i>2925.80</i>
<b>PC 34:1</b>	<i>629.58</i>	<i>329.32</i>	<i>522.17</i>	<i>240.75</i>	<i>245.16</i>	<i>1419.90</i>

<b>PC O-36:5/P-36:4</b>	<i>12.41</i>	<i>6.71</i>	<i>10.63</i>	<i>3.57</i>	<i>4.25</i>	<i>13.70</i>
<b>PC O-36:4/P-36:3</b>	<i>22.96</i>	<i>13.59</i>	<i>21.54</i>	<i>7.61</i>	<i>8.05</i>	<i>39.00</i>
<b>PC O-36:3/P-36:2</b>	<i>5.79</i>	<i>3.50</i>	<i>5.54</i>	<i>1.41</i>		
<b>PC 35:2</b>	<i>14.47</i>	<i>8.70</i>	<i>13.80</i>	<i>5.46</i>		
<b>PC 35:1</b>	<i>2.40</i>	<i>1.46</i>	<i>2.31</i>	<i>1.07</i>		
<b>PC 36:5</b>	<i>210.47</i>	<i>128.00</i>	<i>203.11</i>	<i>28.96</i>	<i>32.59</i>	<i>103.80</i>
<b>PC 36:4</b>	<i>615.62</i>	<i>322.60</i>	<i>511.48</i>	<i>209.64</i>	<i>226.00</i>	<i>1241.20</i>
<b>PC 36:3</b>	<i>337.40</i>	<i>196.80</i>	<i>312.18</i>	<i>127.96</i>	<i>136.22</i>	<i>760.90</i>
<b>PC 36:2</b>	<i>734.10</i>	<i>417.06</i>	<i>661.66</i>	<i>261.85</i>	<i>272.41</i>	<i>1494.20</i>
<b>PC 36:1</b>	<i>56.60</i>	<i>30.57</i>	<i>48.44</i>	<i>19.87</i>	<i>18.95</i>	<i>118.00</i>
<b>PC O-38:6/P-38:5</b>	<i>3.88</i>	<i>2.20</i>	<i>3.49</i>	<i>1.15</i>		<i>4.80</i>
<b>PC O-38:5/P-38:4</b>	<i>21.00</i>	<i>10.74</i>	<i>17.03</i>	<i>6.73</i>	<i>7.41</i>	<i>33.80</i>
<b>PC 37:3</b>	<i>0.39</i>			<i>0.95</i>		
<b>PC 38:7</b>	<i>50.27</i>			<i>4.22</i>		
<b>PC 38:6</b>	<i>154.07</i>	<i>96.64</i>	<i>153.30</i>	<i>47.64</i>	<i>61.17</i>	<i>334.10</i>
<b>PC 38:5</b>	<i>193.69</i>	<i>111.94</i>	<i>177.54</i>	<i>47.71</i>	<i>53.10</i>	<i>254.50</i>
<b>PC 38:4</b>	<i>289.06</i>	<i>163.28</i>	<i>259.01</i>	<i>104.76</i>	<i>111.06</i>	<i>618.40</i>
<b>PC 38:3</b>	<i>77.69</i>	<i>42.83</i>	<i>67.96</i>	<i>27.35</i>	<i>29.10</i>	<i>160.30</i>
<b>PC 38:2</b>	<i>0.00</i>	<i>4.36</i>	<i>6.92</i>			
<b>PC 40:7</b>	<i>30.52</i>	<i>19.33</i>	<i>30.67</i>			
<b>PC 40:6</b>	<i>43.97</i>	<i>25.71</i>	<i>40.77</i>	<i>3.14</i>	<i>3.56</i>	<i>9.40</i>
<b>PC 40:5</b>	<i>11.71</i>	<i>6.32</i>	<i>10.02</i>	<i>12.70</i>	<i>15.77</i>	<i>73.20</i>
<b>PC 40:4</b>	<i>1.33</i>	<i>0.67</i>	<i>1.06</i>	<i>3.21</i>	<i>3.67</i>	<i>17.70</i>
<b>PC O-42:5/P-42:4</b>	<i>1.04</i>	<i>0.54</i>	<i>0.86</i>	<i>0.48</i>	<i>0.48</i>	<i>3.20</i>
<b>PC O-42:4/P-42:3</b>	<i>0.34</i>	<i>0.14</i>	<i>0.22</i>	<i>0.29</i>		<i>1.10</i>
<b>PC O-42:3/P-42:2</b>	<i>0.13</i>	<i>0.09</i>	<i>0.15</i>	<i>0.10</i>		
<b>PC O-44:6/P-44:5</b>	<i>0.94</i>	<i>0.57</i>	<i>0.91</i>			
<b>PC O-44:5/P-44:4</b>	<i>1.91</i>	<i>1.28</i>	<i>2.03</i>	<i>0.54</i>		<i>1.70</i>
	<b>LPC 17:0</b>					
<b>LPC 14:0</b>	<i>1.39</i>			<i>1.17</i>		<i>0.90</i>
<b>LPC 16:1</b>	<i>2.40</i>			<i>1.23</i>	<i>1.51</i>	<i>0.70</i>
<b>LPC 16:0</b>	<i>169.81</i>			<i>122.92</i>	<i>159.55</i>	<i>142.00</i>
<b>LPC 18:2</b>	<i>36.63</i>			<i>25.02</i>	<i>32.58</i>	<i>29.60</i>
<b>LPC 18:1</b>	<i>27.47</i>			<i>18.02</i>	<i>23.31</i>	<i>19.70</i>
<b>LPC 18:0</b>	<i>53.48</i>			<i>28.77</i>	<i>35.65</i>	<i>31.40</i>
<b>LPC 20:4</b>	<i>6.40</i>			<i>4.07</i>	<i>5.10</i>	<i>4.70</i>

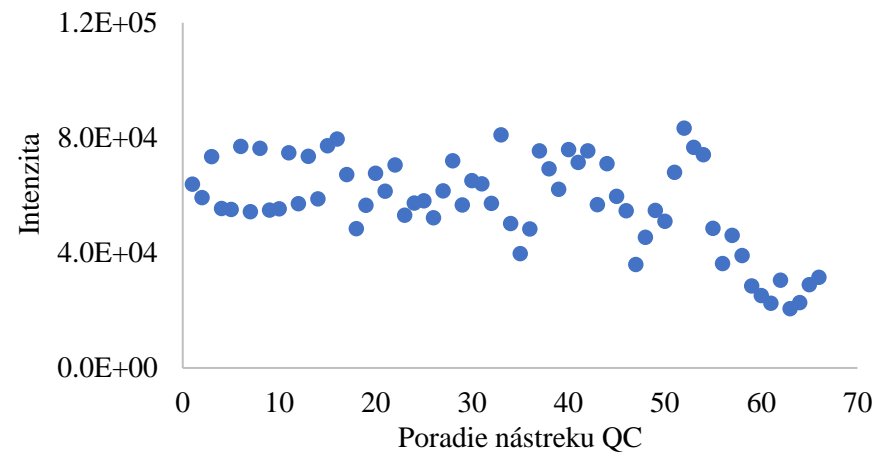
	<b>SM 36:2 d9</b>	<b>SM 30:1</b>				
<b>SM 32:1</b>	<i>12.02</i>	<i>10.38</i>		8.34	7.81	7.00
<b>SM 33:1</b>	<i>7.47</i>	<i>6.67</i>		5.17	4.66	3.60
<b>SM 34:2</b>	<i>20.50</i>	<i>22.00</i>		14.05	14.39	12.60
<b>SM 34:1</b>	<i>226.00</i>	<i>193.46</i>		201.83	204.20	208.90
<b>SM 35:1</b>	<i>3.14</i>	<i>3.27</i>				1.50
<b>SM 36:2</b>	<i>10.56</i>	<i>9.91</i>		8.96	9.18	7.50
<b>SM 36:1</b>	<i>30.16</i>	<i>33.10</i>			24.79	23.40
<b>SM 37:1</b>	<i>0.95</i>	<i>1.47</i>		1.01		0.40
<b>SM 38:2</b>	<i>6.80</i>	<i>6.45</i>		5.03	5.18	3.90
<b>SM 38:1</b>	<i>22.47</i>	<i>30.72</i>		19.43	19.08	17.00
<b>SM 39:1</b>	<i>5.12</i>	<i>7.69</i>		4.56	4.18	3.30
<b>SM 40:2</b>	<i>36.27</i>	<i>39.27</i>			28.08	25.00
<b>SM 40:1</b>	<i>41.05</i>	<i>58.47</i>		35.20	34.73	33.40
<b>SM 41:2</b>	<i>13.58</i>	<i>15.70</i>		9.69	9.72	8.00
<b>SM 41:1</b>	<i>12.78</i>	<i>20.05</i>		10.09	10.00	9.20
<b>SM 42:3</b>	<i>46.62</i>	<i>40.30</i>		35.66	39.82	32.30
<b>SM 42:2</b>	<i>119.24</i>	<i>132.76</i>		96.40	105.22	93.80
<b>SM 42:1</b>	<i>17.23</i>	<i>31.00</i>		11.30		10.50
<b>SM 43:2</b>	<i>1.67</i>	<i>2.50</i>		1.57		0.70



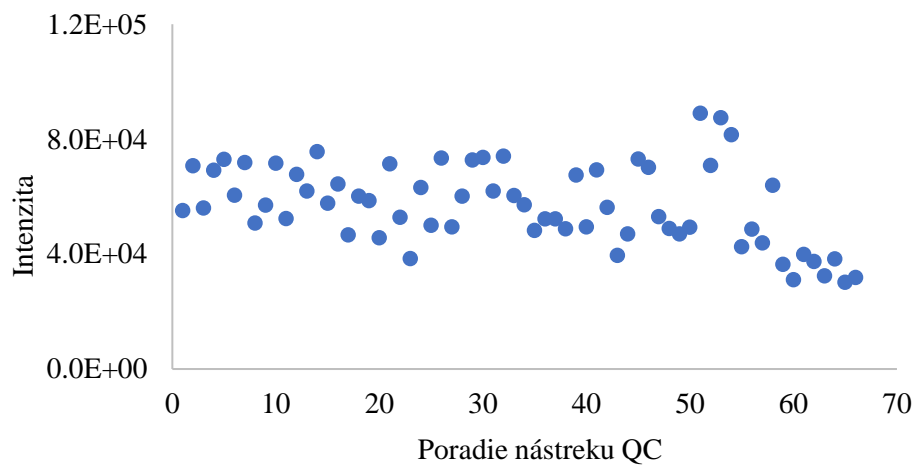
Obrázok P1: Vzorový chromatogram plazmatických lipidov



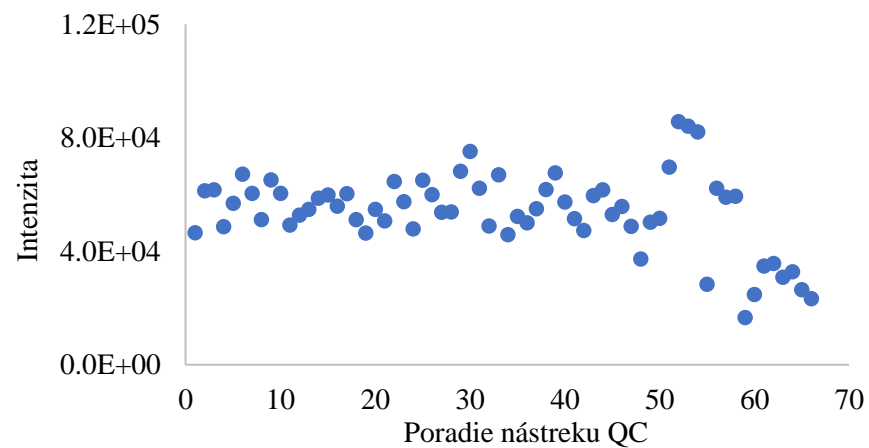
Graf P 1: Stability signálu CE 19:0 pre QC vzorky



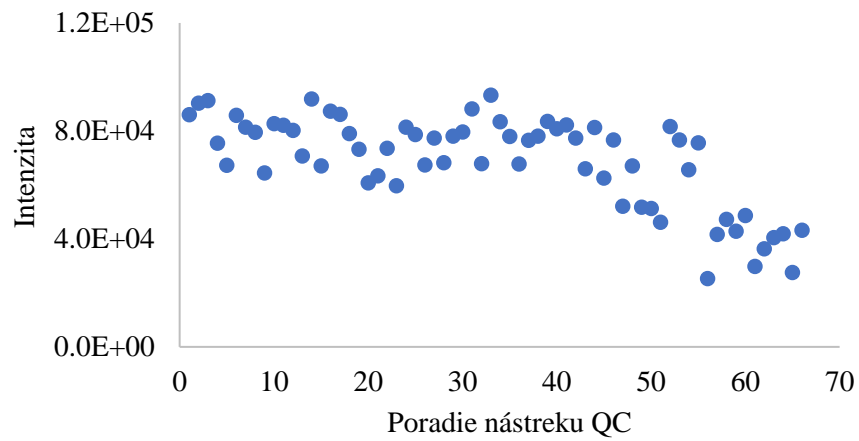
Graf P 3: Stability signálu Cer 36:1 d7 pre QC vzorky



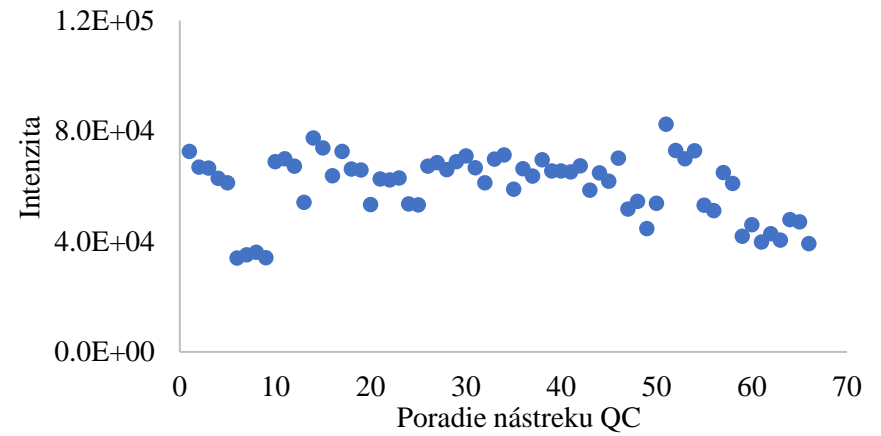
Graf P 2: Stability signálu Cer 35:1 pre QC vzorky



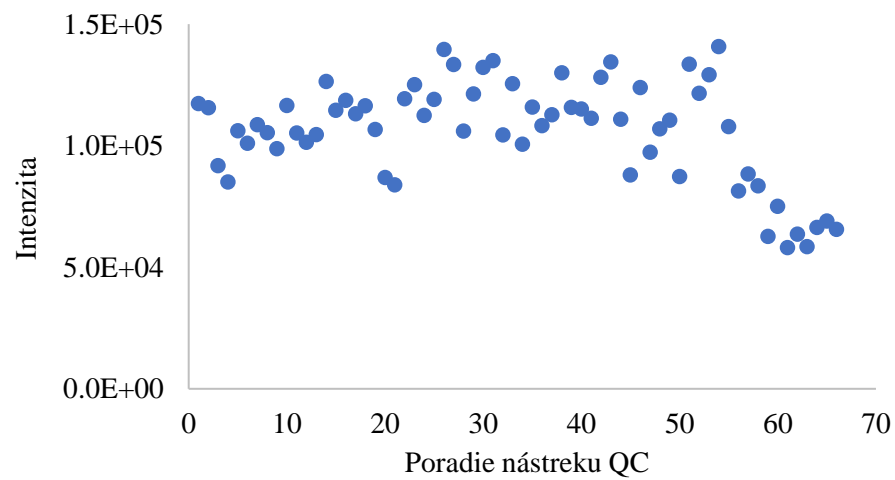
Graf P 4: Stability signálu Cer 30:1 pre QC vzorky



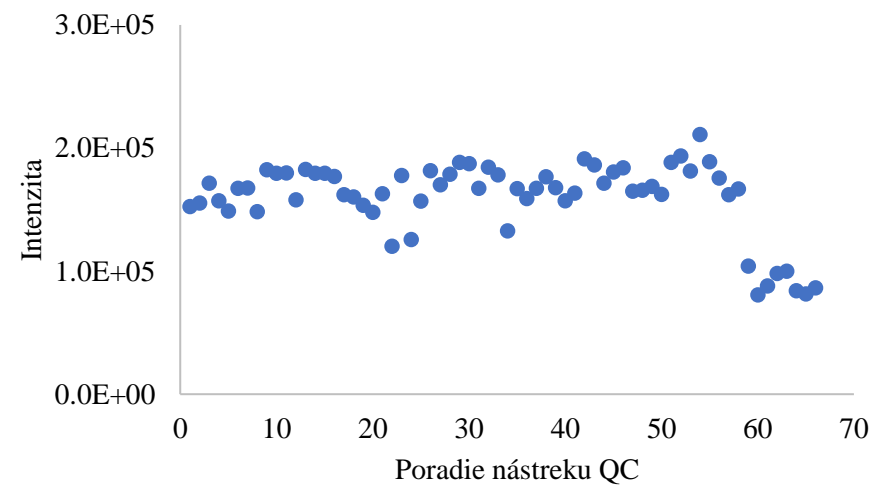
Graf P5: Stability signálu DG 36:2 d5 pre QC vzorky



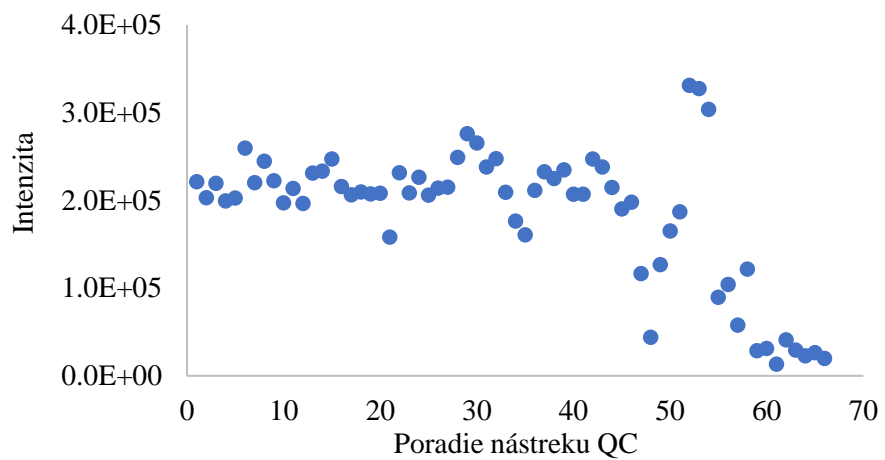
Graf P 7: Stability signálu DG 33:1 d7 pre QC vzorky



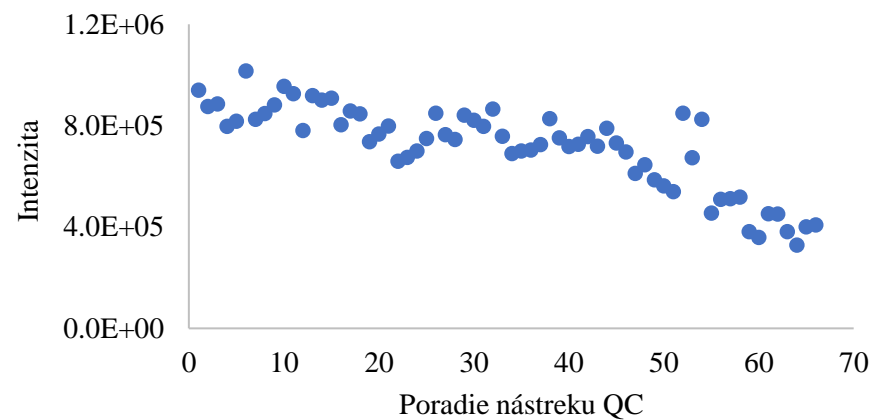
Graf P 6: Stability signálu DG 28:0 pre QC vzorky



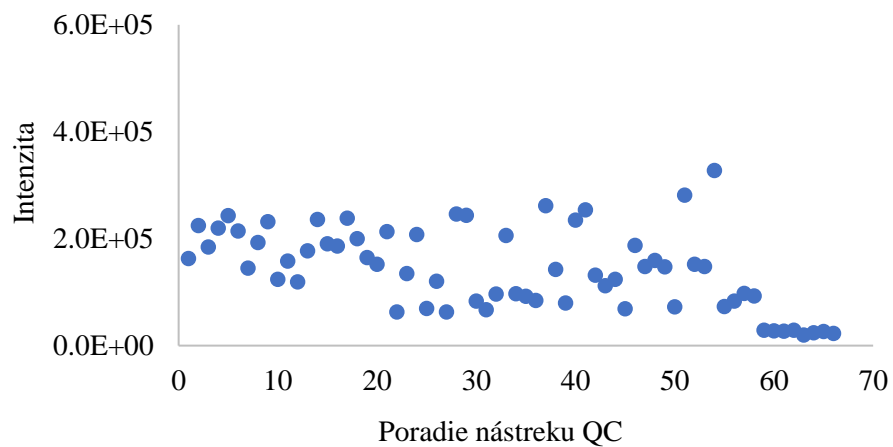
Graf P 8: Stability signálu LPC 17:0 pre QC vzorky



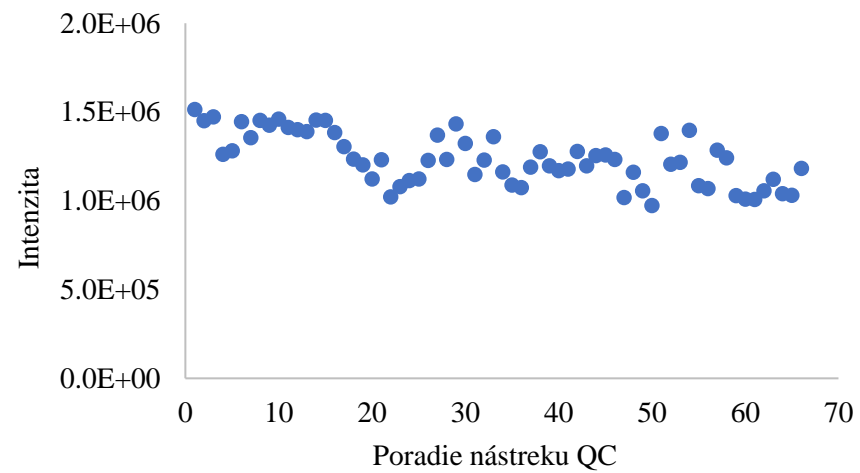
*Graf P 9: Stability signálu MG 19:1 pre QC vzorky*



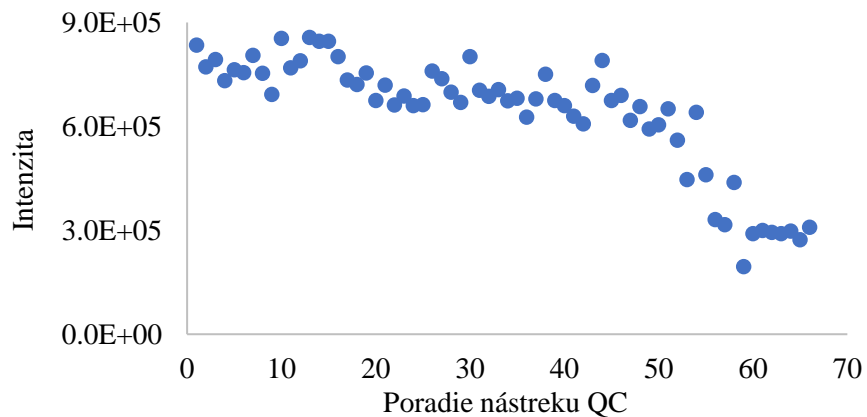
*Graf P 11: Stability signálu PC 33:1 d7 pre QC vzorky*



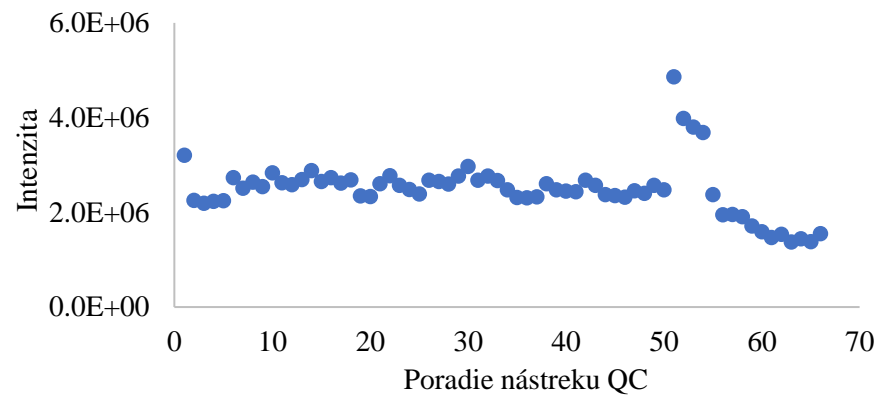
*Graf P 10: Stability signálu MG 18:1 d7 pre QC vzorky*



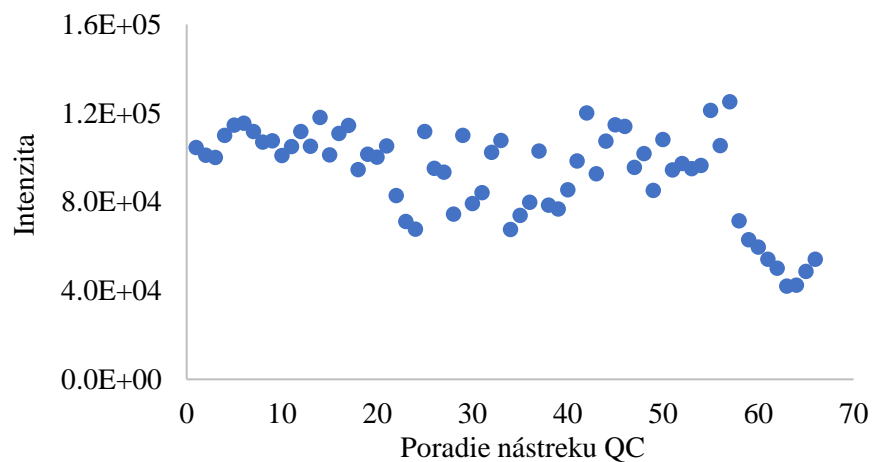
*Graf P 12: Stability signálu PC 28:0 pre QC vzorky*



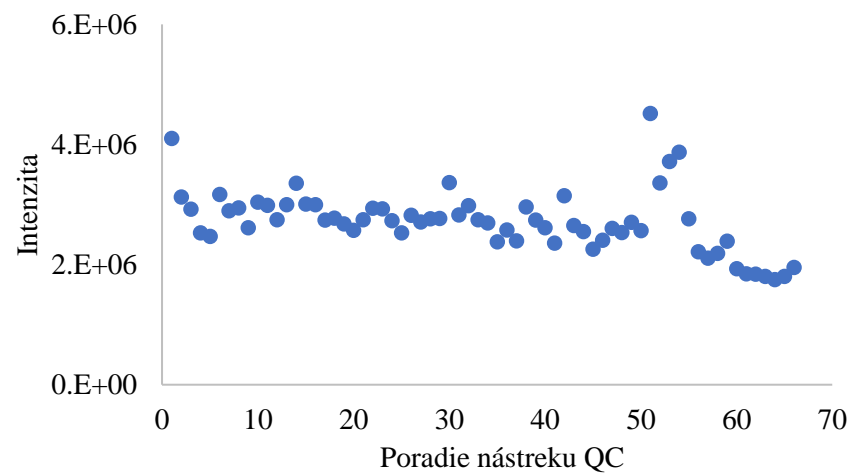
Graf P 13: Stability signálu PC 44:2 pre QC vzorky



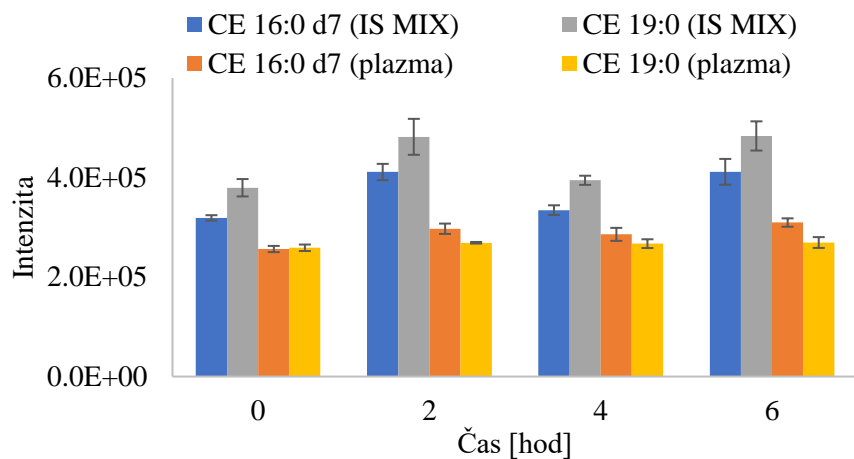
Graf P 15: Stability signálu TG 48:1 d7 pre QC vzorky



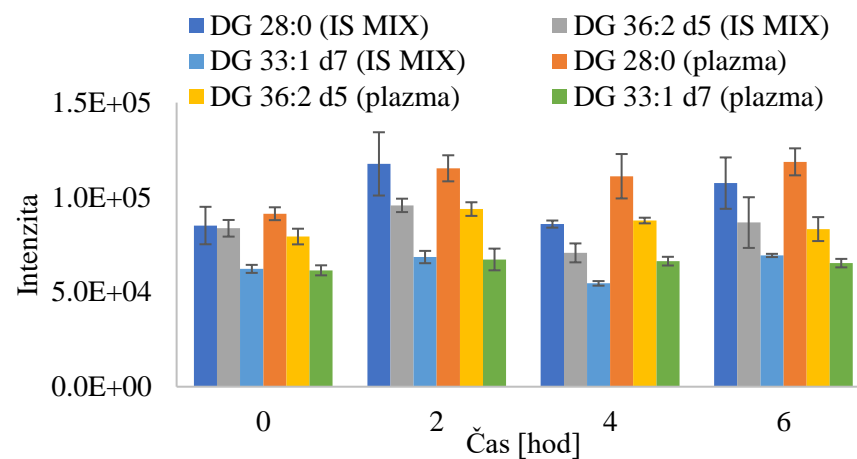
Graf P 14: Stability signálu SM 30:1 pre QC vzorky



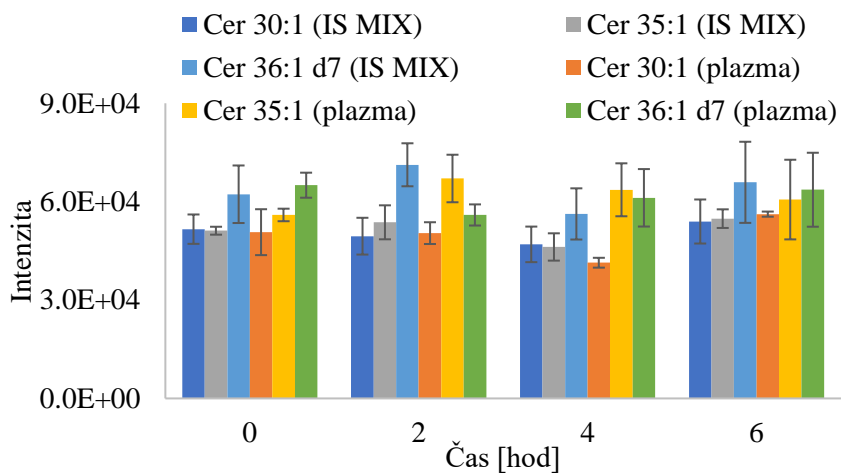
Graf P 16: Stability signálu TG 57:3 pre QC vzorky



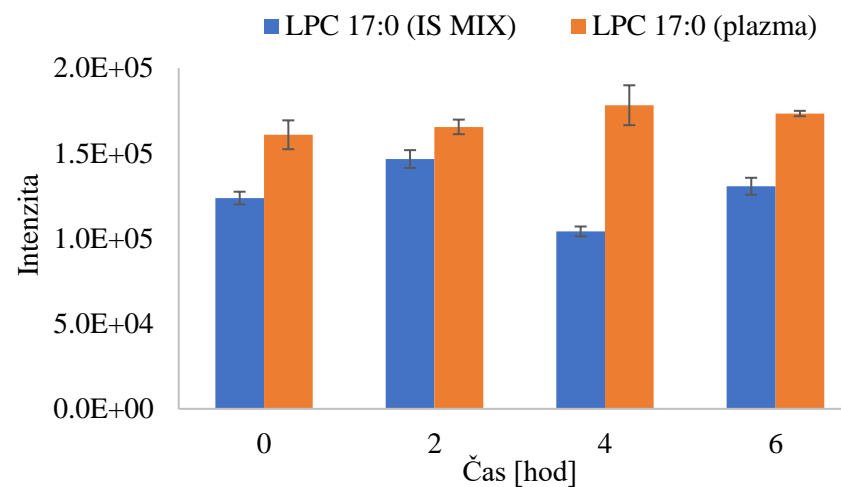
Graf P 17: Krátkodobá stabilita CE v IS MIX



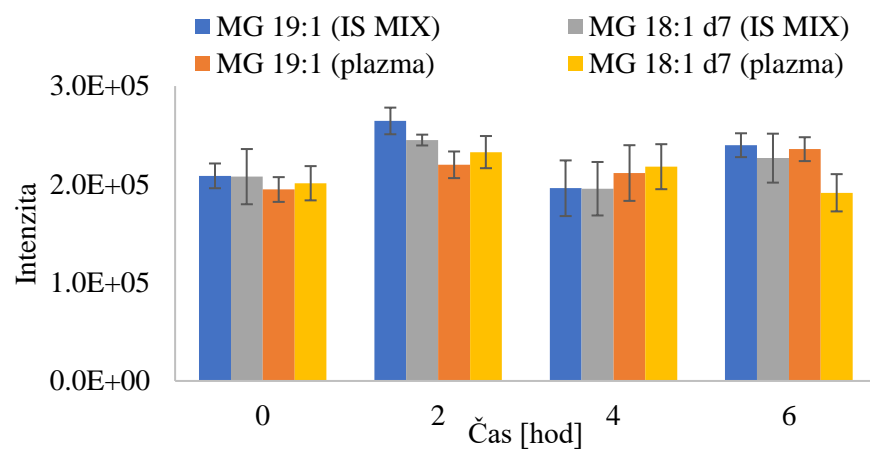
Graf P 19: Krátkodobá stabilita DG v IS MIX



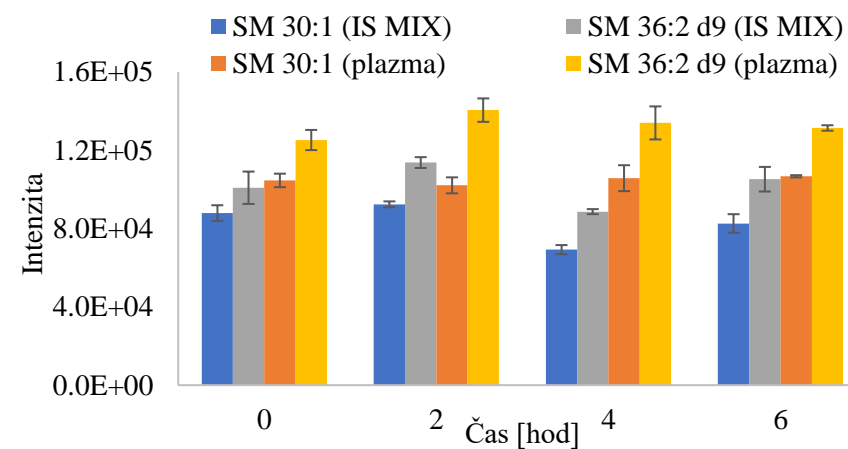
Graf P 18: Krátkodobá stabilita Cer v IS MIX



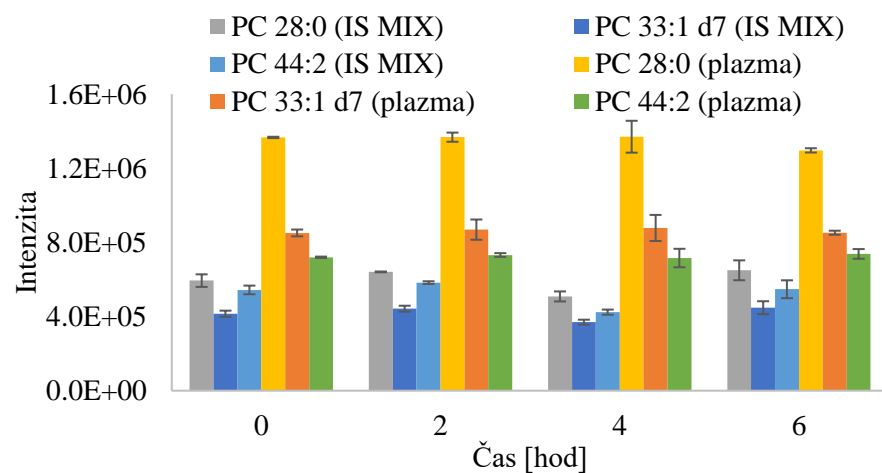
Graf P 20: Krátkodobá stabilita LPC v IS MIX



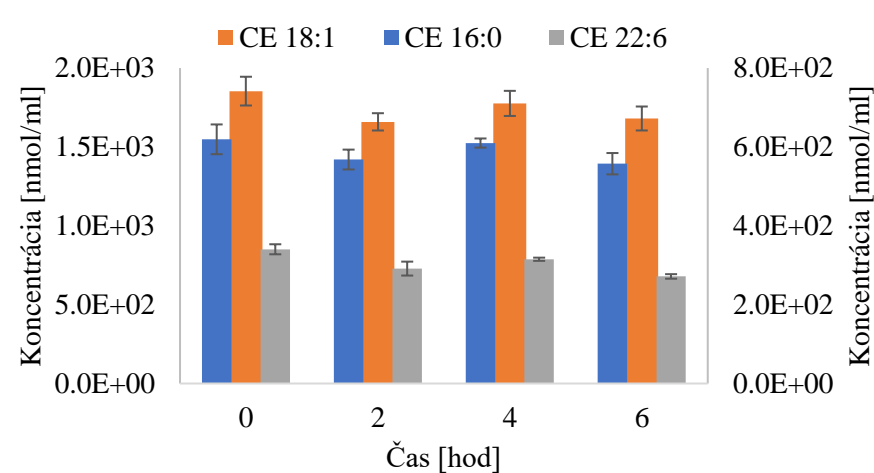
Graf P 21: Krátkodobá stabilita MG v IS MIX



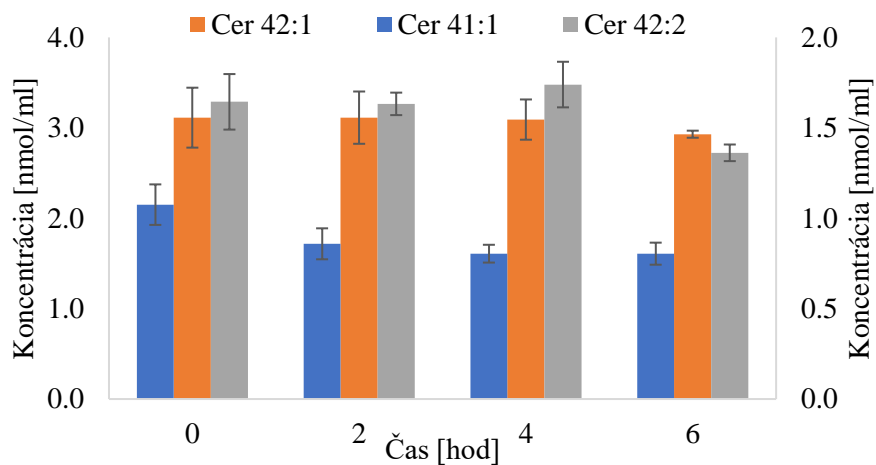
Graf P 23: Krátkodobá stabilita SM v IS MIX



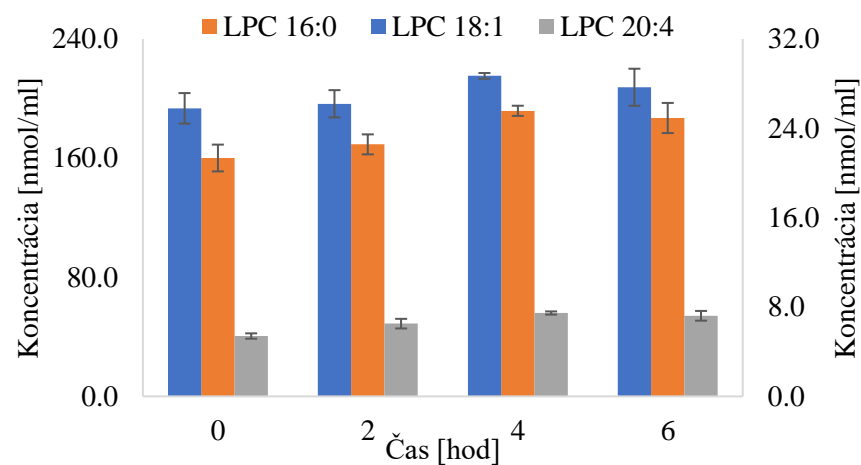
Graf P 22: Krátkodobá stabilita PC v IS MIX



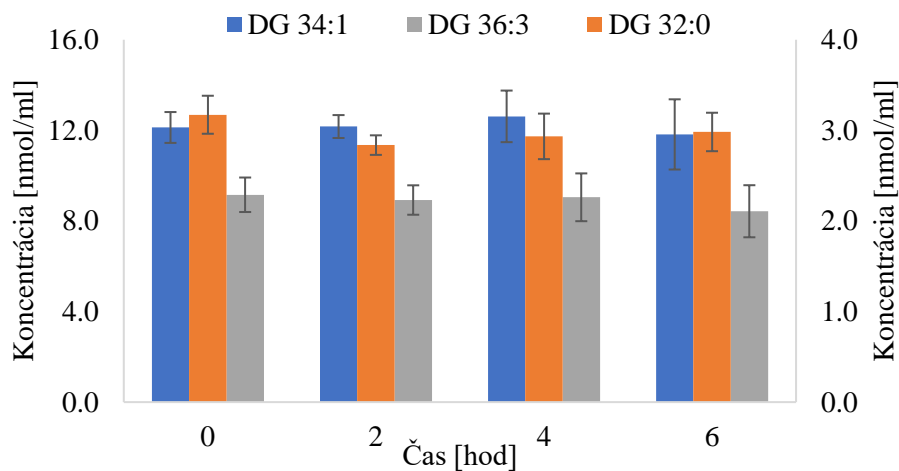
Graf P 24: Krátkodobá stabilita vybraných CE v plazme



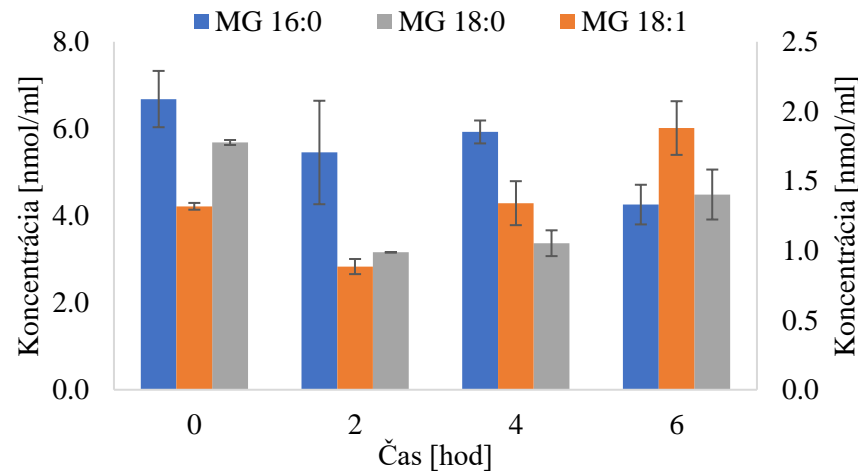
Graf P 25: Krátkodobá stabilita vybraných Cer v plazme



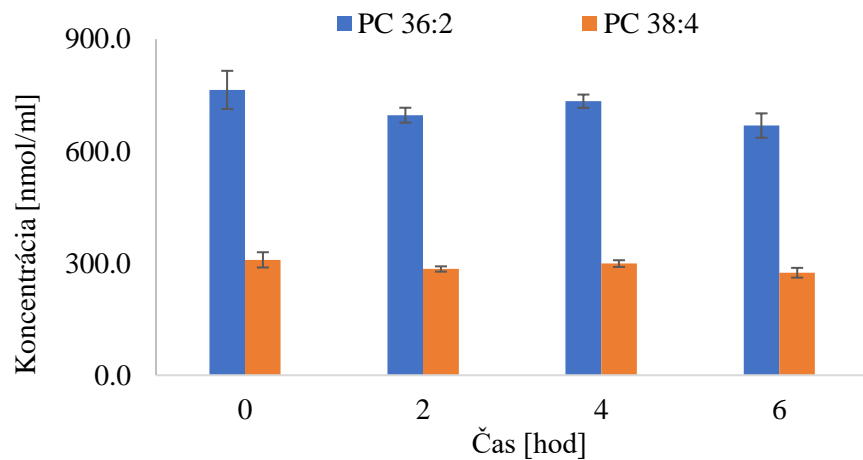
Graf P 27: Krátkodobá stabilita vybraných LPC v plazme



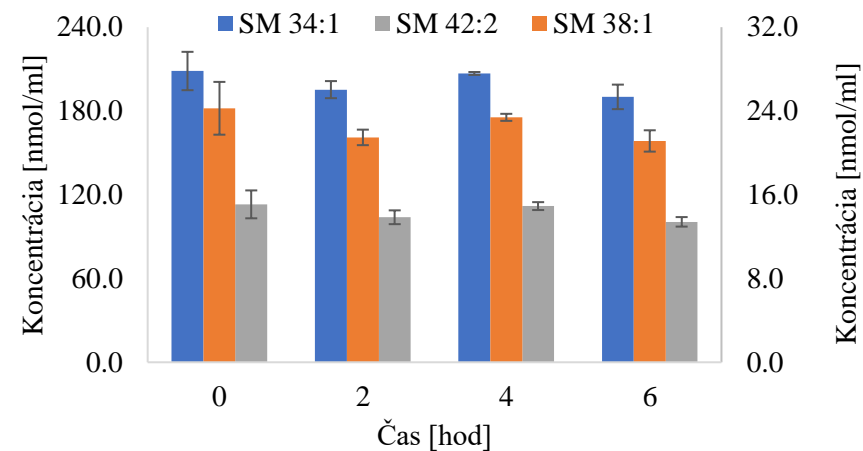
Graf P 26: Krátkodobá stabilita vybraných DG v plazme



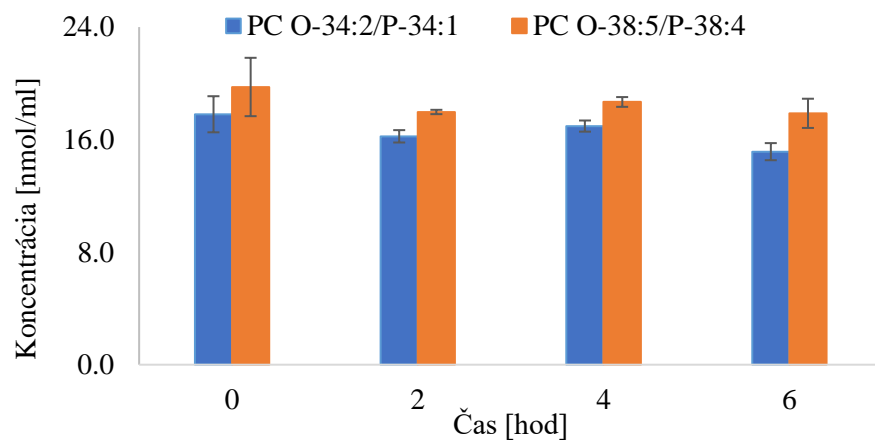
Graf P 28: Krátkodobá stabilita vybraných MG v plazme



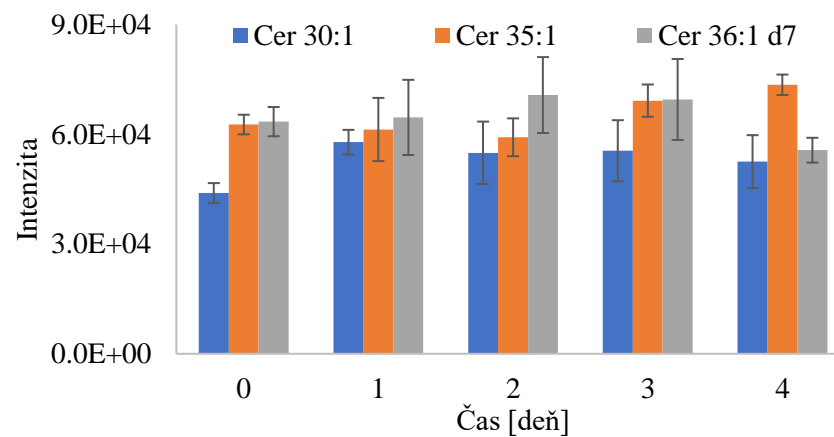
Graf P 29: Krátkodobá stabilita vybraných PC v plazme



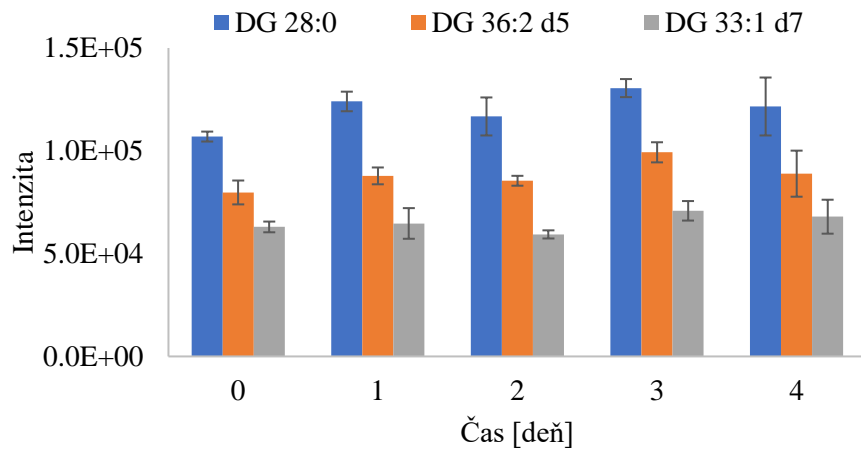
Graf P 31: Krátkodobá stabilita vybraných SM v plazme



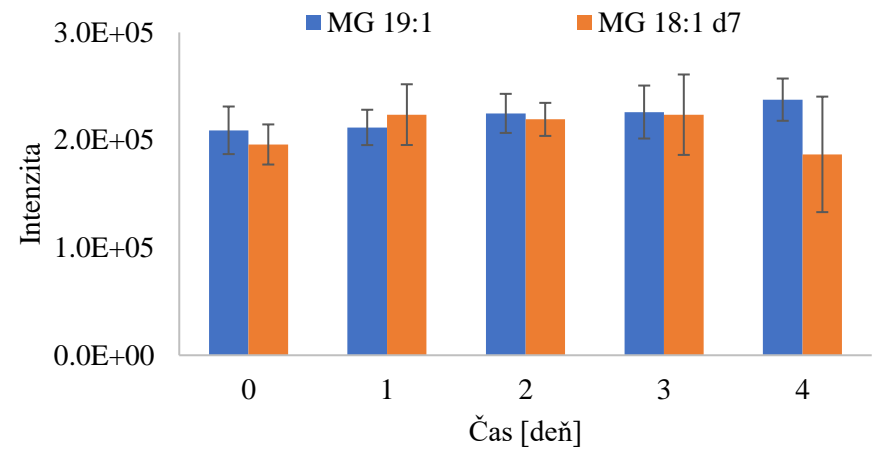
Graf P 30: Krátkodobá stabilita vybraných plazmalogénov v plazme



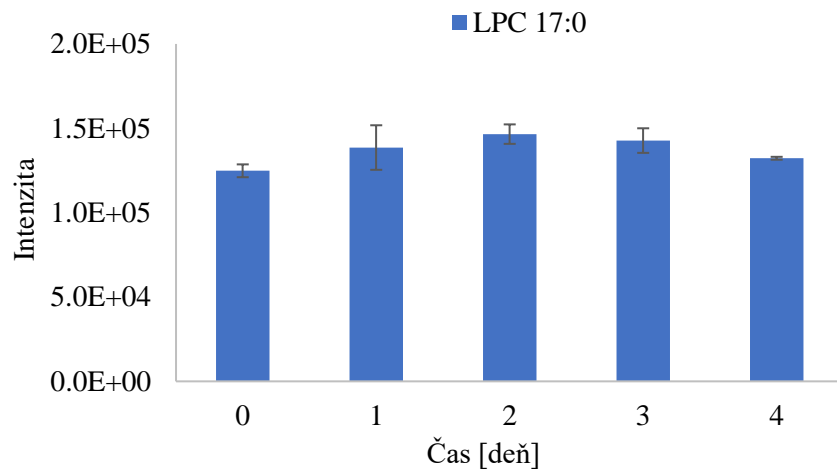
Graf P 32: Stabilita Cer v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



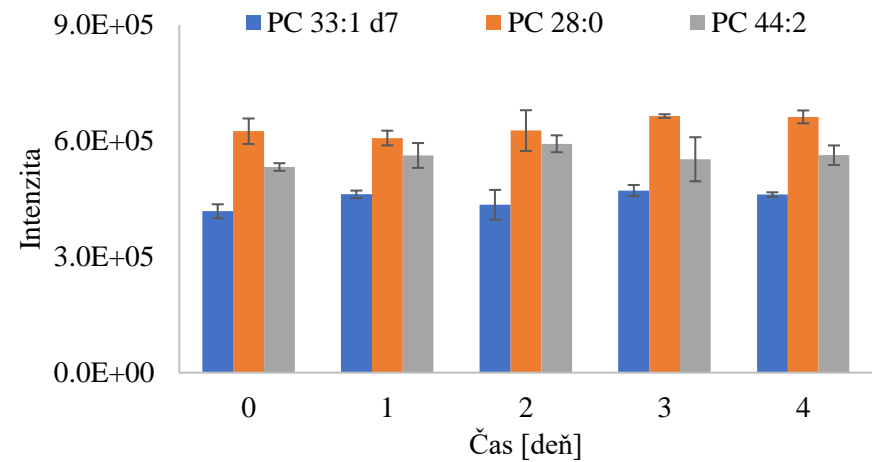
Graf P 33: Stabilita DG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



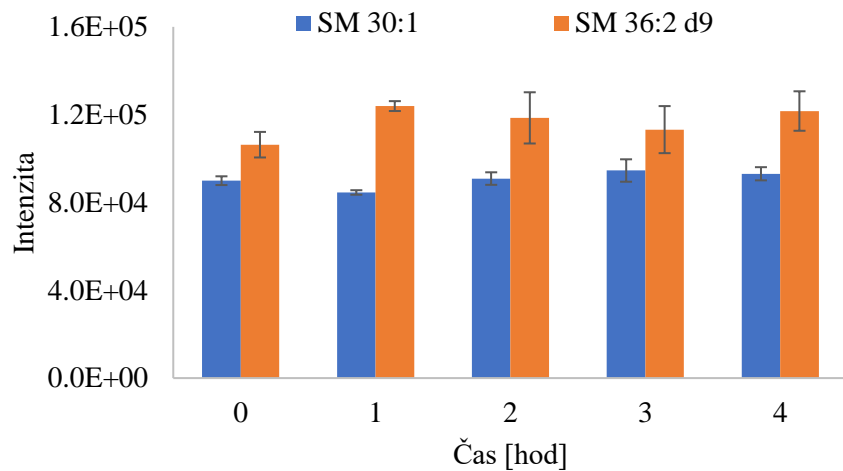
Graf P 35: Stabilita MG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



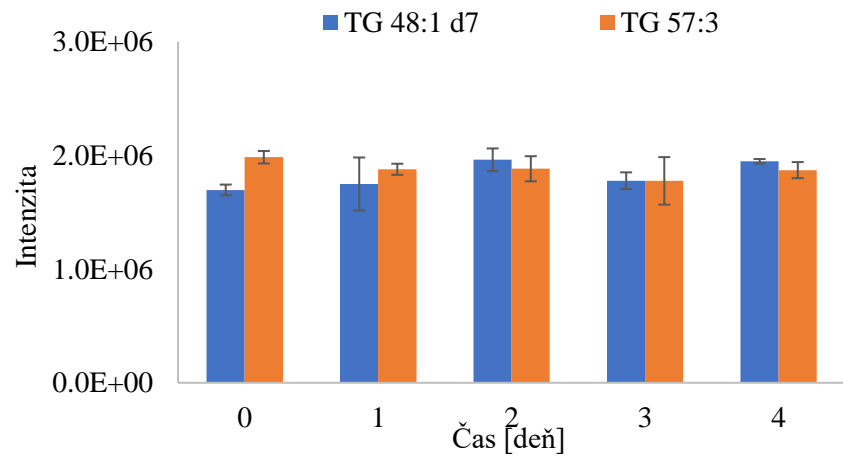
Graf P 34: Stabilita LPC v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



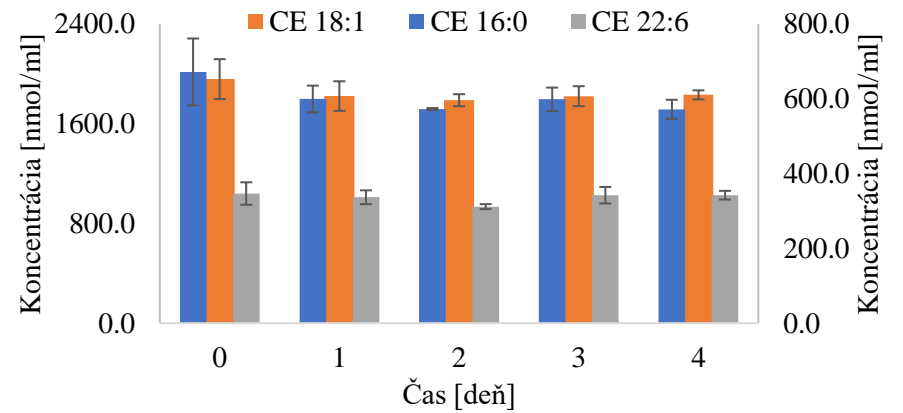
Graf P 36: Stabilita PC v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



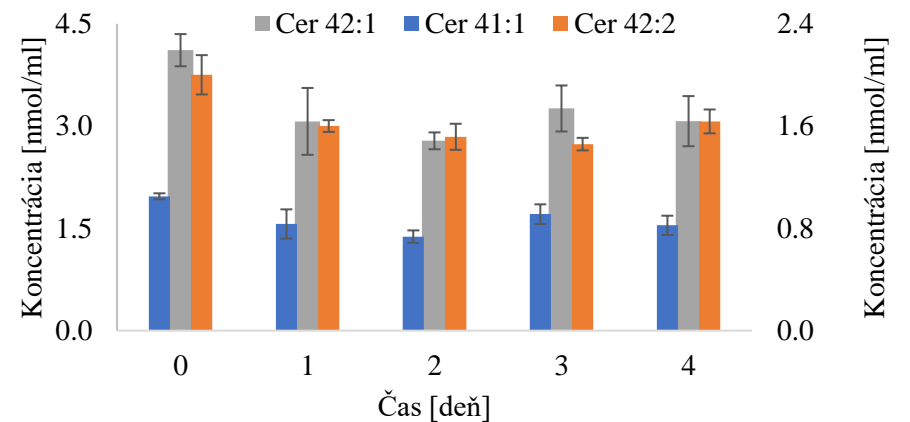
Graf P 37: Stabilita SM v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



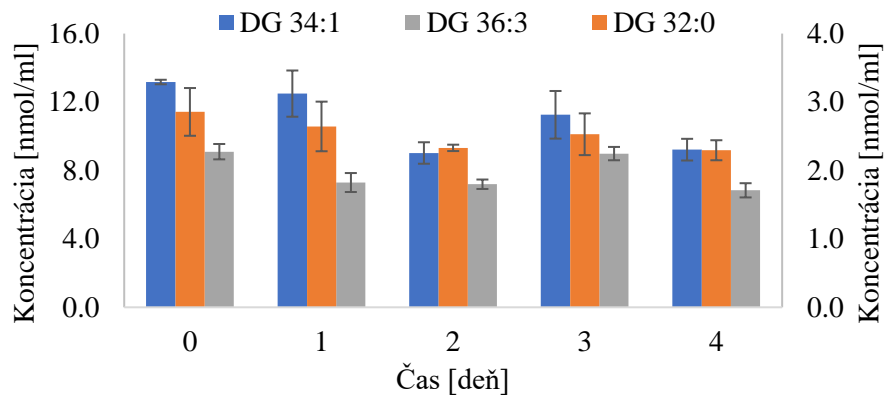
Graf P 38: Stabilita TG v priebehu rozmrazovacích cyklov IS MIX



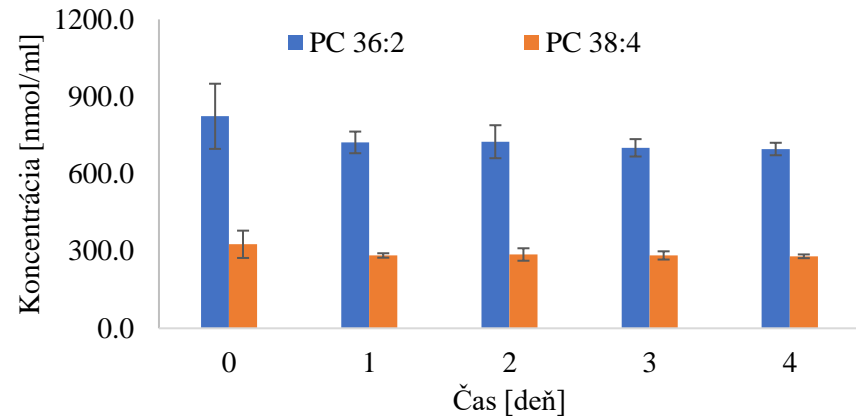
Graf P 39: Stabilita vybraných CE v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



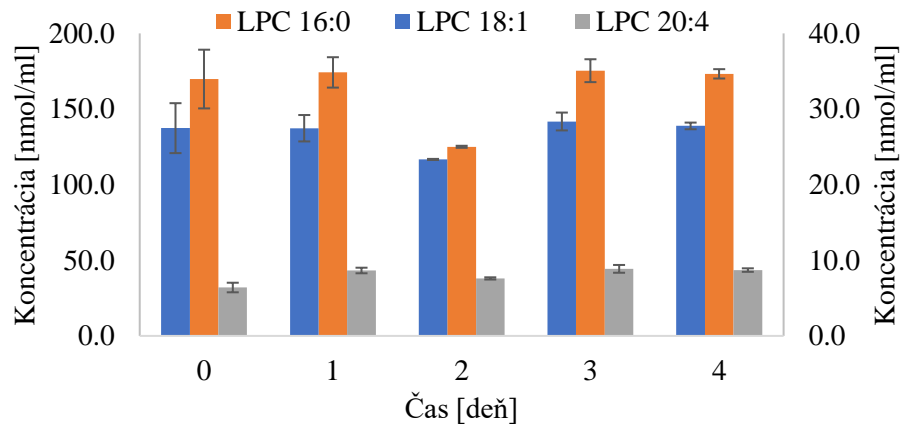
Graf P 40: Stabilita vybraných Cer v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



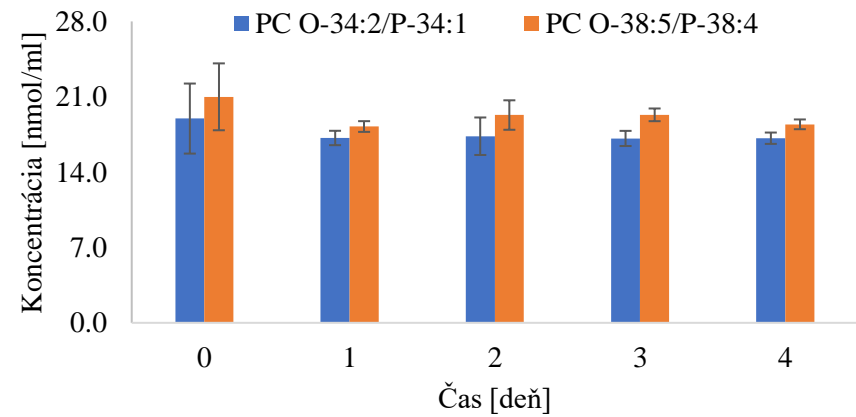
Graf P 41: Stabilita vybraných DG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



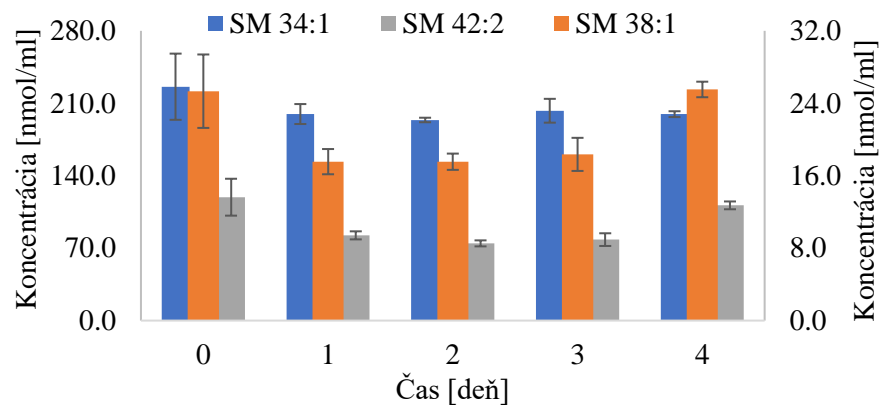
Graf P 43: Stabilita vybraných PC v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



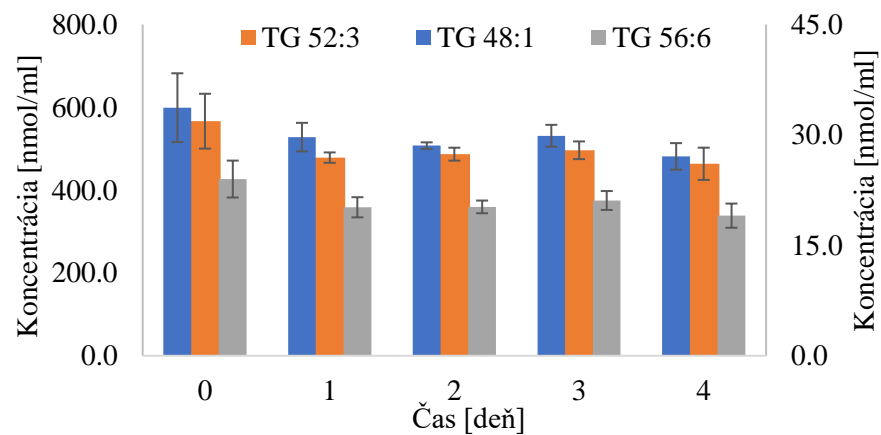
Graf P 42: Stabilita vybraných LPC v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



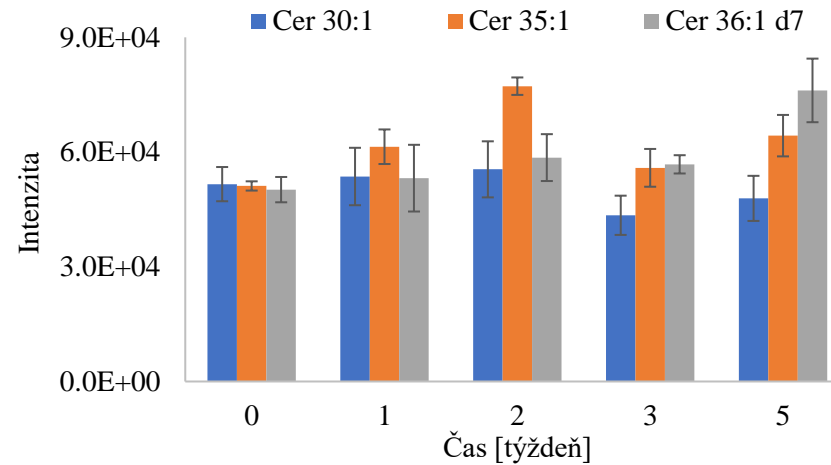
Graf P 44: Stabilita vybraných plazmalogénov v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



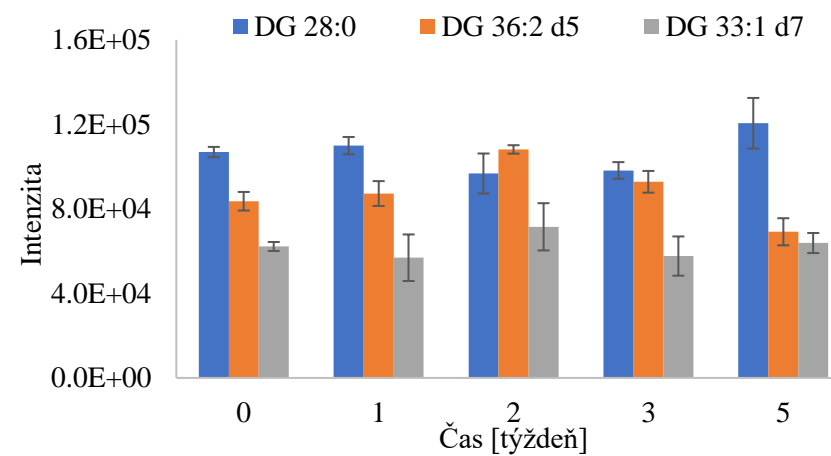
Graf P 45: Stabilita vybraných SM v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



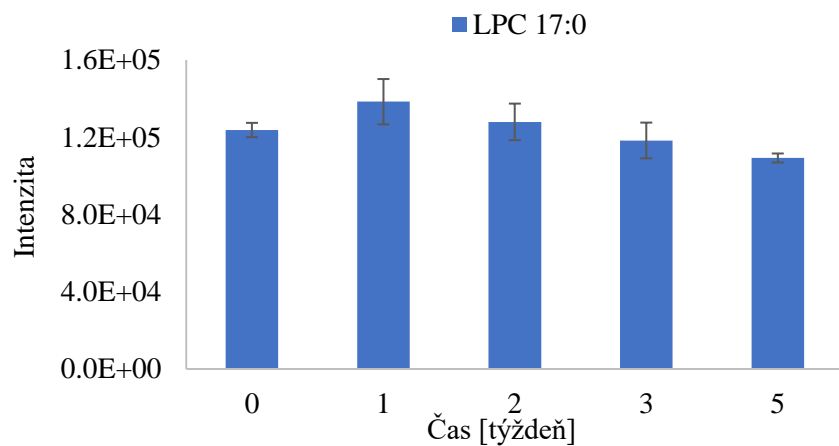
Graf P 46: Stabilita vybraných TG v priebehu rozmrazovacích cyklov plazmy



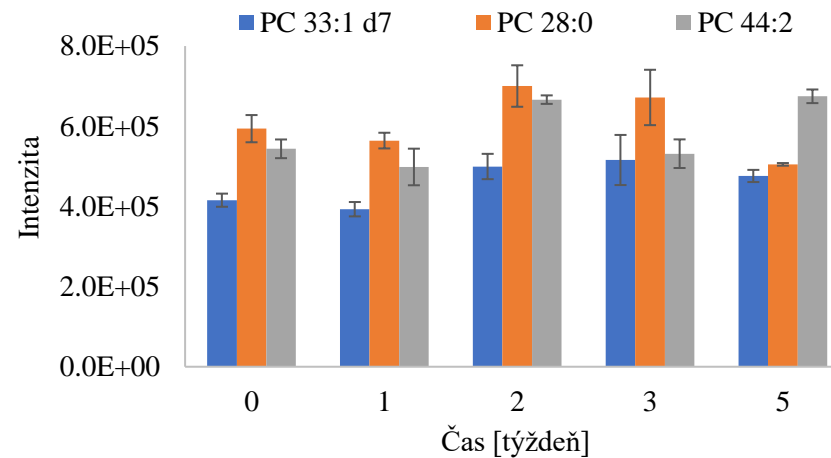
Graf P 47: Dlhodobá stabilita Cer po normalizácii dát



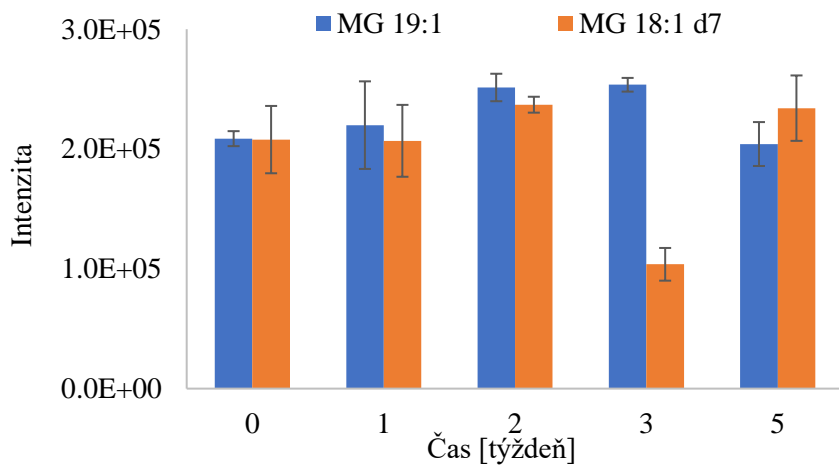
Graf P 48: Dlhodobá stabilita DG po normalizácii dát



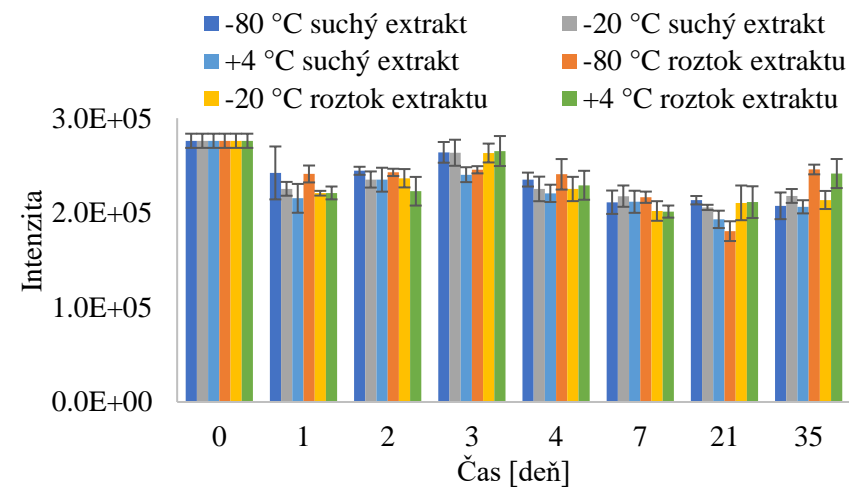
Graf P 49: Dlhodobá stabilita LPC po normalizácii dát



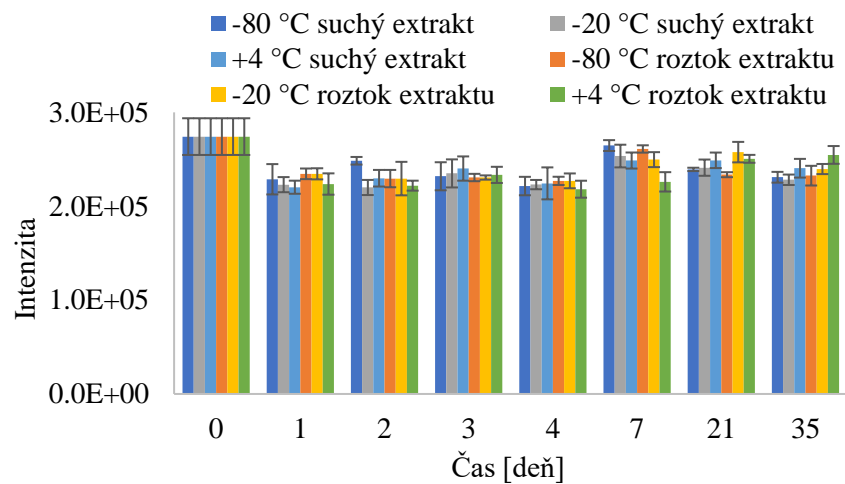
Graf P 51: Dlhodobá stabilita PC po normalizácii dát



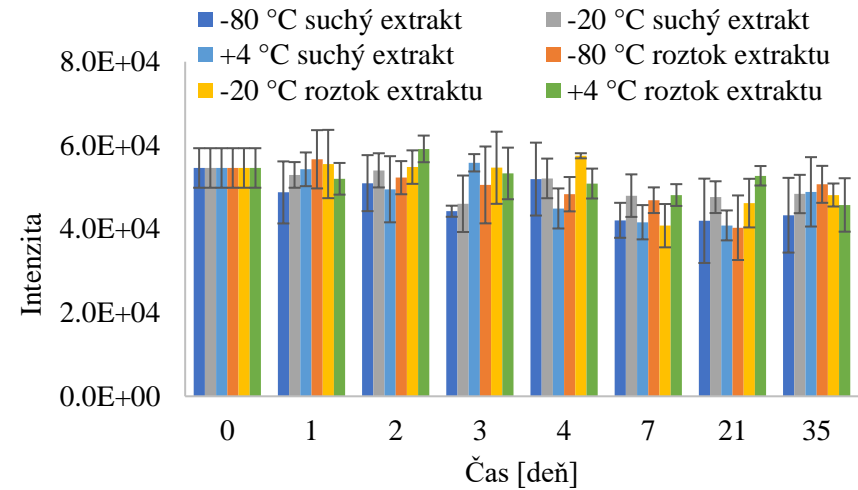
Graf P 50: Dlhodobá stabilita MG po normalizácii dát



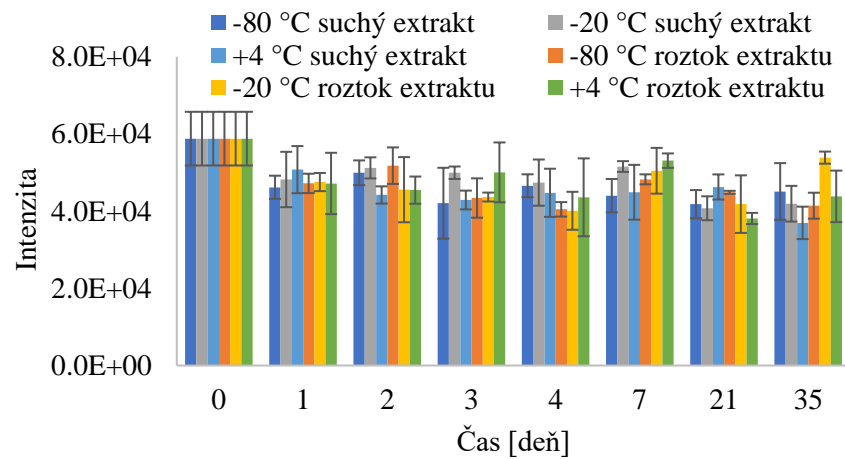
Graf P 52: Stabilita CE 16:0 d7 v extrakte



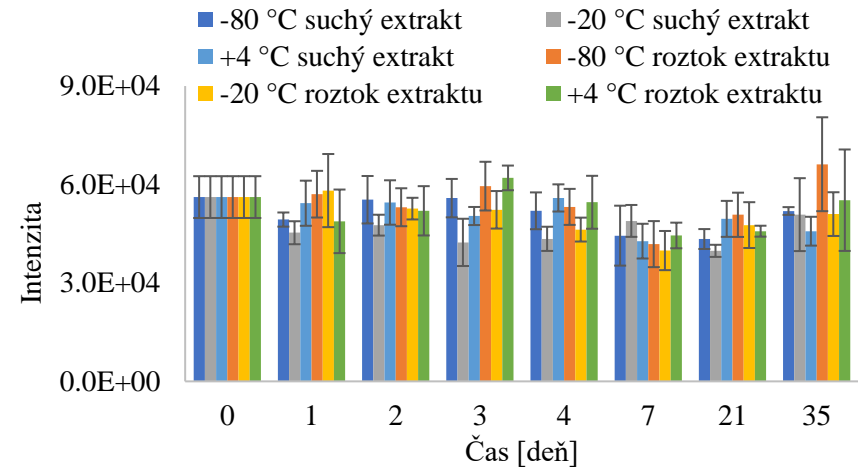
Graf P 53: Stabilita CE 19:0 v extrakte



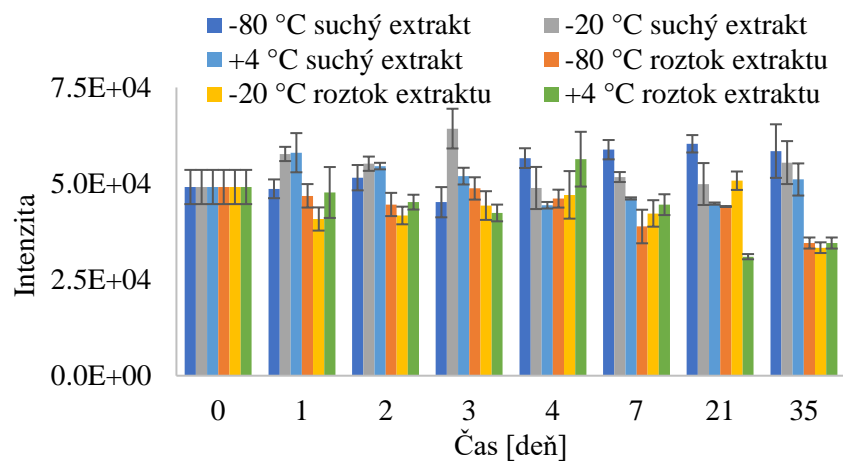
Graf P 55: Stabilita Cer 35:1 v extrakte



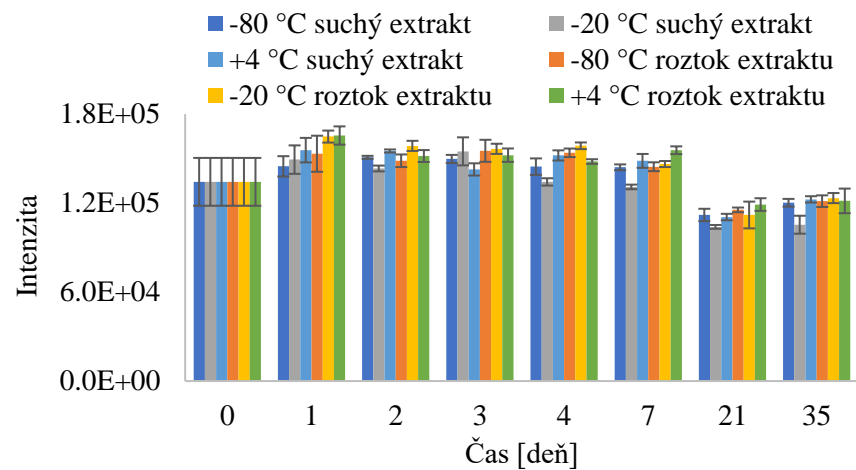
Graf P 54: Stabilita Cer 30:1 v extrakte



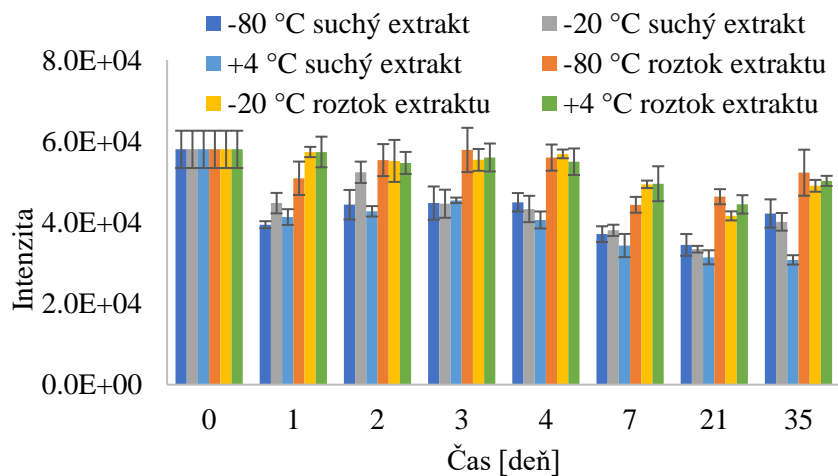
Graf P 56: Stabilita Cer 36:1 d7 v extrakte



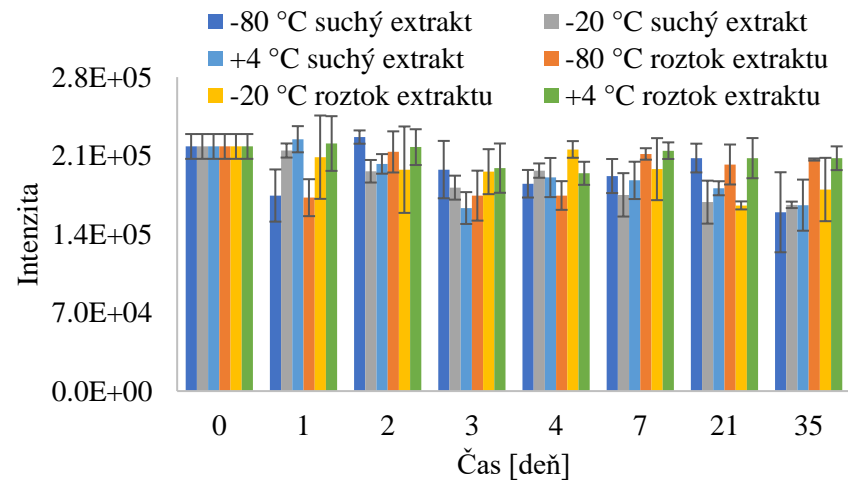
Graf P 57: Stabilita DG 28:0 v extrakte



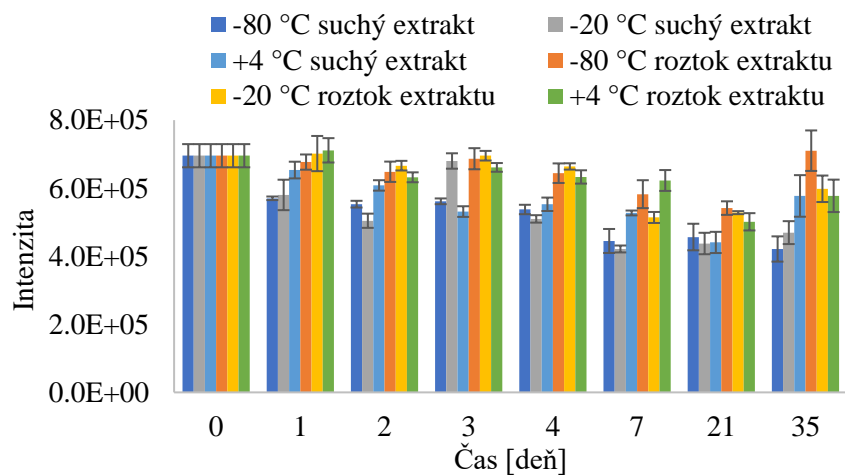
Graf P 59: Stabilita LPC 17:0 v extrakte



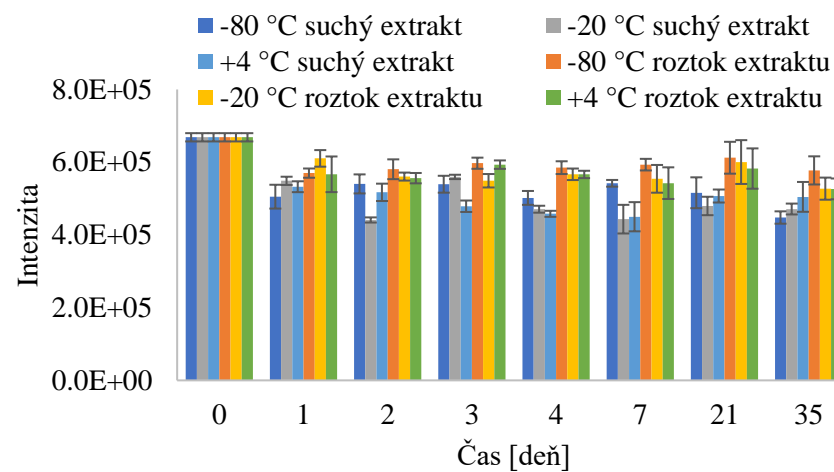
Graf P 58: Stabilita DG 33:1 d7 v extrakte



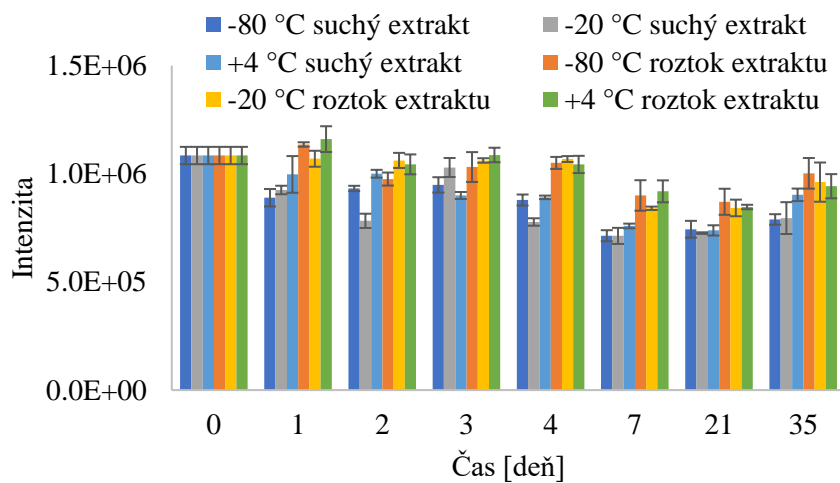
Graf P 60: Stabilita MG 19:1 v extrakte



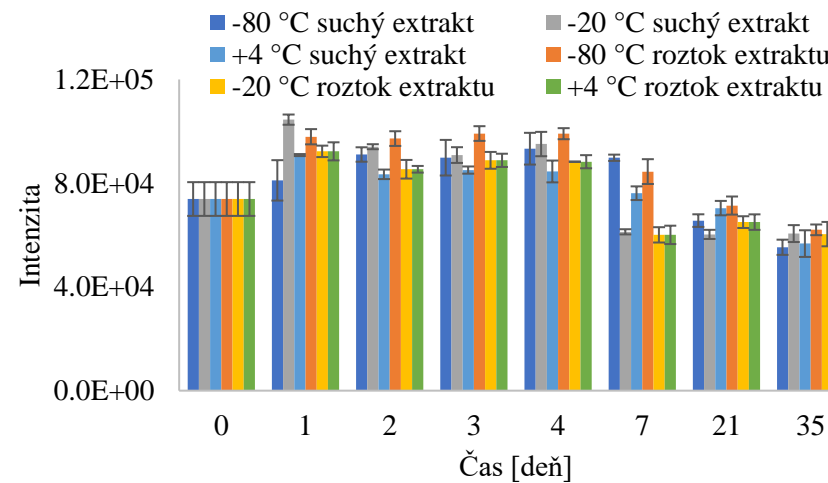
Graf P 61: Stabilita PC 33:1 d7 v extrakte



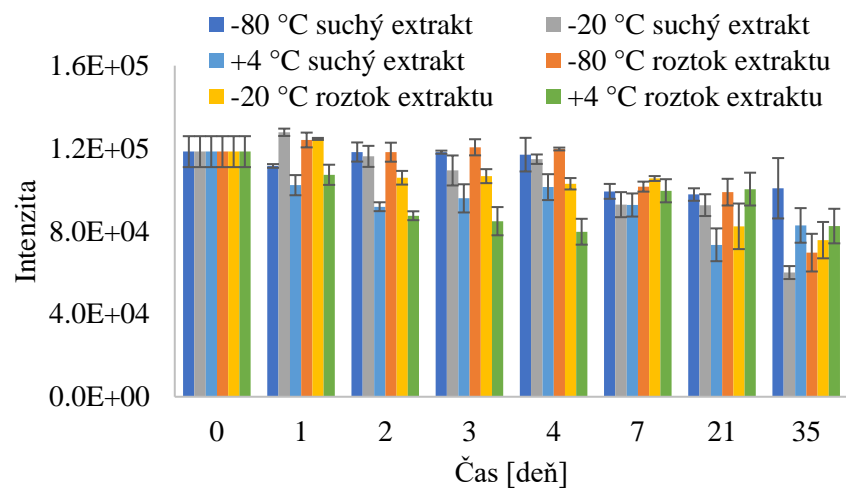
Graf P 63: Stabilita PC 44:2 v extrakte



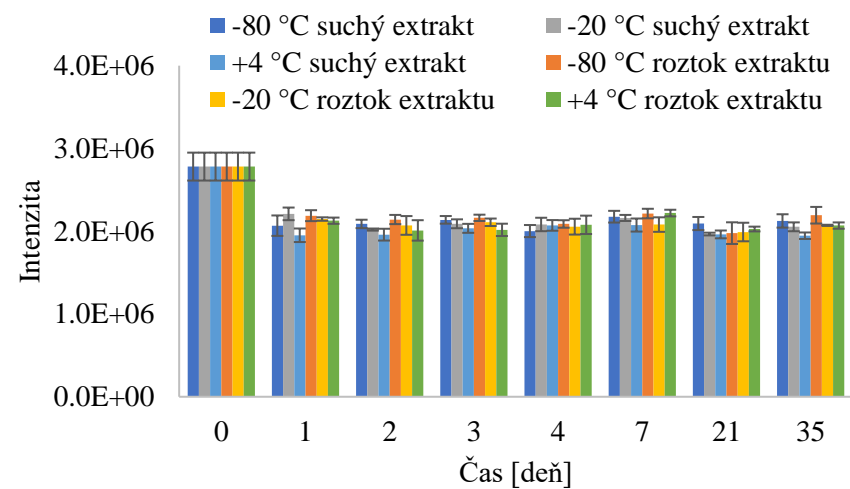
Graf P 62: Stabilita PC 28:0 v extrakte



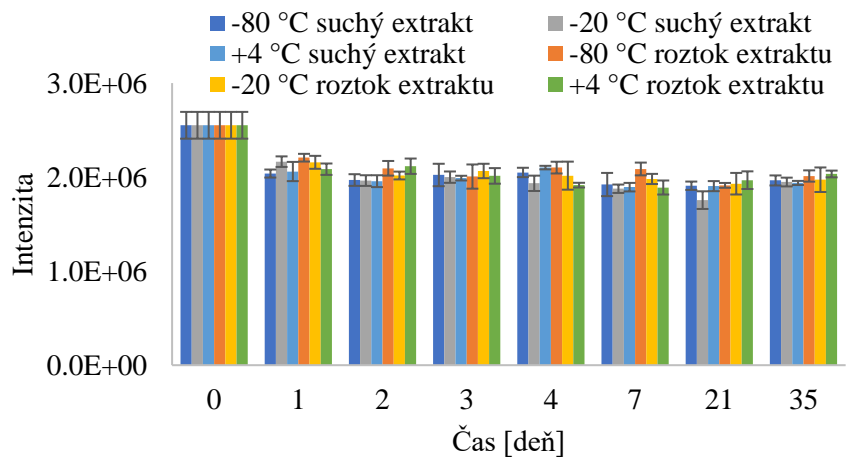
Graf P 64: Stabilita SM 30:1 v extrakte



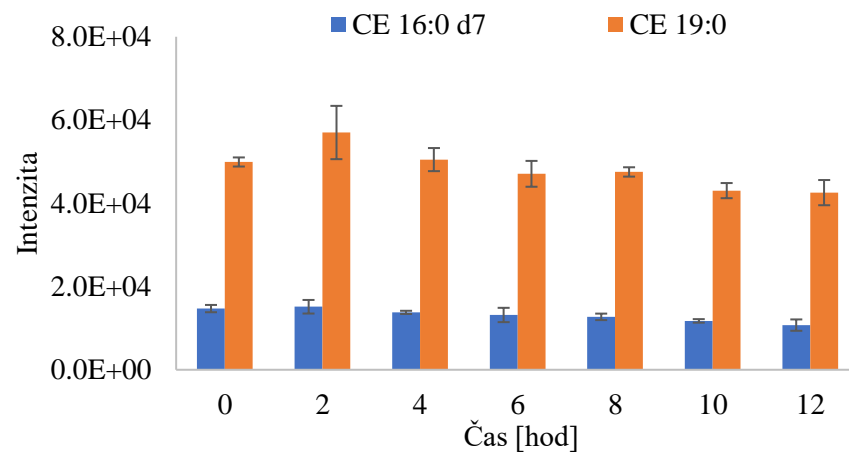
Graf P 65: Stabilita SM 36:2 d9 v extrakte



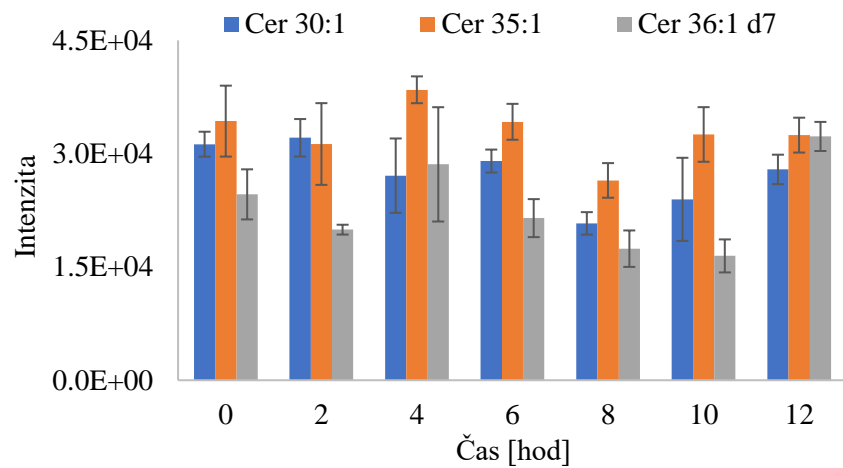
Graf P 67: Stabilita TG 57:3 v extrakte



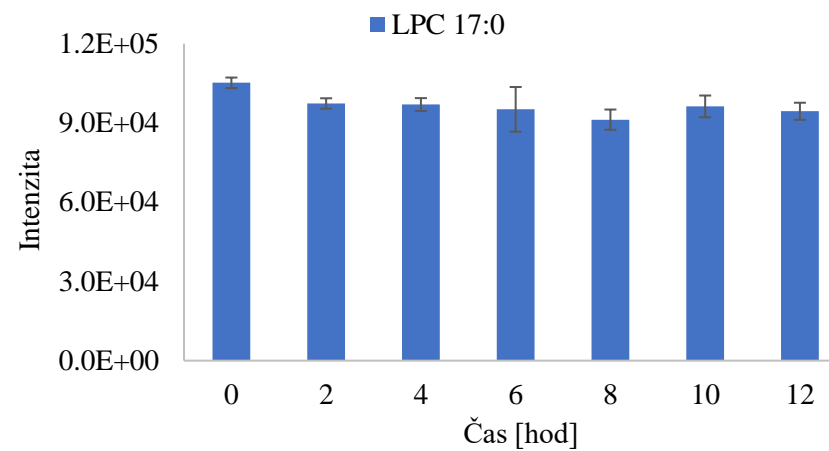
Graf P 66: Stabilita TG 48:1 d7 v extrakte



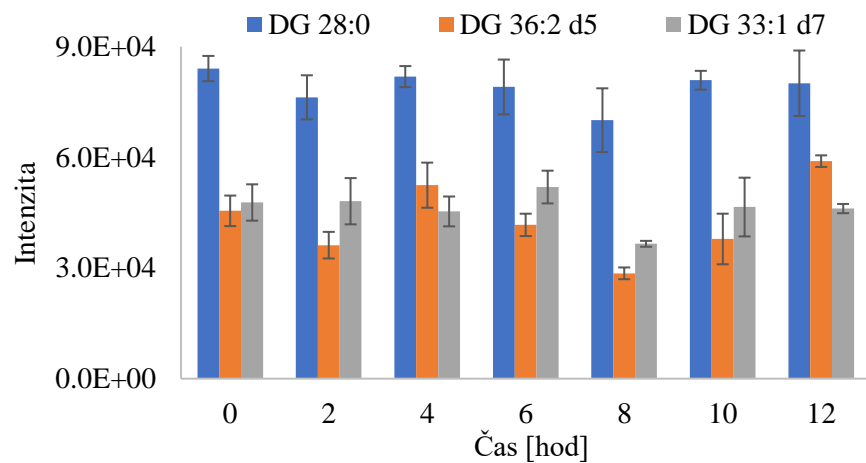
Graf P 68: Stabilita CE v autosampleri



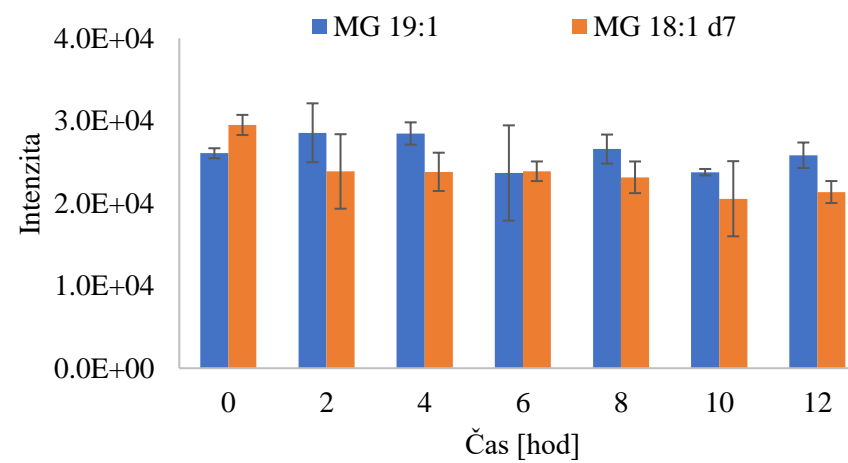
Graf P 69: Stabilita Cer v autosampleri



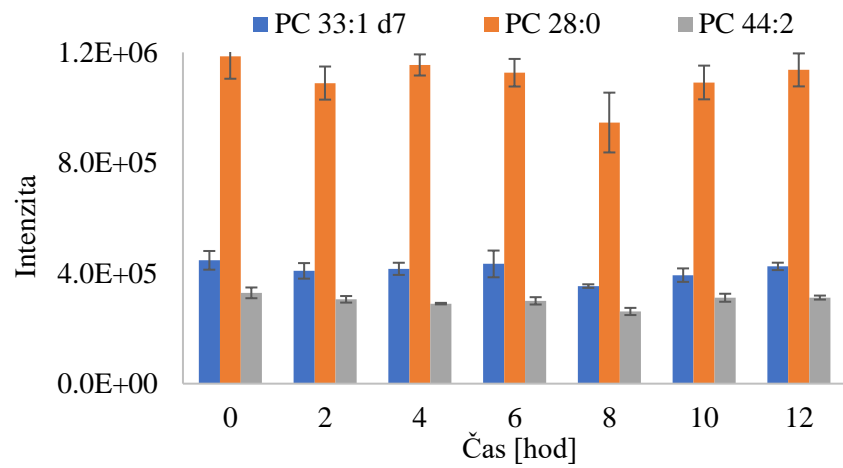
Graf P 71: Stabilita LPC v autosampleri



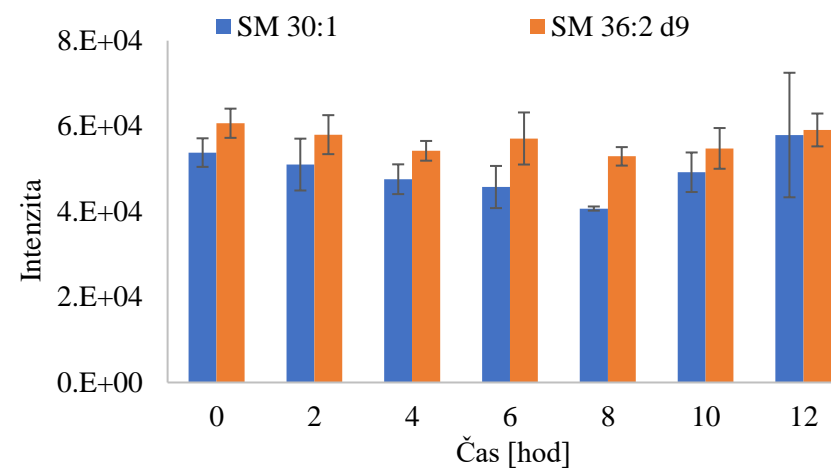
Graf P 70: Stabilita DG v autosampleri



Graf P 72: Stabilita MG v autosampleri



Graf P 73: Stabilita PC v autosampleri



Graf P 74: Stabilita SM v autosampleri