

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Kryštof Pelcl

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

GC/MS stanovení mastných kyselin v třídách lipidů lidské plazmy

Bc. Kryštof Pelcl

Diplomová práce
2025

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kryštof Pelcl**
Osobní číslo: **C23256**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **GC/MS stanovení mastných kyselin v třídách lipidů lidské plazmy**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma třídy lipidů v lidské plasmě. Zaměřte se na separační metody, kterými lze třídy lipidů rozdělit. Dále zmapujte vhodné techniky pro identifikaci mastných kyselin přítomných v lipidech.
2. V experimentální části optimalizujte metodu pro izolaci různých tříd lipidů v lidské plasmě s využitím kapalinové chromatografie.
3. Analyzujte složení mastných kyselin v izolovaných třídách lipidů pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

LS.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem “GC/MS stanovení mastných kyselin v třídách lipidů lidské plazmy“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 9. 5. 2025

Bc. Kryštof Pelel

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při zpracování této práce. Rovněž bych chtěl poděkovat Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za jeho trpělivost a věnovaný čas zejména při práci v laboratoři. Zvláštní poděkování patří mé rodině a mé přítelkyni za podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací nového spojení analytických separačních technik pro stanovení mastných kyselin v lipidických frakcích ze vzorku lidské plazmy. V teoretické části jsou shrnuty základní informace o lipidech, jejich třídách a jednotlivých analytických metodách, které lze využít pro jejich stanovení. Experimentální část práce zahrnovala optimalizaci separace lipidických tříd pomocí kapalinové chromatografie a následně byly lipidy v najímaných frakcích převedeny na methylestery mastných kyselin a analyzovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostním spektrometrem. Díky tomuto postupu mohlo být sledováno zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipidických třídách.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lipidy, mastné kyseliny, esterifikace, estery mastných kyselin, kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, lipidomická analýza

TITLE

GC/MS analyses of fatty acids in human plasma lipid classes

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on the development and optimization of a novel combination of analytical separation techniques for the determination of fatty acids in lipid fractions from human plasma samples. The theoretical part summarizes fundamental information about lipids, their classification, and the analytical methods applicable for their determination. The experimental part involved the optimization of lipid class separation using liquid chromatography. Subsequently, lipids in the collected fractions were converted into fatty acid methyl esters and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. This approach enabled the monitoring of the fatty acid composition within individual lipid classes.

KEYWORDS

Lipids, fatty acids, esterification, fatty acid esters, liquid chromatography of hydrophilic interactions, gas chromatography, mass spectrometry, lipidomic analysis

Obsah

| | |
|--|-----------|
| PODĚKOVÁNÍ | 6 |
| ANOTACE..... | 7 |
| KLÍČOVÁ SLOVA | 7 |
| TITLE..... | 7 |
| ANNOTATION | 7 |
| KEYWORDS | 7 |
| SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK..... | 10 |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK..... | 12 |
| ÚVOD | 14 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST..... | 15 |
| 1.1 Lipidy | 15 |
| 1.1.1 Klasifikace lipidů | 16 |
| 1.1.2 Glycerolfosfolipidy | 18 |
| 1.1.3 Glycerolipidy | 20 |
| 1.1.4 Mastné acyly | 21 |
| 1.1.5 Steroly | 22 |
| 1.1.6 Sfingolipidy..... | 22 |
| 1.1.7 Prenoly | 24 |
| 1.1.8 Polyketidy | 24 |
| 1.1.9 Sacharolipidy | 25 |
| 1.2 Analýza lipidů | 26 |
| 1.2.1 Příprava vzorku | 27 |
| 1.2.2 Separační techniky v lipidomice | 30 |
| 1.2.3 Hmotnostní spektrometrie..... | 35 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 40 |
| 2.1 Seznam přístrojů a zařízení | 40 |
| 2.2 Seznam chemikálií | 40 |
| 2.3 Příprava vzorku | 41 |
| 2.3.1 MTBE extrakce | 41 |
| 2.4 Kapalinová chromatografie..... | 41 |
| 2.5 Hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS QTOF | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.1 | Odběr frakcí | 42 |
| 2.6 | Převedení lipidových frakcí na methylestery | 42 |
| 2.7 | GC-MS | 43 |
| 2.8 | Zpracování experimentálních dat | 43 |
| 3 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 44 |
| 3.1 | Optimalizace metody HPLC | 44 |
| 3.2 | Sběr frakcí po HILIC separaci | 46 |
| 3.3 | Analýza mastných kyselin z frakcí | 47 |
| 3.3.1 | Mastné kyseliny v lipidických frakcích | 48 |
| 3.3.2 | Nasyčené a nenasycené mastné kyseliny ve frakcích | 52 |
| | ZÁVĚR | 53 |
| | POUŽITÁ LITERATURA | 54 |
| | PŘÍLOHY | 61 |

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 – Schéma fosfolipidové dvojvrstvy | 15 |
| Obrázek 2 – Schéma cytoplazmatické membrány | 16 |
| Obrázek 3 - Obecná struktura glycerofosfolipidu; R znamená acyl; R ₂ je místo pro navázání funkční skupiny viz. Tabulka 2..... | 18 |
| Obrázek 4 - Struktury mono-, di- a triacylglycerolu; R znamená acyl | 20 |
| Obrázek 5 - Struktura regioizomerů diacylglycerolu; R znamená acyl..... | 20 |
| Obrázek 6 - Regioizomery monoacylglycerolu; R znamená acyl..... | 21 |
| Obrázek 7 - Struktura kyseliny stearové | 21 |
| Obrázek 8 - Struktura kyseliny linolové | 21 |
| Obrázek 9 - Struktura cholesterolu [24]..... | 22 |
| Obrázek 10 - Struktura isoprenové jednotky | 24 |
| Obrázek 11 – Strukturní vzorec vitamínu E [24] | 24 |
| Obrázek 12 - Polyketidy: Trichostatin [24] | 25 |
| Obrázek 13 - Sacharolipid: 2-O-hexadekanoyl-3-O-(2R,4S,6S-trimethyl-3R-hydroxy-trikosanoyl)- α,α -trehalóza [24]..... | 25 |
| Obrázek 14 - Schéma přípravy vzorku z plazmy [6] | 26 |
| Obrázek 15 - Schéma HPLC | 31 |
| Obrázek 16 - Schéma principu separace v HILIC | 32 |
| Obrázek 17 - Schéma plynové chromatografie..... | 33 |
| Obrázek 18 - Schéma MS [58]..... | 36 |
| Obrázek 19 - Schéma elektronové a chemické ionizace..... | 36 |
| Obrázek 20 - Schéma ESI [59]..... | 37 |
| Obrázek 21 - Schéma měkkých ionizačních technik APCI a APPI..... | 38 |
| Obrázek 22 - Schéma kvadrupolového analyzátoru..... | 38 |
| Obrázek 23 - Schéma analyzátoru TOF | 39 |
| Obrázek 24 - Schéma detektoru MS (fotonásobič) | 39 |
| Obrázek 25 - Chromatogram standardů zástupců lipidických tříd; Třída nepochárních lipidů obsahuje triacylglyceroly, diacylglyceroly a monoacylglyceroly, třída PE (Fosfatidylethanolaminy) a PI (Fosfatidylinositoly), třída PC (Fosfatidylcholiny), třída SM (Sfingomyeliny), třída LPC (Lysofosfatidylcholiny) | 45 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 26 - Chromatogram extraktu lidské plazmy, znázornění jednotlivých frakcí; Frakce nepochárních lipidů (1.), frakce PE a PI (2.), frakce PC (3.), frakce SM (4.) a frakce LPC (5.)..... | 46 |
| Obrázek 27 - Ověřování frakce SM (4.)..... | 47 |
| Obrázek 28 - Chromatogram směsi standardů methylesterů MK..... | 48 |
| Obrázek 29 - První část popsaného chromatogramu Frakce 1..... | 50 |
| Obrázek 30 - Druhá část popsaného chromatogramu Frakce 1 | 51 |
| Obrázek 31 - Graf zastoupení nasycených a nenasycených MK ve frakcích | 52 |
| | |
| Tabulka 1 - Lipidové třídy; R znamená acyl..... | 17 |
| Tabulka 2 - Funkční skupiny glycerolfosfolipidů..... | 19 |
| Tabulka 3 - Přehled sfingolipidových tříd; R znamená acyl..... | 23 |
| Tabulka 4 - Přehled extrakčních metod pro izolaci lipidů | 29 |
| Tabulka 5 - Podmínky MS (Xevo)..... | 42 |
| Tabulka 6 - GC podmínky separace..... | 43 |
| Tabulka 7 - MS podmínky | 43 |
| Tabulka 8 – Lipidické třídy v jednotlivých frakcích..... | 46 |
| Tabulka 9 - Zastoupení MK (%) v jednotlivých frakcích; (-) znamená nedetekováno | 49 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|---------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| APCI..... | Chemická ionizace za atmosférického tlaku (The atmospheric pressure chemical ionization) |
| APPI | Fotoionizace za atmosférického tlaku (The photoionization under atmospheric pressure) |
| BUME | Směs butanolu a methanolu (Mixture of butanol and methanol) |
| CI..... | Chemická ionizace (Chemical ionization) |
| EI..... | Elektronová ionizace (Electron ionization) |
| ESI..... | Elektrosprej (Electrosprey ionization) |
| FAME..... | Methylestery mastných kyselin (Fatty acid methyl esters) |
| GC | Plynová chromatografie (Gas chromatography) |
| HILIC | Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (Liquid chromatography of hydrophilic interaction) |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography) |
| IM..... | Iontová mobilita (Ion mobility) |
| LC..... | Kapalinová chromatografie (Liquid chromatography) |
| LPC | Lysofosfatidylcholin (Lysophosphatidylcholine) |
| MeOH..... | Methanol |
| MF..... | Mobilní fáze |
| MK | Mastné kyseliny |
| MS..... | Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry) |
| MTBE..... | Methyl-terc-butyl ether |
| NMR..... | Nukleární magnetická rezonance (Nuclear magnetic resonance) |
| NP-HPLC | Kapalinová chromatografie s normálními fázemi (Normal phase high performance liquid chromatography) |
| PC..... | Fosfatidylcholin (Phosphatidylcholine) |
| PE | Fosfatidylethanolamin (Phosphatidylethanolamine) |
| PI..... | Fosfatidylinositol (Phosphatidylinositol) |
| PS | Fosfatidylserin (Phosphatidylserine) |

RP-HPLCKapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (Reverse phase high performance liquid chromatography)

SFStacionární fáze

SFC.....Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical fluid chromatography)

SM.....Sfingomyelin (Sphingomyeline)

SPE.....Extrakce tuhou fází (Solid phase extraction)

TOFAnalyzátor doby letu (Time of flight)

UV-VISUltrafialová a viditelná oblast

ÚVOD

Lipidům se v dnešní době věnuje velké pozornosti, zejména v souvislosti s vývojem diagnostické metody pro časné odhalení závažných nemocí jako je například rakovina slinivky břišní. Této oblasti se intenzivně věnuje prof. Holčapek se svým výzkumným týmem, který se zaměřuje na využití lipidového profilu jako možného biomarkeru. Samotné lipidy hrají důležitou roli v řadě biologických procesů, včetně buněčné signalizace, tvorby struktury buněčných membrán nebo ukládání energie pro organismus. Dělí se do osmi hlavních kategorií, kam se mimo jiné řadí i mastné kyseliny, které díky své jednoduché stavbě představují základní stavební jednotky dalších lipidových molekul.

V dnešní zrychlené době se klade důraz na rychlost a přesnost analýz, čímž vzniká poptávka po nových metodách nebo spojeních, které by umožnily efektivní separaci a stanovení mastných kyselin ze složitých matic.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat nové spojení analytických technik, které využívá pro separaci jednotlivých lipidických tříd z lidské plazmy kapalinovou chromatografií hydrofilních interakcí a pro následné stanovení mastných kyselin osvědčené spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

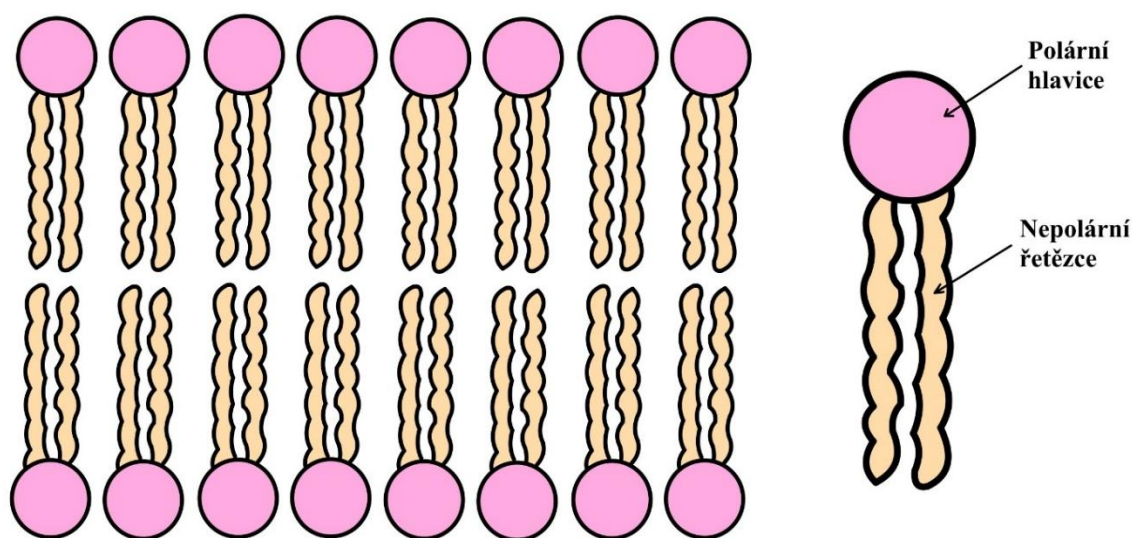
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lipidy

Lipidy jsou početná skupina organických chemických sloučenin, které jsou nerozpustné v polárních rozpouštědlech (například ve vodě), ale jsou rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech jako jsou methanol, ethanol, benzen, chloroform, aj.

Lipidy lze nalézt v živých organismech jako součást buněčných membrán (cytoplazmatické membrány), která je složena z fosfolipidové dvojvrstvy. Další funkcí lipidů je také zásobárna energie ve formě triacylglycerolů. Jsou součástí signálních molekul, hormonů a vyskytují se i v potravinách.

Fosfolipidová dvojvrstva je tvořena z fosfolipidů, které se skládají z polární části neboli hlavičky a nepolárního řetězce neboli ocásku. Polární hlavičky tvoří glycerol a fosfátové skupiny a jsou orientovány do vnějších (extracelulárních) nebo vnitřních (intracelulárních) prostor. Nepolární řetězce jsou orientovány k sobě, formují tak hydrofobní prostředí uvnitř dvojvrstvy a jsou tvořeny dvěma mastnými kyselinami (MK). Schéma je možné vidět na Obrázku 1.

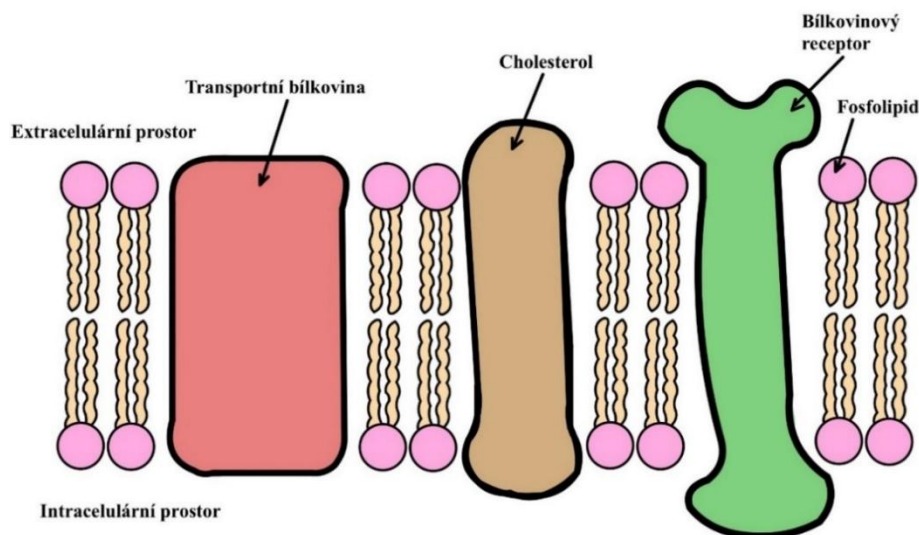


Obrázek 1 – Schéma fosfolipidové dvojvrstvy

Fosfolipidová dvojvrstva dále obsahuje různé druhy bílkovin, které mají transportní funkci, nebo cholesterol, který je zodpovědný za rigiditu neboli tuhost vrstvy a zabraňuje tak její vysoké fluiditě neboli tekutosti (viz Obrázek 2). [1]

Kromě fosfolipidů a cholesterolu lze v buňce nalézt například sfingolipidy nebo glykosfingolipidy. Ty plní například signalizační funkci nebo regulační funkci. Lipidy dále slouží organismu jako forma zásobárny energie ve formě tuků. Tuky jsou převážně složeny z triacylglycerolů. [1; 2; 3; 4; 5; 6] Při jejich odbourávání dochází k uvolnění velkého množství

energie, čehož dnes lze využít i v experimentální léčbě rakoviny v USA metodou „Press-pulse“, protože rakovinná buňka tuto energii neumí využít. [7] Koncentrace lipidů v krvi/krevním séru/plazmě je jedním z hlavních ukazatelů počínajících, případně pokročilých stádií mnoha nemocí jako jsou rakovina, diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby a Alzheimerova choroba. [1; 2; 3; 4; 5; 6]



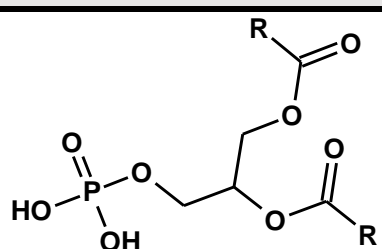
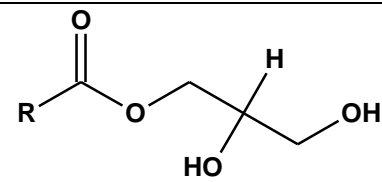
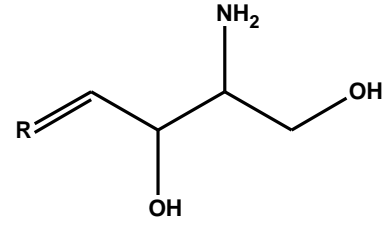
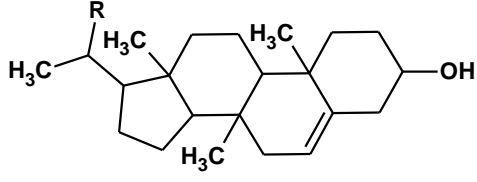
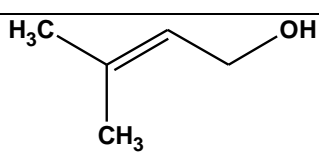
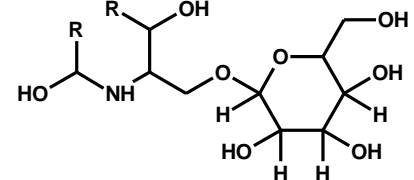
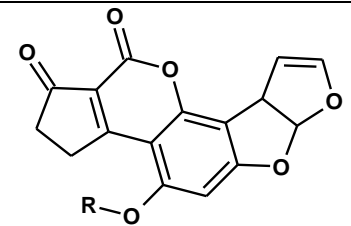
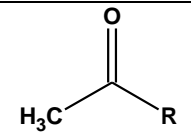
Obrázek 2 – Schéma cytoplazmatické membrány

1.1.1 Klasifikace lipidů

Lipidy se dělí na jednoduché a složené. Jednoduché jsou tvořeny pouze estery mastných kyselin a alkoholu. Pokud obsahují navíc například fosfát nebo cukr, pak se jedná o lipidy složené. Jednoduché lipidy se dají dále dělit na acylglyceroly a vosky. Mezi složené lipidy patří například glykolipidy, fosfolipidy, lipoproteiny. Dále se lipidy dělí na základě jejich skupenství při pokojové teplotě na tuhé a kapalné, podle nasycenosti neboli počtu dvojných vazeb na nasycené a nenasycené nebo podle nutnosti přijímat je ve stravě na esenciální a neesenciální.

Pro jednotnou klasifikaci lipidů byla vytvořena databáze, která obsahuje celkem osm základních kategorií podle jejich struktury a ty se dále dělí na třídy a podtřídy, pro které byl vytvořen dvanáctimístný identifikátor. Mezi základní kategorie se řadí glycerolfosfolipidy, glycerolipidy, mastné acyly, steroly, sfingolipidy, prenoly, polyketidy a sacharolipidy. Jednotlivé třídy jsou vyjmenovány v Tabulce 1 se základním popisem a se svými obecnými strukturami, kde R znamená acyl. Celá databáze je online na stránkách LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org>), kde je celkem zaznamenáno okolo 48700 lipidů. Jiné zdroje dokonce uvádějí přes 100 tisíc sloučenin. [2; 3; 4; 8; 9]

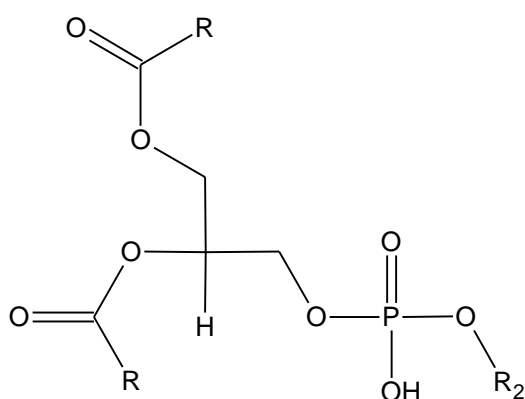
Tabulka 1 - Lipidové třídy; R znamená acyl

| Kategorie lipidů | Popis | Obecná struktura |
|--------------------|---|---|
| Glycerofosfolipidy | Obsahují dvě mastné kyseliny, glycerol a fosfátovou skupinu. |  |
| Glycerolipidy | Lipidy s glycerolem, který je vázán na mastné kyseliny. |  |
| Sfingolipidy | Lipidy obsahující sfingosin, mastné kyseliny a případně další skupiny. |  |
| Steroly | Steroidní lipidy jako např. cholesterol, steroidné hormony nebo žlučové kyseliny. |  |
| Prenoly | Lipidy odvozené od izoprenových jednotek. |  |
| Sacharolipidy | Lipidy s kovalentně vázanými MK na molekuly sacharidu. |  |
| Polyketidy | Sekundární metabolity odvozené od polyketidového systému. |  |
| Mastné acyly | Základní stavební jednotky lipidů. |  |

1.1.2 Glycerolfosfolipidy

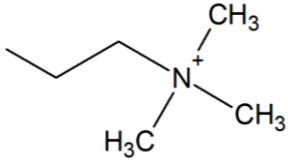
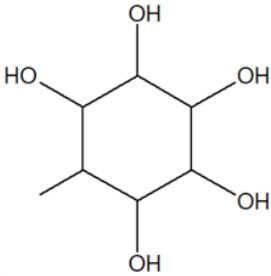
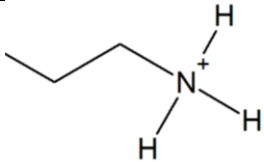
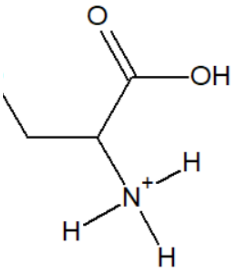

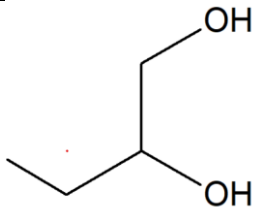
Glycerolfosfolipidy se skládají z polární hlavové skupiny, která je připojená ke glycerolovému skeletu a mohou obsahovat jeden nebo dva mastné acylové řetězce (viz Tabulka 1). [2; 3; 6; 10] Glycerolfosfolipidy se nacházejí v buněčných membránách, kde zajišťují jejich fluiditu, stabilitu a permeabilitu neboli propustnost. [6; 11; 12] Dále se podílejí na správné funkci membránových proteinů, iontových kanálů, receptorů a slouží jako prekurzory regulačních a signálních molekul. Lze je mimo jiné najít i v mozku, kde tvoří zhruba polovinu z celkového množství lipidů. [2]

Glycerolfosfolipidy se dají rozdělit do dalších tříd podle umístění polární skupiny. Na Obrázku 3 je patrná struktura glycerolfosfolipidu a v poloze R₂ se může navázat některá z polárních skupin. Jednotlivé funkční skupiny jsou uvedeny v Tabulce 2. Ta se může vyskytovat v poloze sn-3 na glycerolovém skeletu, která je typická pro eukaryotické buňky (živočišné nebo rostlinné buňky). Pokud se polární skupina nachází v poloze sn-1, pak je to typické pro prokaryotické buňky (jednoduchá buňka bez jádra). Mezi představitele glycerolfosfolipidů vyskytující se v cytoplazmatické membráně patří fosfatidylcholin (PC nebo lecitin), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS), kyselina fosfatidová, lysofosfolipidy, fosfatidylglycerol a další (Tabulka 2). U glycerolfosfoglycerolů a glycerolfosfoglycerofosfátů je druhá glycerolová skupina součástí polární části molekuly. U glycerolfosfoglycerofosfoglycerolů (kardiolipinů) se přidává třetí glycerolová jednotka, která na sobě obsahuje připojené mastné kyseliny v polohách sn-1' a sn-2', které dávají molekule symetrický tvar. Tato jednotka není součástí polární části molekuly. Různé kombinace glycerolfosfolipidových hlavových skupin a mastných acylových řetězců dávají vzniknout tisícům molekulárních druhů. [2; 6; 10; 11; 13]



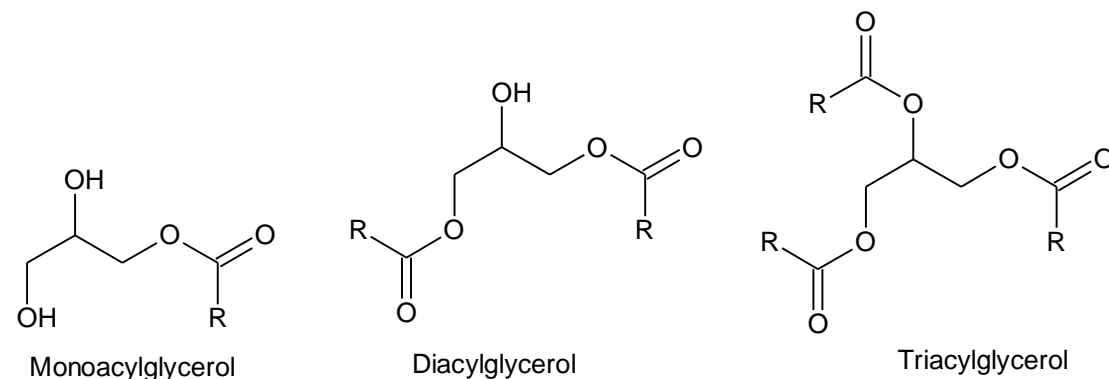
Obrázek 3 - Obecná struktura glycerolfosfolipidu; R znamená acyl; R₂ je místo pro navázání funkční skupiny viz. Tabulka 2

Tabulka 2 - Funkční skupiny glycerolfosfolipidů

| Název třídy | Specifické substituenty | Struktura substituentu |
|-----------------------|---|---|
| Fosfatidylcholin | Cholinová skupina |  |
| Fosfatidylinositol | Inositol |  |
| Fosfatidylethanolamin | Ethanolová skupina |  |
| Fosfatidylserin | Serin |  |
| Kyselina fosfatidová | Základní fosfolipid |  |
| Kardiolipin | Dvě fosfatidové jednotky spojené glycerolem se čtyřmi mastnými kyselinami |  |

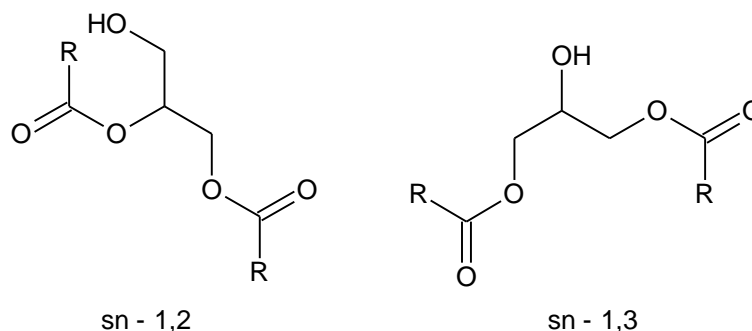
1.1.3 Glycerolipidy

Glycerolipidy se skládají z glycerolového skeletu, na který může být navázána jedna až tři mastné kyseliny pomocí esterové vazby. Podle jejich počtu se dělí na monoacylglyceroly, diacylglyceroly a triacylglyceroly (Obrázek 4). Triacylglyceroly se v přírodě nachází ve formě tukových zásob živých organismů [2; 3; 14], v plazmě a tvoří zhruba 40 % potravy u lidí. [15] Zvýšená hladina triacylglycerolů v plazmě s nižším celkovým počtem uhlíků (48C–50C) a menším počtem nasycení souvisí s se zvýšeným rizikem diabetu. [16; 17; 18]



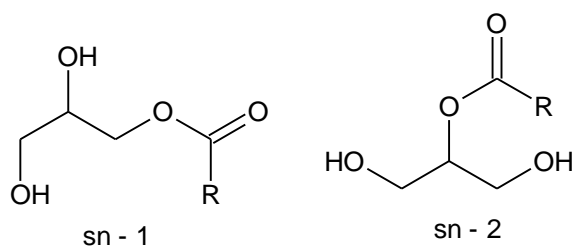
Obrázek 4 - Struktury mono-, di- a triacylglycerolu; R znamená acyl

Enzymatickou nebo chemickou hydrolyzou triacylglycerolů vznikají regioizomerní diacylglyceroly. Regioizomerní diacylglyceroly jsou izomery, které se liší v umístění mastné kyseliny na glycerolovém skeletu. Mohou vzniknout celkem dva typy izomerů sn-1,3 a sn-2,3 (Obrázek 5). [16]



Obrázek 5 - Struktura regioizomerů diacylglycerolu; R znamená acyl

Diacylglyceroly vznikají jako meziprodukty metabolismu lipidů nebo fungují jako signální molekuly a ovlivňují řadu procesů. Regioizomery se vyskytují i u monoacylglycerolů a to sn-1 a sn-2 (Obrázek 6). [2; 3; 6; 15]

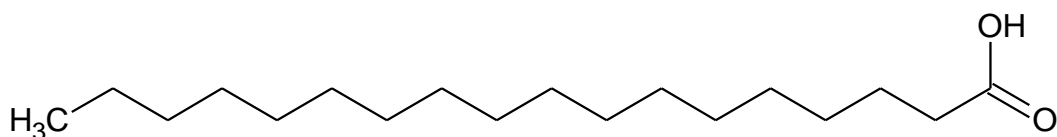


Obrázek 6 - Regioizomery monoacylglycerolu; R znamená acyl

1.1.4 Mastné acyly

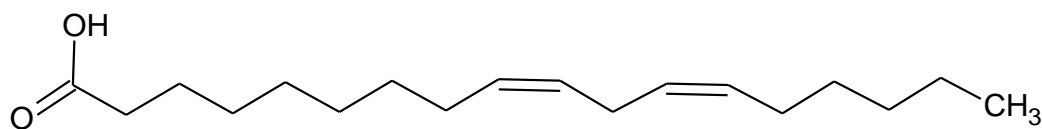
Mastné acyly jsou označovány za nejjednodušší formu lipidů a fungují jako základní stavební jednotky pro složitější lipidy. [2; 3; 6; 19] Tvoří je mastné kyseliny, což jsou karboxylové kyseliny s alkylovým řetězcem, který je ve většině případů nerozvětvený a obsahuje sudý počet uhlíků (8-20). Slouží jako zásobárna energie organismů nebo jako základní složka biomembrán a signálních molekul. [2; 3; 20; 21]

Mastné kyseliny se skládají z polární karboxylové skupiny (-COOH) a z hydrofobního acylového řetězce. Na základě nasycenosti acylového řetězce je lze rozdělit na nasycené a nenasycené. Nasycené mastné kyseliny neobsahují žádné dvojně vazby na acylovém řetězci. Jako zástupce nasycených mastných kyselin lze zařadit kyselinu palmitovou nebo stearovou (Obrázek 7).



Obrázek 7 - Struktura kyseliny stearové

Nenasycené mastné kyseliny obsahují jednu nebo více dvojných vazeb nebo i trojnou vazbu na acylovém řetězci. Nejčastěji se dvojná vazba vyskytuje na 9. uhlíku. Do této skupiny lze zařadit například kyselinu linolovou (Obrázek 8) nebo olejovou.

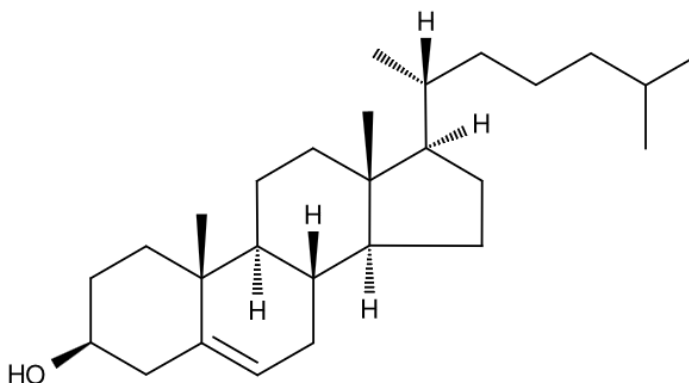


Obrázek 8 - Struktura kyseliny linolové

Dále se dají mastné kyseliny dělit podle nutnosti přijímat je v potravě neboli esenciality. Esenciální mastné kyseliny jsou nepostradatelné pro lidský organismus a je nutné je přijímat ve stravě. Patří sem například kyselina linolová a linolenová. Neesenciální mastné kyseliny si je schopný lidský organismus syntetizovat sám a není nutné je přijímat ve stravě. [19; 20; 22]

1.1.5 Steroly

Steroly jsou kategorií lipidů, která se vyznačuje steroidním jádrem neboli steranem, který je složen ze čtyř cyklických struktur (tří šestičlenných a jednoho pětičlenného kruhu). Dále obsahuje hydroxylovou skupinu, která je navázána na 3. uhlíku tohoto skeletu. Na této struktuře se ještě vyskytuje postranní řetězec, který je připojen na 17. uhlíku (viz Tabulka 1). Nejznámějším zástupcem sterolů je cholesterol (Obrázek 9). [2; 3; 6; 21; 23]



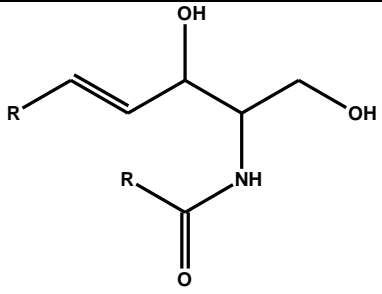
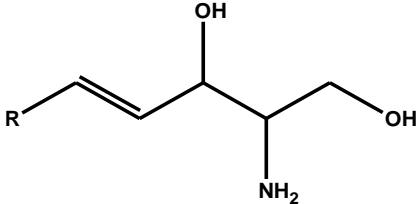
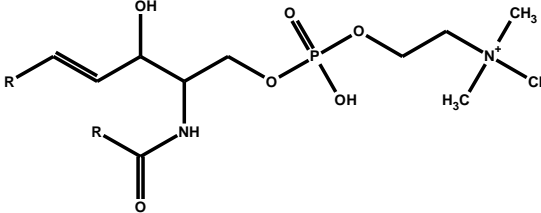
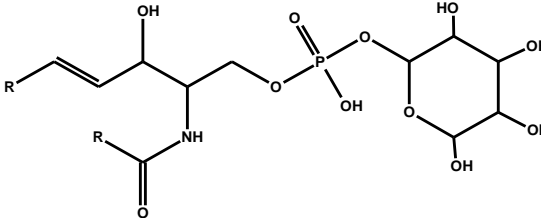
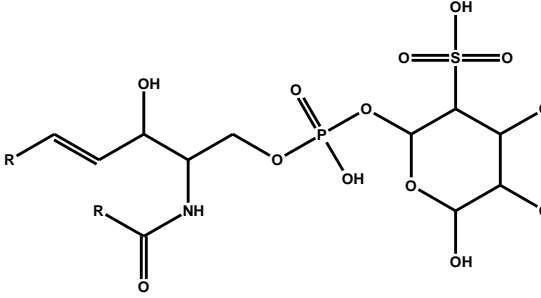
Obrázek 9 - Struktura cholesterolu [24]

Steroly lze nalézt jako součást buněčných membrán, kde hrají důležitou roli v její struktuře. Steroly slouží také jako prekurzory pro syntézu žlučových kyselin, která hraje důležitou roli při trávení. Jsou důležité pro syntézu hormonů jako jsou estrogen, testosteron, kortizol nebo aldosteron. Nebo se uplatňují jako prekurzor při vzniku vitamínu D. [2; 3; 6]

1.1.6 Sfingolipidy

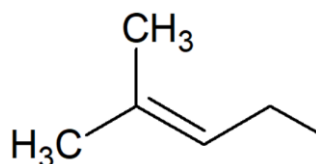
Sfingolipidy jsou kategorií lipidů, jejichž skelet se skládá z dlouhého alifatického aminoalkoholu neboli molekuly sfingosinu, kde je přes amidovou vazbu navázán mastný acylový řetězec (viz Tabulka 1). V přírodě se vyskytuje velké množství sfingolipidů, které se mohou lišit délkou řetězce, umístěním dvojné vazby nebo přítomností hydroxylových skupin. Lze je nalézt v nervové tkáni v myelinové pochvě, v buněčné membráně nebo se vyskytují v krvi. Sfingolipidy se dále dělí na ceramidy, sfingoidní báze, fosfosfingolipidy, neutrální a kyselá sfingolipidy. Kyselá sfingoidní báze mohou obsahovat místo sulfonové skupiny například karboxylovou skupinu. Přehled jednotlivých tříd lipidů je uveden v Tabulce 3, která shrnuje jejich strukturu, výskyt a funkci. [2; 3; 6; 25]

Tabulka 3 - Přehled sfingolipidových tříd; R znamená acyl

| Třída sfingolipidu | Struktura | Funkce | Výskyt |
|------------------------|--|--|--------------------------------|
| Ceramidy |  | Signální molekuly, kožní bariéra, apoptóza | Kůže a buněčné membrány |
| Sfingoidní báze |  | Prekurzory sfingolipidů, buněčná signalizace | Všechny tkáně |
| Fosfosfingolipid |  | Strukturální funkce, myelinové pochvy, signalizace | Nervová tkáň, membrány neuronů |
| Neutrální sfingolipidy |  | Rozpoznávání buněk, stabilita membrán | Nervová tkáň, červené krvinky |
| Kyselé sfingolipidy |  | Buněčná signalizace, receptorové funkce | Nervová soustava a membrány |

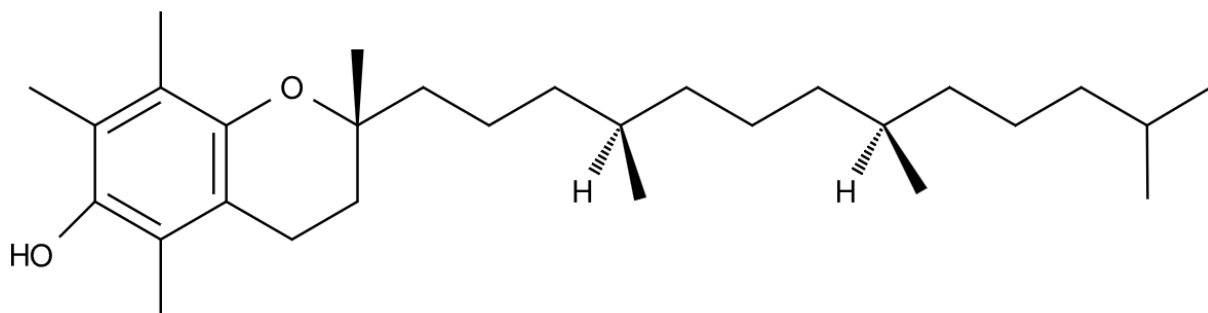
1.1.7 Prenoly

Prenoly se skládají z pěti uhlíkových isoprenových jednotek (Obrázek 10). Ty mohou obsahovat lineární, cyklické nebo rozvětvené řetězce, které se mohou skládat z MK, postranních řetězců s charakteristickými skupinami, cukrů nebo dvojných vazeb. Díky variabilitě isoprenolových jednotek existuje tisíce jedinečných lipidů. [3; 6]



Obrázek 10 - Struktura isoprenové jednotky

Důležitými preny jsou karotenoidy. To jsou jednoduché isoprenoidy, které slouží jako antioxidanty a prekurzor vitamínu A. Dalšími biologicky významnými preny jsou chinony a hydrochinony. Mezi ně se řadí například vitamin E (Obrázek 11), K a ubichinony. [2; 3]

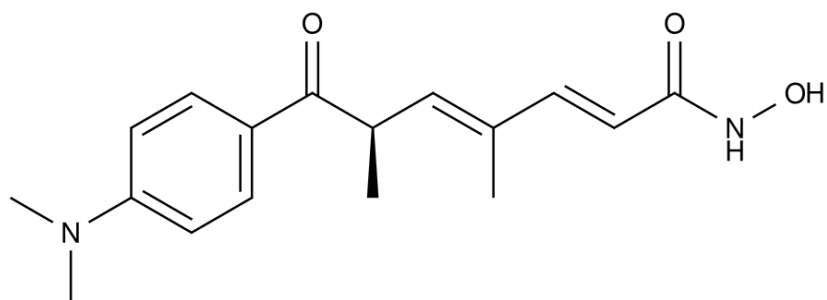


Obrázek 11 – Strukturní vzorec vitamínu E [24]

1.1.8 Polyketidy

Polyketidy vznikají polymerací acetylových a propionových podjednotek pomocí enzymů, které mají stejné mechanismy jako syntázy mastných kyselin. Do této skupiny patří také velké množství sekundárních metabolitů a přírodních produktů s velkou různorodostí. Nemalé množství polyketidů jsou cyklické molekuly, které jsou často modifikovány glykosylací, methylací, hydroxylací, oxidací, anebo dalšími procesy. Na Obrázku 12 je uveden zástupce polyketidů Trichostatin.

Polyketidy využíváme dnes a denně, jsou součástí antimikrobiálních, antiparazitních a protinádorových látek. [2; 3] Kromě toho se vyskytují v membránách a mohou sloužit jako zdroj energie. [6]

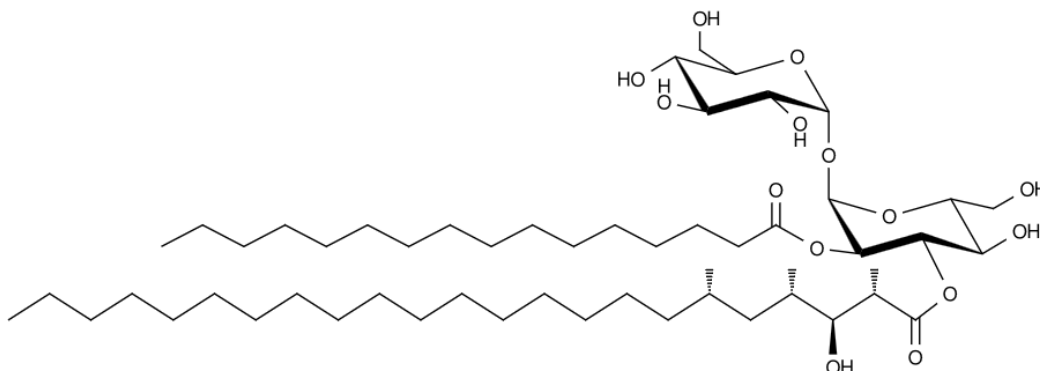


Obrázek 12 - Polyketidy: Trichostatin [24]

1.1.9 Sacharolipidy

Sacharolipidy jsou chemické sloučeniny, pro které je charakteristické spojení MK a cukerné složky. Cukr ve struktuře nahrazuje glycerolový skelet, který se nalézá v glycerolipidech a glycerofosfolipidech. Příklad sacharolipidu 2-O-hexadekanoyl-3-O-(2R,4S,6S-trimethyl-3R-hydroxy-trikosanoyl)- α,α -trehalóza je možné vidět na Obrázku 13.

V přírodě jsou sacharolipidy kompatibilní s membránami buněk. Známymi zástupci této skupiny jsou acylové glukosaminové prekurzory, které jsou potřebné pro růst například bakterie E. Coli. [2; 3; 6]

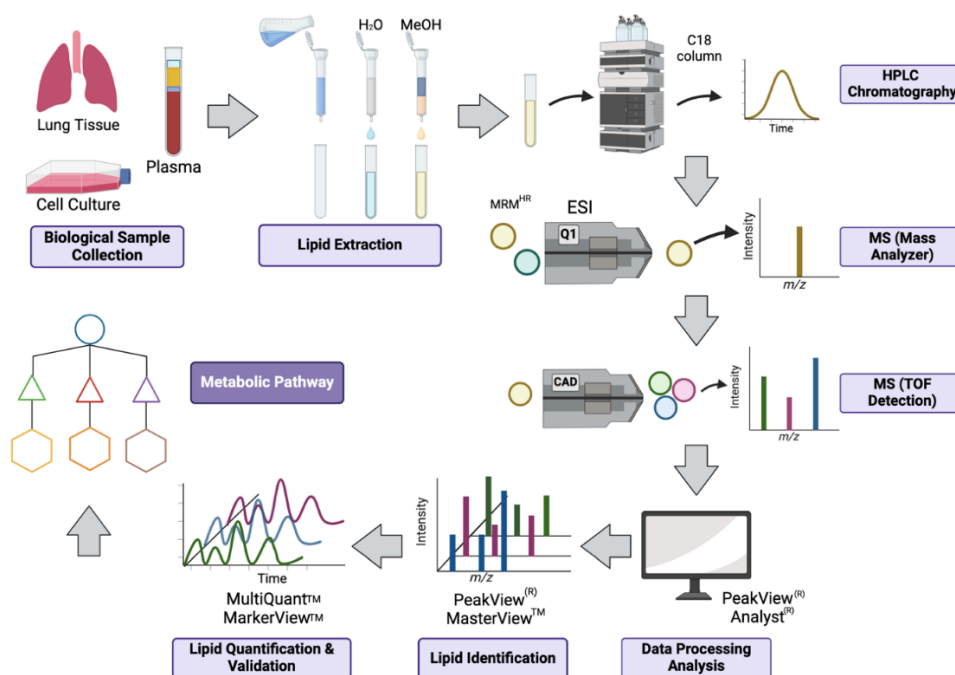


Obrázek 13 - Sacharolipid: 2-O-hexadekanoyl-3-O-(2R,4S,6S-trimethyl-3R-hydroxy-trikosanoyl)- α,α -trehalóza [24]

1.2 Analýza lipidů

Vědní obor, který se zabývá komplexním studiem lipidů a jejich biochemických drah v organismech, se nazývá lipidomika. Přináší cenné informace o funkci lipidů v organismu a o jejich roli při vzniku různých onemocnění, která souvisí s poruchami při metabolismu lipidů. Mezi tyto onemocnění patří například diabetes mellitus, rakovina, neurodegenerativní onemocnění nebo kardiovaskulární onemocnění. Jedná se o poměrně nový vědní obor, který se dynamicky rozvíjí díky rozvoji v informačních technologiích, pokrokům v lékařství a analytické chemii. Lipidomický výzkum pracuje s velkým množstvím dat, které poskytují detailní přehled nejen o změnách v množství lipidů, ale i o složení jednotlivých lipidových tříd. Lipidomická analýza se pak zaměřuje na identifikaci konkrétních lipidů v rámci jednotlivých tříd a jejich kvantifikaci. Dále se pak zaměřuje také na studium stanovených lipidů a jejich interakce s dalšími molekulami. [4; 6]

Lipidomická analýza pracuje s vysokou rozmanitostí lipidů. Vzhledem k rychlé degradaci některých lipidických tříd (Eikosanoidů) je vyloučeno použití univerzálních technik pro jejich extrakci ze vzorku, zejména z plazmy. [6; 26] Jedná se komplexní proces, který zahrnuje odběry vzorků od pacienta (krev, plazmu, tkáň) a jejich následnou úpravu pomocí extrakčních metod. Vyextrahované lipidy se následně separují na kapalinné chromatografii nebo se derivatizují a jejich těkavé deriváty je možné stanovit pomocí plynové chromatografie. Po separaci se stanovují kvalitativně i kvantitativně pomocí hmotnostní spektrometrie. Získaná data je nutné statisticky vyhodnotit. Obecný postup je uveden na Obrázku 14. [6; 26]



Obrázek 14 - Schéma přípravy vzorku z plazmy [6]

1.2.1 Příprava vzorku

Správná manipulace se vzorky tvoří nezbytnou součást lipidomické analýzy a je nezbytná pro následné získání relevantních a reprodukovatelných výsledků. Tímto pojmem se rozumí vhodný odběr vzorků, příprava, jejich skladování a následné zpracování před jejich analýzou. Příprava vzorku by měla být rychlá, reprodukovatelná a měla by být schopná pracovat s širokou škálou lipidů bez ovlivnění jejich struktury. [6; 9; 27]

V lipidomické analýze se pracuje nejčastěji se vzorky plazmy nebo se vzorky rostlin. Ta je odebírána od pacientů na příslušném odběrovém místě nebo v nemocnici. Pokud nelze provést analýzu ihned po odběru, je nutné plazmu uchovat. Vzorky plazmy se uchovávají ve zmraženém stavu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jinak by docházelo k degradaci vlivem biochemických procesů. [6; 27; 28; 29; 30]

Před extrakcí se do vzorků přidává interní standard. To je lipid, který je buď izotopicky značený, nebo lipid s lichým počtem uhlíků, protože v přírodě se vyskytují téměř vždy lipidy se sudým počtem uhlíků. Mezi hlavní metody extrakce lipidů v lipidomické analýze patří extrakce kapalina – kapalina, srážení pomocí organického rozpouštědla a extrakce na pevném sorbentu. Nejvíce využívanou metodou extrakce je pomocí organického rozpouštědla. [6; 27; 28; 30; 31; 32; 33]

1.2.1.1 Extrakce lipidů ze vzorku

Pro extrakci lipidů z biologické matrice se používá několik základních metod, které se odlišují ve složení rozpouštědel i ve způsobu provedení práce (Tabulka 4). Klasickou metodou je postup podle Bligha a Dyera, který využívá směs chloroformu, methanolu a vody. Tato metoda je vhodná pro extrakci lipidů z malého množství biologického materiálu. Nevýhodou je použití chloroformu, který patří mezi škodlivé látky, a také to, že lipidy se nachází ve spodní vrstvě, odkud je nutné je odebírat. Průnik špičky pipety přes vodnou horní vrstvu může vést k přenosu ve vodě rozpustných nečistot do vzorku. [6; 9; 30; 34; 35; 36] Na podobném principu funguje i upravená Folchova metoda, která používá směs chloroformu, methanolu a vody nebo fyziologického roztoku chloridu sodného (0,9 % roztok NaCl). I tato metoda má podobné výhody i nevýhody, protože pracuje také s chloroformem a lipidy se také nachází ve spodní vrstvě. [6; 9; 30; 35; 36; 37] Novým přístupem je metoda, která používá k extrakci lipidického podílu methyl-terc-butyl ether (MTBE). Výhodou je, že lipidy po oddělení fází zůstávají v horní vrstvě. To usnadňuje manipulaci při jejím odběru. Nevýhoda naopak je, že tato vrstva obsahuje relativně vysoký podíl vody, a tím pádem i potenciální ve vodě rozpustné

kontaminanty, které mohou negativně ovlivnit výsledky analýzy. [6; 30; 35; 36] Další možností je metoda použití směsi butanolu a methanolu (BUME). Tato metoda částečně řeší problém s přenosem kontaminantů, které jsou ve vodě rozpustné, protože omezuje jejich výskyt v organické fázi. Na druhou stranu, butanol se obtížně zbavuje ze vzorku, protože se špatně odpařuje, čímž prodlužuje čas přípravy a celé analýzy.

V neposlední řadě je možné použít proteinové vysrážení neboli precipitaci. Tato metoda se používá pro vysrážení proteinů ze vzorku pomocí vhodného rozpouštědla a je nutné, aby dané rozpouštědlo dobře rozpouštělo lipidy. Lipidy ve vzorku představují menší podíl ve srovnání s proteiny, které tvoří převážnou část analyzované matrice. Často se po proteinové precipitaci v lipidomice zařazuje ještě metoda extrakce na tuhé fázi (SPE). Pro lipidomickou analýzu je SPE vhodnější metodou než extrakce kapalina–kapalina, protože umožňuje frakcionaci jednotlivých lipidových tříd. Hlavní výhodou SPE je, že analyt sorbovaný na pevné fázi se nemůže rozkládat a může být uchován, aniž by se změnila jejich koncentrace. Další nespornou výhodou je, že SPE může být použita pro extrakci široké škály organických sloučenin z biologických, potravinových, environmentálních vzorků. Nevýhodou SPE je časová náročnost. [30; 35; 36; 38]

Každá z těchto metod má tedy své výhody i nevýhody a volba konkrétního postupu závisí na typu vzorku, požadované analýze a dostupném vybavení.

Tabulka 4 - Přehled extrakčních metod pro izolaci lipidů

| Název metody | Vzorky | Složení rozpouštědla | Výhody | Nevýhody |
|------------------------|--|--|--|--|
| Bligh a Dyer | Malé množství biologického materiálu (do 50 mg) | CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (2:1:0,9; v/v/v) | Dobrá extrakce lipidů | Toxický chloroform, lipidy ve spodní vrstvě, riziko kontaminace vodní fází |
| Folch | Větší množství biologického materiálu (0,1g) (obdobné jako Bligh a Dyer) | CHCl ₃ /MeOH/nasycený roztok NaCl (H ₂ O) (2:1; v/v a potom 0,2 objemu) | Dobrá výtěžnost lipidů | Toxický chloroform, lipidy ve spodní vrstvě, riziko kontaminace vodní fází |
| MTBE | Extrakce lipidů s lepší manipulací | MTBE:MeOH (5:1,5:1,45; v/v/v) | Lipidy ve vrchní vrstvě (snadný odběr), | Vrchní fáze obsahuje vodu (možná kontaminace) |
| BUME | Extrakce lipidů s omezením vodorozpustných kontaminantů | 1) Butanol:MeOH (3:1; v/v) 2) Heptan: ethyl acetát (3:1; v/v) 3) 1% CH ₃ COOH | Alternativa bez chloroformu | Obtížné odstranění butanolu – časově náročné |
| Proteinová precipitace | Odstranění proteinů ze vzorku a částečná extrakce lipidů | Například MeOH nebo acetonitril | Odstranění proteinů z matrice, vhodné před SPE | Nutnost následné extrakce, nízká selektivita k lipidům |
| SPE | Frakcionace lipidových tříd a čištění vzorku | Specifické sorbenty | Frakcionace lipidů, stabilita, široké použití | Časová náročnost, nutnost optimalizace |

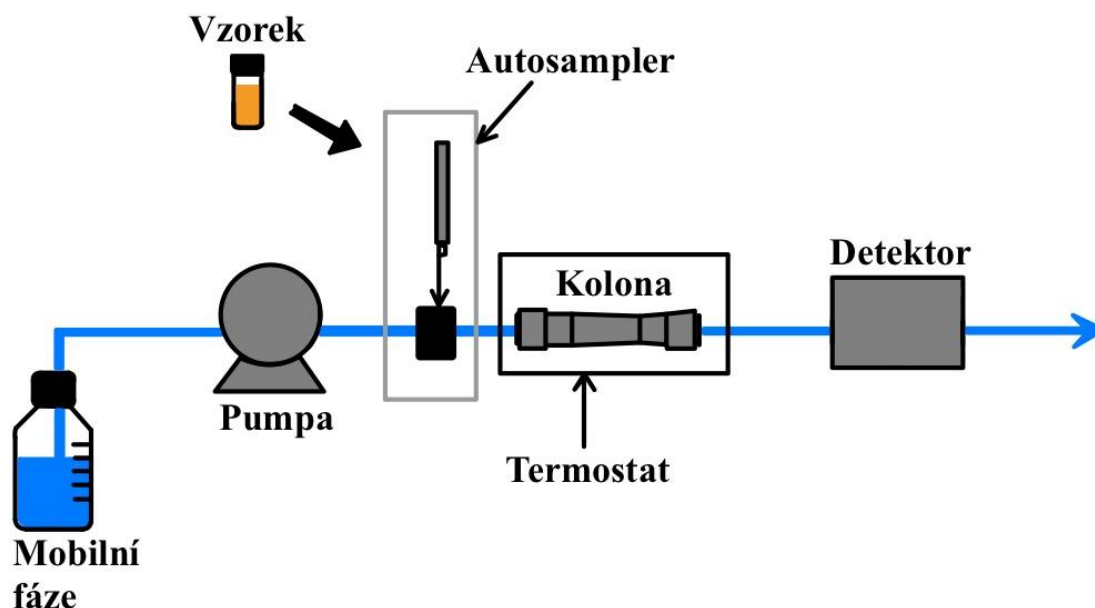
1.2.2 Separační techniky v lipidomice

V minulosti se k analýze lipidů používala tenkovrstvá chromatografie. Ta se v dnešní době uplatňuje především při preparativní izolaci konkrétních lipidů nebo lipidových tříd. Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) je osvědčenou metodou pro analýzu methylesterů MK po transesterifikaci lipidů, která umožňuje získat údaje o složení MK, ale ztrácí naopak informace o původních lipidech.

Pro polárně nabitě metabolity se využívá spojení elektroforézy s MS. V poslední době se ke zlepšení identifikace lipidů používají techniky iontové mobility (IM) spojené s MS (IM-MS). Kromě MS je možné pro analýzu polárních a nepolárních metabolitů použít i nukleární magnetickou rezonanci (NMR). [35] Nejrozšířenější a nejspolehlivější separační technikou pro separaci lipidů je vysokoúčinná nebo ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC nebo UHPLC). Ta ve spojení s MS se stává jedním z klíčových nástrojů pro lipidomickou analýzu. [28] Bohužel HPLC, UHPLC a GC ve spojení s MS mají omezenou schopnost separace a následné identifikace všech lipidů. Zde se může uplatnit dvourozměrné chromatografické metody. [39] Nicméně i multidimenzionální techniky mají své nevýhody. Mezi nevýhody patří časová náročnost analýzy, technická náročnost na vybavení, složitá interpretace dat nebo snížená mez detekce v důsledku ředění vzorku při průchodu oběma rozměry.

1.2.2.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která obsahuje dvě fáze – mobilní a stacionární. Mobilní fáze (MF) je pohyblivá a jedná se o kapalinu. Stacionární fáze (SF) je pevná a tvoří náplň chromatografické kolony. Samotná separace probíhá tak, že vzorek je zaveden do systému, kde je pomocí MF přiváděn na kolonu se SF. Molekuly vzorku prochází skrz kolonu a jejich rychlost pohybu kolonou závisí na jejich interakci se SF. Látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi se zdržují a pohybují se tak pomaleji, zatímco látky s nižší afinitou k SF se pohybují rychleji. Výsledkem je, že se jednotlivé složky ze vzorku rozdělí a postupně přichází již rozdělené na detektor, kde jsou detekovány a zaznamenány jejich eluční časy. V kapalinové chromatografii se používají různé typy detektorů jako například UV-VIS, refraktometrický, coulometrický, fluorescenční, hmotnostní spektrometr a další. Obecné schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na Obrázku 15.



Obrázek 15 - Schéma HPLC

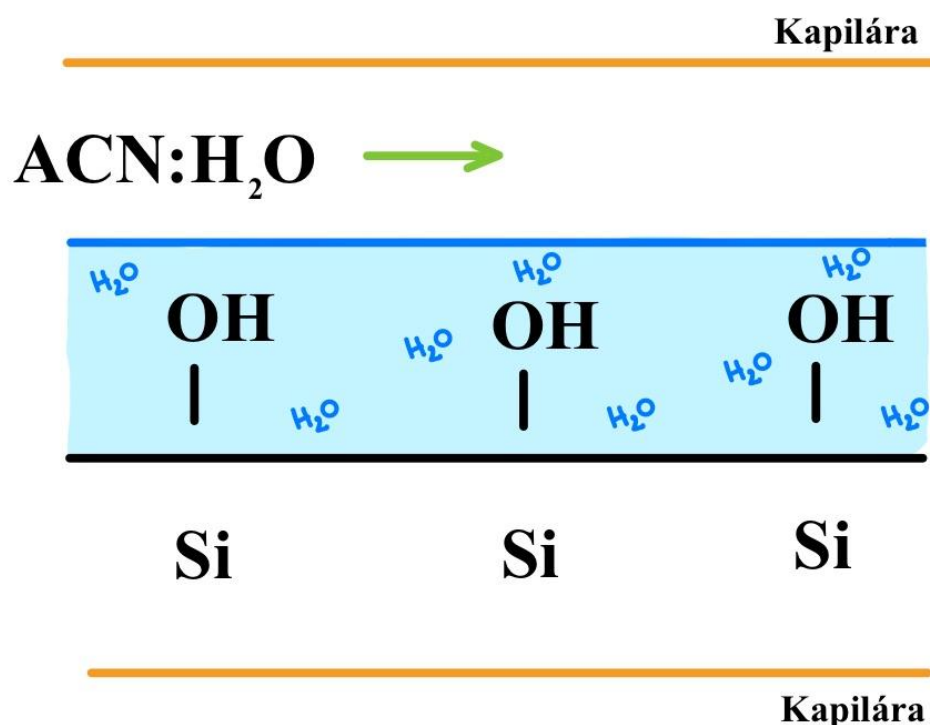
V současnosti existují různé módy kapalinové chromatografie jako například HPLC s normálními fázemi (NP-HPLC), s obrácenými fázemi (RP-HPLC), chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), nebo superkritická fluidní chromatografie (SFC). [6; 40]

Chromatografie s normálními fázemi obsahuje polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi. Mezi nejčastěji používané náplně kolon v NP-HPLC patří silikagel, alumina, vázané aminové, nitrilové nebo diolové skupiny. Jako MF se se používají různá organická rozpouštědla a jejich směsi, například hexan, methanol, methyl acetát, acetonitril. U NP-HPLC se běžně využívá gradientová eluce, kdy separace začíná s vysokým obsahem organického rozpouštědla a postupně se zvyšuje množství vody. NP-HPLC se používá pro separaci glycerofosfolipidů díky jejich polární hlavici nebo pro separaci lipidových tříd. [6; 39; 40; 41]

Dalším běžně využívaným módem je chromatografie s obrácenými fázemi. Tento mód má opačný princip jako NP-HPLC, tedy využívá nepolární SF a polární MF. Mezi nejčastěji používané náplně kolon v RP-HPLC patří oktadecyl (C18), oktyl (C8), triakontyl (C30), vázané nitrilové skupiny nebo hydrofobní polymery vázané na silikagelu. [42] Jako mobilní fáze se používají směsi vody s organickými rozpouštědly jako například methanol, acetonitril, isopropanol nebo tetrahydrofuran. [39; 41] Tento mód je nejpoužívanější v lipidomické analýze, protože lipidy patří mezi nepolární látky a interagují s tímto typem stacionární

fáze. [43] Konkrétně se RP-HPLC využívá například pro separaci mastných kyselin s dlouhými nasycenými řetězci nebo pro analýzu ceramidů. [6; 27; 28; 35; 39; 44]

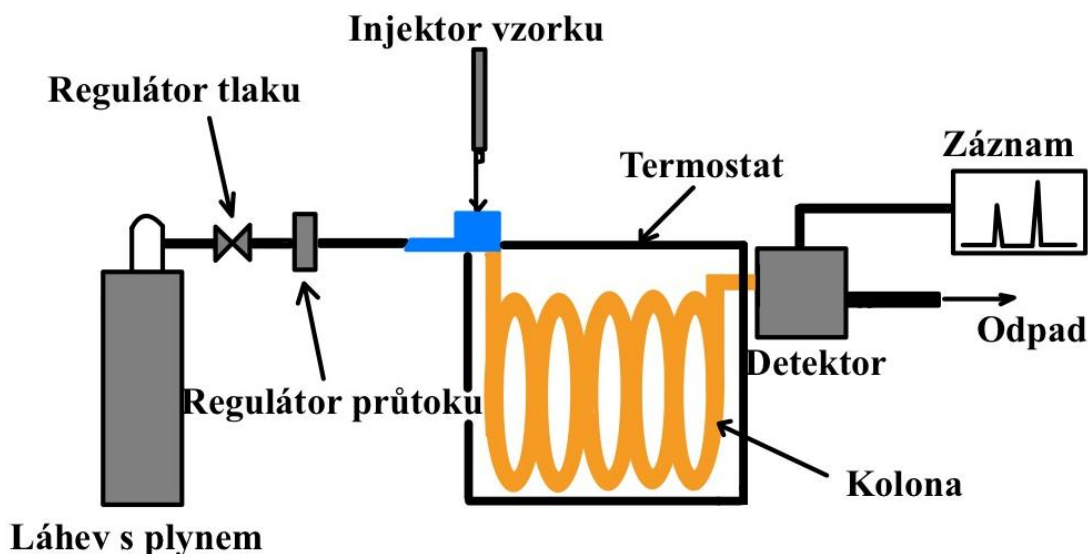
Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí je dalším hojně využívaným módem LC využívající se na dělení tříd lipidů. Principem HILIC je separace polárních látek na polární stacionární fázi. Mobilní fáze obsahuje směs acetonitrilu (ACN) nebo methanolu s vodou, přičemž voda je silně eluční činidlo. Gradientová eluce začíná obvykle s 2–5 % vody v MF a se zvyšujícím se časem roste její podíl v mobilní fázi. Do mobilní fáze je nutné přidávat pufr, jako jsou octan amonný nebo mravenčan amonný, které stabilizují iontové interakce a zlepšují opakovatelnost separace. V HILIC se využívá různé složení stacionárních fází, jako například oxid křemičitý, aminopropylsilan, alkyl amid nebo sulfobetainové skupiny. [39; 41] Separační mechanismus v HILIC je založen na vzniku vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. Vodná vrstva umožňuje interakci polárních analytů pomocí vodíkových vazeb, dipólových interakcí nebo elektrostatických sil (viz Obrázek 16). [6; 39; 41; 42; 43; 45] V lipidomické analýze se HILIC například používá k separaci jednotlivých lipidových kategorií ze vzorku plazmy. [6]



Obrázek 16 - Schéma principu separace v HILIC

1.2.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie funguje na principu separace těkavých látek podle jejich afinity ke stacionární fázi. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je druhou nejlepší metodou pro analýzu těkavých a primárních metabolitů [43; 46], které je nutné před samotnou analýzou derivatizovat (viz kapitola 1.2.2.2.1). [35; 47; 48] Toto spojení má obrovskou výhodu oproti HPLC-MS, a to ve formě knihovny spekter. Obecné schéma plynového chromatografu je na Obrázku 17.



Obrázek 17 - Schéma plynové chromatografie

Plynová chromatografie obsahuje mobilní a stacionární fázi stejně jako kapalinová chromatografie. Mobilní fází je nosný plyn, který nereaguje s analytem neboli je inertní. Mezi nejpoužívanější nosné plyny patří dusík, helium, argon nebo vodík. Stacionární fáze je tvořena tenkou vrstvou kapaliny, pevné látky nebo polymeru nanesenou na vnitřní stěnu kapilární kolony. Kolony dosahují délky desítek metrů o průměru nejčastěji 0,25 mm. [49] Separace probíhá následovně. Vzorek je nadávkován do dávkovacího prostoru, který je vyhříván na teplotu o zhruba 50 °C vyšší, než je teplota varu vzorku. Kolona je vyhřívána na počáteční teplotu, která závisí na těkavosti analytu. U velmi těkavých látek může být počáteční teplota 40 °C a pro méně těkavé látky se volí počáteční teplota obvykle okolo 80 °C s následným teplotním gradientem na 200–300 °C. Následně molekuly plynného analytu proudí skrz kolonu. Rychlost separace závisí na jejich těkavosti a jejich interakci se SF. Výsledkem je rozdělení jednotlivých složek vzorku a jejich následná detekce.

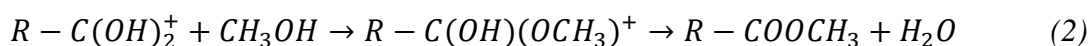
V plynové chromatografii se používají různé typy detektorů, jako například plamenově ionizační, tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu nebo hmotnostní

spektrometr. [50] Pro analýzu methylesterů mastných kyselin tzv. FAME se využívají specializované kapilární kolony. Nejběžnější kolony pro analýzu FAME jsou kyanopropylové kolony, které umožňují přesné rozlišení podle délky řetězce, počtu dvojných vazeb, včetně separace *cis/trans* izomerů a polohových isomerů dvojných vazeb. [51; 52; 53; 54] Další možností jsou polyethylglykolové kolony s vyšší polaritou vhodné pro separaci methylesterů mastných kyselin s podobnou molekulovou hmotností, ale rozdílnou polaritou. [53; 54] Méně často se používají polydimethylsiloxanové kolony, které jsou nepolární až slabě polární, termo stabilní, ale mají nižší selektivitu, a používají se pro separaci nasyčených FAME a jednoduchých směsí. [54; 55] Analýza FAME umožňuje přesnou identifikaci i kvantifikaci, což je klíčové pro lipidomiku, metabolomiku a studium civilizačních chorob. Nevýhoda GC oproti HPLC je délka analýzy. Ta se zde pohybuje mezi 40–60 minutami na rozdíl od průměrné doby analýzy u HPLC, která trvá obvykle několik minut nebo nižší desítky minut. [48]

1.2.2.2.1 Derivatizace lipidů

Obvykle se derivatizují mastné kyseliny s délkou řetězce 10C a více, které se následně analyzují pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Nejčastěji se mastné kyseliny derivatizují na methylestery tzv. FAME (fatty acid methyl ester). Mezi běžně používaná derivatizační činidla se řadí kyselina chlorovodíková (HCl), acetylchlorid nebo kyselina sírová. Tyto činidla vstupují do reakcí jako katalyzátory a tvoří jak kyselé prostředí, tak aktivují karboxylovou skupinu. [35; 56]

Nejčastěji se na derivatizaci mastných kyselin volí právě HCl kvůli své jednoduchosti a snadné aplikaci v laboratorní praxi. Kyselina chlorovodíková poskytuje při reakci proton ve formě H^+ čímž dochází k aktivaci karboxylové skupiny $-COOH$ (Rovnice 1) a následně s ní reaguje methanol za vzniku methylesteru mastné kyseliny a současného odštěpení vody (Rovnice 2).



Samotná esterifikace pomocí HCl probíhá následovně. K suchému lipidovému extraktu se přidá roztok methanolu a HCl a vzniká směs se nechá po určitou dobu zahřívát. Vzhledem k tomu, že některé lipidy se mohou špatně rozpouštět v roztoku methanolu s HCl, může být nutné přidat před derivatizací jiné rozpouštědlo, které zlepší rozpustnost lipidů a zefektivní průběh derivatizace. Další možností je derivatizační metoda pomocí acetylchloridu, která byla

zavedena v roce 1986. Tato metoda spočívá v přidání acetylchloridu k methanolovému roztoku se vzorkem a nechá se zahřívát po dobu 60 minut při teplotě 95–100 °C. Po derivatizaci je nutné vzorek neutralizovat a extrahovat vzniklé FAME do organického rozpouštědla (methanol). Nevýhodou je, že některé polynenasycené mastné kyseliny jsou při vysokých teplotách nestabilní, což může ovlivnit výsledky analýzy. [35; 56]

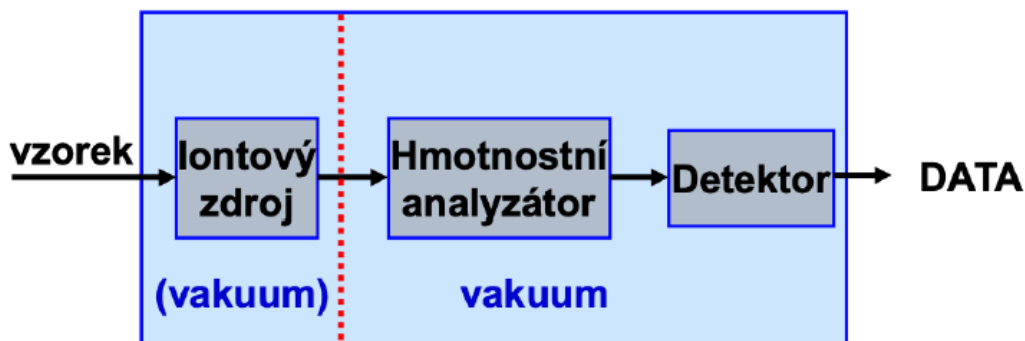
V neposlední řadě je možné použít derivatizační metodu pomocí methoxidu sodného (NaOCH₃). K lipidovému extraktu se ve většině případů přidá 0,5M NaOCH₃ rozpuštěného v bezvodém methanolu a roztok se nechá 5 minut reagovat při 45 °C. Následně se roztok zneutralizuje pomocí NaHSO₄. Nakonec se lipidy vyextrahují pomocí organického rozpouštědla a analyzují se pomocí plynové chromatografie. K derivatizaci lze využít i hydroxid draselný. Derivatizace je poměrně jednoduchá a rychlá. K lipidovému extraktu se přidá methanolický roztok s KOH a nechá se zahřívát při 50 °C po dobu několika minut. Potom se přidá dusičnan sodný a vzniklý supernatan se odebere a analyzuje na plynové chromatografii. [35; 56]

1.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie patří mezi nejuniverzálnější analytické techniky, která se využívá v chemii, biochemii, farmacii, medicíně a mnoha dalších odvětvích. Výhodou této metody je vysoká citlivost a selektivita, extrémně malá spotřeba vzorku, možnost automatizace a spojení s dalšími technikami jako je GC nebo HPLC. Nevýhodou je, že patří mezi destruktivní metody, poměrně značná pořizovací cena a vysoké provozní náklady. [5; 40; 57; 58]

1.2.3.1 Princip

Základním principem hmotnostní spektrometrie je dělení iontů na základě hmotnosti ku náboji (m/z) a následného záznamu jejich intenzit. Celý proces probíhá za vysokého vakua, aby nedocházelo k interakcím s molekulami vzduchu, které by mohly negativně ovlivnit rozdělení vzniklých iontů. Tato metoda je užitečná pro kvalitativní analýzu, protože každá molekula má svůj specifický způsob fragmentace, díky kterému ji lze následně rozpoznat. Samotný přístroj se skládá ze tří částí: iontový zdroj, hmotnostně selektivní analyzátor a detektor (Obrázek 18). [5; 6; 40; 57; 58]

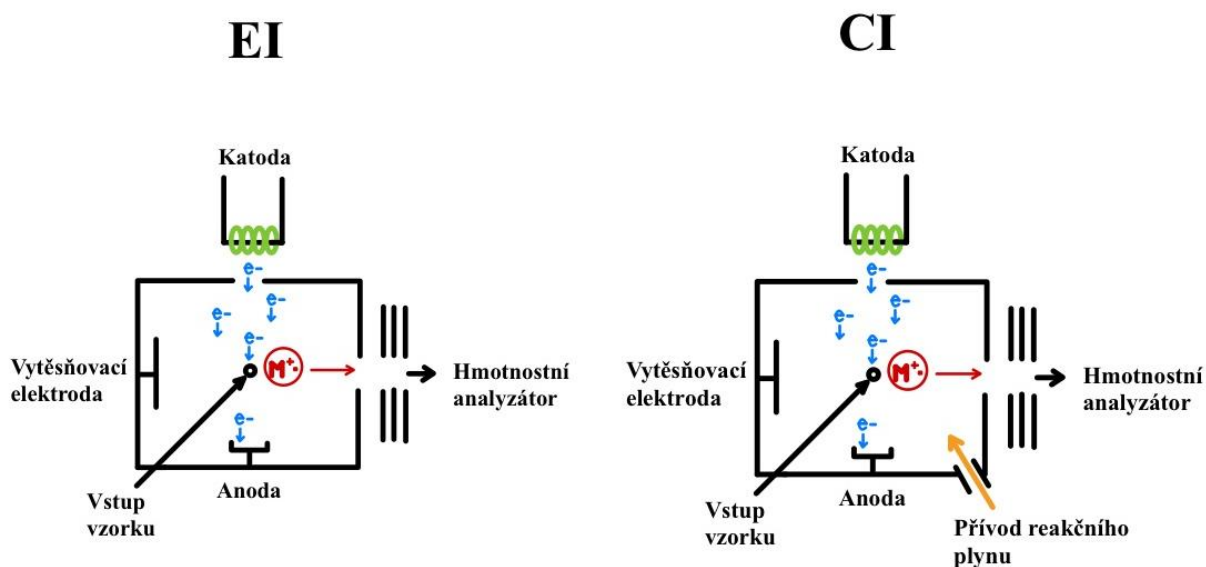


Obrázek 18 - Schéma MS [58]

1.2.3.2 Ionizační techniky

Před každou analýzou je nutné si vybrat optimální ionizaci pro danou látku, protože dosud neexistuje univerzální ionizační technika. Ionizační techniky mohou pracovat jak za atmosférického tlaku, tak i za vakua. Podle vnitřní energie rozlišujeme ionizační techniky na dvě skupiny: tvrdé a měkké. [6; 59]

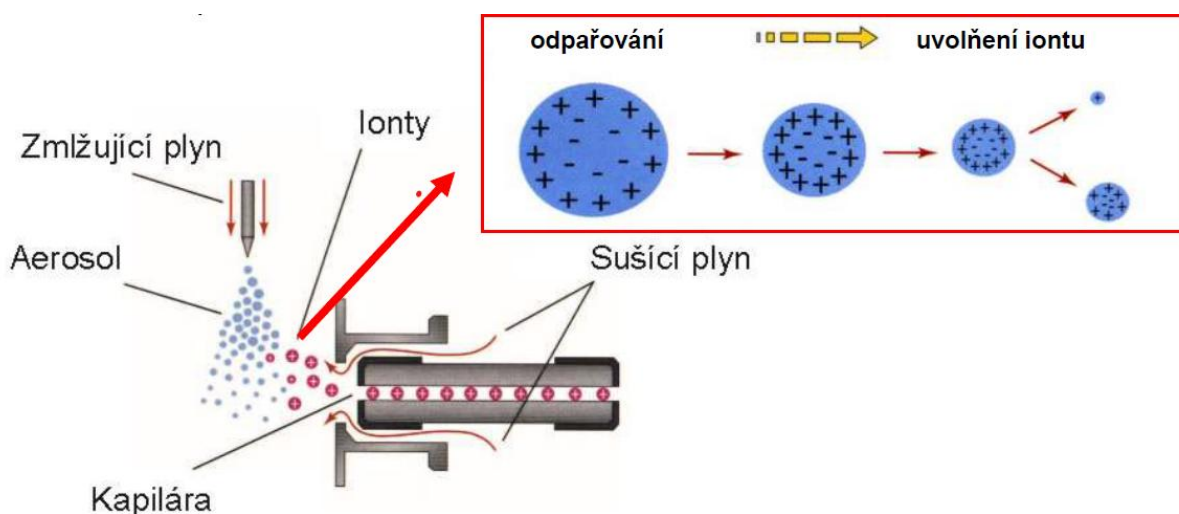
Tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace (EI) a je typická pro GC/MS (Obrázek 19). Principem této techniky je, že žhavená katoda z wolframu nebo rhenia emituje elektrony, které jsou přitahovány k anodě. V reakčním prostoru se s elektrony z katody sráží plynný vzorek, díky čemuž dojde k vyražení elektronu z molekuly vzorku, čímž vznikne kladný molekulový iont (M^+). Nově vzniklý iont je ve většině případů nestabilní a může se rozpadnout na fragmenty. Tyto fragmenty jsou urychleny pomocí elektrického pole do hmotnostního analyzátoru, kde jsou měřeny podle jejich m/z . Celý tento proces probíhá za vakua. [6; 59; 60]



Obrázek 19 - Schéma elektronové a chemické ionizace

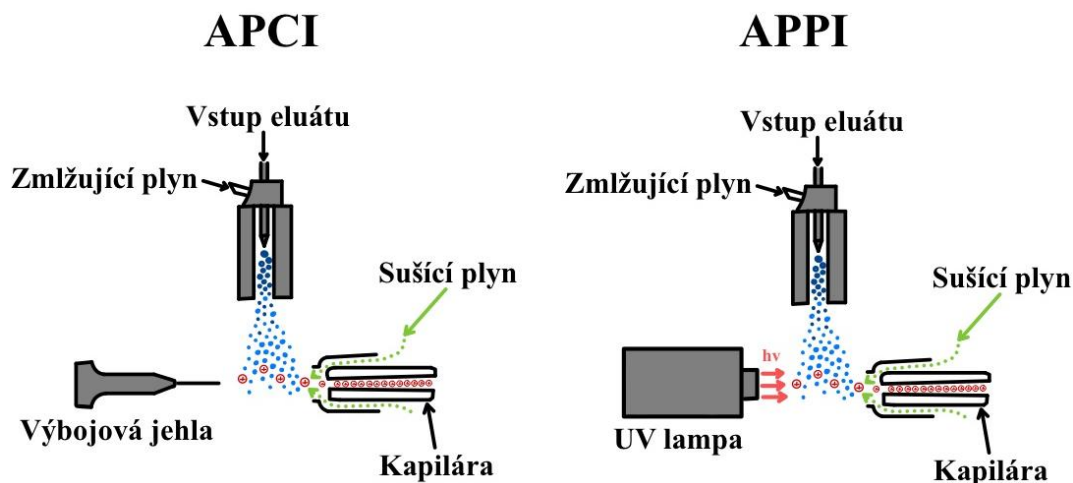
Mezi měkké ionizační techniky pro spojení s GC patří chemická ionizace (CI). Tato technika se odlišuje od EI v tom, že dovnitř do reakčního prostoru je přiváděn reakční plyn (Obrázek 19), který se nejprve ionizuje pomocí elektronů vyzářených z katody a následně reaguje s analytem na základě ion-molekulárních interakcí. Mezi používané plyny patří například methan, isobutan nebo amoniak. Díky zvolení správného reakčního plynu dochází k selektivní ionizaci neboli ke vzniku požadovaných iontů.

Dále k měkkým ionizačním technikám patří techniky pracující za atmosférického tlaku jako jsou ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a další. Pro tyto zmíněné techniky je typické spojení s HPLC. Tyto tři techniky pracují na podobném principu. Kapilárou je přiveden roztok analytu s MF, který je pomocí zmlžovacího plynu (nejčastěji N₂) převeden na aerosol. U ESI dochází díky napětí na kapiláře ke sprejování ve formě tzv. Taylorova kuželu. Následně dochází k Reilegově efektu, což je odpařování rozpouštěla v kapičkách aerosolu, až dojde ke Coulombické explozi, čímž vzniknou nejmenší možné kapičky. Následně jsou tyto miniaturní kapičky vtaženy do hmotnostního analyzátoru (viz Obrázek 20). [6; 59; 60]



Obrázek 20 - Schéma ESI [59]

U APCI není aplikováno napětí na kapiláře, ale až na výbojové jehle. APPI má místo výbojové jehly UV lampu (viz Obrázek 21). [6; 59; 60]

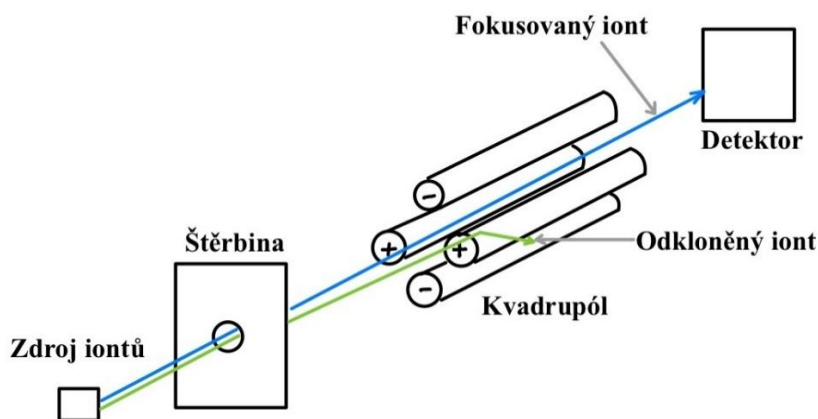


Obrázek 21 - Schéma měkkých ionizačních technik APCI a APPI

1.2.3.3 Hmotnostní analyzátoary

Hmotnostní analyzátoary jsou jednou ze tří důležitých částí MS. Jejich úkolem je separace iontu na základě m/z . Mezi hlavní typy MS analyzátoary patří magnetický sektorový analyzátoar nebo magnetický sektorový analyzátoar s dvojitou fokusací, kvadrupólový analyzátoar, iontová past, analyzátoar doby letu (TOF), Orbitrap nebo cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. [61]

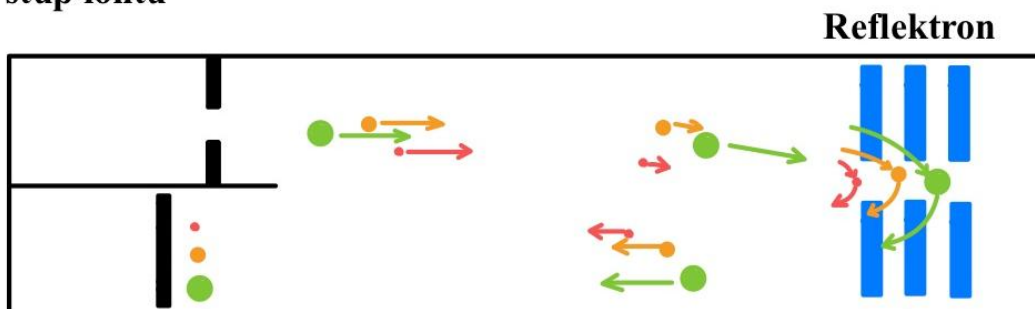
Kvadrupólový analyzátoar je hmotnostní analyzátoar, který se skládá ze čtyř tyčí, dvě obsahují kladné napětí a zbylé dvě mají záporné napětí. Tyto tyče jsou umístěny rovnoběžně a mezi nimi se generuje elektrické pole, kde se střídá stejnosměrné i střídavé napětí. Díky tomu je umožněno průchodu pouze těm iontům, které splňují specifické m/z a mají stabilní oscilace. Ostatní jsou přitáhnuty k jednotlivým tyčím, díky nestabilním oscilacím, a jsou odstraněny (Obrázek 22). [61]



Obrázek 22 - Schéma kvadrupolového analyzátoary

Analyzátor doby letu funguje na principu, že u vstupu jsou ionty urychleny a následně se měří čas doby letu iontů na detektor. Tento analyzátor může obsahovat tzv. reflektron, což je soustava elektrod, která je umístěna v ohybu dráhy a způsobí zpomalení rychlých iontů tak, že se „zaboří“ a při opuštění reflektronu mají ionty stejnou kinetickou energii (viz Obrázek 23). [61]

Vstup iontů

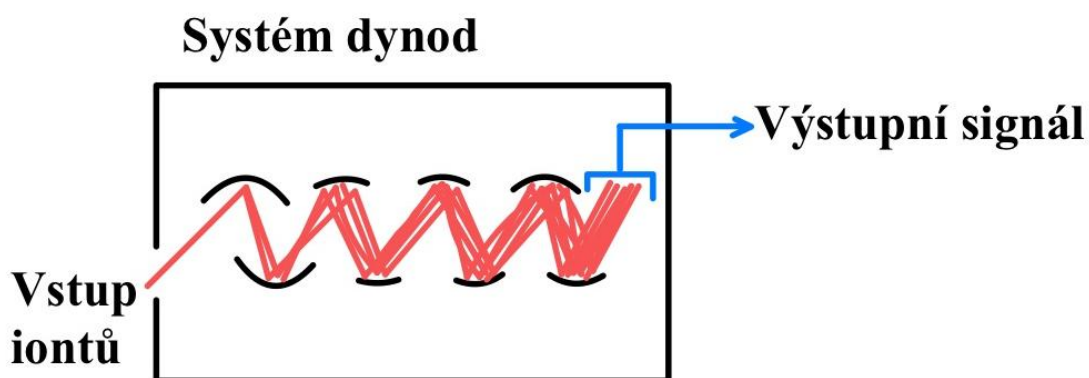


Detektor

Obrázek 23 - Schéma analyzátoru TOF

1.2.3.4 Detekce iontů v hmotnostní spektrometrii

Nejběžnějším detektorem v hmotnostní spektrometrii je elektronásobič (Obrázek 24). Ten funguje na principu emise sekundárních elektronů. Ty jsou urychlovány a usměřovány na další dynody, kde se proces vyrážení elektronů opakuje. Každá z dynod násobí počet elektronů, až vznikne silný proud elektronů, který je na konci detekován jako elektrický signál. [58]



Obrázek 24 - Schéma detektoru MS (fotonásobič)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam přístrojů a zařízení

- Analytické váhy ABJ320-4NM – Kern & Sohn GmbH (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Automatické pipety Sartorius (Sartorius, Göttingen, Německo)
- Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1290 (Agilent Technologies, Waldbromn, Německo) a tandemový hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS QTOF Waters (Waters, Milford, USA)
- Kolona GC TR FAME Thermo Fisher Scientific (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Kolona HPLC Ascentis Express HILIC (15 cm x 3,0 mm, 2,7 μ m) (Belleforte, USA)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 5977A MSD s kvadrupólovým analyzátozem (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a autosamplerem G4513A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Referenční systém čištění vody Milli-Q – Millipore (Molsheim, Francie)
- Termoblok IKA dry block heater 1 (IKA, Staufen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Bandelin sonorex TK52 (Bandelin, Berlin, Německo)
- Vortex (IKA, Staufen, Německo)

2.2 Seznam chemikálií

- Acetonitril (ACN) – MS čistota ($\geq 99,9\%$), Honeywell (Seelze, Německo)
- Ultra čistá voda po úpravě Milli-Q
- Hexan (Hex) – MS čistota ($\geq 99,9\%$), Honeywell (Seelze, Německo)
- Chlorid sodný – čistota 99,9%, Penta, (Chrudim, Česká republika)
- Chloroform – Honeywell (Seelze, Německo)
- Methanolát sodný – Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
- Methanol (MeOH) – MS čistota ($\geq 99,9\%$), Honeywell (Seelze, Německo)
- Mravenčan amonný – Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
- Směs standardů methylesterů mastných kyselin 37 Component FAME Mix (Sigma Aldrich, Mnichov, Německo) – složení směsi je uvedeno v Příloze 1

2.3 Příprava vzorku

2.3.1 MTBE extrakce

Do skleněných vialek o objemu 4 ml bylo přidáno 20 μ l IS mixu, 25 μ l plazmy, 0,7 ml methanolu a 2,3 ml MTBE. Vzniklá směs byla vložena na 15 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C. Po vychladnutí bylo přidáno 0,6 ml 250mM uhličitanu amonného o pH 5. Vzniklá směs byla promíchána po dobu 5 minut při 20 °C. Po ochlazení byla směs vložena do odstředivky na 5 minut s 6000 otáčkami za minutu. Poté byla odebrána horní vrstva MTBE do 8ml vialky (první frakce). Následně bylo přidáno 2,3 ml MTBE k vodné vrstvě a opět se promíchalo po dobu 5 minut při teplotě 20 °C. Po uplynutí 5 minut byla směs vložena opět do odstředivky na 6000 otáček za minutu na 5 minut. Byla odebrána vrstva MTBE a vložena do vialky s první frakcí. Následně bylo MTBE odpařeno pod proudem dusíku při 35 °C do sucha a následně rozpuštěno v 250 μ l směsi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$.

2.4 Kapalinová chromatografie

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 s kolonou Ascentis Express HILIC (15 cm x 3,0 mm, 2,7 μ m) byl použit pro separaci do lipidových tříd pomocí kapalinové chromatografie. Kolona byla po celou dobu vyhřívána termostatem na 40 °C. Byly připraveny dvě mobilní fáze, které obsahovaly směs $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ a 10mM pufr mravenčanu amonného. Mobilní fáze A (MF (A)) obsahovala $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 96:4 a mobilní fáze B (MF (B)) obsahovala $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:50. Následně bylo nutné pro ustálení počátečních podmínek kolony nechat protékat mobilní fází A o průtoku 0,5 ml/min po dobu 30 minut. Po uplynutí doby bylo možné spustit analýzu. Byl nadávkován 1 μ l již vyextrahovaného vzorku plazmy a byl použit oplach dávkovací jehly. Jehla byla opláchnuta před nástřikem na kolonu v hexanu z důvodu možné kontaminace vzorku do následující analýzy. Byl použit gradient průtoku mobilních fází: 0. – 12. min 100 % MF (A), 12. – 25. min 90 % MF (A), 25. – 26. min 50 % MF (A) a 26. – 40. min 100 % MF (A). Kromě gradientu mobilních fází se měnil i gradient průtoku: 0. – 25,9. min průtok 0,5 ml/min, 26. – 39,9. min průtok 0,8 ml/min a ve 40. minutě byl vrácen na hodnotu 0,5 ml/min. Po skončení analýzy bylo nutné počkat na ustálení tlaku a průtoku na koloně.

2.5 Hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS QTOF

Pro experimenty spojené s identifikací a izolací jednotlivých frakcí lipidů byly provedeny na hmotnostním spektrometru Xevo G2-XS (Waters, Milford, USA). Data byla získávána v režimu „sensitivity“ při snímání kladných ionů za podmínek, které jsou v Tabulce 5. Peptid leucin enkefalin byl použit jako referenční hmotnost (lock mass) pro hmotnostní korekci naměřených hodnot m/z.

Tabulka 5 - Podmínky MS (Xevo)

| | |
|---|-------------------------------------|
| Napětí na kapiláře | 3 kV |
| Napětí na vstupní kuželové elektrodě | 20 V |
| Offset zdroje | 90 V |
| Teplota zdroje | 150 °C |
| Teplota sušícího plynu | 500 °C |
| Průtok plynu do vstupního kuželu | 50 l/h |
| Průtok sušícího plynu | 1000 l/h |
| Rozsah měření | 100–1500 m/z |
| Doba snímání | 0,5 s (kontinuální profilový režim) |

2.5.1 Odběr frakcí

Po analýze plazmy a zjištění retenčních časů jednotlivých lipidových tříd byly manuálně odebrány jednotlivé frakce. Z hmotnostního spektrometru byla vyjmuta kapilára a v příslušných časových rozmezech by sebrány frakce eluátu do 4ml vialek. Každý sběr byl proveden 2x. Po obou sběrech bylo nutné se přesvědčit o přítomnosti dané lipidové třídy. Z vialek byl odebrán 1 ml do 2ml vialek a ty byly následně analyzovány s nástřikem 4 μ l. Po nástřiku byl zbytek frakce přendán ke zbytku sběru zpět do 4ml vialky. Celkem bylo odebráno 5 frakcí v časových intervalech: 1. sběr 0. – 3. minuta; 2. sběr 10. – 14,7. minuta; 3. sběr 15. – 16,4. minuta; 4. sběr 17. – 19,5. minuta a 5. sběr 19,7. – 21,5. minuta.

2.6 Převedení lipidových frakcí na methylestery

Do vialky o objemu 4 ml bylo naváženo přibližně 100 mg vzorku, a k němu bylo přidáno 1,5 ml methanolického roztoku methanolátu sodného. Obsah vialky byl řádně promíchán na vortexu a poté byl vložen na 20 minut do termobloku vyhřátého na 60 °C a v průběhu reakce

bylo s vialkou třepáno vždy po uplynutí 5 minut. Po vychladnutí byl k roztoku přidán 1 ml nasyceného vodného roztoku NaCl a 2 ml hexanu a vialka byla vložena na minutu do vortexu. Po protřepání došlo k oddělení fází a následnému odebrání horní organické fáze. Tato část byla odpařena do sucha pod proudem dusíku a rozpuštěna 100 μ l hexanu.

2.7 GC-MS

Podmínky pro měření v systému GC jsou v Tabulce 6 a MS podmínky v Tabulce 7.

Tabulka 6 - GC podmínky separace

| | |
|-------------------------------|--|
| Kolona | TR FAME 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m |
| Nosný plyn | Helium |
| Průtok nosného plynu | 1,5 ml/min |
| Teplota nástřiku | 250 °C |
| Teplotní program | Počáteční teplota: 80 °C Gradient: 10 °C/min do 150 °C, 3 °C/min do 235 °C držení 20 min |
| Dávkovaný objem vzorku | 5 μ l |
| Splitovací poměr | 1:1 |

Tabulka 7 - MS podmínky

| | |
|----------------------------------|--------------------|
| Ionizace | EI + |
| Zapnutí MS | 8 minut |
| Frekvence skenování | 5 skenů za sekundu |
| Teplota EI zdroje | 250 °C |
| Teplota kvadrupólu | 150 °C |
| Teplota MSD transfer line | 300 °C |
| Rozsah skenu (m/z) | 50–600 |

2.8 Zpracování experimentálních dat

Výsledky z HPLC/MS byly interpretovány v programu MassLynx Waters (Waters, Milford, USA), výsledky z GC/MS byly interpretovány v programu Agilent MassHunter Data Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a v programu knihovny NIST. Následně již interpretovaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) a Microsoft Word (Microsoft, Redmond, USA). Obrázky byly tvořeny v programu Goodnotes 6 (GoodNotes Limited, Londýn, Velká Británie).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro izolaci různých lipidových tříd z lidské plazmy s využitím kapalinové chromatografie v HILIC módu, sběr eluátu do frakcí podle retenčních časů a následně analyzovat složení mastných kyselin v izolovaných třídách lipidů pomocí GC/MS.

Obdržený vzorek lidské plazmy byl již vyextrahován pomocí MTBE metody. Takto připravený vzorek nebylo již nutné nijak upravovat. Spojení metod HILIC a GC/MS bylo vybráno poprvé a bylo nutné ověřit, zda koncentrace lipidů v odebraných frakcích bude dostačující pro následnou detekci po převedení na methylestery v GC/MS.

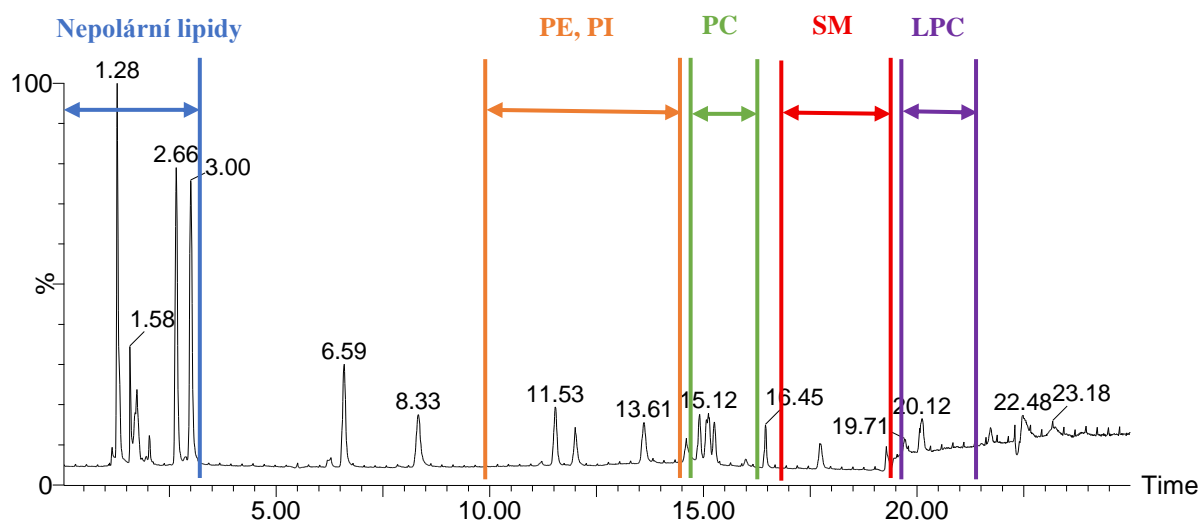
3.1 Optimalizace metody HPLC

Nejprve bylo nutné optimalizovat metodu HPLC v módu HILIC pro separaci jednotlivých frakcí lipidických tříd z lidské plazmy. Byla provedena optimalizace dávkování vzorku i gradientu mobilních fází.

Po celou dobu optimalizace a následné analýzy byla použita kolona Ascentis Express HILIC (15 cm x 3,0 mm; 2,7 μ m). Tato kolona obsahuje vysoce purifikovaný silikagel, který neobsahuje žádné další příměsi. Díky tomu je SF vysoce polární a vhodná pro separaci lipidových tříd na základě jejich polarit. Jako mobilní fáze byly zvoleny směsi MF (A) (ACN:H₂O s 10mM pufrém mravenčanu amonného 96:4; v/v) a MF (B) (ACN:H₂O s 10mM pufrém mravenčanu amonného 50:50; v/v), protože tyto systémy odpovídají požadavkům HILIC separace. Acetonitril jako organické rozpouštědlo tvoří dominantní část mobilní fáze a podporuje retenční mechanismus založený na interakci polárních analytů s povrchem stacionární fáze. Voda je nezbytnou složkou pro vytvoření vodního hydratačního filmu, který umožňuje vznik potřebných interakcí. Přídavek pufru mravenčanu amonného stabilizuje pH systému, zlepšuje iontovou sílu prostředí a je vhodný pro detekci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Při hledání vhodných podmínek pro separaci lipidických tříd byl použit vzorek, který obsahoval směs standardů s jednotlivými zástupci lipidických tříd. Pro standardy bylo zvoleno dávkování 1 μ l. V průběhu optimalizace byly vyzkoušeny různé varianty gradientů mobilních fází, a nakonec byl vybrán gradient s programem 0. – 12. min 100 % MF (A), 12. – 25. min 90 % MF (A), 25. – 26. min 50 % MF (A) a 26. – 40. min 100 % MF (A). Dále byl upravován i průtok v gradientu: 0. – 25,9. min 0,5 ml/min, 26. – 39,9. min 0,8 ml/min a 40. min 0,5 ml/min.

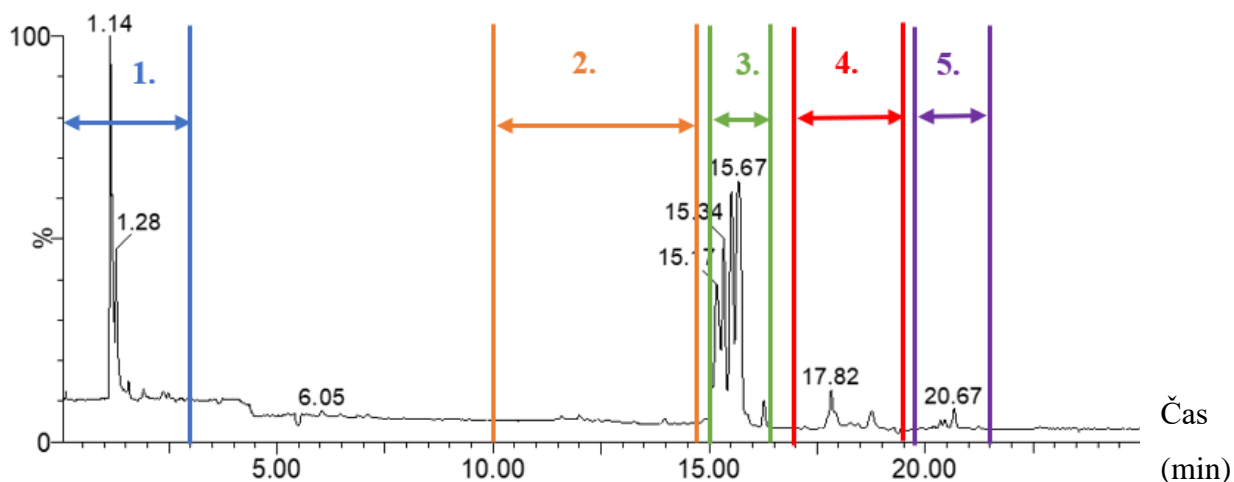
Úprava průtoku v časovém rozmezí 26 – 39,9 min byla provedena z důvodu ušetření času celkové analýzy. Při předchozích gradientech bylo vždy nutné nechat po 30minutové analýze dalších 30 minut pro ustálení kolony. Chromatogram se záznamem standardů je možné vidět na Obrázku 25. Optimalizované podmínky pro HILIC separaci byly následně aplikovány i na analýzu extrahovaného vzorku z lidské plazmy. Pro identifikaci lipidových tříd jak ze směsi standardů, tak z extraktu vzorku lidské plazmy, byl použit hmotnostní spektrometr (Xevo QTOF).



Obrázek 25 - Chromatogram standardů zástupců lipidických tříd; Třída nepolárních lipidů obsahuje tracylglyceroly, diacylglyceroly a monoacylglyceroly, třída PE (Fosfatidylethanolaminy) a PI (Fosfatidylinositoly), třída PC (Fosfatidylcholiny), třída SM (Sfingomyeliny), třída LPC (Lysofosfatidylcholiny)

3.2 Sběr frakcí po HILIC separaci

Pro odběr jednotlivých frakcí lipidových tříd bylo nejprve zvoleno dávkování 4 μ l vzorku lidské plazmy z důvodu vyšší koncentrace lipidických tříd ve vzorku a tím pádem i jejich lepší detekci. Nicméně se vyskytl problém s ucpáním tzv. sedla dávkovací jehly u UHPLC a bylo nutné změnit množství dávkovaného vzorku na 2 μ l na jednu analýzu. Celkem vzniklo 5 druhů odebraných lipidových frakcí, které obsahovaly sběry z jedné analýzy. Na Obrázku 26 je možné vidět chromatogram vzorku plazmy, kde jsou znázorněny časové úseky jednotlivých sběrů.



Obrázek 26 - Chromatogram extraktu lidské plazmy, znázornění jednotlivých frakcí; Frakce napolárních lipidů (1.), frakce PE a PI (2.), frakce PC (3.), frakce SM (4.) a frakce LPC (5.)

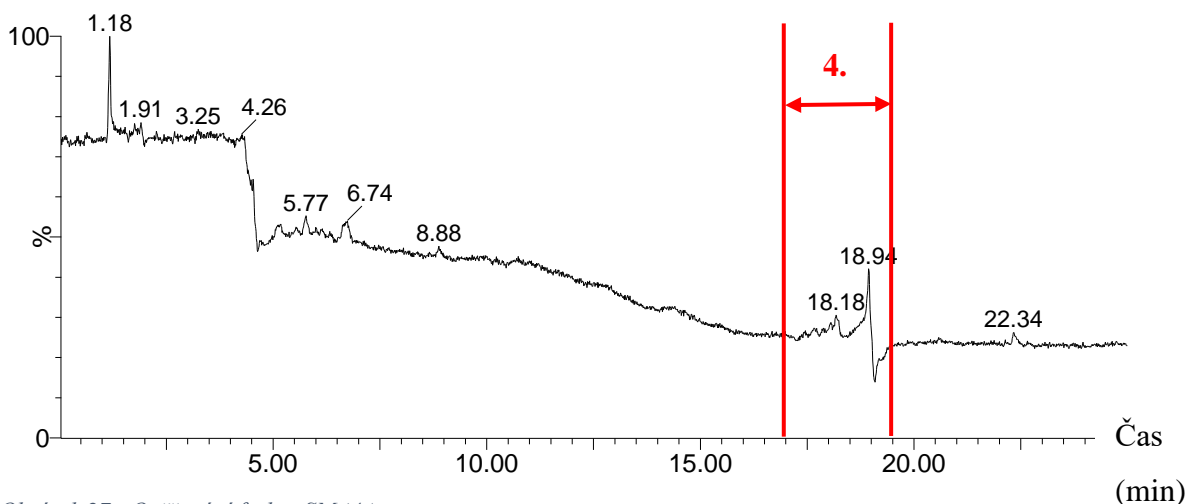
První frakce obsahovala napolární lipidy, které tvořily zejména triacylglyceroly (TAG), diacylglyceroly (DAG) a monoacylglyceroly (MAG). Druhá frakce obsahovala fosfatidylinositoly (PI) a fosfatidylethanolaminy (PE). Třetí sběr obsahoval fosfocholiny (PC), čtvrtý sběr obsahoval sfingomyeliny (SM) a pátý sběr lysofosfatidylcholiny (LPC). Celkový souhrn je možné vidět v Tabulce 8. Eluční pořadí jednotlivých lipidických tříd jak u standardů, tak u extrahovaného vzorku lidské plazmy, je stejné jako v literatuře. [45; 62; 63]

Tabulka 8 – Lipidické třídy v jednotlivých frakcích

| Frakce | Lipidické třídy | Čas sběru (min) |
|--------|-----------------|-----------------|
| 1. | TAG, DAG, MAG | 0,0–3,0 |
| 2. | PE, PI | 10,0–14,7 |
| 3. | PC | 15,0–16,4 |
| 4. | SM | 17,0–19,5 |
| 5. | LPC | 19,7–21,5 |

V prvním sběru byly dávkovány 4 µl vzorku a u dalších dvou sběrů byly dávkovány 2 µl vzorku na jednu analýzu. Poté byla provedena analýza slepého pokusu, kterou je možné vidět v Příloze 2. Analýza slepého pokusu byla provedena z důvodu ověření, že nedocházelo k přenosu jednotlivých lipidických tříd mezi nasbíranými frakcemi neboli tzv. „carry over“.

Odebrané sběry byly analyzovány za stejných podmínek a nebyla zjištěna kontaminace u žádného z pěti sběrů lipidických tříd. Ověřovací chromatogram frakce č.4 (SM) je vidět na Obrázku 27.

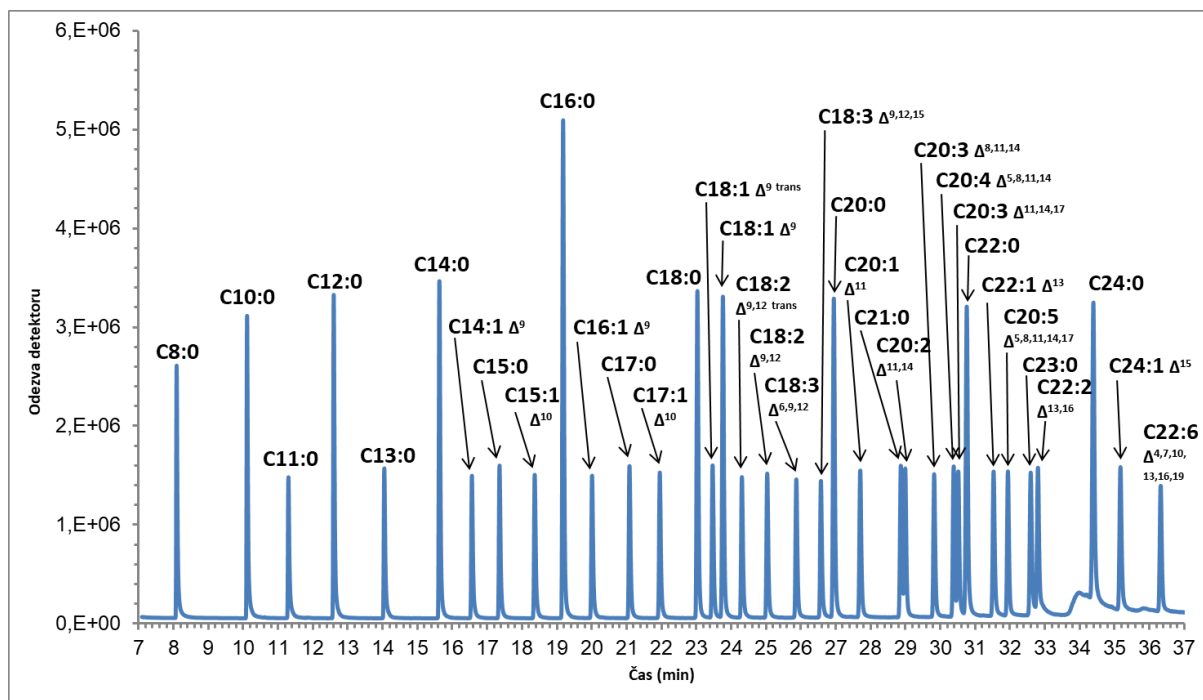


Obrázek 27 - Ověřování frakce SM (4.)

3.3 Analýza mastných kyselin z frakcí

Metoda esterifikace lipidových frakcí a následná analýza na GC/MS byla převzata z diplomové práce Ing. Michaely Merclové. [64] Principem bylo převedení frakcí s lipidickými třídami na methylestery mastných kyselin pomocí methanolátu sodného a methanolu. Následně byl vzniklý roztok zahříván při 60 °C 20 minut a každých 5 minut byl protřepán. Po uplynutí doby a vychladnutí směsi byl přidán roztok NaCl a byla provedena extrakce hexanem. Po protřepání byla odebrána vrchní organická fáze, která byla odpařena na dusíku a znovu rozpuštěna v malém množství hexanu (viz kapitola 2.6). Pro analýzu na GC/MS byla vybrána kolona TR FAME (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Tato kolona byla zvolena z toho důvodu, protože obsahuje SF na bázi kyanosilylovaných polysiloxanů a je tak vhodná nejen pro samotnou separaci methylesterů MK, ale i pro rozlišení jejich geometrických izomerů *cis/trans* (*Z/E*) a polohových izomerů dvojných vazeb. Podmínky pro analýzu na GC/MS, které byly zvoleny, jsou popsány výše v kapitole 2.7. Na Obrázku 28 je chromatogram směsi standardů methylesterů mastných kyselin 37 Component FAME Mix, který byl změřen za výše popsáných podmínek. Směs obsahovala methylestery mastných kyselin s různou délkou řetězce

i s rozdílným počtem dvojných vazeb. Methylestery s kratšími řetězci měly nižší bod varu, a proto eluovaly dříve než FAME s delšími řetězci nebo s dvojnými vazbami. U nenasycených FAME hrála roli nejen délka jejich řetězce ale i umístění a počet dvojných vazeb. Čím vzdálenější byla dvojná vazba od uhlíku karboxylové skupiny, tím později ester MK eluoval. Také bylo ověřeno, že se zvyšujícím počtem dvojných vazeb se lineárně prodlužoval eluční čas daných FAME. Pokud se ve směsi vyskytovaly *cis* i *trans* izomery jedné látky, tak nejprve eluoval *trans* izomer, a pak následně *cis* izomer.



Obrázek 28 - Chromatogram směsi standardů methylesterů MK

3.3.1 Mastné kyseliny v lipidických frakcích

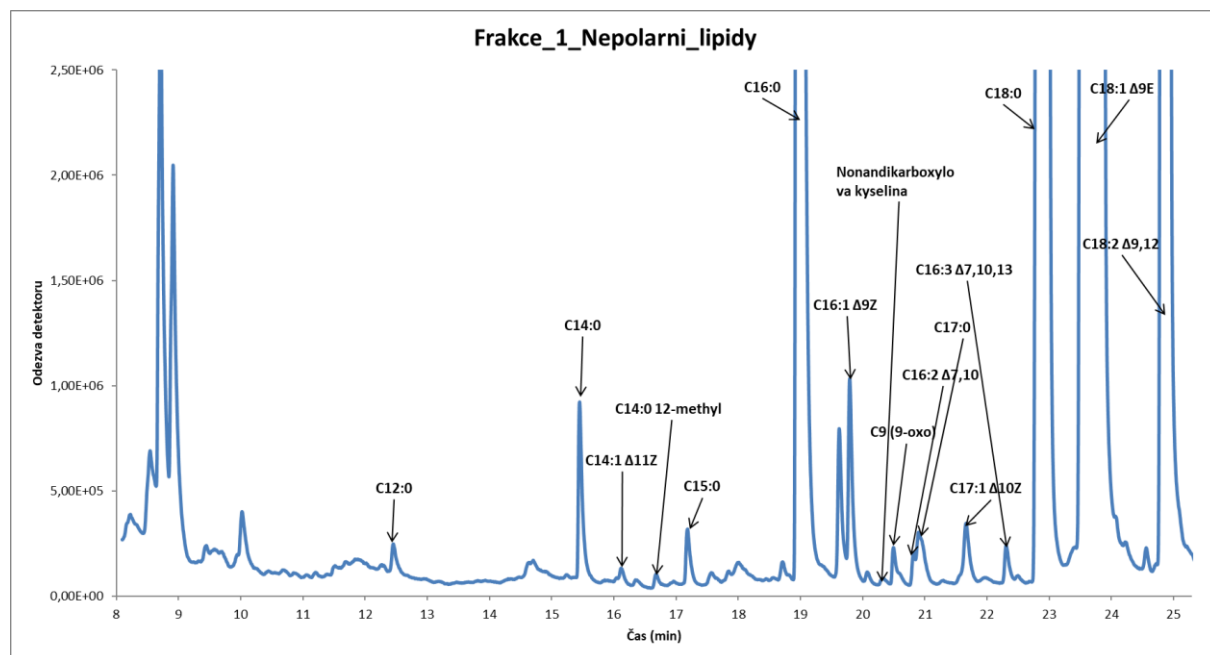
Mastné kyseliny byly analyzovány v 5 frakcích, které obsahovaly odlišnou lipidickou třídu. Jednotlivé methylestery byly identifikovány porovnáním s retenčními časy se standardy a také porovnáním pomocí knihovny hmotnostních spekter NIST. Procentuální zastoupení jednotlivých methylesterů mastných kyselin ve frakcích bylo vypočteno ze sumy ploch píků MK. Cílem bylo zjistit zastoupení MK v jednotlivých frakcích a zjistit, v čem se jednotlivé frakce od sebe liší nebo co mají společného. Seznam všech mastných kyselin, které se vyskytovaly a jejich procentuální zastoupení, jsou uvedeny v Tabulce 9 a jejich retenční časy jsou uvedeny v Příloze 3.

Tabulka 9 - Zastoupení MK (%) v jednotlivých frakcích; (-) znamená nedetekováno

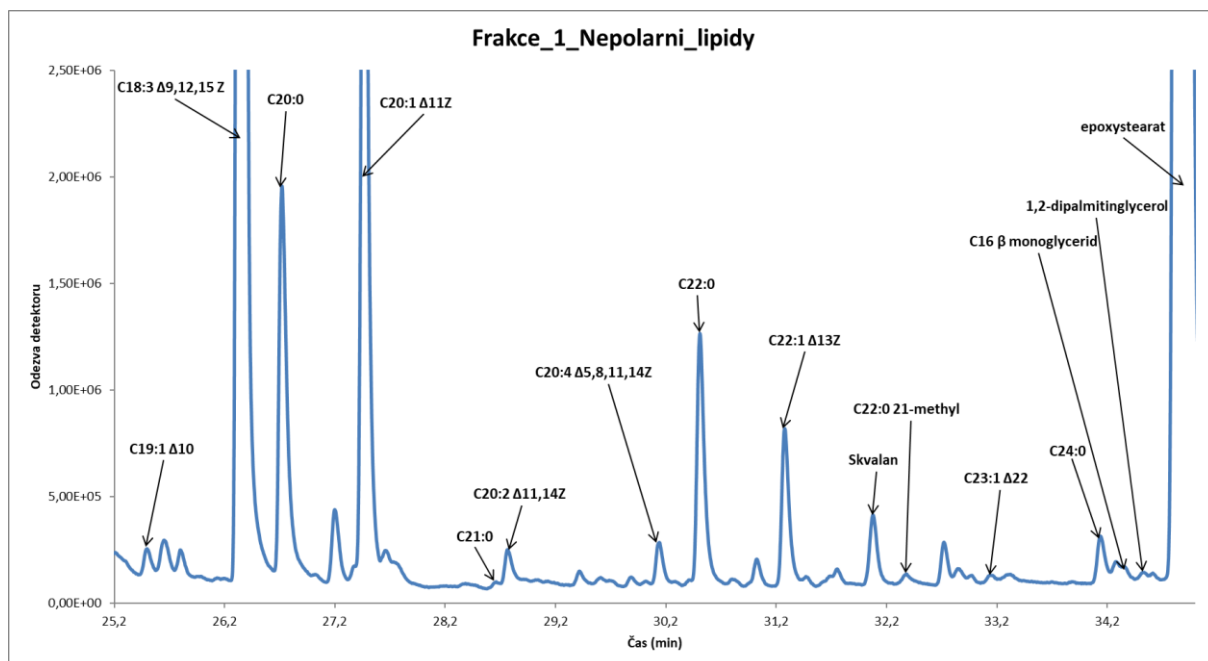
| Název | Frakce 1. | Frakce 2. | Frakce 3. | Frakce 4. | Frakce 5. |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| C 12:0 | 0,05 | - | - | - | - |
| C 14:0 | 0,24 | 0,75 | 0,81 | 0,13 | 0,69 |
| C 14:1 ^{Δ9} | - | 0,09 | 0,06 | 0,02 | 0,11 |
| C 14:1 ^{Δ11 Z} | 0,04 | - | - | - | - |
| C 14:0 (12-methyl) | 0,03 | 0,08 | 0,08 | - | 0,11 |
| C 14:0 (13-methyl) | - | 0,05 | 0,03 | - | 0,04 |
| C 15:0 | 0,09 | 0,26 | 0,40 | 0,07 | 0,29 |
| C 15:1 ^{Δ14} | - | - | 0,15 | - | - |
| C 14:1 ^{Δ9} (14-methyl) | - | - | 0,04 | - | - |
| C 16:0 | 10,95 | 34,13 | 32,51 | 8,23 | 33,19 |
| C 16:1 ^{Δ9} | - | 0,62 | - | 0,23 | 0,89 |
| C 16:1 ^{Δ9 Z} | 0,29 | 0,08 | 0,71 | 0,20 | - |
| C 9:0 (dikarboxylová) | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | - |
| C 9:0 (9-oxo) | 0,08 | 0,09 | 0,04 | 0,08 | - |
| C 16:2 ^{Δ7,10} | 0,04 | - | - | 0,03 | - |
| C 17:0 | 0,15 | 0,27 | 0,23 | 0,12 | 0,18 |
| C 17:1 ^{Δ10} | - | - | - | - | 0,09 |
| C 17:1 ^{Δ10 Z} | 0,13 | - | - | 0,08 | - |
| C 16:3 ^{Δ7,10,13} | 0,06 | - | - | 0,08 | - |
| C 18:0 | 9,60 | 31,24 | 26,13 | 6,78 | 30,49 |
| C 18:1 ^{Δ6} | - | 0,07 | 0,20 | - | - |
| C 18:1 ^{Δ9 Z} | 43,28 | 18,10 | 24,00 | 48,31 | 19,09 |
| C 18:1 ^{Δ11} | - | 1,18 | 1,63 | 0,03 | - |
| C 18:1 ^{Δ13 E} | - | - | - | - | 1,20 |
| C 18:2 ^{Δ9,12} | 14,33 | - | 8,00 | 14,94 | 5,58 |
| C 18:2 ^{Δ9,12 Z} | - | 5,44 | - | - | - |
| C 19:1 ^{Δ10} | 0,04 | - | - | - | - |
| C 18:3 ^{Δ9,12,15} | - | - | 2,24 | 5,87 | 1,85 |
| C 18:3 ^{Δ9,12,15 Z} | 5,83 | 1,82 | - | - | - |
| C 20:0 | 0,63 | 0,43 | 0,40 | 0,42 | 0,43 |
| C 20:1 ^{Δ11} | - | 0,35 | 0,45 | 1,32 | 0,37 |
| C 20:1 ^{Δ11 Z} | 1,35 | - | - | - | - |
| C 20:1 ^{Δ9} | - | - | - | 0,04 | - |
| C 21:0 | 0,01 | - | - | - | - |
| C 20:2 ^{Δ11,14} | - | - | 0,08 | 0,05 | - |
| C 20:2 ^{Δ11,14 Z} | 0,05 | - | - | - | - |
| C 20:4 ^{Δ5,8,11,14} | - | 0,04 | 0,57 | - | - |
| C 20:4 ^{Δ5,8,11,14 Z} | 0,06 | - | - | - | - |
| C 22:0 | 0,37 | 0,17 | 0,18 | 0,31 | 0,16 |
| C 22:1 ^{Δ11} | - | - | - | - | 0,37 |
| C 22:1 ^{Δ13} | - | - | 0,06 | 0,22 | - |
| C 22:1 ^{Δ13 Z} | 0,23 | 0,05 | - | - | - |
| Skvalan | 0,11 | 0,30 | 0,38 | 0,50 | 0,61 |
| C 22:0 (21-methyl) | 0,02 | - | - | - | - |
| C 23:1 ^{Δ22} | 0,01 | - | - | - | - |
| C 24:0 | 0,07 | 0,11 | 0,12 | - | 0,09 |
| 16-β-monoglycerid | 0,02 | 0,10 | 0,18 | 0,05 | 0,08 |
| 1,2-dipalmitinglycerol | 0,01 | - | - | - | 0,11 |
| Epoxystearat | 11,81 | 4,16 | 5,03 | 11,86 | 4,16 |

Nejvýznamnější zastoupení v jednotlivých frakcích měly olejová kyselina (C 18:1 Δ^{9Z} ; 18,10–48,31 %), kyselina stearová (C 18:0; 6,78–31,24 %) a kyselina palmitová (C 16:0; 8,23–34,13 %). Kyselina palmitová byla detekována ve všech frakcích, nejvíce byla zastoupena ve Frakci 2, Frakci 3 a ve Frakci 5. Vysoká koncentrace kyseliny stearové byla zaznamenána ve Frakci 2, 3 a 5. Vysoký podíl kyseliny olejové byl zjištěn ve Frakci 1 a ve Frakci 4. Ve srovnání s ostatními frakcemi je patrné, že právě podíl kyseliny olejové a kyseliny palmitové rozděluje frakce na dvě skupiny. Na skupinu frakcí obsahující kyselinu olejovou a na skupinu neobsahující kyselinu olejovou. Ve všech frakcích byl detekován také epoxystearát, což nemusí být neobvyklé. Epoxidy mohou vznikat vlivem žluknutí mastných kyselin. Ve frakcích se epoxidy vyskytovaly ve vyšší koncentraci (4–12 %).

Ve Frakci 1 (nepolární lipidy) se nejvíce vyskytovala olejová kyselina (C 18:1 Δ^{9Z}), jejíž obsah byl 43,27 %. Druhou nejvíce zastoupenou MK byla kyselina linolová (C 18:2 $\Delta^{9,12}$) s obsahem 14,32 %. Dále následovala kyselina palmitová (C 16:0) s obsahem 10,95 % a kyselina stearová (C 18:0) s obsahem 9,60 %. Obsah dalších mastných kyselin se pohyboval v rozsahu jednotek až setin procenta. V této jediné frakci se vyskytovaly ve větším počtu MK s lichým počtem uhlíků. Konkrétně C 23:1 Δ^{22} , C 21:0, C 19:1 Δ^{10} , C 17:1 Δ^{10Z} , C 17:0 a C 15:0. Dále se tato frakce odlišovala od ostatních frakcí výskytem rozvětvených MK C 22:0 (21-methyl). Části chromatogramů s popsányými píky Frakce 1 jsou uvedené na Obrázku 29 a 30. Z důvodu lepší čitelnosti jsou chromatogramy rozděleny na dvě části.



Obrázek 29 - První část popsaného chromatogramu Frakce 1



Obrázek 30 - Druhá část popsaného chromatogramu Frakce 1

Nejvíce zastoupenou MK ve Frakci 2 (fosfatidylethanolaminy, fosfatidylinositoly) byla kyselina palmitová (C 16:0) s obsahem 34,13 %. Potom následovala kyselina stearová (C 18:0) s obsahem 31,24 %. Třetí nejvíce zastoupenou MK byla olejová kyselina (C 18:1 Δ^9 Z) s obsahem 18,10 %. Tato frakce se odlišovala od ostatních výskytem kyseliny *cis*-linolové (C 18:2 $\Delta^9,12$ Z), která byla zastoupena 5,44 %. Části chromatogramů s popsanými píky Frakce 2 lze nalézt v Přílohách (Příloha 4).

Frakce 3 (fosfatidylcholinu) obsahovala 32,51 % kyseliny palmitové, 26,13 % kyseliny stearové, 24,00 % kyseliny olejové a 8,00 % kyseliny linolové. Tato frakce se odlišuje od ostatních výskytem rozvětvené MK 14-methyltetradek-9-enové kyseliny (C 14:1 Δ^9 (14-methyl)). Části chromatogramů s popsanými píky Frakce 3 lze nalézt v Přílohách (Příloha 5).

Ve Frakci 4 (sfingomyeliny) byla nejzastoupenější MK kyselina olejová (C 18:1 Δ^9 Z) s procentuální zastoupením 48,31 %. Touto MK se také tato frakce výrazně lišila od ostatních frakcí. Části chromatogramů s popsanými píky Frakce 4 lze nalézt v Přílohách (Příloha 6).

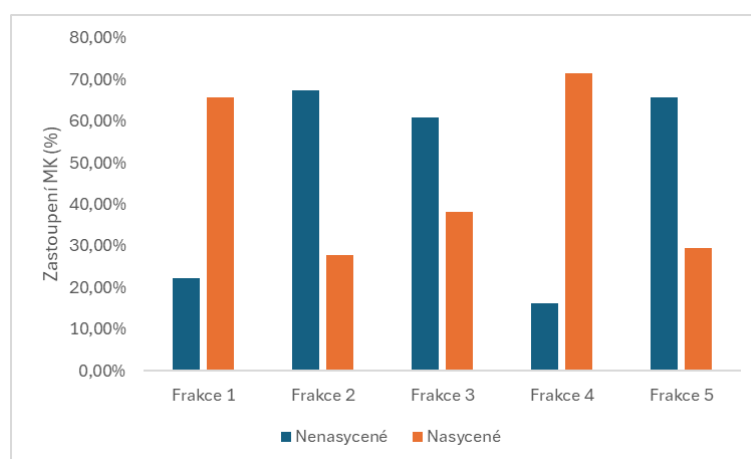
Poslední Frakce 5 (lysofosfatidylcholinu) obsahovala nejvíce kyselinu palmitovou (C 16:0) s obsahem 33,19 %, kyselinu stearovou (C 18:0) s obsahem 30,49 % a kyselinu olejovou (C 18:1 Δ^9 Z) s obsahem 19,09 %. Tato frakce se odlišovala od ostatních výskytem MK C 22:1 Δ^{11} a C 17:1 Δ^{10} . Části chromatogramů s popsanými píky Frakce 5 lze nalézt v Přílohách (Příloha 7).

Byl připraven slepý vzorek, který namísto vzorku lipidické frakce obsahoval směs chloroformu a MeOH 1:1 (v/v). Tato směs byla podrobena identickému postupu esterifikace

jako byl proveden u vzorků frakcí lipidických tříd. Ke směsi byl přidán methanolický roztok methanolátu sodného a vzniklá směs byla zahřívána 20 minut při 60 °C a každých 5 minut byla protřepána. Po vychladnutí byl ke směsi přidán nasycený roztok NaCl a byla provedena extrakce hexanem. Po oddělení byla odebrána vrchní organická fáze, která byla poté odpařena na proudě dusíku a znovu rozpuštěna v hexanu (viz kapitola 2.6). Tento slepý vzorek byl analyzován na GC/MS za stejných podmínek jako vzorek frakce lipidické třídy (viz kapitola 2.7). Bylo zjištěno, že tento slepý vzorek obsahoval kromě epoxidů i některé estery mastných kyselin. Jednalo se zejména o estery kyseliny palmitové, stearové a olejové. Tyto látky by se ve slepém vzorku neměly vyskytovat, což naznačuje možnou kontaminaci, kvůli které mohlo dojít ke zkreslení výsledků analýzy. Výskyt jednotlivých mastných kyselin nebyl ovlivněn kontaminací, ale mohlo dojít ke zkreslení jejich kvantitativního stanovení. Postupnými analýzami a vylučovací metodou bylo zjištěno, že zdrojem kontaminace byl zásobní roztok methanolu. Tento roztok byl používán na přípravu methanolickeho roztoku methanolátu sodného. Z důvodu časové náročnosti a omezeného množství vzorku plazmy nebylo již možné znovu nasbírat jednotlivé frakce lipidických tříd, následně provést esterifikaci a opětovně je analyzovat. Přesný okamžik kontaminace methanolu nebylo tedy možné určit.

3.3.2 Nasycené a nenasycené mastné kyseliny ve frakcích

Jednotlivé frakce lze porovnat podle poměru zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin (viz Obrázek 31).



Obrázek 31 - Graf zastoupení nasycených a nenasycených MK ve frakcích

Z obrázku lze vyčíst, že pouze Frakce 1 a Frakce 4 obsahovaly větší množství nasycených MK než nenasycených MK. Ostatní frakce obsahovaly naopak vysoké procento nenasycených mastných kyselin. Největší zastoupení nenasycených MK obsahovala Frakce 2 a to konkrétně 67,44 %.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost využití kombinací technik kapalinové chromatografie a plynové chromatografie na analýzu mastných kyselin ve třídách lipidů. Kapalinová chromatografie v HILIC módu rozseparovala lipidický extrakt lidské plasmy dle polarity do tříd, poté byly lipidy v nasbíraných frakcích převedeny na methylestery a následně byla plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem použita na identifikaci a zjištění zastoupení mastných kyselin.

V první fázi byly optimalizovány podmínky pro HILIC separaci. Nasbíráno bylo 5 frakcí, přičemž Frakce 1 obsahovala nepolární lipidy (TAG, DAG, MAG), Frakce 2 obsahovala lipidické třídy fosfatidylethanolaminy a fosfatidylinositoly, Frakce 3 obsahovala pouze lipidickou třídu fosfatidylcholinů, Frakce 4 obsahovala lipidickou třídu sfingomyelinů a Frakce 5 obsahovala lipidickou třídu lysofosfatidylcholinů.

Získané frakce byly esterifikovány pomocí mehtanolátu sodného a methanolu a vzniklé estery mastných kyselin byly analyzovány pomocí plynové chromatografie spojenou s hmotnostní spektrometrií. Díky analýze bylo zjištěno rozdílné složení mastných kyselin mezi jednotlivými frakcemi. Byly identifikovány nasycené, nenasycené i rozvětvené mastné kyseliny. Každá frakce se vyznačovala obsahem určitých mastných kyselin. Například Frakce 1 se mimo jiné vyznačovala vyšším obsahem mastných kyselin s lichým počtem uhlíků. Kromě zadaných úkolů bylo nutné vyřešit problém s vysokými koncentracemi epoxidů ve vzorcích. Byla zjištěna kontaminace zásobního roztoku methanolu nejen epoxidy, ale i dalšími estery mastných kyselin.

Získané výsledky ukazují detailní profil mastných kyselin, který by mohl pomoci v rozlišování mezi zdravými pacienty a pacienty trpící onemocněním, jako je například rakovina, plicní fibróza, Alzheimerova choroba aj, které se mohou vyznačovat změnami v metabolismu lipidů. Ověření této teorie by vyžadovalo větší množství vzorků než jeden a bylo by nutné tuto metodu validovat.

Tato práce potvrzuje, že toto spojení technik HILIC a GC/MS s tímto konkrétním gradientem a nástřikem je vhodné pro detailní analýzu mastných kyselin jednotlivých lipidických tříd ze vzorku lidské plazmy a má potenciál k využití v oblasti klinické diagnostiky.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WATSON, Andrew D. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of lipid research*. 2006, **10**(47), 2101-2111.
- [2] Lipid Classification System. *LIPID MAPS* [online]. © 2003-2024 LIPID MAPS, 20. 2. 2024 [cit. 2024-11-22]. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/resources/education/classification>
- [3] FAHY, Eoin, Shankar SUBRAMANIAM, Alex H. BROWN, Stephen H. WHITE, Joseph L. WITZTUM a Edward A. DENNIS. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*. 2005, **46**(5), 839-861.
- [4] KUDA, Ondřej. Lipidomika. *Lipidomická sekce ČSBMB* [online]. 1.11.2014 [cit. 2024-12-12]. Dostupné z: <http://lipidomics.uochb.cas.cz/lipidomika.html>
- [5] ZÜLLIG, Thomas a Harald C. KÖFELER. High resolution mass spectrometry in lipidomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2021, **3**(40), 162-176.
- [6] NASSAR, Ala F., Xinxin NIE, Tianxiang ZHANG, et al. Is Lipid Metabolism of Value in Cancer Research and Treatment? Part I- Lipid Metabolism in Cancer. *Metabolites*. 2024, **2024**(14), 312. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3390/metabo14060312](https://doi.org/10.3390/metabo14060312)
- [7] DURAJ, Tomás, Miriam KALAMIAN, Giulio ZUCCOLI, Joseph C. MAROON, Dominic P. D'AGOSTINO, Adrienne C. SCHECK a Angela POFF. Clinical research framework proposal for ketogenic metabolic therapy in glioblastoma. *BMC Medicine*. 2024, **22**(578), 1-49.
- [8] FAHY, Eoin, Shankar SUBRAMANIAM, Robert C. MURPHY, Masahiro NISHIJIMA, Christian R.H. RAETZ, Takao SHIMIZU a Friedrich SPENER. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*. 2009, (50), 9-14.
- [9] WOLRAB, Denise, Robert JIRÁSKO, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Ondřej PETERKA a Michal HOLČAPEK. Oncolipidomics: Mass spectrometric quantitation of lipids in cancer research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, (120), 1-15.

- [10] SALA, Sergio D., Richard S. LEE, Rodney C. SAMACO, Pia ROTSHTEIN a Annamaria CATTANEO. *Encyclopaedia of behavioural neuroscience*. 2nd. Elsevier Science, 2021. ISBN 978-0-12-821636-1.
- [11] HERMANSSON, Martin, Kati HOKYNAR a Pentti SOMERHARJU. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Progress in Lipid Research*. 2011, **3**(50), 240-257.
- [12] FAROOQUI, Akhlaq A., Lloyd A. HORROCKS a Tahira FAROOQUI. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000, **1**(106), 1-29.
- [13] STEPHENSON, Daniel J., L. Alexis HOEFERLIN a Charles E. CHALFANT. Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational Research*. 2017, (189), 13-29.
- [14] SHADYRO, Oleg, Svetlana SAMOVICH a Irina EDIMECHEVA. Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019, **2019**(144), 6-15. ISSN 0891-5849.
- [15] MU, Huiling a Carl-Erik HØY. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 2004, **2**(43), 105-133. ISSN 0163-7827.
- [16] XIA, Tian, Ming YUAN, Feng ZHOU, Kate YU a Yu XIA. Deep Structural Annotation of Glycerolipids by the Charge-Tagging Paterno–Büchi Reaction and Supercritical Fluid Chromatography–Ion Mobility Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*. 2021, **23**(93), 8345–8353.
- [17] LU, Jieli, Sin Man LAM, Qin WAN, Lixin SHI, Yanan HUO, Lulu CHEN, Xulei TANG a Bowen LI. High-Coverage Targeted Lipidomics Reveals Novel Serum Lipid Predictors and Lipid Pathway Dysregulation Antecedent to Type 2 Diabetes Onset in Normoglycemic Chinese Adults. *Diabetes Care*. 2019, **11**(42), 2117–2126.
- [18] RHEE, Eugene P., Susan CHENG, Martin G. LARSON, Geoffrey A. WALFORD, Gregory D. LEWIS a Elizabeth MCCABE. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011, **121**(4), 1402-1411.

- [19] AKOH, Casimir C. a David B. MIN, ed. *Food Lipids: Chemistry, nutrition and biochemistry*. Second edition, Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 0-8247-0749-4.
- [20] VEJRAŽKA, Martin a Čestmír ŠTUKA. Mastné kyseliny. *WikiSkripta* [online]. 2009, 30. 5. 2024 [cit. 2025-03-09]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Mastn%C3%A9_kyseliny
- [21] COLEMAN, Rosalind A. a Douglas P. LEE. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*. 2004, **2**(43), 134-176.
- [22] Fatty acid. *Britanica* [online]. 1999, 28.2.2025 [cit. 2025-03-09]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/fatty-acid>
- [23] ROHMAN, Ali a Bauke W. DIJKSTRA. Application of microbial 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenases in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2021, (49), 1-21.
- [24] LIPID MAPS® Structure Database (LMSD). *LIPID MAPS* [online]. © 2003-2024 LIPID MAPS, 20. 2. 2024 [cit. 2025-03-02]. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/browse>
- [25] Sphingolipid. *Encyclopedia Britannica* [online]. 1999, 7.12.2018 [cit. 2025-03-10]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/sphingolipid>
- [26] SORGI, Carlos Artério, Ana Paula Ferranti PETI, Tania PETTA, Alyne Fávero Galvão MEIRELLES, Caroline FONTANARI, Luiz Alberto Beraldo DE MORAES a Lúcia Helena FACCIOLI. Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. *Scientific Data*. 2018, **5**(180167).
- [27] ZÜLLIG, Thomas, Martin TRÖTZMÜLLER a Harald C KÖFELER. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2020, **10**(412), 2191–2209.
- [28] HOLČAPEK, Michal, Gerhard LIEBISCH a Kim EKROOS. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*. 2018, **7**(90), 4249–4257.
- [29] GOLOVKO, Mikhail Y a Eric J MURPHY. An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction. *Journal of lipid research*. 2008, **4**(47), 893-902.

- [30] LIAKH, Ivan, Tomasz SLEDZINSKI, Lukasz KASKA, Paulina MOZOLEWSKA a Adriana MIKA. Sample Preparation Methods for Lipidomics Approaches Used in Studies of Obesity. *Molecules*. 2020, **22**(25), 5307.
- [31] DEL BOCCIO, Piero, Damiana PIERAGOSTINO, Maria DI IOIA, Francesca PETRUCCI, Alessandra LUGARESI a Giovanna DE LUCA. Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *Journal of proteomics*. 2011, **12**(74), 2826-2836.
- [32] SEPPÄNEN-LAAKSO, Tuulikki a Matej ORESIC. How to study lipidomes. *Journal of molecular endocrinology*. 2009, **3**(42), 185-190.
- [33] SORGI, Carlos Artério, Ana Paula Ferranti PETI, Tania PETTA, Alyne Fávero Galvão MEIRELLES, Caroline FONTANARI, Luiz Alberto Beraldo DE MORAES a Lúcia Helena FACCIOLI. Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. *Scientific Data*. 2018, **5**(180167), 167.
- [34] BLIGH, E.G. a W.J. DYER. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959, **8**(37), 911 - 917.
- [35] RAKUSANOVA, Stanislava a Tomas CAJKA. Tips and tricks for LC–MS-based metabolomics and lipidomics analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2024, **2024**(170), 117940. ISSN 0165-9936.
- [36] YANG, Kui a Xianlin HAN. Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends in Biochemical science*. 2016, **11**(41), 954-969.
- [37] FOLCH, J., M. LEES a G.H. SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1957, **1**(226), 497-509.
- [38] ANDRADE-EIROA, Auréa, Moisés CANLE, Valérie LEROY-CANCELLIERI a Víctor CERDÀ. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, (80), 655-667.
- [39] LÁSKO, Zuzana, Tomáš HÁJEK, Robert JIRÁSKO, Ondřej PETERKA, Petr ŠIMEK, Peter J. SCHOENMAKERS a Michal HOLČAPEK. Four-Dimensional Lipidomic Analysis Using Comprehensive Online UHPLC × UHPSFC/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2024, **49**(96), 19439-19446.

- [40] HARKEWICZ, Richard a Edward A DENNIS. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annual review of biochemistry*. 2011, **80**, 301–325.
- [41] LÍSA, Miroslav, Eva CÍFKOVÁ a Michal HOLČAPEK. Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(31), 5146-5156.
- [42] LI, Amy, Kelly M HINES a Libin XU. Lipidomics by HILIC-Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Ion Mobility-Mass Spectrometry*. 2020, **Methods in Molecular Biology**(2084), 119–132.
- [43] HARRIEDER, Eva-Maria, Fleming KRETSCHMER, Sebastian BÖCKER a Michael WITTING. Current state-of-the-art of separation methods used in LC-MS based metabolomics and lipidomics. *Journal of Chromatography B*. 2022, **2022**(1188), 123069. ISSN 1570-0232.
- [44] MASUKAWA, Yoshinori a Hisashi TSUJIMURA. Highly Sensitive Determination of Diverse Ceramides in Human Hair Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Lipids*. 2007, **3**(42), 275-290.
- [45] 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*. 2020, **15**(1137), 74-84.
- [46] RAKUSANOVA, Stanislava, Oliver FIEHN a Tomas CAJKA. Toward building mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics atlases for biological and clinical research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023, **158**(116825).
- [47] GRIMM, Fiona, Louise FETS a Dimitrios ANASTASIOU. Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC–MS) to Study Metabolism in Cultured Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016, (899), 59–88.
- [48] Lipidomics: Overview and techniques for analysis of lipids in biological samples. *Creative Proteomics* [online]. 2025 [cit. 2025-03-02]. Dostupné z: <https://lipidomics.creative-proteomics.com/resource/gc-ms-overview.htm>

- [49] SON, Hyun-Hwa, Ju-Yeon MOON, Hong Seog SEO, Hyun Hee KIM, Bong Chul CHUNG a Man Ho CHOI. High-temperature GC-MS-based serum cholesterol signatures may reveal sex differences in vasospastic angina. *Journal of lipid research*. 2013, **1**(55), 155-162.
- [50] STASHENKO, Elena a Jairo René MARTÍNEZ. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: GUO, Xinghua. *Advances in Gas Chromatography*. Book metrics overview, 2014, s. 1-38. ISBN 978-953-51-5047-3.
- [51] ECKER, Josef, Max SCHERER, Gerd SCHMITZ a Gerhard LIEBISCH. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B*. 2012, (897), 98-104.
- [52] SCHÖTT, Hans-F., Maurice C. J. M. KONINGS, Vera B. SCHRAUWEN-HINDERLING, Ronald P. MENSINK a Jogchum PLAT. A Validated Method for Quantification of Fatty Acids Incorporated in Human Plasma Phospholipids by Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *ACS Omega*. 2021, **2**(6), 1129-1137.
- [53] LIN, Chen-Chen, Amarjargal SENGEER a Svein A. MJØS. Minor compounds and potential interferences in gas chromatographic analyses of human serum fatty acids. *Journal of Chromatography B*. 2020, (1138).
- [54] DAVID, Frank, Pat SANDRA a Allen K. VICKERS. Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters application. *Agilent technologies*. 2005, 1-12.
- [55] EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, **1-2**(671), 113-131.
- [56] CHIU, Huai-Hsuan a Ching-Hua KUO. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2020, **1**(28), 60-73.
- [57] WANG, Chunyan, Miao WANG a Xianlin HAN. Applications of mass spectrometry for cellular lipid analysis. *Molecular BioSystems*. 2015, **3**(11), 698-713.
- [58] JIRÁSKO, Robert. *Hmotnostní spektrometrie (v organické analýze)* [online]. Pardubice, 2024 [cit. 2025-03-03]. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>. Prezentace. Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice.

- [59] JIRÁSKO, Robert. *Ionizační techniky* [online]. Pardubice, 2024 [cit. 2025-03-03].
Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>. Prezentace. Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice.
- [60] CAPPIELLO, Achille, Giorgio FAMIGLINI, Filippo MANGANI a Pierangela Palma. New trends in the application of electron ionization to liquid chromatography—mass spectrometry interfacing. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001, 2(20), 88-104.
- [61] JIRÁSKO, Robert. *Hmotností analyzátořy* [online]. Pardubice, 2024 [cit. 2025-03-23].
Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>. Prezentace. Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice.
- [62] HOLČAPEK, Michal, Eva CÍFKOVÁ, Blanka ČERVENÁ, Miroslav LÍSA, Jitka VOSTÁLOVÁ a Jan GALUSZKA. Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, (1377), 85-91.
- [63] PETERKA, Ondřej, Alessandro MACCELLI, Robert JIRÁSKO, Zuzana VAŇKOVÁ, Jakub IDKOWIAK, Roman HRSTKA, Denise WOLRAB a Michal HOLČAPEK. HILIC/MS quantitation of low-abundant phospholipids and sphingolipids in human plasma and serum: Dysregulation in pancreatic cancer. *Analytica Chimica Acta*. 2024, (1288), 1-10.
- [64] MERCLOVÁ, Michaela. *GC-MS stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích* [online]. Pardubice, 2023 [cit. 2025-04-23].
Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice. Vedoucí práce Ing. Tomáš Hájek, PhD.

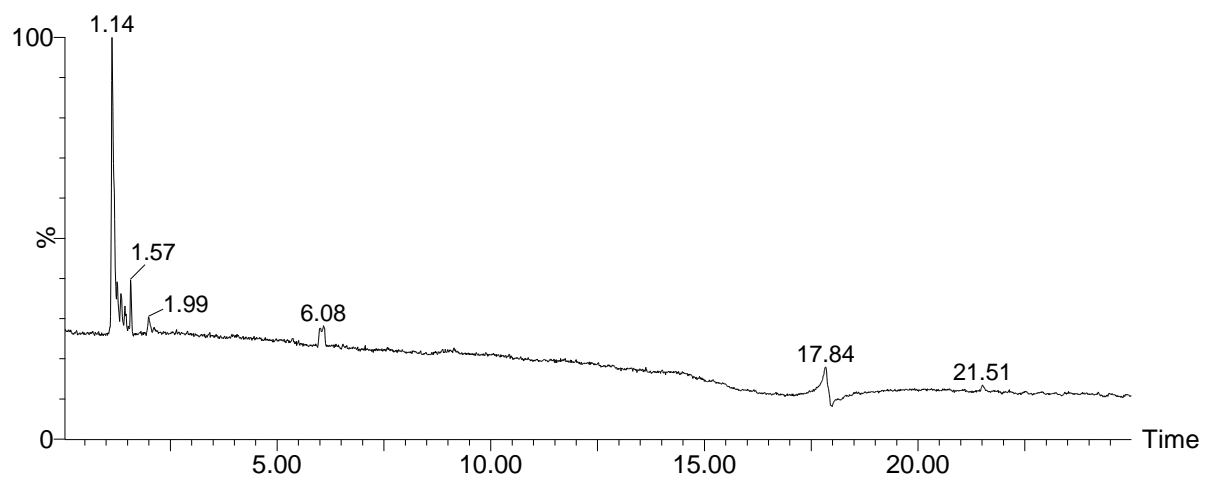
PŘÍLOHY

| | |
|--|----|
| Příloha 1 - Seznam standardů MK a jejich koncentrace ve směsi | 62 |
| Příloha 2 - Slepý pokus (MS Xevo)..... | 63 |
| Příloha 3 - Tabulka s retenčními časy (min) jednotlivých methylestery MK v jednotlivých frakcích | 64 |
| Příloha 4 - Popsaný chromatogram Frakce 2..... | 65 |
| Příloha 5 - Popsaný chromatogram Frakce 3..... | 66 |
| Příloha 6 - Popsaný chromatogram Frakce 4..... | 67 |
| Příloha 7 - Popsaný chromatogram Frakce 5..... | 68 |

Příloha 1 - Seznam standardů MK a jejich koncentrace ve směsi

| Název methylesteru MK | Vzorec | Koncentrace (µg/ml) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Máselná | C 4:0 | 400 |
| Kapronová | C 6:0 | 400 |
| Kaprylová | C 8:0 | 400 |
| Kaprinová | C 10:0 | 400 |
| Undekanová | C 11:0 | 200 |
| Laurová | C 12:0 | 400 |
| Tridecylová | C 13:0 | 200 |
| Myristová | C 14:0 | 400 |
| Myristoolejová | C 14:1 | 200 |
| Pentadecylová | C 15:0 | 200 |
| Cis-10 pentadecylová | C 15:1 ^{Δ10Z} | 200 |
| Palmitová | C 16:0 | 600 |
| Palmitoolejová | C 16:1 ^{Δ9Z} | 200 |
| Heptadecylová | C 17:0 | 200 |
| Cis-10 heptadecylová | C 17:1 ^{Δ10Z} | 200 |
| Stearová | C 18:0 | 400 |
| Elaidová | C 18:1 ^{Δ9E} | 200 |
| Olejová | C 18:1 ^{Δ9Z} | 400 |
| Linoelaidová | C 18:2 ^{Δ9,12E} | 200 |
| Linolová | C 18:2 ^{Δ9,12Z} | 200 |
| γ-Linolenová | C 18:3 ^{Δ6,9,12Z} | 200 |
| α-Linolenová | C 18:3 ^{Δ9,12,15Z} | 200 |
| Arachidonová | C 20:0 | 400 |
| Cis-11-Ikosanová | C 20:1 ^{Δ11Z} | 200 |
| Heneikosanová | C 21:0 | 200 |
| Cis-11,14-Ikosadienová | C 20:2 ^{Δ11,14Z} | 200 |
| Cis-8,11,14-Ikosatrienová | C 20:3 ^{Δ8,11,14Z} | 200 |
| Cis-5,8,11,14-Ikosatetraenová | C 20:4 ^{Δ5,8,11,14Z} | 200 |
| Cis-11,14,17-Ikosatrienová | C 20:3 ^{Δ11,14,17Z} | 200 |
| Behenová | C 22:0 | 400 |
| Eruková | C 22:1 ^{Δ13Z} | 200 |
| Cis-5,8,11,14,17- Eikosapentaenová | C 20:5 ^{Δ5,8,11,14,17Z} | 200 |
| Trikosanová | C 23:0 | 400 |
| Cis-13,16-dokosadienová | C 22:2 ^{Δ13,16Z} | 400 |
| Lignocerová | C 24:0 | 400 |
| Nervonová | C 24:1 ^{Δ9Z} | 400 |
| Cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová | C 22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19Z} | 400 |

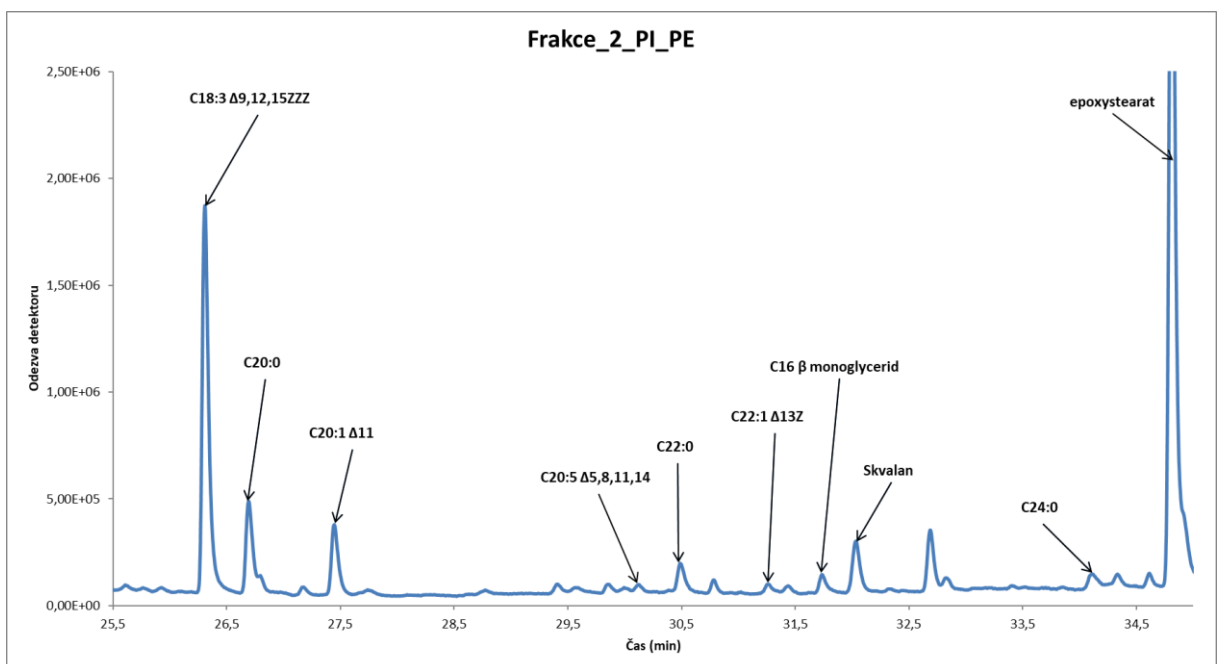
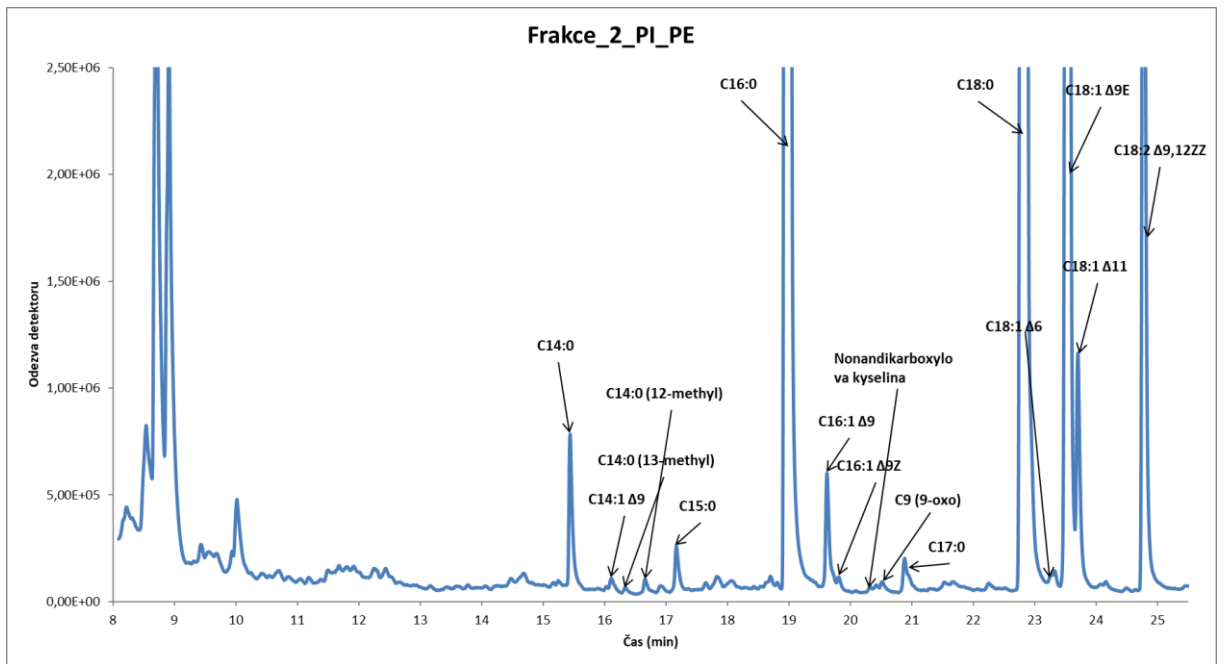
Příloha 2 - Slepý pokus (MS Xevo)



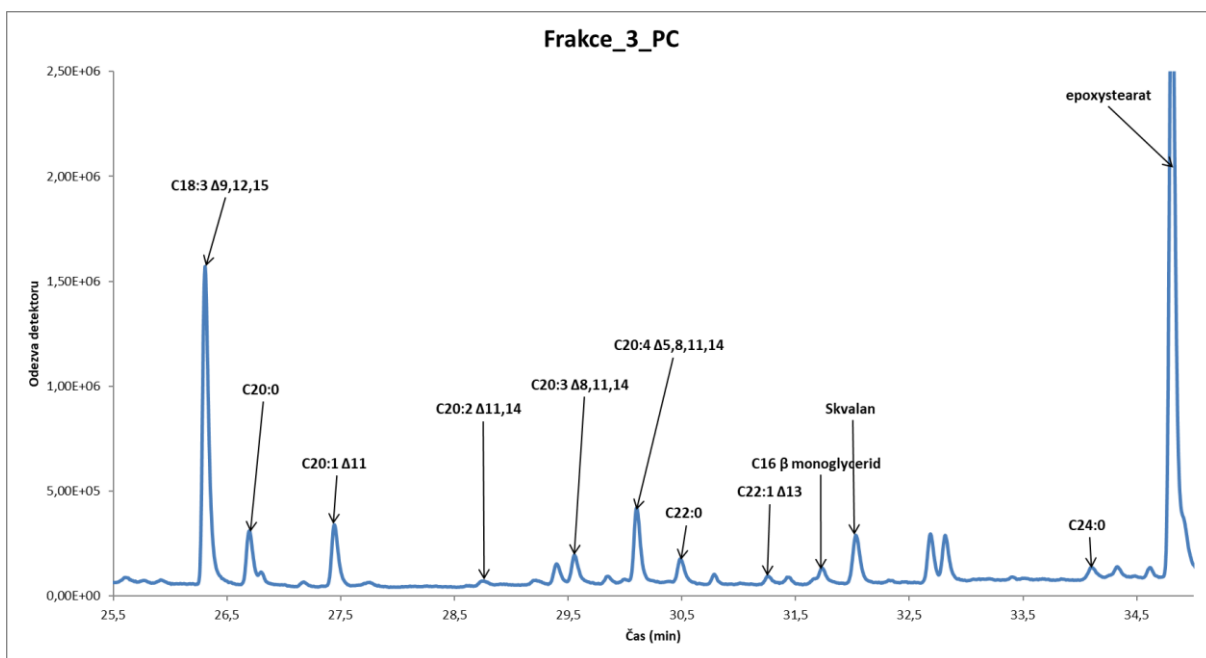
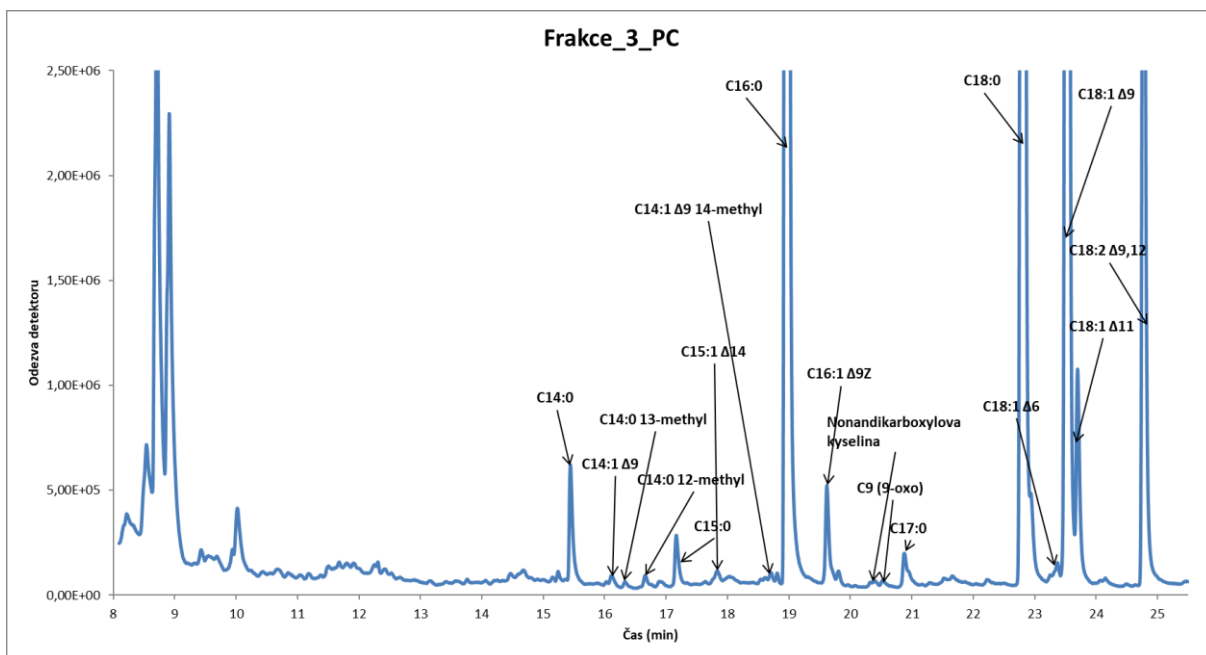
Příloha 3 - Tabulka s retenčními časy (min) jednotlivých methylesterů MK v jednotlivých frakcích

| Název | Frakce 1 | Frakce 2 | Frakce 3 | Frakce 4 | Frakce 5 | Průměrný čas (min) |
|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------|
| C 12:0 | 12,46 | - | - | - | - | 12,46 |
| C 14:0 | 15,45 | 15,44 | 15,44 | 15,45 | 15,44 | 15,45 |
| C 14:1 ^{Δ9} | - | 16,12 | 16,11 | 16,11 | 16,10 | 16,11 |
| C 14:1 ^{Δ11 Z} | 16,12 | - | - | - | - | 16,12 |
| C 14:0 (12-methyl) | 16,68 | 16,66 | 16,66 | - | 16,66 | 16,67 |
| C 14:0 (13-methyl) | - | 16,34 | 16,33 | - | 16,33 | 16,33 |
| C 15:0 | 17,19 | 17,17 | 17,17 | 17,18 | 17,16 | 17,17 |
| C 15:1 ^{Δ14} | - | - | 17,83 | - | - | 17,83 |
| C 14:1 ^{Δ9} (14-methyl) | - | - | 18,71 | - | - | 18,71 |
| C 16:0 | 19,02 | 19,01 | 18,98 | 18,97 | 18,99 | 18,99 |
| C 16:1 ^{Δ9} | - | 19,62 | - | 19,62 | 19,61 | 19,62 |
| C 16:1 ^{Δ9 Z} | 19,79 | 19,81 | 19,62 | 19,79 | - | 19,75 |
| C 9:0 (dikarboxylová) | 20,33 | 20,32 | 20,33 | 20,32 | - | 20,33 |
| C 9:0 (9-oxo) | 20,50 | 20,52 | 20,53 | 20,50 | - | 20,51 |
| C 16:2 ^{Δ7,10} | 20,82 | - | - | - | - | 20,82 |
| C 17:0 | 20,90 | 20,89 | 20,88 | 20,89 | 20,88 | 20,89 |
| C 17:1 ^{Δ10} | - | - | - | - | 21,53 | 21,53 |
| C 17:1 ^{Δ10 Z} | 21,66 | - | - | 21,66 | - | 21,66 |
| C 16:3 ^{Δ7,10,13} | 22,31 | - | - | 22,31 | - | 22,31 |
| C 18:0 | 22,96 | 22,86 | 22,82 | 22,86 | 22,84 | 22,87 |
| C 18:1 ^{Δ6} | - | 23,27 | 23,37 | - | - | 23,32 |
| C 18:1 ^{Δ9} | - | - | 23,54 | - | - | 23,54 |
| C 18:1 ^{Δ9 Z} | 23,82 | 23,55 | - | 24,18 | 23,55 | 23,77 |
| C 18:1 ^{Δ11} | - | 23,71 | 23,70 | 24,01 | - | 23,81 |
| C 18:1 ^{Δ13 E} | - | - | - | - | 23,70 | 23,70 |
| C 18:2 ^{Δ9,12} | 24,93 | - | 24,77 | 24,85 | 24,78 | 24,83 |
| C 18:2 ^{Δ9,12 Z} | - | 24,78 | - | - | - | 24,78 |
| C 19:1 ^{Δ10} | 25,50 | - | - | - | - | 25,50 |
| C 18:3 ^{Δ9,12,15} | - | - | 26,31 | 26,33 | 26,31 | 26,31 |
| C 18:3 ^{Δ9,12,15 Z} | 26,37 | 26,31 | - | - | - | 26,34 |
| C 20:0 | 26,72 | 26,69 | 26,70 | 26,70 | 26,69 | 26,70 |
| C 20:1 ^{Δ11} | - | 27,45 | 27,44 | 27,45 | 27,44 | 27,44 |
| C 20:1 ^{Δ11 Z} | 27,47 | - | - | - | - | 27,47 |
| C 20:1 ^{Δ9} | - | - | - | 27,65 | - | 27,65 |
| C 21:0 | 28,66 | - | - | - | - | 28,66 |
| C 20:2 ^{Δ11,14} | - | - | 28,76 | 28,75 | - | 28,75 |
| C 20:2 ^{Δ11,14 Z} | 28,77 | - | - | - | - | 28,77 |
| C 20:4 ^{Δ5,8,11,14} | - | 30,12 | 30,10 | - | - | 30,11 |
| C 20:4 ^{Δ5,8,11,14 Z} | 30,14 | - | - | - | - | 30,14 |
| C 22:0 | 30,51 | 30,49 | 30,49 | 30,49 | 30,48 | 30,49 |
| C 22:1 ^{Δ11} | - | - | - | - | 31,25 | 31,25 |
| C 22:1 ^{Δ13} | - | - | 31,26 | 31,26 | - | 31,26 |
| C 22:1 ^{Δ13 Z} | 31,28 | 31,26 | - | - | - | 31,27 |
| Skvalan | 32,08 | 32,03 | 32,03 | 32,06 | 32,03 | 32,04 |
| C 22:0 (21-methyl) | 32,38 | - | - | - | - | 32,38 |
| C 23:1 ^{Δ22} | 33,14 | - | - | - | - | 33,14 |
| C 24:0 | 34,14 | 34,11 | 34,09 | - | 34,10 | 34,11 |
| 16-β-monoglycerid | 34,32 | 31,73 | 31,73 | 31,73 | 34,33 | 32,77 |
| 1,2-dipalmitinglycerol | 34,53 | - | - | - | 31,73 | 33,13 |
| Epoxystearat | 34,91 | 34,81 | 34,81 | 34,86 | 34,81 | 34,84 |

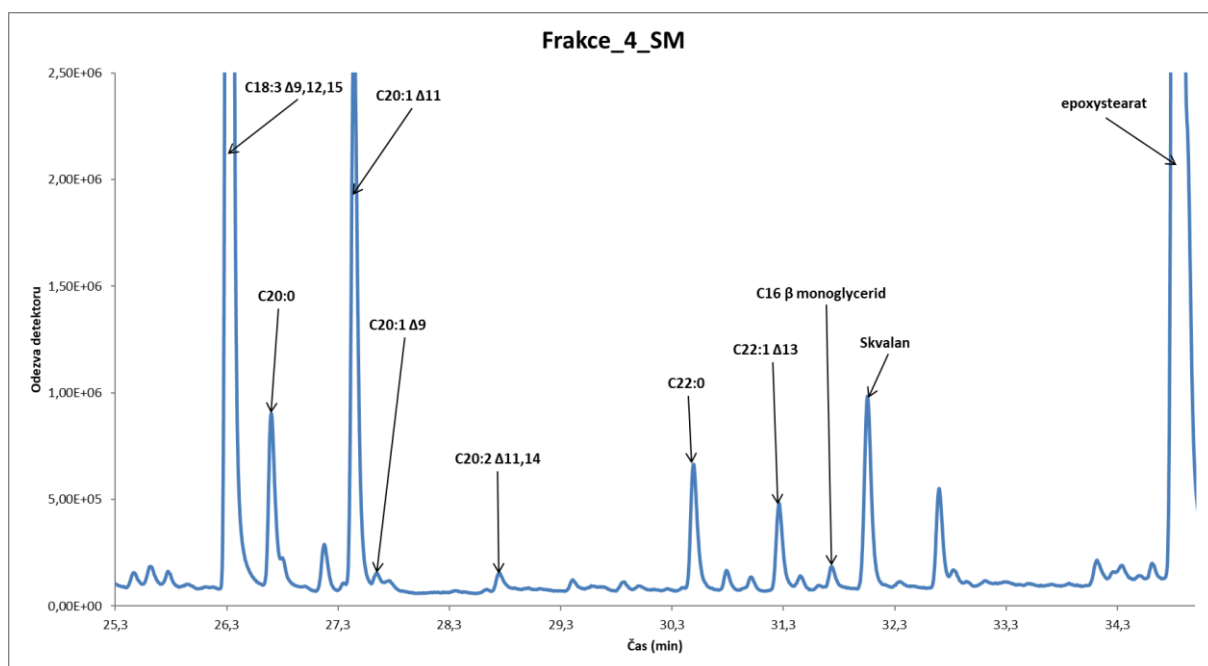
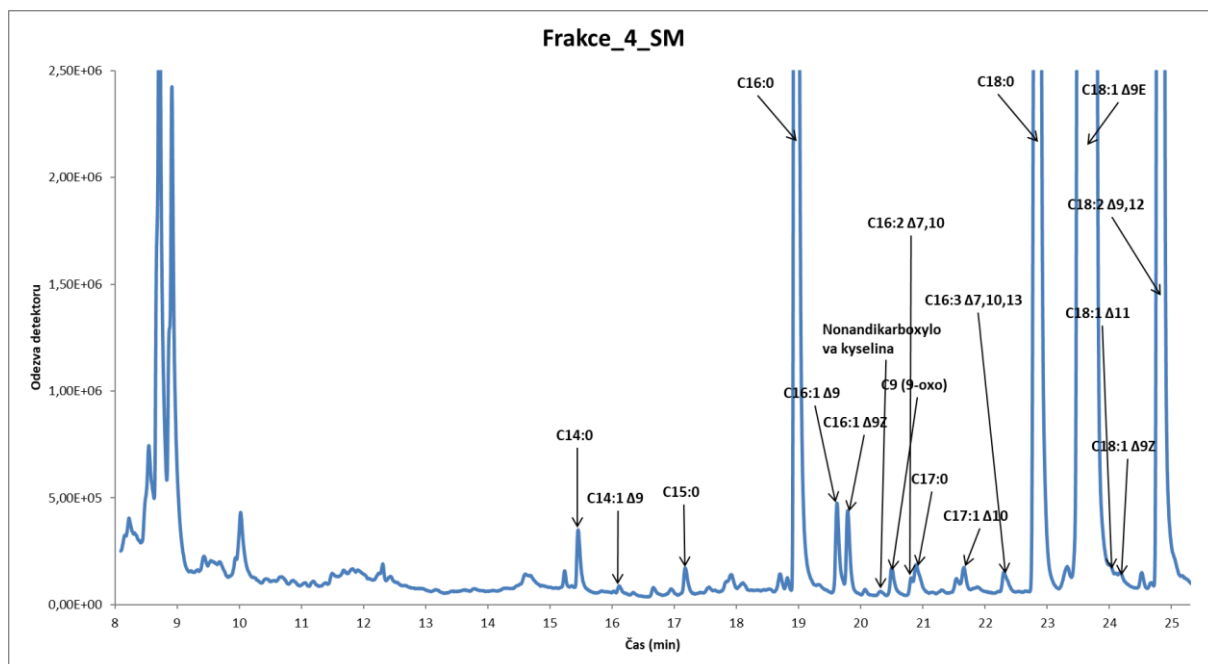
Příloha 4 - Popsaný chromatogram Frakce 2



Příloha 5 - Popsaný chromatogram Frakce 3



Příloha 6 - Popsaný chromatogram Frakce 4



Příloha 7 - Popsaný chromatogram Frakce 5

