

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Derivatizace v lipidomické analýze
Bakalářská práce

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michal Šilhán**
Osobní číslo: **C22083**
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**
Téma práce: **Derivatizace v lipidomické analýze**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- V teoretické části popište stručně lipidy a tradiční metody lipidomické analýzy. V další kapitole diskutujte derivatizační přístupy využívané v lipidomice pro zlepšení citlivosti a separační účinnosti lipidů a na dané téma vypracujte literární rešerši.
- Provedte experiment zaměřený na optimalizaci derivatizačních podmínek acetylace vybraných lipidových tříd pro následnou analýzu s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Zaměřte se na optimalizaci množství reagentů a reakčního času. Optimalizované podmínky následně aplikujte na derivatizaci vybrané směsi standardů lipidů. Finálně změřte pomocí LC/MS zřetěvací série vzorků před a po derivatizaci, porovnejte a diskutujte získané výsledky.

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

Seznam doporučené literatury:

- F. Xia and J.-B. Wan, Chemical derivatization strategy for mass spectrometry-based lipidomics. *Mass Spectrometry Reviews* 2023, 42, e21729.
- D. Wang, H. M. Xiao, X. Lv, H. Chen and F. Wei, Mass Spectrometry Based on Chemical Derivatization Has Brought Novel Discoveries to Lipidomics: – Comprehensive Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2025, 55, 21-52.
- O. Peterka, R. Jirásko, Z. Vaňková, M. Chocholoušková, D. Wolrab, J. Kulhánek, F. Bureš and M. Holčápek, Simple and Reproducible Derivatization with Benzoyl Chloride: Improvement of Sensitivity for Multiple Lipid Classes in RP-UHPLC/MS. *Analytical Chemistry* 2021, 93, 13835-13843.
- Další odborné články týkající se dané problematiky dostupné na WOS databázi.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Robert Jirásko, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Ondřej Peterka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2025**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

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 „Derivatizace v lipidomické analýze“ 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 27. června 2025

Michal Šilhán

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, podporu a cenné rady při vypracování této práce. Velké poděkování patří také Ing. Ondřeji Peterkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a odborný pohled na experimentální část práce. Rovněž bych rád poděkoval celé skupině hmotnostní spektrometrie vedené prof. Ing. Michalem Holčápkem, Ph.D. za užitečné rady a za vytvoření přátelského a profesionálního prostředí. Zvláštní poděkování patří mé rodině za jejich neustálou podporu během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá tématem derivatizačních technik v lipidomické analýze s cílem zlepšit identifikaci a kvantifikaci lipidů za pomoci hmotnostní spektrometrie. Teoretická část práce se nejprve věnuje základnímu rozdělení lipidů a principům lipidomiky, dále shrnuje klíčové analytické techniky využívané při analýze lipidů - od přípravy vzorků přes separační metody až po hmotnostní spektrometrii. Druhá část práce se věnuje derivatizačním metodám využívaných v lipidomických analýzách. Experimentální část práce se potom zaměřuje na optimalizaci derivatizační reakce pomocí acetylchloridu a vyhodnocení parametrů ovlivňující její účinnost.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lipidomika, hmotnostní spektrometrie, derivatizační reakce, analýza lipidů

TITLE

Derivatization in lipidomic analysis

ANNOTATION

The bachelor thesis addresses the topic of derivatization techniques in lipidomic analysis, aiming to improve the identification and quantification of lipids using mass spectrometry. The theoretical part of the thesis first discusses the basic classification of lipids and the principles of lipidomics, and then summarizes the key analytical techniques used in lipid analysis - from sample preparation and separation methods to mass spectrometry. The second part of the thesis focuses on derivatization methods used in lipidomic analyses. The experimental part of the thesis then focuses on the optimization of the derivatization reaction using acetyl chloride and the evaluation of parameters affecting its efficiency.

KEYWORDS

Lipidomics, mass spectrometry, derivatization reactions, lipid analysis

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	16
1. TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1. Lipidy a lipidomika	17
1.1.1. Základní rozdělení lipidů	18
1.2. Analytické techniky využívané v lipidomice	23
1.2.1. Příprava vzorků pro lipidomickou analýzu.....	23
1.2.1.1. Extrakce	24
1.2.2. Separační techniky v lipidomice.....	26
1.2.2.1. Kapalinová chromatografie.....	26
1.2.3. Konfigurace hmotnostního spektrometru pro lipidomické analýzy.....	27
1.2.3.1. Ionizační techniky v lipidomické analýze	28
1.2.3.2. Hmotnostní analyzátoři v lipidomické analýze.....	29
1.2.3.2.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)	30
1.2.4. Kvantitativní lipidomická analýza	31
1.3. Derivatizační přístupy v lipidomické analýze	32
1.3.1. Základní typy derivatizace a požadavky na deriváty	32
1.3.2. Specifika derivatizace funkčních skupin v molekulách lipidů	33
1.3.2.1. Derivatizace karboxylové skupiny.....	34
1.3.2.2. Derivatizace aminoskupiny.....	35
1.3.2.3. Derivatizace hydroxylové skupiny	36
1.3.2.4. Chemická derivatizace zaměřená na dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku	38
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
2.1. Seznam použitých chemikálií a standardů	41

2.2. Použité přístroje a zařízení	41
2.3. Anotace a nomenklatura lipidů.....	42
2.4. Příprava směsi standardů.....	42
2.5. Derivatizační reakce za pomoci acetylchloridu (acetylace).....	43
2.6. Extrakce podle Folche	44
2.7. UHPLC podmínky.....	44
2.8. MS podmínky	44
2.9. Zpracování naměřených dat	45
2.10. Optimalizace derivatizační reakce.....	45
2.10.1. Poměr reagentů	45
2.10.2. Množství acetylchloridu	46
2.10.3. Reakční čas	46
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	47
3.1. Vyhodnocení optimalizace poměru reagentů.....	47
3.2. Vyhodnocení optimalizace množství činidel	49
3.3. Vyhodnocení optimalizace reakčního času	51
3.4. Porovnání přístupu bez derivatizace a s derivatizací při optimalizovaných podmínkách reakce.....	53
ZÁVĚR	58
POUŽITÁ LITERATURA	59

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schématické znázornění glycerofosfolipidu a lipidové dvojvrstvy	17
Obrázek 2 Základní struktura mastného acylu – kyselina dodekanová.....	19
Obrázek 3 Základní struktura glycerolipidů.....	19
Obrázek 4 Základní struktura glycerofosfolipidů.....	20
Obrázek 5 Sfingoidní báze (sfingosin) - základní struktura sfingolipidů.....	20
Obrázek 6 Struktura cholesterolu (cholest-5-en-3 β -ol).....	21
Obrázek 7 Struktura C5 isoprenoidu - dimethylallylpyrofosfát	22
Obrázek 8 Princip tandemové hmotnostní spektrometrie	30
Obrázek 9 Reakční schéma derivatizace karboxylové skupiny s pomocí cholaminu.....	34
Obrázek 10 Reakční schéma derivatizace karboxylové skupiny s pomocí DMPI	35
Obrázek 11 Reakční schéma derivatizace aminofosfolipidu s použitím acetonu	36
Obrázek 12 Reakční schéma derivatizace cholesterolu za pomoci DMAPI	38
Obrázek 13 Schéma derivatizační reakce (acetylace) hydroxylových skupin za pomoci acetylchloridu a pyridinu	43
Obrázek 14 Vliv objemového poměru reagentů (Py:AcCl, v/v) na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů.....	49
Obrázek 15 Vliv absolutního množství reagentů (Py: AcCl) na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů	51

Obrázek 16 Vliv reakčního času na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů.....	53
Obrázek 17 Porovnání kalibračních závislostí ploch EIC lipidových standardů před a po derivatizaci.....	56
Obrázek 18 Rozptyl signálu kontrolního lipidu PC 36:2 během optimalizace podmínek derivatizace	57
Tabulka 1 Seznam vybraných standardů pro přípravu Std mix včetně molární koncentrace v zásobním roztoku	42
Tabulka 2 Násobná změna intenzity signálu standardů lipidů po derivatizaci acetylchloridem	54

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AcCl	Acetylchlorid
ACN	Acetonitril
AMPP	N-(4-aminomethylfenyl)pyridinium chlorid
API	Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
Cer	Ceramid
CID	Kolizní indukovaná disociace (Collision Induced Dissociation)
DG	Diacylglycerol
DMAPI	4-(dimethylamino)fenyl isokyanát
DMPI	N,N-dimethylpiperazinium jodid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EIC	Extrahovaný iontový proud (Extracted ion chromatogram)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
ESI-MS	Ionizace elektrosprejem ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Electrospray Ionization – Mass Spectrometry)
FA	Mastné acyly (Fatty Acyls)

FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography– Mass Spectrometry)
GlcCer	Glukosylceramid
GL	Glycerolipid
GP	Glycerofosfolipid (Glycerophospholipid)
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HILIC	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HOBt	1-hydroxybenzotriazol hydrát
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (High-Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)
HPLC-UV	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí (High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection)
IS	Vnitřní standard (Internal Standard)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LLE	Extrakce mezi dvě kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)
LPA	Lysofosfatidová kyselina (Lysophosphatidic Acid)
LPC	Lysofosfatidylcholin (Lysophosphatidylcholine)
LPE	Lysofosfatidylethanolamin (Lysophosphatidylethanolamine)
LMSD	Strukturní databáze LIPID MAPS (LIPID MAPS Structural Database)
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MALDI-MS	Ionizace laserem za účasti matrice ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry)
MeOH	Methanol
MG	Monoacylglycerol
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
MSI	Hmotnostně spektrometrické zobrazování (Mass Spectrometry Imaging)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butyl ether
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti k náboji (Mass-to-Charge Ratio)

nano-LC	Nano kapalinová chromatografie (Nano Liquid Chromatography)
NP-LC	Kapalinová chromatografie s normální fází (Normal – Phase Liquid Chromatography)
OzID	Ozonem indukovaná disociace (Ozone-Induced Dissociation)
PA	Fosfatidová kyselina (Phosphatidic Acid)
PB	Paternò - Büchi reakce
PC	Fosfatidylcholin (Phosphatidylcholine)
PE	Fosfatidylethanolamin (Phosphatidylethanolamine)
PFE	Extrakce tlakovou tekutinou (Pressurised Fluid Extraction)
PG	Fosfatidylglycerol (Phosphatidylglycerol)
PK	Polyketidy
PR	Prenoly
PS	Fosfatidylserin (Phosphatidylserine)
Py	Pyridin
QqQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole)
Q-TOF	Hybridní analyzátor kvadrupól / analyzátor doby letu (Hybrid Quadrupole Analyzer / Time of Flight Analyzer)
RS	Rozlišovací schopnost
RP-LC	Kapalinová chromatografie s reverzní fází (Reversed – Phase Liquid Chromatography)
S1P	Sfingosin-1-fosfát (Sphingosine-1-Phosphate)
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SL	Sacharolipidy

SM	Sfingomyeliny
SP	Sfingolipidy (Sphingolipids)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction)
ST	Steroly
Std mix	Směs standardů
TEA	Triethylamin
TG	Triacylglycerol
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography)
TOF	Analyzátor doby letu (Time-of-Flight mass analyzer)
UAE	Extrakce asistovaná ultrazvukem (Ultrasound-Assisted Extraction)
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet Radiation)
UVPD	Fotodisociace za pomoci ultrafialového světla (Ultraviolet Photodissociation)

ÚVOD

Lipidy představují rozsáhlou a strukturálně rozmanitou skupinu biomolekul, které hrají zásadní roli v biologických systémech. Kromě tvorby buněčných membrán se účastní také energetického metabolismu a signalizačních procesů. Klíčovým nástrojem v oblasti výzkumu lipidů je hmotnostní spektrometrie a to zejména pro vysokou citlivost a selektivitu.

Rozvoj analytických technik, a především právě hmotnostní spektrometrie, umožnil detailní zkoumání lipidového složení buněk a tkání, čímž vznikla nová disciplína – lipidomika. Složitost lipidového spektra představuje výzvu, zejména při identifikaci izomerů, strukturálně složitých molekul nebo látek přítomných ve velmi nízkých koncentracích.

V tomto textu se uplatňují derivatizační techniky, které přispívají ke zlepšení chromatografického chování lipidů, podpoře ionizace a tím i k dosažení lepší detekce a rozlišení cílových analytů.

Tato bakalářská práce se věnuje využití derivatizačních metod v lipidomické analýze obecně, zabývá se ale rovněž i konkrétní aplikací derivatizační reakce pomocí acetylchloridu s cílem zlepšit detekovatelnost širší škály lipidů v LC-MS analýze.

1. TEORETICKÁ ČÁST

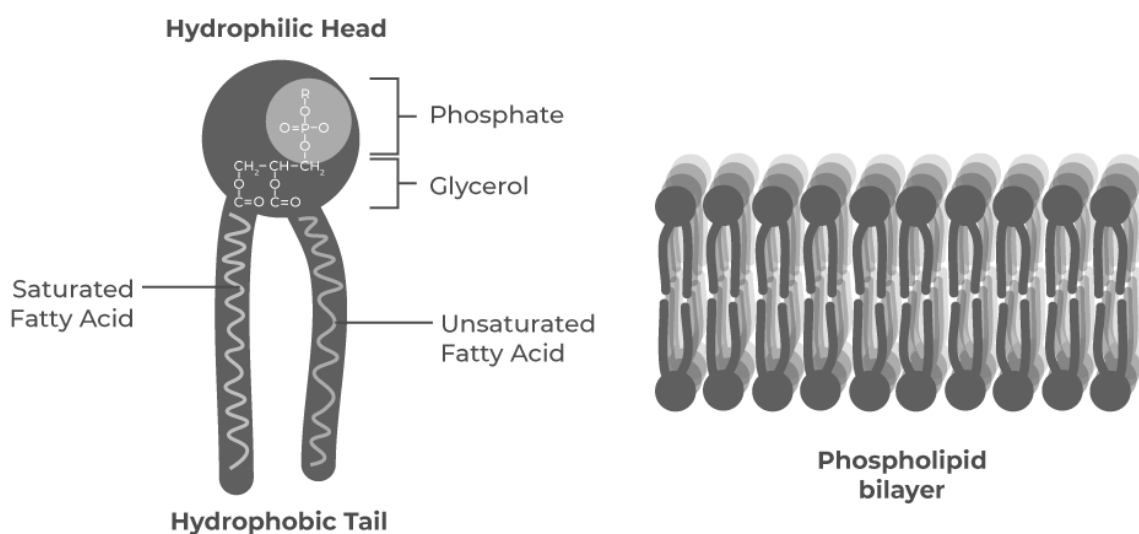
1.1. Lipidy a lipidomika

Lipidy jsou jednou z hlavních tříd sloučenin v biologických systémech a plní důležité fyziologické funkce. Jejich hydrofobní charakter jim umožňuje vytvářet buněčné membrány (**Obrázek 1**), jež tvoří hranici vůči hydrofilnímu okolí buněk.

Druhým důležitým biologickým úkolem lipidů je ukládání energie. Lipidy jsou pro tuto fyziologickou funkci ideálně přizpůsobeny díky vysokému množství energie, které se uvolňuje při jejich oxidaci. Třetí funkcí lipidů je role signální, tu plní účastí na mezimolekulárních a intramolekulárních autoregulačních, parakrinních a endokrinních procesech. [1]

Termín „lipid“ byl volně definován jako jakákoli skupina organických sloučenin, které jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech. Zahrnují především mastné kyseliny a jejich přirozeně se vyskytující deriváty (např. estery nebo aminy) a další příbuzné komplexní látky. [2, 3]

Dle novější definice lze lipidy definovat jako hydrofobní nebo amfipatické malé molekuly, které vznikají zcela nebo částečně kondenzací thioesterů na bázi karbaniontu anebo kondenzací jednotek isoprenu na bázi karbokationtu. [4]



Obrázek 1 Schématické znázornění glycerofosfolipidu a lipidové dvojvrstvy [7]

Podobně jako proteomika v oblasti proteinů se lipidomika zaměřuje na systematickou charakterizaci lipidového profilu v biologických vzorcích a umožňuje vytvořit detailní přehled přítomných tříd lipidů a jejich charakteristických molekulárních druhů. [5]

1.1.1. Základní rozdělení lipidů

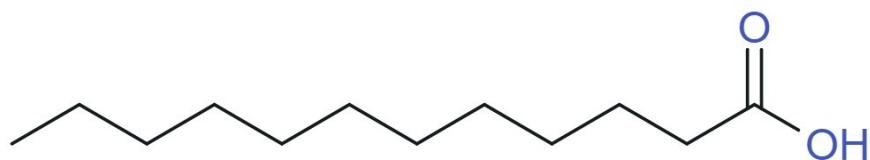
Lipidom savců a dalších organismů jeví obrovskou strukturní rozmanitost, která vyžaduje systematické členění. Za tímto účelem byl v roce 2005 Mezinárodním výborem pro klasifikaci a nomenklaturu lipidů vyvinut a zaveden komplexní klasifikační systém s názvem LIPID MAPS. Tento systém rozdělení lipidů vychází z jasně definovaných chemických a biologických principů a je navržen tak, aby byl kompatibilní s moderními informačními technologiemi z důvodu záznamu velkého množství získaných informací v této disciplíně. [2]

Lipidy jsou zde zařazeny do osmi hlavních kategorií – mastné acyly (FA), glycerolipidy (GL), glycerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), steroly (ST), prenoly (PR), sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK). Jednotlivé kategorie lipidů jsou dále rozděleny do tříd a podtříd. [4]

Strukturní databáze LIPID MAPS (LMSD) [6], jež je nejobsáhlejší databází v oblasti lipidomické analýzy uvádí zaznamenaných okolo 43,6 tis. jednotlivých lipidů. Ovšem počet přirozeně se vyskytujících lipidů se odhaduje na počet převyšující až 100 tisíc druhů. [1]

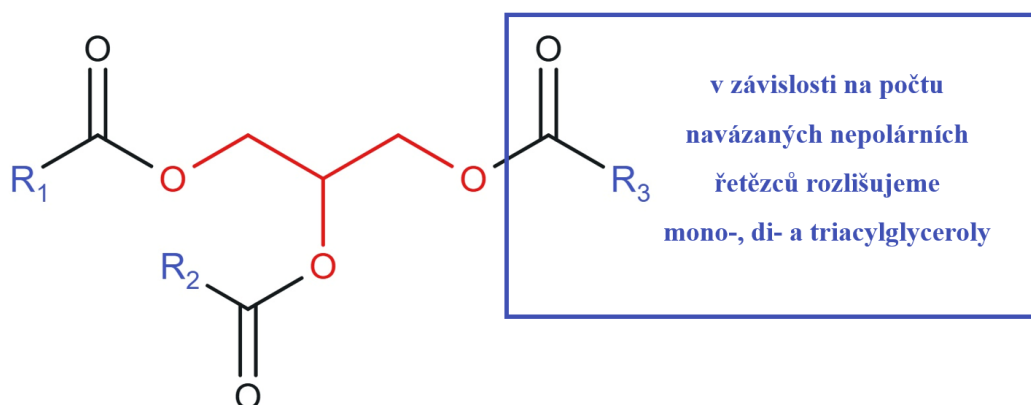
Mastné acyly se řadí mezi jednu z nejzákladnějších skupin lipidů a to především z důvodu, že tvoří klíčovou stavební jednotku složitějších lipidů. Mezi první podtřídou mastných acylů lze zařadit mastné kyseliny mající na konci alifatického řetězce navázanou karboxylovou skupinu. Mohou být lineární nebo rozvětvené, případně mohou obsahovat násobné vazby (nenasyčené mastné kyseliny). U vybraných podtříd může být na uhlíkatý skelet navázán heteroatom, nejčastěji kyslík, dusík, síra, výjimečně také halogen. Existují i cyklické varianty mastných kyselin, kde cyklus zpravidla tvoří 3 až 6 atomů uhlíku. [8, 10]

Obecně se mastné acyly (**Obrázek 2**) vyznačují opakující se řadou methylenových skupin, jež této kategorii lipidů zaručují hydrofobní charakter. Další lipidové podtřídy v kategorii mastných acylů jsou mastné alkoholy, mastné aldehydy, mastné ethery, eikosanoidy, dokosanoidy a deriváty mastných kyselin – estery, nitrily a amidy. [8, 9]



Obrázek 2 Základní struktura mastného acylu – kyselina dodekanová

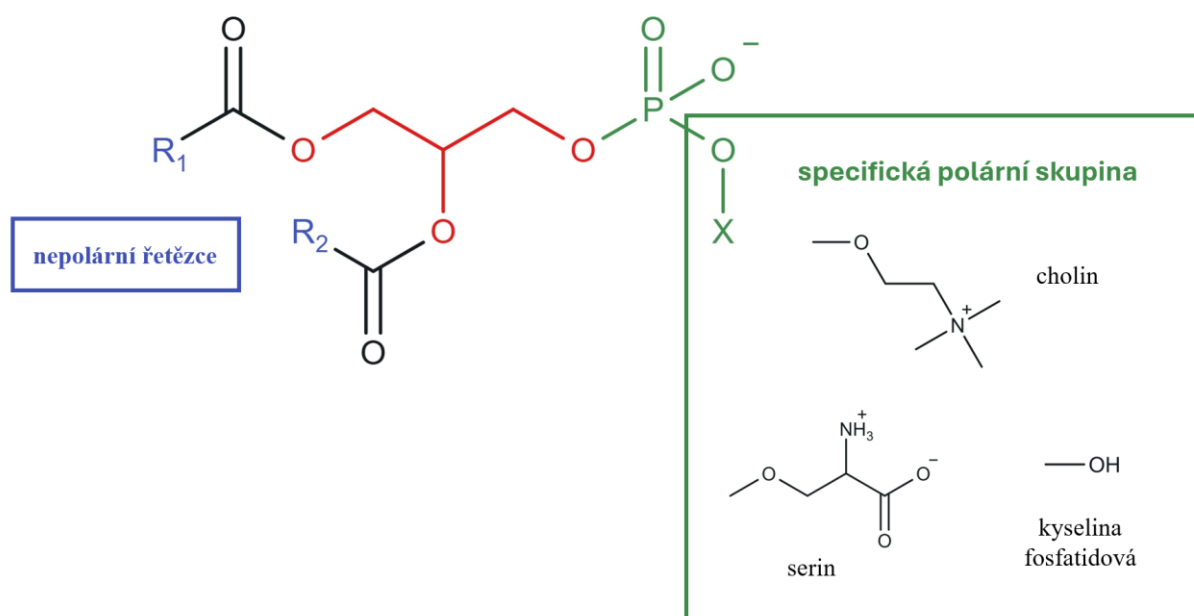
Kategorie glycerolipidů (**Obrázek 3**) zahrnuje lipidy tvořené glycerolem esterifikovaným mastnými kyselinami, bez přítomnosti fosfátové skupiny. Nejčastější jsou mono-, di- a triacylglyceroly, přičemž nejznámější jsou právě ty posledně jmenované. V lidské plazmě tvoří glycerolipidy vysoký podíl celkového množství přítomných lipidů, z nichž nejvíce zastoupené jsou triacylglyceroly. [8, 11]



Obrázek 3 Základní struktura glycerolipidů

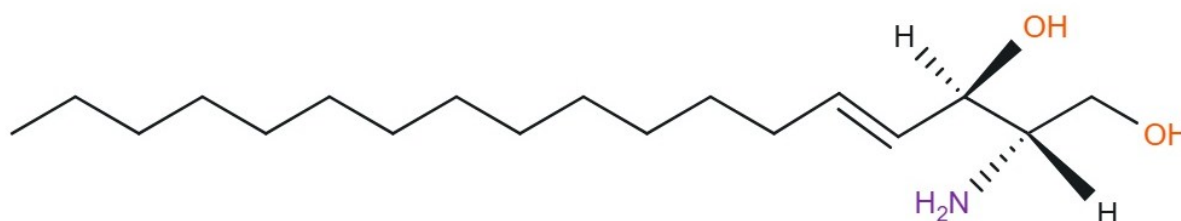
Glycerofosfolipidy (**Obrázek 4**) jsou charakteristické přítomností fosfátové skupiny esterifikované na jednu z hydroxylových skupin glycerolu. Lze je rozdělit do podtříd na základě povahy skupiny navázané na polární části molekuly lipidu. Mezi tyto podtřídy patří také lysofosfolipidy, což jsou deriváty glycerofosfolipidů, které postrádají jednu z acylových skupin a obsahují tak pouze jeden mastný řetězec připojený ke glycerolu. Glycerofosfolipidy mají záměrně svou vlastní kategorii, jelikož jsou hojně zastoupeny a mají velký fyziologický význam. Především jsou to primární složky buněčných membrán, rovněž

slouží jako signální molekuly v organismu a jako vazebná místa pro mezibuněčné proteiny. Zařadit sem můžeme i podtřídu nazývanou oxidované glycerofosfolipidy skládající se z molekul, u nichž je oxidován jeden nebo více postranních řetězců. [2, 8]



Obrázek 4 Základní struktura glycerofosfolipidů

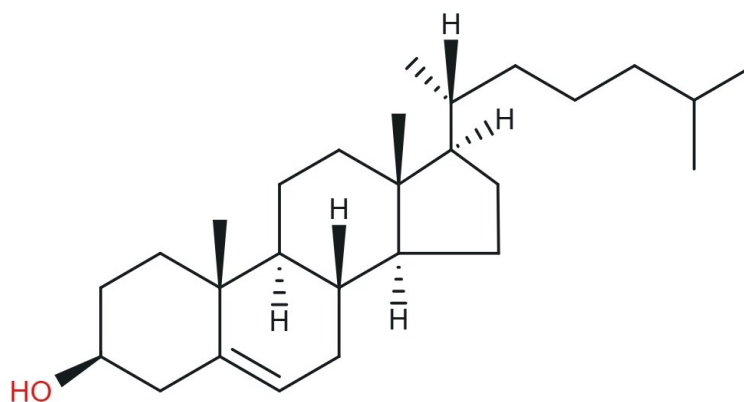
Sfingolipidy jsou dobře definovanou komplexní skupinou sloučenin, které mají společný strukturní rys v podobě sfingoidní báze (nejčastěji sfingosin - **Obrázek 5**). Lze je rozdělit do několika hlavních podtříd – sfingoidní báze a její jednoduché deriváty nebo sfingoidní báze s amidicky navázanou mastnou kyselinou, které označujeme jako ceramidy.



Obrázek 5 Sfingoidní báze (sfingosin) - základní struktura sfingolipidů

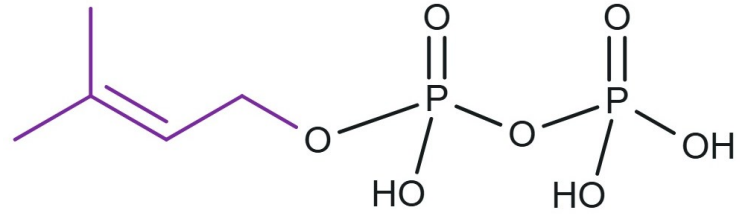
Složitější sfingolipidy, které jsou navázány prostřednictvím fosfodiesterových vazeb nazýváme fosfosfingolipidy, nejčastěji sfingomyeliny (SM). Sfingolipidy jsou důležitou složkou buněčných membrán obdobně jako glycerofosfolipidy, rovněž některé molekuly z této kategorie zastupují roli signálních látek, např. glykosfingolipidy, které obsahují polární sacharidovou část. [2, 8]

Kategorie sterolů se dělí především na základě biologické funkce. Společným a charakteristickým rysem sterolů je cyklopentanoperhydrofenantrenová struktura, tento skelet představuje molekulu steranu. Mezi základní steroly řadíme cholesterol (**Obrázek 6**) a jeho deriváty. Dále pak i skupinu steroidů, jejichž základní strukturu tvoří rovněž skupina čtyř uhlíkových cyklů, mají ovšem odlišné biologické role, jedná se o hormony a signální molekuly. Všechny přírodní steroly savců jsou odvozeny od cholesterolu nebo jeho prekurzorů. [8, 9]



Obrázek 6 Struktura cholesterolu (cholest-5-en-3 β -ol) [8]

Prenoly jsou tvořeny z pěti-uhlíkatých prekurzorů isopentenyldifosfátů a dimetyldifosfátu. Polyprenoly a jejich fosforylované deriváty hrají důležitou roli při transportu oligosacharidů přes buněčné membrány. Prenolové lipidy jsou syntetizovány z isoprenových jednotek s pěti uhlíky (**Obrázek 7**). [8, 11]



Obrázek 7 Struktura C5 isoprenoidu - dimethylallylpyrofosfát

Mezi poslední kategorie lipidů patří sacharolipidy a polyketidy. Sacharolipidy jsou sloučeniny v nichž jsou mastné acylové skupiny navázány přímo na strukturu cukru, mohou se vyskytovat jako glykany nebo jako fosforylované deriváty. Polyketidy se řadí do rozsáhlé skupiny metabolitů z živočišných, rostlinných a mikrobiálních zdrojů. Jsou syntetizovány enzymy a generují velké množství přírodních produktů s rozmanitou strukturou, z nichž mnohé mají charakter lipidů. [2, 8]

1.2. Analytické techniky využívané v lipidomice

Lipidomika je vědní obor, který zahrnuje rozsáhlou analýzu jednotlivých druhů lipidů a základní analytickou technikou, jenž se využívá k identifikaci a kvantifikaci lipidů je obvykle hmotnostní spektrometrie (MS) a to především z důvodu své vysoké citlivosti. [12]

Klíčové kroky v lipidomické analýze zahrnují přípravu vzorku, vlastní analytické měření, nejčastěji s využitím chromatografie a hmotnostní spektrometrie, zakončené softwarovým zpracováním dat a jejich interpretace. [12]

V lipidomickém výzkumu se využívá třech hlavních přístupů, a to přímá MS analýza (často nazývaná jako „shotgun lipidomika“), separace v kapalně fází spojená s hmotnostní spektrometrií (typicky kapalinová chromatografie – LC-MS) a hmotnostně spektrometrické zobrazování (MSI). [4]

1.2.1. Příprava vzorků pro lipidomickou analýzu

Při procesu přípravy vzorků je nezbytné dbát na jejich správný odběr, uchování i na následnou extrakci. Tyto postupy by měly být vždy prováděny konzistentně mezi jednotlivými vzorky i studiemi, aby byla zajištěna maximální reprodukovatelnost a spolehlivost získaných dat. [4]

Prvním a nejdůležitějším krokem během zpracování biologických vzorků je jejich samotný odběr. Vzorky mohou mít dvojí podobu, buď se jedná o pevnou formu (tkáň či buňky), případně mohou zahrnovat komplexní biologické tekutiny (jako je plazma, sérum či moč). [12, 13]

Z pohledu přípravy vzorků jsou protokoly pro pevné biologické vzorky časově náročnější a více komplexní než u vzorků biologických tekutin. Biologické tekutiny je obvykle možné ihned po odběru rozdělit do alikvot a zmrazit, zatímco pevných vzorků je potřeba provést více kroků. Například játra je nutné perfundovat, aby došlo k odstranění krevních složek, včetně buněk, lipoproteinových částic a albuminu, před vlastním zmrazením je ještě třeba tkáň nařezat na malé kousky. Po odebrání vzorků dochází buď k okamžité analýze, nebo k jejich rychlému zmrazení v kapalném dusíku či na suchém ledu. Následně jsou vzorky skladovány při velmi nízkých teplotách (přibližně $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a rozmrazeny až před dalším analytickým zpracováním. Stabilita vzorku může být prodloužena uchováním v prostředí bez kyslíku, rovněž lze stabilitu zvýšit přidáním antioxidantu (např. butylovaný hydroxytoluen), který dokáže potlačit degradaci lipidů. Nežádoucí je opakované rozmrazování vzorků, kdy hrozí jejich degradace příčinou hydrolýzy lipidů. [4, 13]

Pokud nejsou vzorky ihned zpracovány nebo rychle zmrazeny, pokračují v nich enzymatické a chemické procesy, které vedou k metabolizaci lipidů. Příkladem může být nárůst koncentrace lysofosfatidylcholinu (LPC) a lysofosfatidové kyseliny (LPA) v plazmě, je-li vzorek ponechán příliš dlouho při pokojové teplotě. Z těchto důvodů je doporučeno vzorky zpracovat v co nejkratší době, a pokud to není možné, uchovávat je při zmíněných nízkých teplotách. Některé biologické matrice mohou být při těchto nízkých teplotách bezpečně skladovány po dobu až několika let. U krevních vzorků je přitom zvláště důležité použít vhodný antikoagulant, přičemž ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) je preferovaná volba pro zajištění požadované stability. [4, 12]

Další důležitou částí je pečlivé zvážení výběru vhodných rozpouštědel, reagentů, množství vzorku, lipidových standardů a užití vyhovující extrakční techniky. Neméně důležitá je i kvalita odebraného vzorku, jenž musí být dostatečně vysoká, aby umožnila hodnotné a cenné analýzy. Pro kvantitativní analýzy lipidů je nezbytné přidání exogenního vnitřního „interního“ standardu (IS) před další přípravou vzorku, jako je například extrakce. [4]

1.2.1.1. Extrakce

Každá extrakční metoda využívaná v lipidomice slouží dvěma hlavními účelům. Především snižuje komplexnost vzorku tím, že odstraňuje nežádoucí nelipidové sloučeniny. Tento proces zároveň snižuje množství kontaminantů a kvalitní selektivní extrakce snižuje znečištění hmotnostního spektrometru, což má za následek nižší potřebu údržby přístroje a možnost měření většího počtu vzorků. Extrakce vzorku může také sloužit k zakoncentrování požadovaných analytů (v našem případě lipidů) a zvýšení citlivosti. [12]

Obecně platí, že lipidomické analýzy vyžadují metody přípravy vzorků, které jsou rychlé, reprodukovatelné a schopné extrahovat široké spektrum studovaných analytů s různou polaritou, přičemž zároveň musí být kompatibilní s použitou instrumentální technikou. V lipidomické analýze se běžně k přípravě vzorků používají dvě hlavní extrakční metody, extrakce mezi dvěma kapalinami (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE).

Nejrozšířenější LLE metoda byla vyvinuta Folchem a jeho týmem v roce 1957. Jako extrakční činidla využili směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v). Tato metoda byla později vylepšena Blighem a Dyerem, kteří využili stejných rozpouštědel (chloroform/MeOH v poměru 1:2 v/v), a následně přidali jeden díl chloroformu a jeden díl vody. [14, 15]

U anionických lipidů, jako jsou fosfatidová kyselina (PA), lysofosfatidová kyselina (LPA) nebo sfingosin-1-fosfát (S1P) je doporučeno upravit tento protokol přidáním kyseliny,

nejčastěji kyseliny chlorovodíkové (typicky v koncentraci kolem 0,1 M), k neutralizaci těchto anionických lipidů, čímž se zlepší jejich rozpustnost v organické fázi a následně se zvýší efektivita extrakce. Při použití této extrakce je ale velmi důležité kontrolovat koncentraci přidávané kyseliny a dobu extrakce, jinak může docházet k nežádoucí hydrolyze lipidů a tím k chybným pozitivním výsledkům. V tomto nastavení obsahuje organická fáze (chloroform/methanol) lipidy, zatímco vodná fáze obsahuje hydrofilní sloučeniny a soli. Jedná se o velmi účinnou metodu pro extrakci jak polárních, tak nepolárních lipidů, díky jejich schopnosti pronikat buněčnými membránami, vyšší polaritě a silnější interakci s vodíkovými vazbami. [12, 15, 28]

Další variantou LLE je metoda založená na systému hexan/isopropanol, kde jsou daná rozpouštědla v typickém poměru 3:2. Ve srovnání s Folchovou metodou jsou tato rozpouštědla mnohem méně toxická, ovšem tato metoda není příliš rozšířena kvůli relativně nízké účinnosti extrakce. [15]

V roce 2013 byla vyvinuta metoda kapalinové extrakce na bázi methyl-*terc*-butyl etheru (MTBE) pro extrakce lipidů a daných tříd metabolitů zároveň. Tento moderní přístup umožnil komplexní analýzu metabolitů, včetně lipidů, v rámci jednoho experimentu po jediné extrakci. Tato metoda spočívá v přidávání methanolu a MTBE v poměru 1,5:5 (v/v) ke vzorku, samotná separace je pak vyvolána přidávkem vody. Výhodou extrakce za pomoci MTBE oproti zavedeným dvoufázovým systémům obsahujícím chloroform, je nízká hustota organické fáze obsahující lipidy, ta navíc během separace fází tvoří horní vrstvu. To výrazně usnadňuje její odběr a minimalizuje ztráty způsobené odkapáváním. Rovněž ve srovnání s chloroformem je MTBE netoxický a nemá karcinogenní účinky, což snižuje jak ekologickou zátěž, tak zdravotní rizika pro exponovaný personál. Od svého zavedení tato metoda vykazuje tendenci nahrazovat extrakční systémy obsahující chloroform. [14, 15]

Metody extrakce na tuhou fázi (SPE) používané v lipidomické analýze využívají materiály jako je čistý či modifikovaný silikagel s amidovými nebo diolovými skupinami nebo oktadecylsilikagelem jako tuhou stacionární fázi. Jako eluční rozpouštědla se nejčastěji používají acetonitril, methanol, hexan nebo chloroform, přičemž jejich volba závisí na typu cílových lipidů a požadované selektivitě extrakce. Ve srovnání s metodami LLE snižuje SPE výrazně spotřebu rozpouštědel i časovou náročnost. Nicméně při zpracování velkého objemu vzorků může docházet k výraznému snížení účinnosti extrakce v důsledku omezené kapacity separační fáze SPE metod. [15]

Mimo zmíněných metod LLE a SPE bylo v posledních letech v lipidomické analýze využito mnoho nových extrakčních technik. Příkladem může být ultrazvukem asistovaná

extrakce (UAE), mikroextrakce na tuhé fázi (SPME), extrakce pomocí tlakové tekutiny (PFE) a další. [15]

1.2.2. Separační techniky v lipidomice

Před zavedením ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (API) se v lipidomice převážně využívala tenkovrstvá chromatografie (TLC) a plynová chromatografie (GC). Zatímco TLC nevyžaduje derivatizaci, u GC je často nutná derivatizace polárních funkčních skupin, například metylace mastných kyselin. S nástupem API technik se však v lipidomice začala převážně uplatňovat MS ve spojení s kapalinovou chromatografií. [4]

Nejčastěji využívanou API technikou v lipidomické analýze je v dnešní době bezesporu hmotnostní spektrometrie využívající ionizaci elektrosprejem (ESI-MS). Hlavní výhody spočívají především ve vysoké citlivosti, snadnému spojení s (ultra)vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií ((U)HPLC) nebo superkritickou fluidní chromatografií (SFC), a velmi nízké spotřebě vzorku. [4]

1.2.2.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) patří mezi nejrozšířenější techniky v lipidomické analýze a zároveň představuje klíčovou metodu pro detailní charakterizaci lipidů. Hlavní výhodou LC-MS je široká škála separačních režimů, které lze přizpůsobit téměř všem existujícím typům lipidových izomerů. [4, 13]

Při analýze lipidů se využívají různé konfigurace kapalinové chromatografie, mezi nejběžnější patří LC s normální fází (NP-LC) nebo s reverzní fází (RP-LC), kde je na vhodném nosiči (nejčastěji silikagelu) navázán nepolární uhlíkatý řetězec (C18 nebo C8). Přičemž každý typ slouží k odlišným analytickým účelům. Tyto metody umožňují separaci analytů během jejich migrace skrze kolonu naplněnou mikročásticemi (stacionární fáze). Separace je založena na rozdílných chemických a fyzikálních interakcích mezi analyty, tuhou stacionární fází a mobilní fází, která obsahuje směs polárních a organických rozpouštědel. [1, 13, 14, 15]

RP-LC je jednoznačně nejpoužívanější metodou, umožňující komplexní separaci lipidů v rámci jediné třídy na základě délky mastných acylových řetězců i počtu a polohy dvojných vazeb. Naproti tomu NP-LC představuje alternativní metodu separace pro nepolární lipidové třídy, kde separace probíhá primárně podle polaritativy hlavových skupin lipidů. [1, 4, 13]

Z praktického hlediska je ovšem NP-LC obtížně spojitelná s procesem ionizace elektrosprejem, především z důvodu vysokého obsahu nepolárních organických rozpouštědel. Nicméně lze využít specificky upravené NP-LC metody, jako je argentační chromatografie spojená s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Ta umožňuje například detailní analýzu triacylglycerolů (TG), včetně určení poloh mastných acylů, počtu dvojných vazeb, jejich pozice, a dokonce i jejich cis/trans geometrie. [4, 12]

Jednou z novějších metod pro separaci lipidů je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), podobně jako u systému NP-LC dochází k separaci lipidů hlavně podle jejich polárních hlavových skupin, ovšem použitá rozpouštědla u HILIC jsou mnohem méně hydrofobní, což metodu celkově činí kompatibilnější s elektrosprejovou ionizací. HILIC byla úspěšně použita pro separaci polárnějších lipidových tříd, jako PC, PE, SM a LPC v lidské plazmě. Tento režim separace je preferován pro kvantitativní LC-MS analýzu lipidů, a proto je v lipidomice velmi často využíván. [4, 12, 13, 14]

Současným trendem v kapalinové chromatografii je využití částic menších než 2 μm a vysokých provozních tlaků. UHPLC tak v posledních letech stále více nahrazuje zavedené HPLC systémy, nabízí totiž rychlejší časy analýz při lepším chromatografickém rozlišení díky vyšší toleranci vůči zpětnému tlaku. Zmenšování částic stacionární fáze vede také ke zmenšení vnitřního průměru kolony, což je doprovázeno snížením objemu průtoku mobilní fáze. To umožňuje vzniku kapilární LC (resp. nano-LC), která ještě zvyšuje citlivost detekce stopového množství vzorků. Poslední výzkumy prokázaly vynikající efektivitu nano-LC při analýze lipidů, přičemž limit detekce dosahuje hodnot v řádu femtomolů. [4, 12, 15]

Hlavní výhody LC-MS zahrnují výbornou reprodukovatelnost, vysoké rozlišení a snížené efekty potlačení ionizace ve srovnání s přímou MS analýzou a na rozdíl od GC-MS není nutné provádět chemickou derivatizaci, což má za následek snížení rizika degradace a modifikace lipidů. [13, 14]

1.2.3. Konfigurace hmotnostního spektrometru pro lipidomické analýzy

Lipidomická analýza založená na hmotnostní spektrometrii může být rozdělena do dvou podoblastí a to na obecnou a specifickou lipidomiku. Obecná lipidomika má za cíl identifikovat a kvantifikovat všechny lipidy nacházející se v daném systému. Naopak specifická lipidomika se zaměřuje na charakterizaci konkrétních lipidů. Metodologie v obou

přístupech byly zdokonaleny díky rozvoji hmotnostní spektrometrie a paralelnímu vývoji nástrojů pro analýzu naměřených dat. [16]

Během MS analýz jsou lipidové vzorky analyzovány buď metodou přímé MS analýzy („shotgun lipidomika“), nebo za pomoci předřazených chromatografických metod ve spojení s MS (LC-MS analýzy). Alternativně mohou být určité vzorky jako tkáň nebo buněčné vzorky podrobeny hmotnostně spektrometrickému zobrazování (MSI). [21]

1.2.3.1. Ionizační techniky v lipidomické analýze

Volba ionizační metody při LC-MS analýze zásadně ovlivňuje výsledný lipidomický profil. Vzhledem k rozdílným ionizačním vlastnostem jednotlivých tříd lipidů nelze použít jednu univerzální ionizační techniku, která by byla vhodná pro všechny typy těchto látek. Účinnost ionizace lze zvýšit přidáním určitých složek (aditiv) do mobilní fáze, což má za následek tvorbu různých typů aduktů. [14]

Ionizace elektrosprejem (ESI) patří bezesporu mezi nejvyužívanější metody ionizace v LC-MS analýze a dokáže efektivně ionizovat širokou škálu lipidů. ESI se často využívá rovněž v shotgun lipidomice, kde vzorek nepodléhá žádné předřazené separaci. [1, 14, 21]

ESI patří mezi měkké ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, které umožňují tvorbu vícenásobně nabitých iontů. Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí a snadnou kompatibilitou s HPLC nebo s kapilární elektroforézou (CE). Principem ESI je tvorba jemného spreje vysoce nabitých kapiček vlivem silného elektrického pole. Následný odpar rozpouštědla vede k převedení nabitých kapiček na ionty v plynné fázi. Koncept elektrospreje navrhl již v roce 1968 americký chemik Malcom Dole, zdokonalení ve vývoji a využití elektrospreje v hmotnostní spektrometrii je ovšem připisováno Johnu B. Fennovi, kterému byla za tyto přínosy v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii. [18, 19, 21]

Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) patří do skupiny desorpčních ionizačních technik a umožňuje analýzu velkých a/nebo labilních molekul, jako jsou peptidy a proteiny, ale také dalších biologicky významných molekul, včetně lipidů. MALDI nachází široké uplatnění zejména při zobrazovací hmotnostní spektrometrii (MSI), kde dochází k analýze tkáňových či buněčných vzorků. Využívaná je ale rovněž i v přímé MS analýze. [4, 15, 21]

Důležitým krokem je výběr vhodné matrice, což jsou většinou malé organické molekuly, které musí efektivně absorbovat energii laserového záření o dané vlnové délce. Vzorek s matricí se následně vysuší, čímž vznikne pevná vrstva krystalů matrice obsahující

analyt rozptýlený v celé struktuře, přičemž jednotlivé molekuly zůstávají vzájemně izolované. Intenzivní laserové pulzy aplikované na vzorek způsobí ablaci a desorpci jak analytu, tak i materiálu matrice, čímž vzniká tzv. horký oblak ablačních plynů. V tomto oblaku dochází k ionizaci molekul analytu, které jsou následně detekovány a analyzovány hmotnostním analyzátozem. [19, 21]

MALDI zůstává široce využívána v MS metodách, především v oblasti klinického výzkumu nemocí spojených s lipidy. Tento typ ionizace může být také využit k analýze extraktů, ovšem reprodukovatelnost a robustnost MALDI je mírně horší ve srovnání s ESI. Proto by kvantifikace pomocí MALDI měla být považována spíše za semikvantitativní. Kromě MALDI lze pro stejný účel využít i řadu dalších desorpčních ionizačních technik. Vedle ESI a MALDI existuje celá řada dalších ionizačních technik, příkladem může být chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). [1, 4, 15]

1.2.3.2. Hmotnostní analyzátory v lipidomické analýze

Hmotnostní analyzátoz představuje velmi důležitou součást hmotnostního spektrometru, ve které dochází k rozlišení jednotlivých iontů (m/z). Kvalitu separace iontu reprezentuje parametr rozlišovací schopnost. Mezi další důležité parametry lze zmínit hmotnostní a dynamický rozsah, skenovací rychlost a správnost určení hmoty. Typ analyzátozu zásadně ovlivňuje kvalitu získaných hmotnostních spekter i cenu samotného hmotnostního spektrometru. [23]

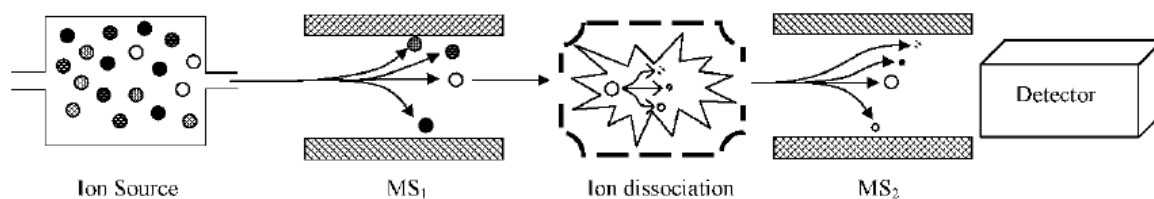
Obecně lze hmotnostní analyzátory rozdělit dle jejich rozlišovací schopnosti (RS). Mezi analyzátory mající nízkou rozlišovací schopnost se řadí kvadrupólový analyzátoz nebo Paulova iontová past, tyto analyzátory mají RS obvykle v rozmezí 2 000 – 4 000 a poskytují většinou pouze jednotkové rozlišení.

Analyzátory s vysokou RS umožňují výrazně vyšší rozlišení ($RS > 10\,000$) a mezi ně se řadí analyzátoz doby letu (TOF) s opožděnou extrakcí nebo reflektorem. Orbitrap, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a případně sektorový magnetický analyzátoz s dvojitou fokusací, který pro lipidomickou analýzu téměř využíván není. Vysokou RS poskytují i hybridní analyzátory, z nichž nejčastější je kombinace kvadrupólu a TOF (Q-TOF). Díky vysoké RS analyzátozu je možné určit/ověřit elementární složení pozorovaných iontů, což je zejména důležité pro kvalitativní analýzy.

V posledních letech vzrůstá zájem i o kombinaci analyzátorů s předřazenou iontovou mobilitou, která jako ortogonální technika rozšiřuje získané analytické informace o další dimenzi. [20, 21]

1.2.3.2.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Důležitým parametrem hmotnostního analyzátoru je také schopnost měření MS/MS spekter, což umožňuje tandemová hmotnostní spektrometrie. Stejně jako v ostatních oborech i v lipidomice je MS/MS důležitým krokem pro identifikaci konkrétních lipidů. Tandemová hmotnostní spektrometrie je technika, která izoluje ion s konkrétním poměrem m/z (tj. prekurzorový ion), který je následně podroben disociaci za tvorby produktových iontů (**Obrázek 8**). Výsledné MS/MS spektrum pak umožňuje získat cenné informace o molekulární struktuře analyzovaného vzorku. Zřejmě nejběžnější tandemový hmotnostní spektrometr je trojitý kvadrupól (QqQ). První kvadrupól selektuje ionty určené k analýze, které jsou následně směřovány do kolizní cely obsahující inertní plyn. Kolize iontů s plynem vede k fragmentaci a tento proces je označován jako kolizní indukovaná disociace (CID). QqQ se využívá zejména při kvantitativní analýze. [18, 24]



Obrázek 8 Princip tandemové hmotnostní spektrometrie [22]

Kromě QqQ umožňuje měření MS/MS spekter také iontová past, ale i hybridní analyzátoary, které se skládají z různých typů analyzátorů, přičemž první analyzátor izoluje prekurzorový ion, který je následně fragmentován, zatímco druhý analyzátor separuje vzniklé produktové ionty podle jejich hodnot m/z .

V praxi se lze setkat s kombinací různých typů hmotnostních analyzátorů, např. kombinace iontové pasti nebo kvadrupólu s analyzátoarem doby letu, Orbitrapem, případně FT-ICR. [18, 22, 24]

1.2.4. Kvantitativní lipidomická analýza

V oblasti kvantifikace lipidů dominuje hmotnostní spektrometrie, a to buď ve formě přímé analýzy - známé jako shotgun lipidomika, nebo ve spojení se separačními technikami, především LC-MS. [25]

Základním předpokladem kvantitativní lipidomické analýzy je použití alespoň jednoho exogenního interního standardu (IS) pro každou lipidovou podtřídu, která má být kvantifikována. V ideálním případě by měl mít analyt a příslušný IS podobnou nebo úplně stejnou retenci. Tento požadavek je jednoduše realizovaný v případě separace lipidových tříd, protože interní standardy dané lipidové třídy eluují současně s analytem. To zajišťuje stejné matricové efekty a potlačuje ionizaci pro IS i analyt.

Jako IS se využívají nejčastěji izotopicky značené analogy endogenních lipidů nebo lipidy s kratšími acylovými řetězci (např. 12:0 nebo 14:0) či s lichým počtem uhlíků (např. 17:0, 19:0), které nejsou ve studovaných vzorcích přítomny. [4, 14, 25]

Obdobná situace nastává při přímé MS analýze s využitím trojitého kvadrupólu, kde specifické skenovací režimy umožňují rozlišení jednotlivých lipidových tříd. V tomto případě jsou IS i analyt ionizovány současně a tím se minimalizuje chyba v kvantifikaci. [25]

Interní standardy jsou klíčovým prvkem pro přesné stanovení koncentrací lipidových analytů. Použití IS v hmotnostní spektrometrii pomáhá kompenzovat přirozené odchylky během zpracování vzorků i během vlastního měření, jako efektivitu extrakce lipidů, matricové efekty nebo specifické ztráty pro určité lipidové třídy. Ideální IS by měl být strukturálně podobný kvantifikovanému analytu a vykazovat podobnou MS/MS fragmentaci. Jelikož nelze pro každý lipid použít jeden specifický IS, jsou doporučení týkající se jejich počtu, koncentrace, typu a vlastností nezbytná pro zachování přesnosti a spolehlivosti lipidomických analýz. [26]

Nejvhodnější volbou IS je stabilní izotopově značený analog cílové molekuly, nejčastěji deuterovaným nebo značeným izotopem uhlíku-13 (^{13}C). Díky své vysoké strukturální podobnosti s analytem vykazuje podobné chování během přípravy vzorku i při následné chromatografické separaci a hmotnostně spektrometrické analýze. Metoda s izotopickým značením se využívá především pro kvantifikaci cílených lipidů. [27]

Bez ohledu na zvolenou MS metodu je vhodné použít alespoň jeden IS pro každou lipidovou třídu. Metoda by měla být analyticky validována, při čemž pro tento účel je doporučeno využít reálnou biologickou matici, aby bylo možné věrně simulovat podmínky analýzy. Pro tento účel se běžně připravuje směsný vzorek složený z alikvot všech

nebo reprezentativního množství analyzovaných vzorků, do kterého se interní standardy přidávají ještě před extrakcí. Citlivost a selektivitu analýzy lze v některých případech zvýšit pomocí derivatizačních reakcí, kterým se bude věnovat následující kapitola. [25]

1.3. Derivatizační přístupy v lipidomické analýze

Derivatizace představuje chemickou úpravu analytu, při níž je do molekuly zaváděna nová funkční nebo značící skupina za účelem zlepšení jejích analytických vlastností. Mezi hlavní přínosy derivatizace patří zvýšení ionizační účinnosti, zlepšení detekce a chromatografické separace či zvýšení stability stanovovaných sloučenin. Proces derivatizace zpravidla vychází z reakce specifické funkční skupiny ve výchozí sloučenině, která umožňuje její přeměnu na derivát s výhodnějšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

V analytické chemii, a zejména v oblasti lipidomické analýzy, hraje derivatizace zásadní roli. Strukturální rozmanitost lipidů, přítomnost izomerních forem a nízká koncentrace mnoha lipidů v komplexních biologických vzorcích značně komplikují jejich spolehlivou detekci a kvantifikaci. Aplikace derivatizačních metod proto představuje efektivní nástroj pro překonání výše uvedených problémů a současně rozšiřuje množství získaných dat. [20, 29, 35]

1.3.1. Základní typy derivatizace a požadavky na deriváty

Derivatizační techniky lze podle místa, kde chemická reakce probíhá, rozdělit do tří typů – zejména se jedná o předkolonovou a postkolonovou derivatizaci, ale reakce může probíhat i na koloně. Primárně se liší nároky kladenými na vzniklé deriváty. [34]

U předkolonové derivatizace se reakce uskutečňuje ještě před vstupem analytu na chromatografickou kolonu, z tohoto důvodu musí výsledný derivát představovat jednoznačné a dostatečně stabilní chemické individuální. Reakce by měla probíhat kvantitativně a pokud možno co nejvíce selektivně, přičemž tvorba vedlejších produktů musí být omezena tak, aby neměla vliv na vlastní analýzu. Případný přebytek derivatizačního činidla musí být dokonale oddělitelný od produktů. Derivát by měl disponovat odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které usnadní jeho detekci. Tyto nároky činí předkolonovou derivatizaci experimentálně náročnější a kladou vysoké požadavky na zkušenost operátora i reprodukovatelnost výsledků. [34, 36]

Naproti tomu postkolonová derivatizace probíhá až za separační kolonou, z čehož vyplývá, že kvantitativní průběh reakce ani jednoznačná struktura derivátu nejsou tolik důležité. Rozhodující je v tomto případě dobrá reprodukovatelnost a rychlost reakce za podmínek, které neovlivní již provedená separace analytů. Často se využívá přebytku derivatizačního činidla, které po reakci zůstává v mobilní fázi, dochází k jejímu ředění činidlem a může docházet k mírnému snížení účinnosti separace. Nároky na selektivitu jsou výrazně nižší a vedlejší produkty ve většině případů nevadí. Tento typ derivatizace vyžaduje ovšem začlenění T-spojky do přístroje a přívod činidla s využitím např. infuzní pumpy, výhodou je možnost plné automatizace. Derivatizaci za kolonou lze někdy rovněž nazvat on-line derivatizací. [34, 35]

Derivatizace na koloně představuje mezistupeň, kdy chemická reakce probíhá přímo v koloně a kombinuje výhody i omezení obou zmíněných přístupů. Všechny uvedené typy derivatizace ovlivňují eluční chování separovaných látek, tedy jak účinnost separace, tak dobu analýzy. [34]

1.3.2. Specifika derivatizace funkčních skupin v molekulách lipidů

Jako derivatizaci označujeme specifickou chemickou reakci, která vyžaduje přítomnost reaktivních funkčních skupin jak ve sledované sloučenině, tak v odpovídajícím derivatizačním činidle.

Mezi nejčastěji derivatizované funkční skupiny v molekulách lipidů patří primární a sekundární aminoskupiny (např. v polární hlavě fosfolipidů či u sfingoidních bází), karboxylové skupiny (např. u volných mastných kyselin), hydroxylové skupiny (např. ve sterolech, ceramidech, mono- a diacylglycerolipidech nebo lysofosfolipidech) a karbonylové skupiny. Rovněž sem lze zařadit i nenasycené vazby v acylových řetězcích molekul lipidů. Každý typ funkční skupiny vyžaduje vhodně zvolené derivatizační činidlo, které zajistí selektivní a reprodukovatelnou reakci bez vzniku nežádoucích vedlejších produktů. [20, 33, 39, 40]

Volba vhodného derivatizačního činidla se neodvíjí pouze od charakteru cílové funkční skupiny, ale také od požadavků na citlivost a specifitu následné analytické detekce. Aby mohla být derivatizační reakce efektivně využita pro analytické účely, měla by splňovat několik zásadních požadavků. Reakce musí být spolehlivá a probíhat kvantitativně; tvorba vedlejších produktů i konkurenčních reakcí by měla být co nejnižší. Výsledný derivát by měl být stabilní a nepodléhat rychlé degradaci. Splnění těchto kritérií je zásadní pro efektivní

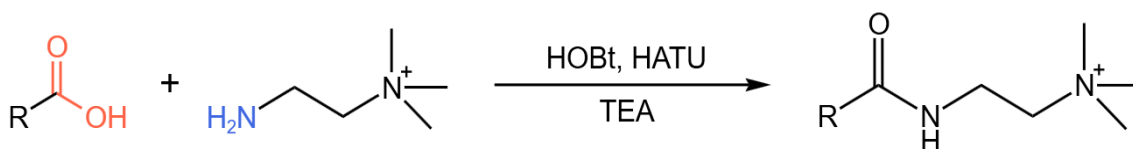
chromatografickou separaci i následnou citlivou a selektivní hmotnostně spektrometrickou analýzu. [39, 40]

1.3.2.1. Derivatizace karboxylové skupiny

Volné mastné kyseliny s dlouhým alifatickým řetězcem obsahující alespoň jednu karboxylovou skupinu a představují širokou škálu lipidů. Standardně je lze rozdělit na nasycené a nenasycené mastné kyseliny, přičemž toto rozdělení lze dále rozšířit na mono- a poly-nenasycené mastné kyseliny podle počtu dvojných vazeb C=C. Finální detekce je komplikovaná jejich vysokou strukturní podobností, hydrofobním charakterem a nízkou koncentrací. [41]

Mezi nejznámější derivatizační reakce mastných kyselin (FA) patří metylace volných FA nebo FA uvolněných po hydrolyze složitějších lipidů. Těkavé a stabilní methylestery FA jsou poté nejčastěji analyzovány pomocí GC-MS. Nicméně pro LC-MS a MALDI-MS analýzu se využívají jiná činidla, např. (2-aminoethyl)trimethylamonium chlorid hydrochlorid (cholamin). Společně s ním se této konkrétní derivatizační reakce účastní 1-hydroxybenzotriazol hydrát (HOBt), 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát (HATU), dimethylsulfoxid (DMSO) a triethylamin (TEA). [40, 41, 51]

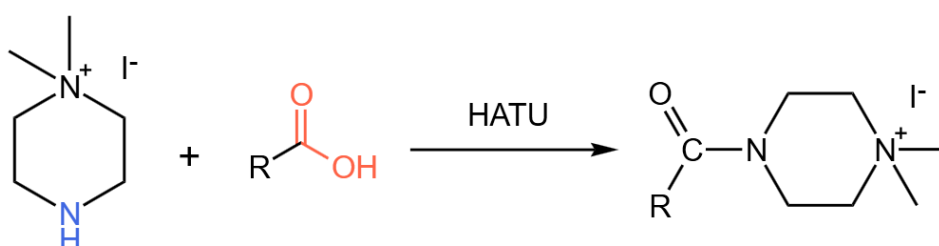
Samotná derivatizační reakce (**Obrázek 9**) byla optimalizována následujícím způsobem: suché standardy (případně reálné vzorky) byly postupně smíchány s roztokem HOBt v DMSO, roztokem cholaminu s TEA v DMSO a roztokem HATU v DMSO. Reakční směs byla doplněna ACN do výsledného objemu a následovala přímá injektáž do UHPLC-Q-TOF/MS. Reakce probíhala po dobu jedné minuty při pokojové teplotě. Postup byl rychlý, snadno reprodukovatelný a ve srovnání s většinou ostatních metod výrazně jednodušší. [41]



Obrázek 9 Reakční schéma derivatizace karboxylové skupiny s pomocí cholaminu [41]

Dalším vhodným derivatizačním činidlem pro volné mastné kyseliny může být N,N-dimethylpiperazinium-jodid (DMPI). Reakce (**Obrázek 10**) umožňuje připojení kvarterního amoniového kationtu na mastnou kyselinu, kdy k derivatizaci dochází přímo na tkáni, a tedy za mírných podmínek a rychlého reakčního času. Díky tvorbě derivátů (karboxylových kyselin) s permanentním kladným nábojem a charakteristické fragmentaci, jsou tyto deriváty dobře využitelné pro následnou analýzu v LC-MS i MALDI MS/MS. Výhodou je i snadná syntetizovatelnost derivatizačního činidla.

Mezi další reakce využívající zavedení permanentního kladného náboje do molekuly FA lze zařadit derivatizační strategie využívající činidla, jako je AMPP (N-(4-aminomethylfenyl)pyridinium chlorid) nebo jeho derivát NMPA (4-jodo-AMPP), která reagují s karboxylovou skupinou za vzniku kladně nabitého amidového derivátu. [42, 52, 53]



Obrázek 10 Reakční schéma derivatizace karboxylové skupiny s pomocí DMPI [42]

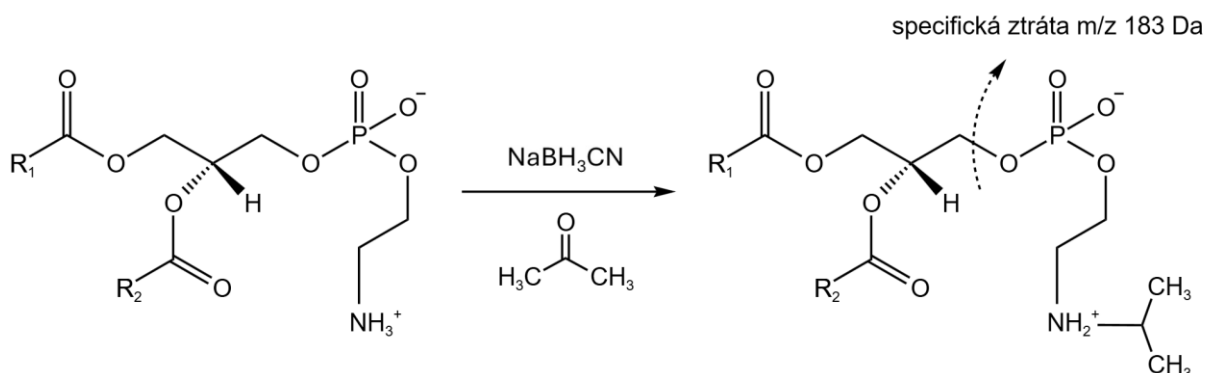
1.3.2.2. Derivatizace aminoskupiny

Derivatizace aminoskupiny představuje klíčový krok pro efektivní analýzy aminofosfolipidů, jako jsou fosfatidylethanolamin (PE) nebo fosfatidylserin (PS) v biologických vzorcích. [43]

Jednou z možností zlepšení detekce je využití acetonu, jenž reaguje s primární aminoskupinou za vzniku stabilního isopropylového derivátu. Tento typ chemické derivatizace zvyšuje chromatografickou separaci a rovněž také výrazně zlepšuje citlivost detekce při MS analýze. Pro účely relativní kvantifikace lze využít izotopicky značený aceton, nejčastěji deuterovaný, který zavádí přesně definovaný hmotnostní posun (např. 6 Da). Tímto způsobem lze aplikovat strategii izotopického poolování – tedy analýzy směsi dvou variant téhož analytu (značené a neznačené). V typickém uspořádání jsou jednotlivé biologické vzorky derivatizovány běžným (neznačeným) acetonem, zatímco referenční směsný vzorek

(pool), složený z podílů všech analyzovaných vzorků, je derivatizován značeným (deuterovaným) acetonem. Oba derivatizované vzorky se následně smísí a analyzují současně pomocí LC-MS. Ačkoli dochází k určitému zředění studovaného vzorku, každému analytu v něm odpovídá jeho izotopový analog, což umožňuje přesné srovnání mezi vzorky a zároveň kompenzuje matriční efekty. Tato metoda tak výrazně zvyšuje reprodukovatelnost a přesnost kvantifikace. [44, 45]

Derivatizace aminofosfolipidů acetonem (**Obrázek 11**) probíhá za mírných podmínek v přítomnosti redukčního činidla NaBH_3CN . Suchý lipidový extrakt nebo standard se nejprve rozpustí v methanolu, poté se smísí s acetonem (standardním nebo deuterovaným) obsahujícím čerstvě připravený NaBH_3CN . Reakce probíhá při 40°C po dobu 50 minut. Po ukončení reakce se směs mírně promíchá a suší se pod proudem dusíku. Výsledný produkt autoři před následnou HPLC-MS analýzou rozpustili v methanolu/chloroformu (1:1, v/v). Tímto způsobem derivatizace přispívá ke zvýšení přesnosti a reprodukovatelnosti kvantitativní analýzy lipidů obsahující aminoskupinu. [44, 45]



Obrázek 11 Reakční schéma derivatizace aminofosfolipidu s použitím acetonu [44]

1.3.2.3. Derivatizace hydroxylové skupiny

Pro tento účel lze využít benzoylchlorid, který představuje běžné a účinné předkolonové derivatizační činidlo pro hydroxylové skupiny, čímž dochází ke zvýšení citlivosti detekce nejen lipidů, ale i širokého spektra dalších metabolitů. Jedná se o aromatický acylchlorid, který reaguje s hydroxy skupinami za vzniku benzoylových esterů přes Schottena–Baumannovo schéma reakce. Reakce probíhá rychle při pokojové teplotě a vyžaduje zásadité prostředí (obvykle $\text{pH} \geq 9$). Během reakce vzniká chlorovodík, který je neutralizován přítomnou bází. Vzorek se běžně připravuje smícháním s několika procenty

roztoku benzoylchloridu v acetonitrilu, po následném přidání kyseliny (např. kyseliny sírové nebo formiové) nebo vhodného organického rozpouštědla (např. methanolu) se reakce ukončí. Benzoylové deriváty lze uchovávat stabilně i po delší dobu (desítky dnů při nízkých teplotách).

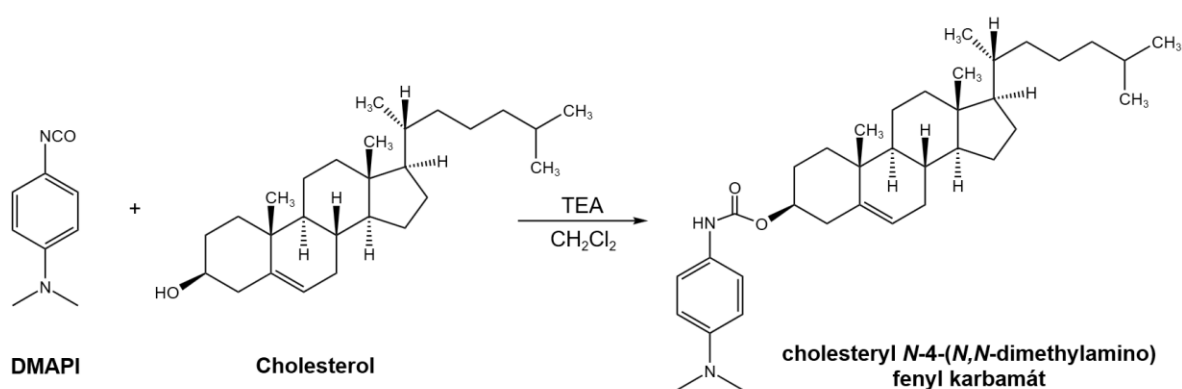
Stupeň derivatizace závisí na počtu přítomných reagujících skupin na výchozí sloučenině. Příkladem je derivatizace hydroxylových skupin glykolů ve vodném prostředí, kde na základě Schotten–Baumannovy reakce vznikají dibenzoylové estery. Tyto deriváty jsou snadno extrahovatelné do nepolárních rozpouštědel, čímž se oddělují od polárních kontaminantů a anorganických solí. Tato reakce je rychlá, dobře reprodukovatelná a významně zlepšuje chromatografické chování analytů. Dibenzoylové deriváty navíc silně absorbují v UV oblasti, což umožňuje citlivou detekci pomocí HPLC-UV. V hmotnostní spektrometrii s elektrosprejovou ionizací tato derivatizace zlepšuje signál při záznamu kladných iontů a zlepšuje také poměr signál/šum, protože analyty se přesouvají do vyššího hmotnostního rozsahu. Derivatizace benzoylchloridem má potenciál i pro další funkční skupiny, jako jsou fenoly a primární či sekundární aminy. Ukazuje se jako vhodná i pro analýzu derivátů polymerních alkoholů. [46]

Benzoylchlorid byl rovněž použit jako univerzální derivatizační činidlo pro více lipidových tříd současně. Kdy reakce probíhala za pokojové teploty a nevyžadovala použití nebezpečných činidel. Metoda byla optimalizována pro 12 lipidových tříd zahrnujících jak polární, tak nepolární lipidy. Ve srovnání s nederivatizovanými vzorky vedla benzoylace k výraznému zvýšení citlivosti detekce, zejména u mono- a diacylglycerolů. Reakce rovněž stabilizovala cholesterol, který jinak během ionizace podléhá snadné fragmentaci. Dále umožnila detekci mastných kyselin v kladném iontovém módu a odpadla nutnost přepínání polaritě během měření. Metoda byla hodnocena jako snadná, robustní a reprodukovatelná, a to i při použití nezkušeným operátorem. Aplikace metody na lidskou plazmu umožnila identifikaci 169 lipidů z 11 lipidových tříd. [47]

I v případě těchto derivatizací je možné využít izotopické poolování s cílem zlepšit ionizační účinnost a zajistit přesné porovnání mezi vzorky pomocí LC-MS analýzy. Tento princip byl použit např. s využitím dansylchloridu (4-dimethylamino-benzo-1-sulfonylchlorid), a to ve dvou izotopových formách – neznačené (^{12}C) a značené (^{13}C). Jednotlivé vzorky se derivatizovaly neznačeným činidlem, zatímco směsný referenční vzorek (pool) byl derivatizován izotopově značeným dansylchloridem. Smícháním obou variant a jejich následnou společnou analýzou byla provedena relativní kvantifikaci metabolitů na základě poměru intenzit izotopových párů. Ačkoliv byla tato metoda navržena především

pro metabolity lze ji uplatnit i pro analýzu lipidových molekul, jež hydroxylové skupiny obsahují. [48, 49]

Dalším příkladem může být derivatizace sterolů, které jsou díky svému neutrálnímu charakteru obtížně detekovatelné elektrosprejovou ionizací. Jako derivatizační činidlo zde slouží 4-(dimethylamino)fenyl isokyanát (DMAPI). Toto činidlo v přítomnosti triethylaminu (TEA) a dichlormethanu rychle reaguje s přítomnou hydroxylovou skupinou za vzniku stabilního karbamátového derivátu (**Obrázek 12**). Zavedená aromatická aminoskupina zabraňuje fragmentaci během ESI a vede výhradně k tvorbě protonovaných molekul. Metoda byla úspěšně validována a vykazovala dobrou citlivost, stabilitu a reprodukovatelnost při analýze sterolů a oxysterolů. [50]



Obrázek 12 Reakční schéma derivatizace cholesterolu za pomoci DMAPI [50]

1.3.2.4. Chemická derivatizace zaměřená na dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku

Nenasycené mastné kyseliny jsou základními stavebními kameny fosfolipidů, glycerolipidů a dalších lipidových tříd. Struktury těchto nenasycených mastných kyselin jsou vysoce rozmanité a zahrnují různé délky uhlíkových řetězců, stupně nenasycení a umístění dvojných vazeb v alifatických řetězcích.

V současné době je k dispozici několik derivatizačních metod, které poskytují přesnou strukturální identifikaci a zaměřují se na lokalizaci dvojných vazeb mezi atomy uhlíku v alifatických řetězcích molekuly. Mezi nejvíce využívané patří Paternò - Büchi reakce (PB), ozónem indukovaná disociace (OzID), fotodisociace za pomoci ultrafialového světla (UVPD) a epoxidační reakce. [20, 33]

Paternò - Büchi je fotochemická reakce mezi fotoaktivovanou karbonylovou sloučeninou a dvojnou vazbou uhlík - uhlík (C=C). Nenasycený lipidový analyt se rozpustí například v roztoku acetonu a vody (1:1, v/v), přičemž aceton slouží jako reakční činidlo a zároveň jako rozpouštědlo pro nano-elektrosprejovou ionizaci. Ke spuštění reakce dochází ozářením vzorku, vedeného transparentní borosilikátovou kapilárou do nanoESI zdroje, ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm. Toto ozáření vede k vytvoření čtyřčlenných adičních produktů (oxetanů) mezi acetonem a olefinovou funkční skupinou mastné kyseliny. V závislosti na vzájemné poloze karbonylové skupiny a C=C vazby vznikají dva poziční izomery oxetanu. Tyto reakční produkty jsou stabilní a lze je izolovat v hmotnostním spektrometru pro následnou MS/MS analýzu, při níž kolizní aktivace způsobí štěpení oxetanových kruhů a vznik specifických iontů nesoucích informaci o poloze dvojných vazeb C=C. [20, 30, 32, 33]

Pro zvýšení účinnosti PB reakce a minimalizaci vzniku vedlejších reakcí byla testována různá chemická derivatizační činidla, zejména benzaldehyd, acetofenon a benzofenon. Použití acetonu jako derivatizačního činidla je problematické zejména pro TAG, kdy dochází k malé rozpustnosti a vznikající adukty se ve spektru překrývají s původními ionty. Benzofenon se naopak výborně rozpouští v methanolových směsích vhodných pro MS analýzu lipidů a vytváří adukty, jež lze ve spektru snadno rozeznat. [20, 31]

Ačkoliv tato reakční činidla umožňují jednoznačnou identifikaci izomerů polohy dvojných vazeb C=C, nejsou schopna rozlišit regioizomery, tedy konkrétní polohu *sn*-substituce acylové skupiny na glycerolu lipidů. Tento problém řeší 2-acetylpyridin, který jako nové PB derivatizační činidlo vytváří specifické fragmentační ionty. Umožňuje tak v jednom kroku určit jak polohu C=C dvojných vazeb tak i *sn*-substituce a provádět kvalitativní i kvantitativní profilování lipidů. [20, 32, 33]

Ozonem indukovaná disociace je metoda založená na reakci mezi ozonem a vybranými ionty nenasycených lipidů v plynné fázi. Hmotnostně selektované lipidové ionty jsou vystaveny ozonovým parám buď v ESI, iontové pasti nebo kolizní cele dle typu uspořádání MS. Výsledný produkt při následné kolizní disociaci poskytuje dva specifické fragmentační ionty pro každou dvojnou vazbu, které umožňují jednoznačné určení její polohy. Tato metoda umožňuje téměř úplnou strukturální charakterizaci lipidů bez nutnosti jejich předechozí derivatizace, ovšem její širší využití je omezeno nutností úprav komerčně dostupných hmotnostních spektrometrů a specializovaného zařízení pro generování ozonu. [20, 37, 38]

Další limitací OzID je relativně pomalá rychlost reakce (0,2 – 10 sekund) mezi ionty a molekulami ozonu v plynné fázi. K výraznému zvýšení účinnosti i zkrácení reakční doby reakce dochází při zpomalení iontů v oblasti pasti, čímž se prodlouží jejich kontakt s ozonem, k tomuto účelu byly využity moduly iontové mobility, které sloužily jako reakční prostředí pro OzID reakci. [20]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Seznam použitých chemikálií a standardů

- Acetonitril (ACN) – LC-MS čistota, Honeywell (Německo)
- Acetylchlorid (AcCl) – čistota $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Chloroform (CHCl₃) – LC čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Methanol (MeOH) – LC-MS čistota, $\geq 99.9\%$, Honeywell (Německo)
- Pyridin (Py) – HPLC čistota, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Uhličitan amonný – čistota $\geq 99.999\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Směs standardů (Std mix) – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)

2.2. Použité přístroje a zařízení

- Centrifuga Hettich EBA 20 – Hettich (Tuttlingen, Německo)
- Hmotnostní spektrometr timsTOF Ultra – Bruker Daltonik GmbH (Brémy, Německo)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Sartorius (Goettingen, Německo)
- Minitřepačka IKA MS1 – IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Německo)
- Koncentrátor vzorku MIULAB NDK200 – Hangzhou MIU Instruments Co., Ltd. (Hangzhou, Čína)
- Pasteurovy pipety skleněné – Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Software pro vyhodnocení dat – DataAnalysis 6.1 – Bruker Daltonik GmbH (Brémy, Německo)
- Třepačka IKA KS 130 basic – IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Německo)
- UHPLC chromatograf 1290 Infinity – Agilent Technologies (Waldbronn, Německo)

2.3. Anotace a nomenklatura lipidů

Anotace a nomenklatura lipidů byla provedena v souladu s aktuálními doporučeními Mezinárodního výboru pro klasifikaci a nomenklaturu lipidů (LIPID MAPS). Použité zkratky lipidových tříd odpovídají zavedeným konvencím.

Způsob anotace jednotlivých lipidových druhů (včetně údajů o délce řetězce a stupňů nenasyčenosti) vychází z doporučené nomenklatury podle G. Liebische, která je široce používána ve sféře lipidomiky a kompatibilní s databází LIPID MAPS. [6, 9]

2.4. Příprava směsi standardů

Za účelem optimalizace derivatizační reakce byla připravena směs standardů (Std mix), ta obsahovala 12 různých lipidů z odlišných lipidových tříd (**Tabulka 1**). Konkrétně se jednalo o ceramid (Cer), sfingomyelin (SM), glukosylceramid (GlcCer), sfingosin, cholesterol, fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylcholin (PC), lysofosfatidylcholin (LPC), lysofosfatidylethanolamin (LPE), monoacylglycerol (MG) a diacylglycerol (DG).

Tyto standardy byly smíchány ve vhodných koncentracích tak, aby poskytovaly optimální LC-MS signál. Prvním krokem přípravy Std mix byla optimalizace koncentrací zředěných zásobních roztoků, z nichž byla připravena testovací směs o celkovém objemu 1,5 ml. Pro vlastní experimenty bylo vždy pipetováno 20 μ L této směsi Std mix.

Tabulka 1 Seznam vybraných standardů pro přípravu Std mix včetně molární koncentrace v zásobním roztoku

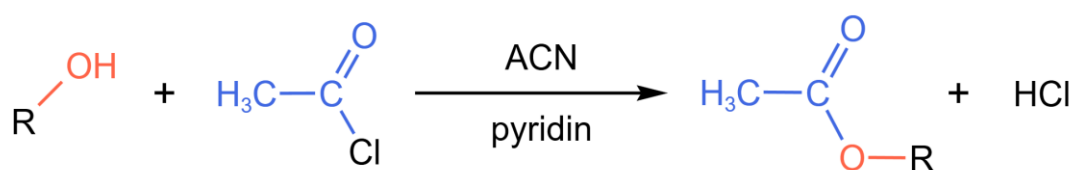
Lipid CN:DB	Elementární složení (neutrální forma)	C zásobní roztok [mg/ml]	V _v 1,5 ml směsi [μ l]	C v 1,5 ml směsi [μ g/ml]
MG 18:2/0:0/0:0	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	2	75	100,00
DG 16:0/0:0/16:0	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	2	10	13,33
Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₁	6	132	528,00
SPB 18:1;O2 (sfingosin)	C ₁₈ H ₃₇ O ₂ N ₁	2	17,5	23,33
Cer 18:1;O2/18:1	C ₃₆ H ₆₉ O ₃ N ₁	2	5	6,67

GlcCer 18:1;O2/12:0	C ₃₆ H ₆₉ O ₈ N ₁	2	12,5	16,67
SM 18:1;O2/12:0	C ₃₅ H ₇₁ O ₆ N ₂ P ₁	2	3	4,00
LPC 18:1/0:0	C ₂₆ H ₅₂ O ₇ N ₁ P ₁	2	7,5	10,00
LPE 18:1/0:0	C ₂₃ H ₄₆ O ₇ N ₁ P ₁	2	40	53,33
PE 18:1/18:1	C ₄₁ H ₇₈ O ₈ N ₁ P ₁	2	10	13,33
PG 18:1/18:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P ₁	2	50	66,67
PC 18:1/18:1	C ₄₄ H ₈₄ O ₈ N ₁ P ₁	2	3	4,00

2.5. Derivatizační reakce za pomoci acetylchloridu (acetylace)

Vybrané lipidové standardy z různých tříd (**Tabulka 1**) byly podrobeny derivatizační reakci za účelem zlepšení jejich signálu při hmotnostně spektrometrické analýze.

Jako derivatizační činidlo byl zvolen acetylchlorid, který sloužil k acylaci hydroxylových funkčních skupin v molekulách lipidů. Samotná derivatizační reakce byla provedena za přítomnosti pyridinu, ten sloužil v reakčním prostředí jako báze a odnímal vznikající kyselinu chlorovodíkovou. (**Obrázek 13**)



Obrázek 13 Schéma derivatizační reakce (acetylace) hydroxylových skupin za pomoci acetylchloridu a pyridinu

Derivatizované vzorky byly přečištěny pomocí extrakce podle Folche a analyzovány s využitím UHPLC/MS v režimu měření kladných iontů (viz níže).

2.6. Extrakce podle Folche

Extrakce podle Folche je jednou z nejvíce rozšířených extrakcí mezi dvěma kapalinami. Využívá extrakčních činidel chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v). [14, 15]

Modifikovaná extrakce dle Folche v experimentu probíhala následujícím způsobem. K reakční směsi o celkovém objemu 500 μl bylo přidáno 2 000 μl chloroformu a 1 000 μl methanolu, pro zvýšení účinnosti samotné extrakce bylo přidáno 600 μl vodného roztoku uhličitanu amonného o koncentraci 250 mM. Reakční směs byla důkladně protřepána a vložena do centrifugy (6 000 ot./min) pro oddělení fází.

2.7. UHPLC podmínky

Separace lipidů byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity série. Separace probíhala za následujících podmínek: předkolona Acquity UPLC BEH C18 VanGuard (5 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), kolona Acquity UPLC BEH C18 (150 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), průtok 0,35 mL/min, vstříkovaný objem 0,5 μL , teplota kolony 55 °C. Gradient mobilní fáze byl nastaven následovně: v čase 0 minut bylo použito 35 % fáze B, ve 3,2 minutách 50 % B, v rozmezí 8,4 až 9,2 minut 95 % B a v čase 9,6 až 11 minut opět 35 % B. Mobilní fáze A byla směsí acetonitrilu a vody (60:40, v/v) a mobilní fáze B směsí acetonitrilu a 2-propanolu (10:90, v/v). Obě mobilní fáze obsahovaly 0,1 % kyseliny mravenčí a 5 mM mravenčanu amonného. Před koncem analýzy byly nástříková jehla a nástříkové sedlo opláchnuty směsí chloroformu a methanolu (1:1, v/v).

2.8. MS podmínky

Kapalný chromatograf byl spojen s hmotnostním spektrometrem timsTOF Ultra. Vzorky byly zaváděny do hmotnostního spektrometru pomocí elektrosprejového zdroje Apollo II ESI při napětí 4,5 kV, teplotě iontového zdroje 220 °C, tlaku rozprašovacího plynu 2,5 bar a průtoku sušícího plynu 8 L/min. Hmotnostní spektra v režimu plného skenu byla zaznamenávána v kladném iontovém módu v rozsahu m/z 50–1350. Kalibrace hmotnosti byla provedena pomocí klastrových iontů mravenčanu sodného během prvních 30 sekund analýzy, a to s využitím šesticestného přepínacího ventilu. Metoda využívala přenosový čas (transfer time) 65 μs a dobu předpulzního uložení (pre puls storage time) 12 μs .

2.9. Zpracování naměřených dat

Data získaná z LC-MS analýzy byla primárně zpracována pomocí softwaru DataAnalysis (Bruker), který slouží k prohlížení a vyhodnocení chromatogramů a hmotnostních spekter. Tento software umožnil extrakci konkrétních iontových chromatogramů, detekci relevantních signálů a výpočet výšky a plochy píků chromatogramů. Následné grafické zpracování a vizualizace výsledků, včetně tvorby sloupcových grafů, byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel.

2.10. Optimalizace derivatizační reakce

Derivatizační reakce vybraných lipidových standardů byla optimalizována na tři parametry. První z parametrů byl poměr reagentů, tedy poměr pyridinu a acetylchloridu (Py:AcCl). Poté množství těchto reaktantů a následně reakční čas reakce. Všechny optimalizační kroky byly prováděny v triplicátu (tj. ve třech opakováních) a byly prováděny za laboratorní teploty (20 °C).

2.10.1. Poměr reagentů

Optimalizace poměru pyridinu a acetylchloridu probíhala následovně. Z testovací směsi standardů bylo pipetováno 20 µl a směs byla dále odpařena do sucha pod proudem dusíku. K suchému vzorku byl přidán acetonitril s pyridinem, a to v takovém objemu, aby byl dodržen aktuální poměr a zároveň celkový objem reakční směsi byl 250 µl.

Následovalo důkladné promíchání směsi na třepačce a přidání odpovídajícího množství acetylchloridu. Reakční směs byla nakonec doplněna acetonitrem do celkového objemu 500 µl. Po přidání činidel byla reakční směs promíchávána při 320 ot./min po dobu 5-ti minut.

Po ukončení reakce byla provedena extrakce podle Folche přidáním chloroformu, methanolu a uhličitanu amonného. Reakční směs byla po protřepání vložena do centrifugy (6 000 ot./min) po dobu 3 minut pro dokonalé rozdělení vodné a organické fáze. Vrchní vodná fáze byla s pomocí Pasteurových pipet odebrána a zbylá organická fáze byla podrobena odparu do sucha pod proudem dusíku a uskladněna v mrazícím boxu při teplotě – 80 °C.

Tímto postupem byla derivatizační reakce provedena při pěti různých poměrech Py:AcCl – 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3. Množství přidávaného acetylchloridu bylo v rámci této

optimalizace konstantní a činilo 30 μl . Reakce probíhaly při pokojové teplotě po dobu 5 minut.

2.10.2. Množství acetylchloridu

Pro vybraný nejlépe vycházející poměr reakčních činidel následovala optimalizace jejich množství. Byly provedeny 4 série měření v triplikátu, kdy reakce opět probíhaly při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Podoba experimentu byla shodná jako v předchozím případě optimalizace, ovšem s rozdílnými množství reaktantů odpovídajících danému poměru (5:10 μl , 15:30 μl , 25:50 μl a 40:80 μl).

2.10.3. Reakční čas

Finální část optimalizace se zaměřovala na hledání vhodného reakčního času. Pro odpovídající poměr činidel a jejich množství byly provedeny 3 série měření v triplikátu. Měření byla provedena při reakčním čase 2, 5 a 15 minut.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Vyhodnocení optimalizace poměru reagentů

Pro vyhodnocení prvního kroku optimalizace bylo zvoleno 5 různých objemových poměrů pyridinu a acetylchloridu. Konkrétně se jednalo o poměry 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3 (v/v).

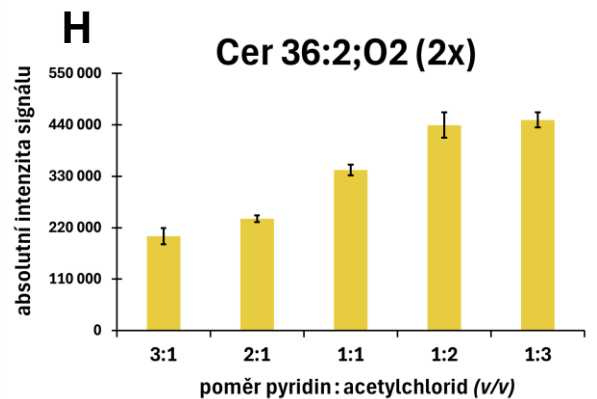
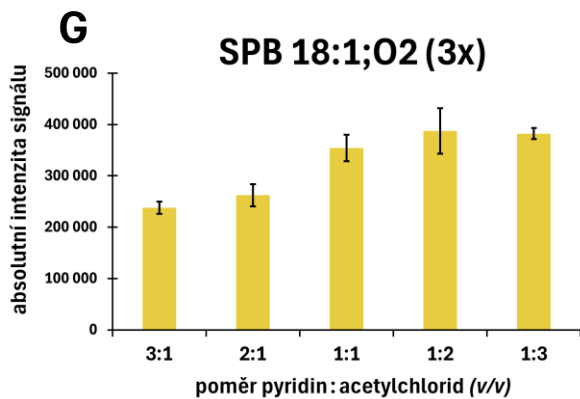
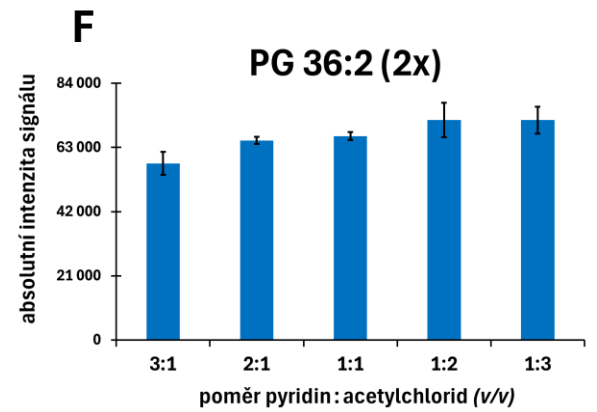
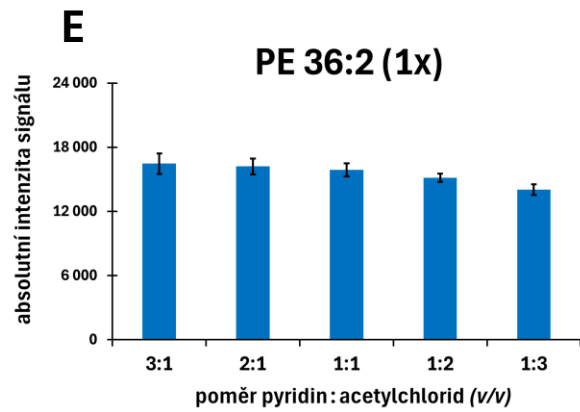
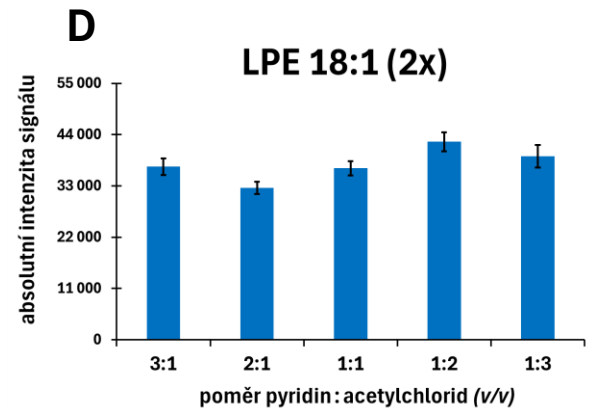
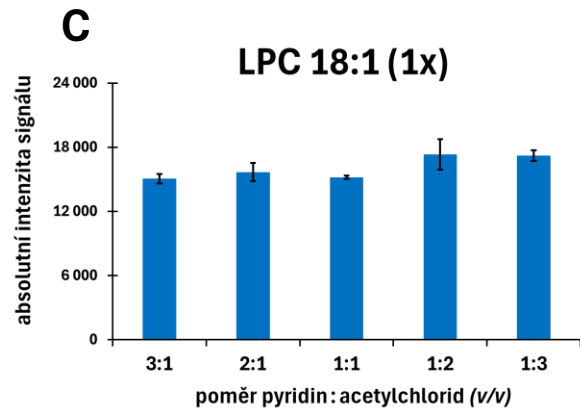
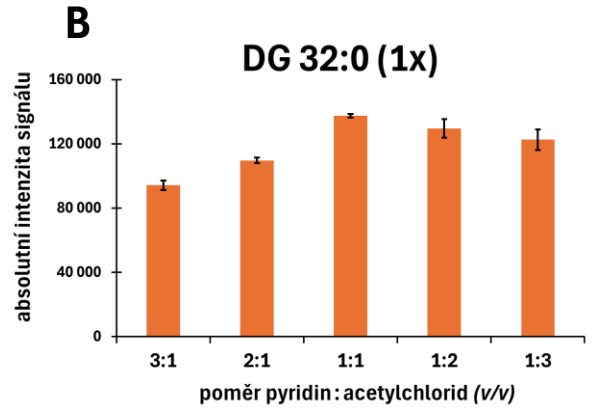
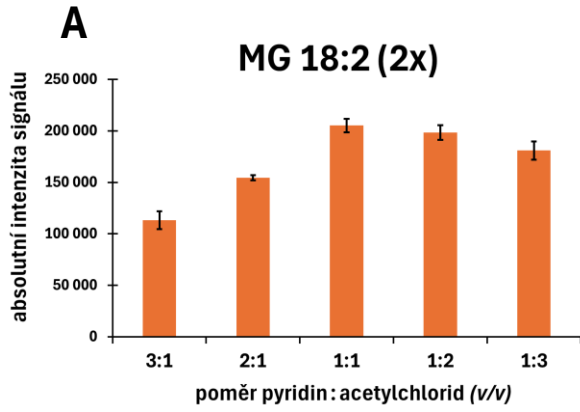
Na základě dat z LC-MS analýzy byly graficky znázorněny závislosti průměrné intenzity signálu jednotlivých derivátů na daném poměru reagentů (**Obrázek 14**). Jednotlivá měření byla provedena ve třech opakováních pro zajištění dostatečně objektivních výsledků. Ve sloupcových grafech jsou chybové úsečky vyjádřeny pomocí směrodatné odchylky.

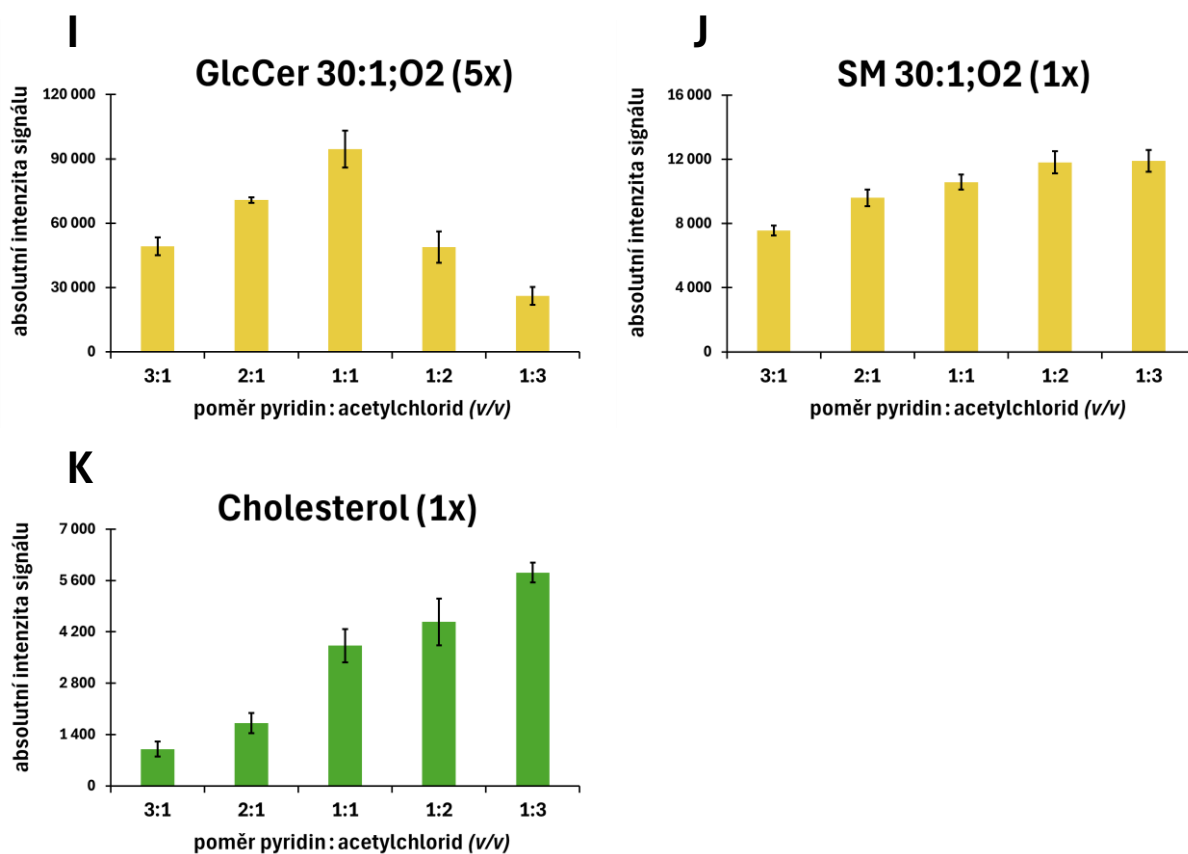
Pro lepší orientaci jsou v grafech jednotlivé lipidové standardy barevně rozlišeny podle tříd. Oranžovou barvou jsou označeny standardy spadající mezi glycerolipidy, modrá barva označuje standardy patřící mezi fosfolipidy, barva žlutá označuje sfingolipidy a zelenou barvou je zde vyznačen jediný zástupce sterolů – cholesterol. Toto rozdělení platí i v dalších kapitolách.

Vzhledem k rozdílné struktuře zvolených lipidových standardů docházelo k acetylaci v různé míře - některé lipidy mají ve své struktuře více derivatizovatelných hydroxylových (případně aminových) skupin. Počet acetylací je vyznačen číslem v závorce za názvem příslušného derivátu (např. SPB 18:1;O₂ (3x) označuje trojnásobnou acetylaci).

Z testovaných poměrů byl jako optimální vyhodnocen poměr 1:2 (Py:AcCl, v/v). Tento poměr poskytoval nejvyšší signál u derivátů LPC 18:1, LPE 18:1, PG 36:2, SPB 18:1;O₂, Cer 36:2;O₂ a SM 30:1;O₂. U ostatních standardů byl tento poměr zpravidla druhým nejlepším, ale rozdíly oproti nejlepším podmínkám byly jen minimální. Nicméně je třeba zmínit, že pro GlcCer 30:1;O₂ by bylo výhodnější využít poměr 1:1.

Poměry s nadbytkem pyridinu (2:1 a 3:1) vykazovaly po proběhnutí derivatizační reakce oranžové až hnědé zbarvení, to nejspíše souvisí se vznikem vedlejších produktů díky nadbytku přítomného bazického prostředí. Stejně tak u poměru 1:1 byl patrný mírný barevný nádech, který naznačoval vyšší podíl vedlejších produktů souvisejících s nadbytkem pyridinu. Tyto vedlejší produkty byly detekovány v první minutě LC-MS analýzy. I z tohoto důvodu byl nakonec jako optimální zvolen poměr 1:2.



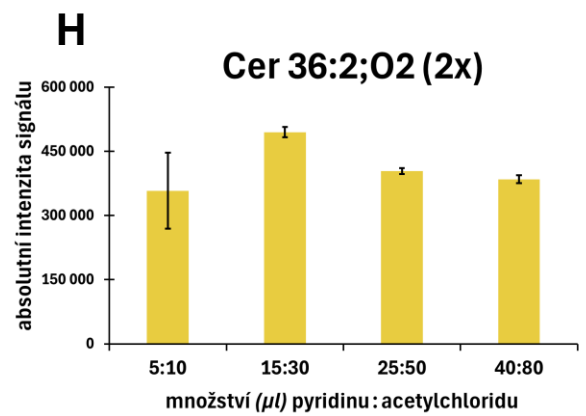
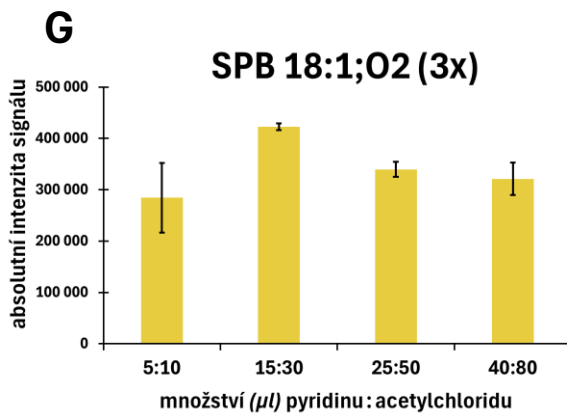
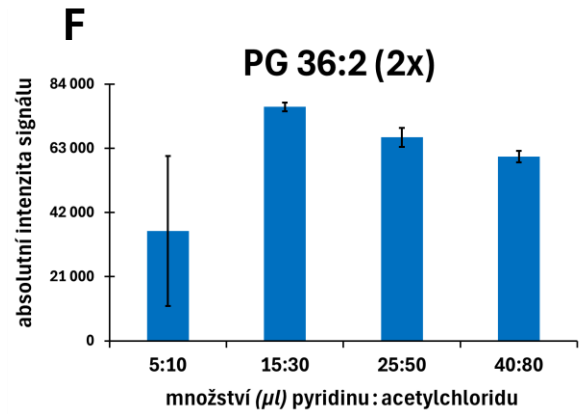
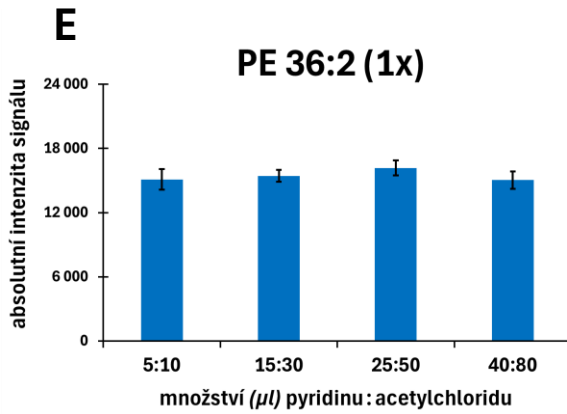
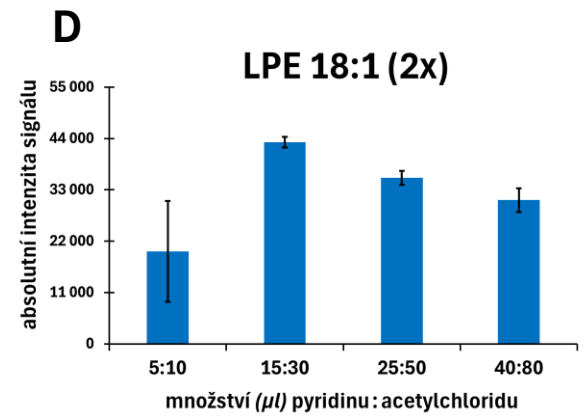
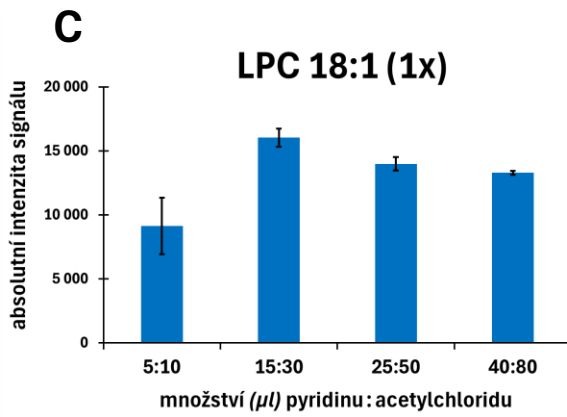
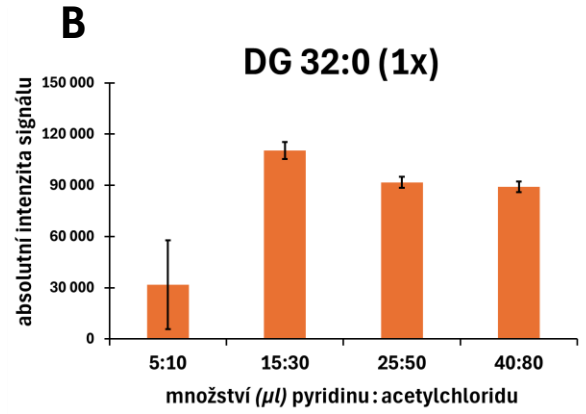
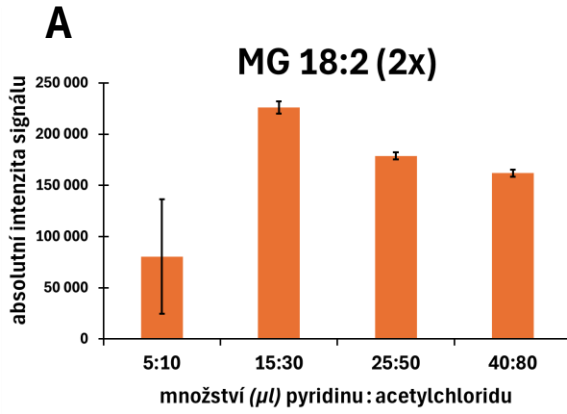


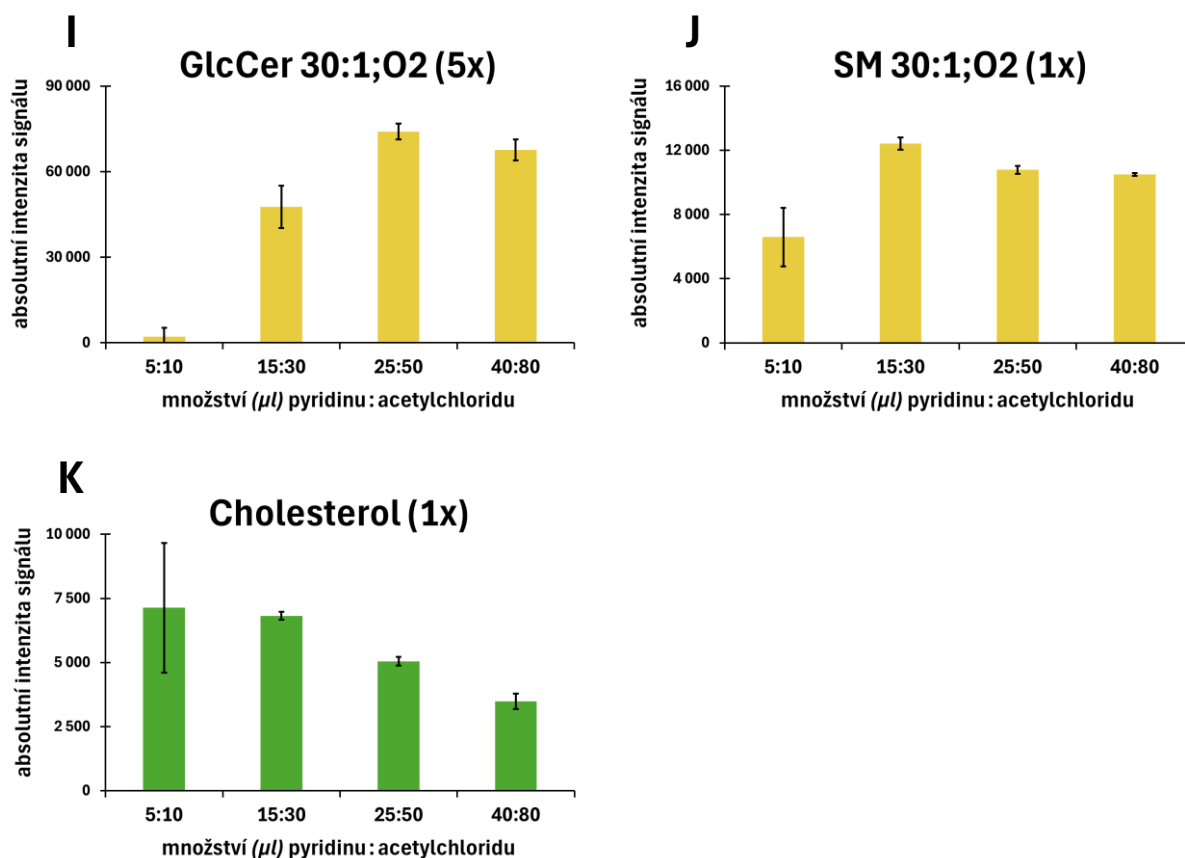
Obrázek 14 Vliv objemového poměru reagentů (Py:AcCl, v/v) na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů – **A** MG 18:2, **B** DG 32:0, **C** LPC 18:1, **D** LPE 18:1, **E** PE 36:2, **F** PG 36:2, **G** SPB 18:1;O₂, **H** Cer 36:2;O₂, **I** GlcCer 30:1;O₂, **J** SM 30:1;O₂, **K** Cholesterol

3.2. Vyhodnocení optimalizace množství činidel

Druhým krokem optimalizace byla volba absolutního množství reagentů při zachování zvoleného poměru 1:2 (Py:AcCl v/v). Testovaná byla množství reagentů 5:10 μ l, 15:30 μ l, 25:50 μ l a 40:80 μ l (Py:AcCl), každá ve třech opakováních.

Na základě dat z LC-MS analýzy byly sestrojeny grafické závislosti intenzity signálu jednotlivých derivátů na použitém absolutním množství reagentů (**Obrázek 15**). Jako optimální varianta byla zvolena série s množstvím 15 μ l pyridinu a 30 μ l acetylchloridu. Tato série poskytovala nejvyšší intenzitu signálu téměř u všech derivátů a zároveň vykazovala velmi nízký rozptyl. Výjimku představoval pouze derivát GlcCer 30:1;O₂, u nějž byla vzhledem většímu množství reaktivních hydroxylových skupin lepší odezva pozorována až při vyšším množství reaktantů.

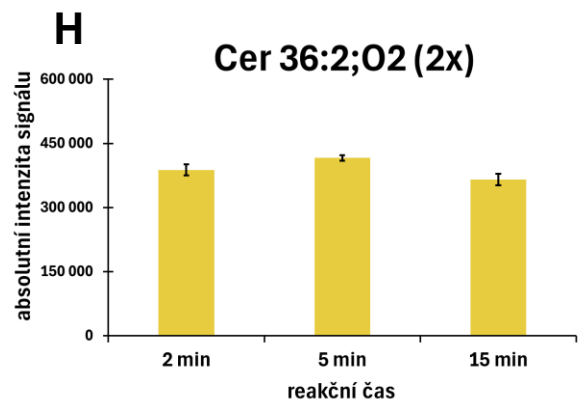
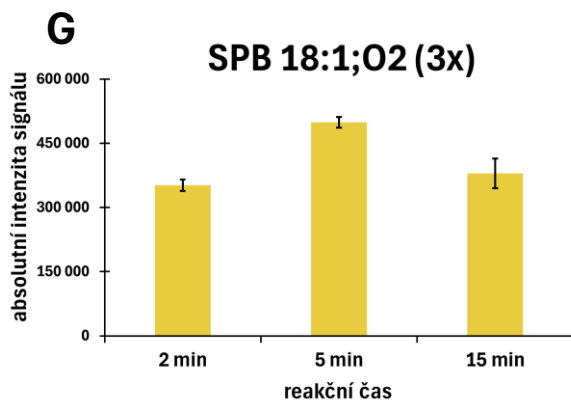
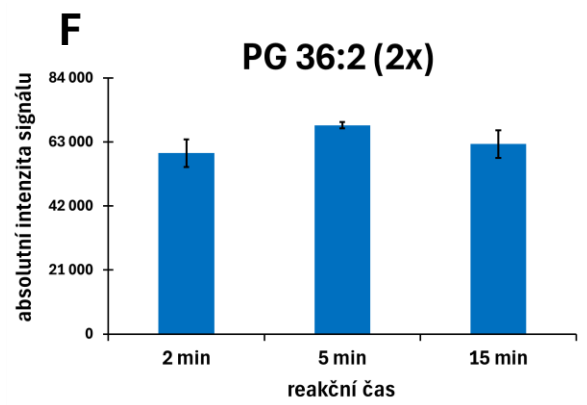
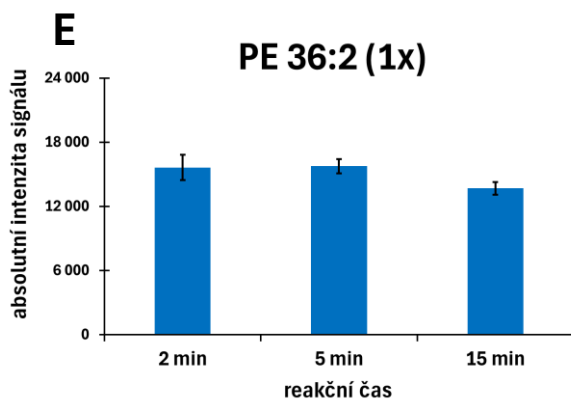
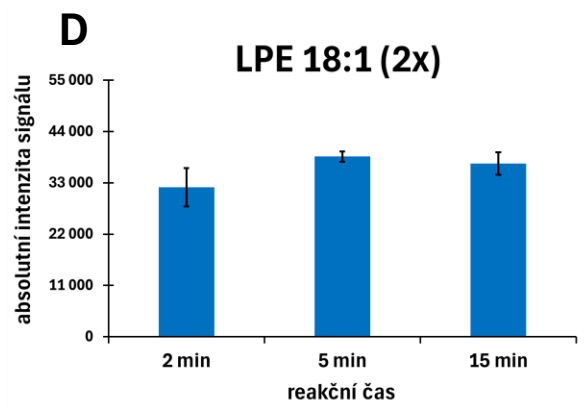
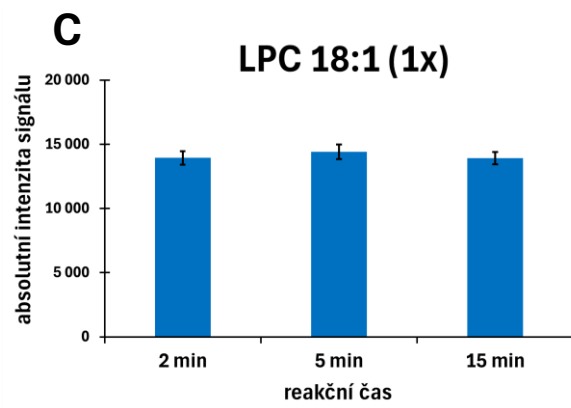
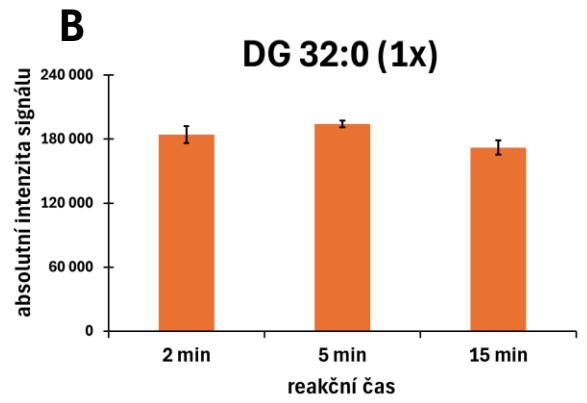
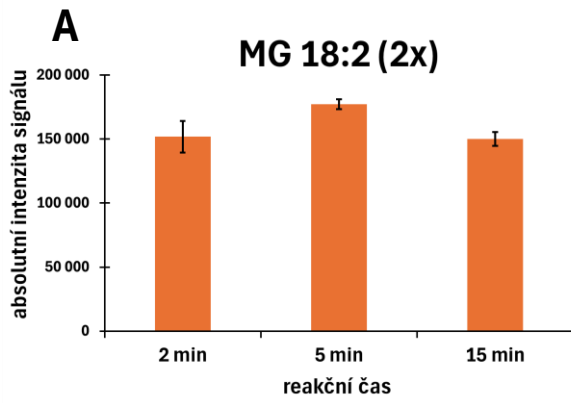


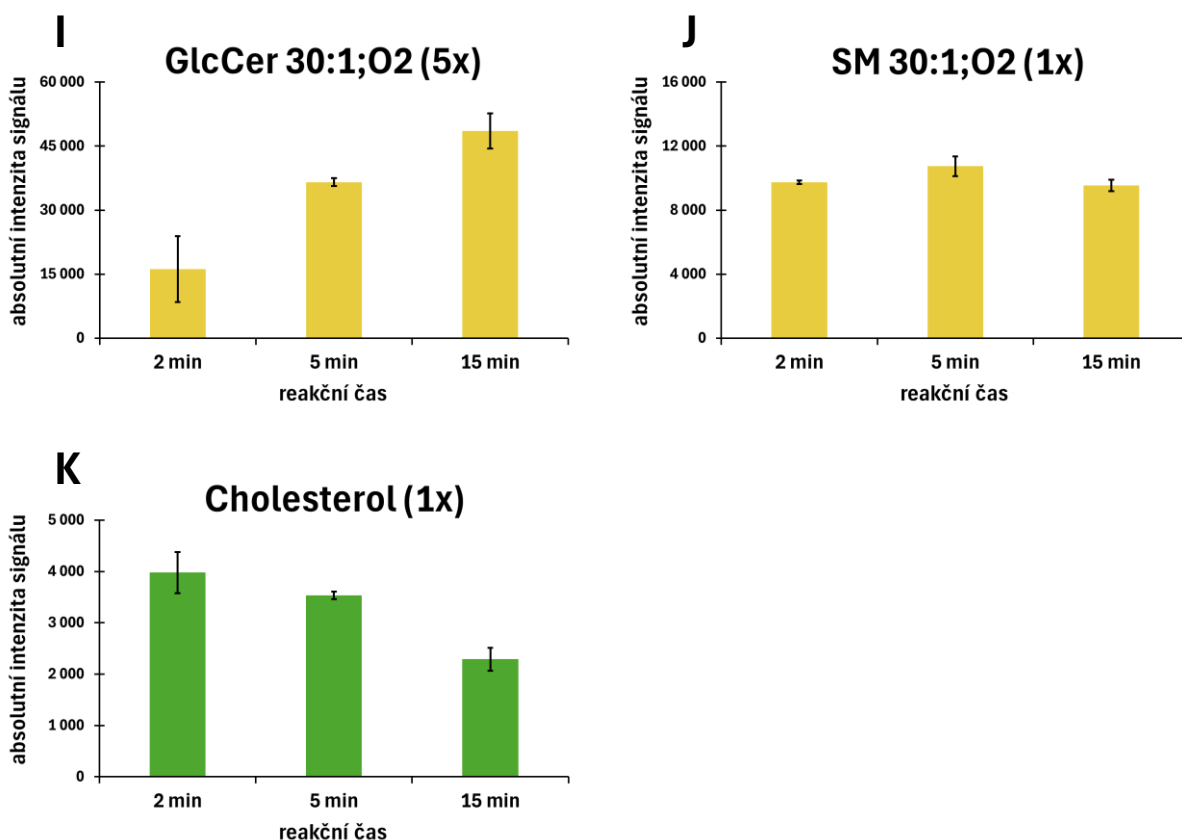


Obrázek 15 Vliv absolutního množství reagentů (Py: AcCl) na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů – **A** MG 18:2, **B** DG 32:0, **C** LPC 18:1, **D** LPE 18:1, **E** PE 36:2, **F** PG 36:2, **G** SPB 18:1;O2, **H** Cer 36:2;O2, **I** GlcCer 30:1;O2, **J** SM 30:1;O2, **K** Cholesterol

3.3. Vyhodnocení optimalizace reakčního času

Posledním parametrem optimalizace derivatizační reakce byla volba reakčního času, při poměru činidel 1:2 (Py:AcCl *v/v*) a jejich absolutním množství 15:30 μl. Byly provedeny tři série měření, každá ve třech opakováních. Testované reakční časy byly 2, 5 a 15 minut při konstantní teplotě 20 °C. Na základě výsledků z LC-MS analýzy byly sestaveny grafické závislosti průměrné intenzity signálu derivátů na reakčním čase derivatizační reakce (**Obrázek 16**). Hodnoty signálu jsou prezentovány jako průměr ze tří měření, včetně chybových úseček. Jako optimální byl vyhodnocen reakční čas 5 minut, pro který byl zároveň pozorován vyvážený signál napříč všemi standardy. Výjimkou byl opět derivát GlcCer 30:1;O2, u nějž byl nejsilnější signál při čase 15 minut, pravděpodobně v důsledku vyššího počtu reaktivních skupin a tedy pomalejší kinetiky derivatizační reakce.





Obrázek 16 Vliv reakčního času na intenzitu signálu z LC-MS analýzy pro jednotlivé deriváty lipidových standardů – **A** MG 18:2, **B** DG 32:0, **C** LPC 18:1, **D** LPE 18:1, **E** PE 36:2, **F** PG 36:2, **G** SPB 18:1;O2, **H** Cer 36:2;O2, **I** GlcCer 30:1;O2, **J** SM 30:1;O2, **K** Cholesterol

3.4. Porovnání přístupu bez derivatizace a s derivatizací při optimalizovaných podmínkách reakce

Po optimalizaci podmínek derivatizační reakce bylo provedeno srovnání signálů lipidových standardů před a po derivatizaci. Hodnocení vycházelo z výpočtu ploch extrahovaných iontových proudů (EIC) v LC-MS analýze při objemu nástřiku v rozmezí 0,1 – 1,5 μ l. (**Obrázek 17**)

Z výsledků vyplývá, že derivatizace acetylchloridem vedla u většiny lipidových standardů k výraznému zvýšení intenzity signálu. Největší zesílení bylo pozorováno u derivátů MG 18:2, DG 32:0, cholesterolu, SPB 18:1;O2, PG 36:2, Cer 36:2;O2 a GlcCer 30:1;O2 (**Tabulka 2**). U standardů PE 36:2 a SM 30:1;O2 derivatizace neměla zásadní vliv

na změnu intenzity signálu. Naproti tomu mírný pokles signálu po derivatizaci vykazovaly standardy LPC 18:1 a LPE 18:1.

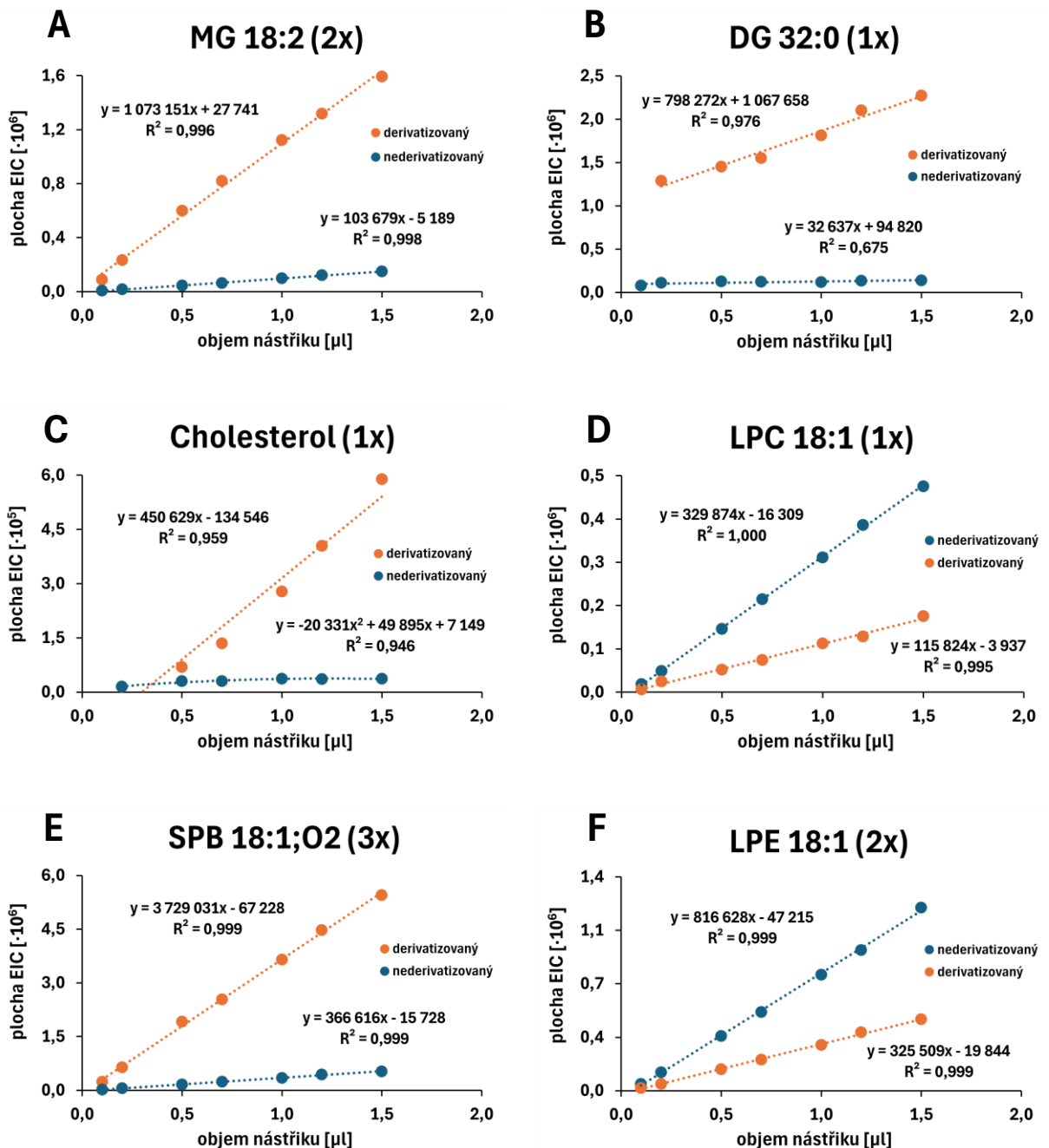
Tabulka 2 Násobná změna intenzity signálu standardů lipidů po derivatizaci acetylchloridem. Hodnoty představují poměr směrnic po a před derivatizací (**Obrázek 17**). Změna signálu je klasifikována jako zesílená (>1,3), zeslabená (<0,7) nebo beze změny (0,7-1,3).

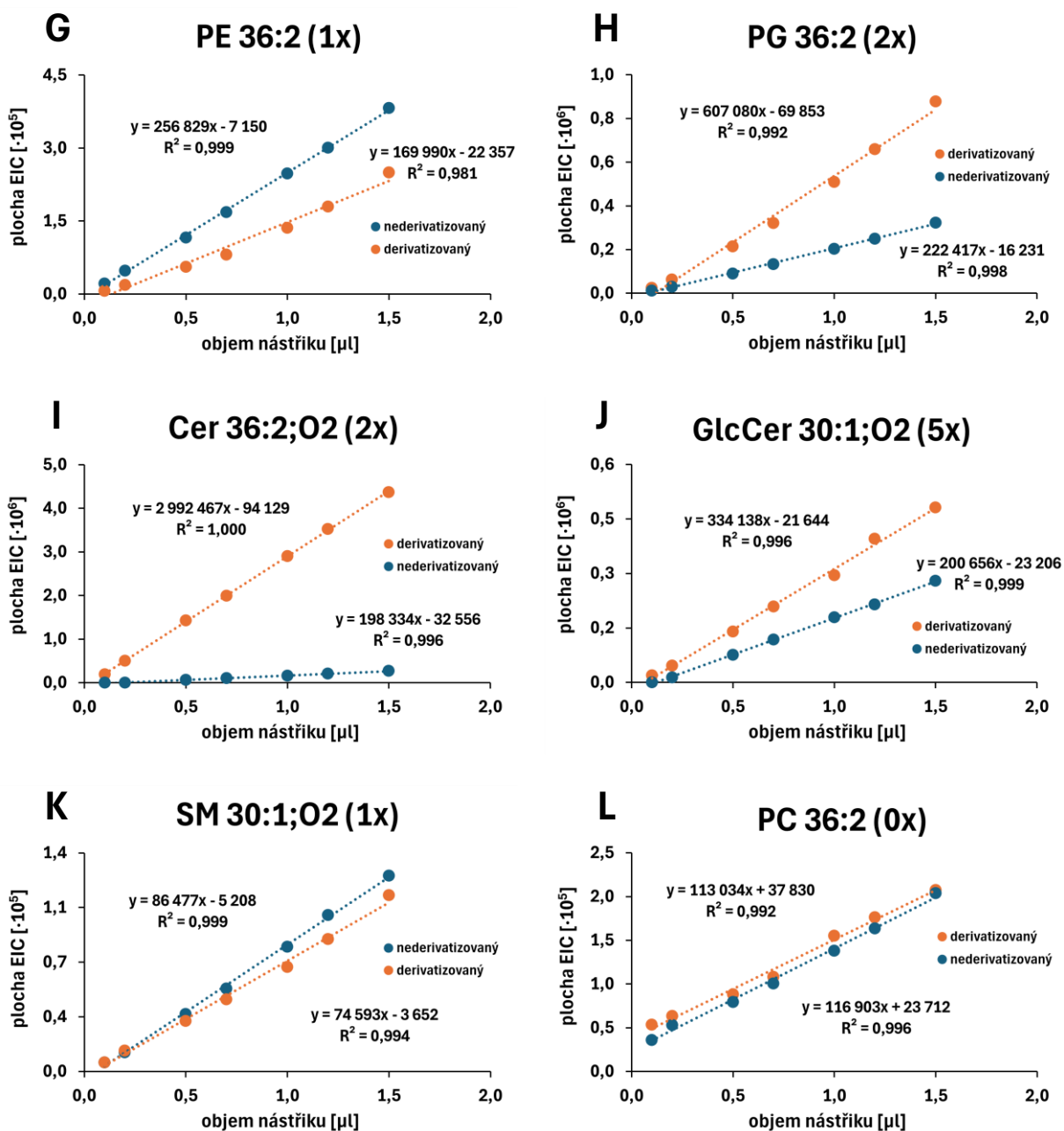
Lipid - standard	Násobná změna signálu
MG 18:2	10,4
DG 32:0	24,5
Cholesterol	29,4
LPC 18:1	0,4
SPB 18:1;O2	10,2
LPE 18:1	0,4
PE 36:2	0,7
PG 36:2	2,7
Cer 36:2;O2	15,1
GlcCer 30:1;O2	1,7
SM 30:1;O2	0,9
PC 36:2	1,0

V případě standardu DG 32:0 byla zaznamenána akumulace v systému, pravděpodobně z důvodu nedostatečného promytí, zároveň byla zaznamenána blízká signálová interference, která mohla vést ke zkreslení absolutních hodnot signálu. I přes to bylo u tohoto derivátu patrné zvýšení intenzity signálu, ovšem vzhledem k výše napsaným faktům nemusí být tato změna signálu plně objektivní.

Nederivatizovaná forma cholesterolu vykazovala plnou fragmentaci (ztrátu vody) v iontovém zdroji, což komplikovalo jeho následnou identifikaci, rovněž vykazovala

nelineární průběh signálu. Po derivatizaci však došlo k potlačení fragmentace, a kromě fragmentu m/z 369 byl ve stejném čase pozorován i aduktový ion $[M+NH_4]^+$ a signál (součet plochy aduktového a fragmentového iontu) vykazoval lineární trend se zřetelným zesílením.

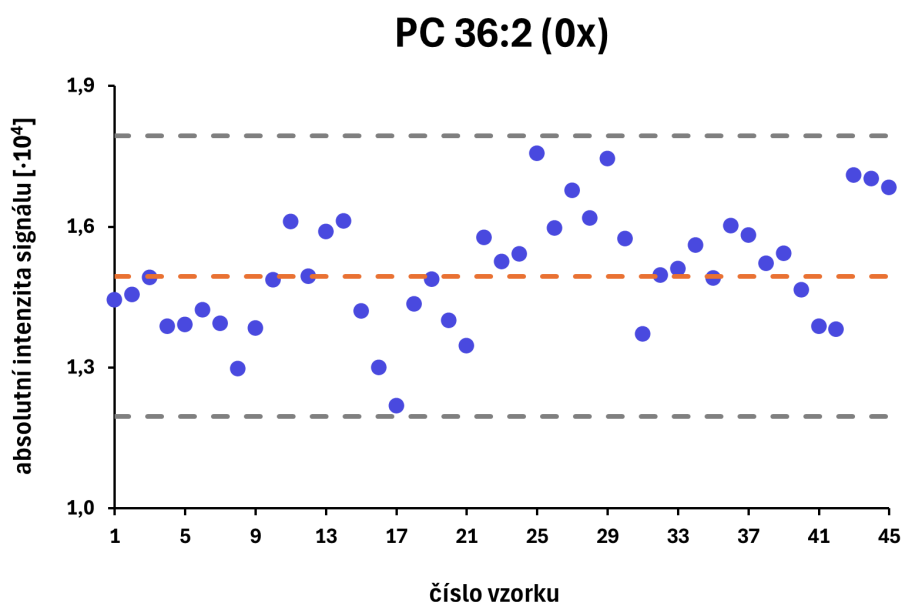




Obrázek 17 Porovnání kalibračních závislostí ploch EIC lipidových standardů před a po derivatizaci - **A** MG 18:2, **B** DG 32:0, **C** Cholesterol, **D** LPC 18:1, **E** SPB 18:1;O2, **F** LPE 18:1, **G** PE 36:2, **H** PG 36:2, **I** Cer 36:2;O2, **J** GlcCer 30:1;O2, **K** SM 30:1;O2, **L** PC 36:2

Jako kontrolní standard byl využit lipid PC 36:2, který vlivem derivatizace neprodělal žádnou změnu v signálu. Takový výsledek byl očekávaný, neboť tento standard neobsahuje volné hydroxylové skupiny a je pro danou derivatizační reakci chemicky neaktivní. Tento fakt potvrzuje selektivitu zvolené derivatizační metody.

Naměřené hodnoty intenzity signálu kontrolního lipidu PC 36:2 z LC-MS analýzy pro jednotlivé série měření během celé optimalizace jsou znázorněny v následujícím grafu (**Obrázek 18**). Vzorky jsou číslovány podle pořadí měření jednotlivých optimalizovaných parametrů (poměr, množství, čas), přičemž každý parametr byl proměřen v samostatné sekvenci. Mezi sekvencemi byly několikátýdenní rozestupy kvůli vyhodnocování dat a dostupnosti přístroje. Každá sekvence zahrnovala také tři nástřiky vzorku bez derivatizace. Celkem bylo analyzováno 45 vzorků. V grafu je uveden medián hodnot (oranžová linie) a příslušný interval (medián \pm 20 % signálu) je poté znázorněn šedými liniemi, jenž primárně slouží k vizuálnímu posouzení rozptylu měření v rámci celé optimalizace. Z grafu je patrné, že změna absolutního signálu v rámci celého experimentu je akceptovatelná a nepřevyšuje 20 %.



Obrázek 18 Rozptyl signálu kontrolního lipidu PC 36:2 během optimalizace podmínek derivatizace – oranžová linie znázorňuje medián naměřených hodnot, šedé linie vymezují interval \pm 20 % od tohoto mediánu.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala využitím derivatizačních metod v lipidomické analýze s použitím hmotnostní spektrometrie jako detekční metody.

Cílem experimentální části bylo optimalizovat derivatizační reakci za použití acetylchloridu jako derivatizačního činidla a následně vyhodnotit, jak tato změna ovlivňuje citlivost analýzy vybraných lipidových standardů. V rámci optimalizace byly testovány různé poměry acetylchloridu a pyridinu jako komponent derivatizační směsi, jejich absolutní množství a doba reakce. Nejuspokojivějších výsledků bylo dosaženo při poměru 1:2 (Py:AcCl, v/v), množství 15 μ l pyridinu, 30 μ l acetylchloridu a reakčním čase 5 minut.

Účinnost derivatizační reakce byla posouzena srovnáním MS signálů derivatizovaných lipidových standardů a MS signálů nederivatizovaných standardů v původní směsi před derivatizací.

Výsledky ukázaly, že derivatizace za pomoci acetylchloridu vede u většiny analyzovaných lipidových standardů k zesílení signálu, a to zejména u studovaných sfingolipidů a nepolárních lipidů. Nicméně pro LPC a LPE byl pozorován opačný efekt.

Acetylace může tedy být jednoduchou a účinnou metodou ke zvýšení citlivosti a mezi detekce v LC-MS analýze lipidů. Nutno podotknout, že účinnost derivatizace bude potřeba dále ověřit i v přítomnosti komplexní matrice, což nebylo součástí této bakalářské práce, ale bude předmětem budoucího navazujícího experimentu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ZÜLLIG, Thomas a Harald C. KÖFELER. HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY IN LIPIDOMICS. *Mass Spectrometry Reviews*. 2021, 40(3), 162-176. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21627
- [2] FAHY, Eoin, Dawn COTTER, Manish SUD a Shankar SUBRAMANIAM. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011, 1811(11), 637-647. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009
- [3] WANG, Jianing, Chunyan WANG a Xianlin HAN. Tutorial on lipidomics. *Analytica Chimica Acta*. 2019, 1061, 28-41. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.01.043
- [4] HOLČAPEK, Michal, Gerhard LIEBISCH a Kim EKROOS. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*. 2018, 2018-04-03, 90(7), 4249-4257. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b05395
- [5] WOLF, Claude a Peter J. QUINN. Lipidomics: Practical aspects and applications. *Progress in Lipid Research*. 2008, 47(1), 15-36. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2007.09.001
- [6] LIPID MAPS. LIPID MAPS® Lipidomics Gateway [online]. ©2024. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/> [cit. 2025-02-28].
- [7] Lipids - Function, Structure, Example. In: GeeksforGeeks [online]. 2024, 14. února 2024 [cit. 2024-12-08]. Dostupné z: <https://www.geeksforgeeks.org/lipids-function-structure-example/>
- [8] FAHY, Eoin, Shankar SUBRAMANIAM, H. Alex BROWN, et al. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* [online]. 2005, 46(5), 839-861 [cit. 2024-12-22]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200
- [9] LIEBISCH, Gerhard, Juan Antonio VIZCAÍNO, Harald KÖFELER, Martin TRÖTZMÜLLER, William J. GRIFFITHS, Gerd SCHMITZ, Friedrich SPENER a Michael J.O. WAKELAM. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. 2013, 54(6), 1523-1530. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M033506

- [10] MALTSEV, Yevhen a Kateryna MALTSEVA. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2021, 20(2), 515-547. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-021-09571-3
- [11] QUEHENBERGER, Oswald, Aaron M. ARMANDO, Alex H. BROWN, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research* [online]. 2010, 51(11), 3299-3305 [cit. 2025-01-02]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M009449
- [12] ZÜLLIG, Thomas, Martin TRÖTZMÜLLER a Harald C. KÖFELER. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, 412(10), 2191-2209 [cit. 2025-02-24]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-019-02241-y
- [13] TEO, Chin Chye, William Pooi Kat CHONG, Eddy TAN, Nurhidayah Binte BASRI, Zhen Jie LOW a Ying Swan HO. Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, 66, 1-18 [cit. 2025-02-24]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.10.010
- [14] CAJKA, Tomas a Oliver FIEHN. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, 61, 192-206 [cit. 2025-02-24]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.04.017
- [15] LI, Min, Li YANG, Yu BAI a Huwei LIU. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, 2014-01-07, 86(1), 161-175 [cit. 2025-02-24]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac403554h
- [16] HU, Ting a Jin-Lan ZHANG. Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, 41(1), 351-372 [cit. 2025-03-20]. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700709
- [17] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Vydání: první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.

- [18] DASS, Chhabil. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. Wiley-Interscience series on mass spectrometry. ISBN 9780471682295.
- [19] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. Mass spectrometry: principles and applications. 3rd ed. Chichester: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03311-1.
- [20] XIA, Fangbo a Jian-Bo WAN. Chemical derivatization strategy for mass spectrometry-based lipidomics. Mass Spectrometry Reviews [online]. 2023, 42(1), 432-452 [cit. 2025-03-20]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21729
- [21] YANG, Kui a Xianlin HAN. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. Trends in Biochemical Sciences [online]. 2016, 41(11), 954-969 [cit. 2025-03-24]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2016.08.010
- [22] EL-ANEED, Anas, Aljandro COHEN a Joseph BANOUB. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. Applied Spectroscopy Reviews [online]. 2009, 44(3), 210-230 [cit. 2025-03-26]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920902717872
- [23] JIRÁSKO, Robert. Hmotnostní analyzátory, Přednáška [online]. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie. Dostupné také z: https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/04_05_MS_analyzatory_RJ.pdf
- [24] LI, Chang, Shiyang CHU, Siyuan TAN, et al. Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. Frontiers in Chemistry [online]. 2021, 2021-12-21, 9 [cit. 2025-03-26]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2021.813359
- [25] 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 [online]. 2019, 120 [cit. 2025-03-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.04.012
- [26] BURLA, Bo, Makoto ARITA, Masanori ARITA, et al. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. Journal of Lipid Research [online]. 2018, 59(10), 2001-2017 [cit. 2025-03-27]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.S087163

- [27] HSU, Fong-Fu. Mass spectrometry-based shotgun lipidomics – a critical review from the technical point of view. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, 410(25), 6387-6409 [cit. 2025-03-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1252-y
- [28] TRIEBL, Alexander, Martin TRÖTZMÜLLER, Anita EBERL, Pia HANEL, Jürgen HARTLER a Harald C. KÖFELER. Quantitation of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid molecular species using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1347, 104-110 [cit. 2025-05-17]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.04.070
- [29] ROCHA, Fábio R. P. a Elias A. G. ZAGATTO. Chemical Derivatization in Flow Analysis. *Molecules* [online]. 2022, 27(5) [cit. 2025-05-19]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27051563
- [30] STINSON, Craig A. a Yu XIA. A method of coupling the Paternò–Büchi reaction with direct infusion ESI-MS/MS for locating the C=C bond in glycerophospholipids. *The Analyst* [online]. 2016, 141(12), 3696-3704 [cit. 2025-05-19]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C6AN00015K
- [31] DENG, Jiewei, Yunyun YANG, Yaohui LIU, Ling FANG, Li LIN a Tiangang LUAN. Coupling Paternò–Büchi Reaction with Surface-Coated Probe Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry for In Vivo and Microscale Profiling of Lipid C=C Location Isomers in Complex Biological Tissues. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 2019-04-02, 91(7), 4592-4599 [cit. 2025-05-19]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b05803
- [32] XIE, Xiaobo a Yu XIA. Analysis of Conjugated Fatty Acid Isomers by the Paternò–Büchi Reaction and Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 2019-06-04, 91(11), 7173-7180 [cit. 2025-05-19]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b00374
- [33] CAO, Wenbo, Simin CHENG, Jing YANG, et al. Large-scale lipid analysis with C=C location and sn-position isomer resolving power. *Nature Communications* [online]. 2020, 11(1) [cit. 2025-05-19]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-14180-4

- [34] DOUŠA, Michal. Typy a triky v HPLC: Derivatizační techniky. Česká chromatografická škola/Michal Douša [online]. 2022, 11.8.2022 [cit. 2025-05-19]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/2251>
- [35] SHI, Endao, Lihua ZUO, Huan YAO, Zhi SUN a Di CHEN. Recent advances in post-column derivatization: Enhancing sensitivity and selectivity in liquid chromatography analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2024, 177 [cit. 2025-05-19]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2024.117799
- [36] MIYANO, Hiroshi a Akira NAKAYAMA. Development of Precolumn Derivatization-LC/MS for Amino-Acid-Focused Metabolomics. *CHROMATOGRAPHY* [online]. 2021, 42(1), 17-27 [cit. 2025-05-19]. ISSN 1342-8284. Dostupné z: doi:10.15583/jpchrom.2020.023
- [37] HARRIS, Rachel A., Jody C. MAY, Craig A. STINSON, Yu XIA a John A. MCLEAN. Determining Double Bond Position in Lipids Using Online Ozonolysis Coupled to Liquid Chromatography and Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, 2018-02-06, 90(3), 1915-1924 [cit. 2025-05-19]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b04007
- [38] MARSHALL, David L., Angela CRISCUOLO, Reuben S. E. YOUNG, Berwyck L. J. POAD, Martin ZELLER, Gavin E. REID, Todd W. MITCHELL a Stephen J. BLANKSBY. Mapping Unsaturation in Human Plasma Lipids by Data-Independent Ozone-Induced Dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2019, 2019-09-01, 30(9), 1621-1630 [cit. 2025-05-19]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1007/s13361-019-02261-z
- [39] WANG, Dan, Huaming XIAO, Xin LV, Hong CHEN a Fang WEI. Mass Spectrometry Based on Chemical Derivatization Has Brought Novel Discoveries to Lipidomics: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2025, 2025-01-02, 55(1), 21-52 [cit. 2025-05-23]. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2023.2261130
- [40] ŘEZANKA, Tomáš, Karolína PÁDROVÁ a Karel SIGLER. Derivatization in Gas Chromatography of Lipids. In: WENK, Markus R., ed. *Encyclopedia of Lipidomics* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, s. 1-9 [cit. 2025-05-23]. ISBN 978-94-007-7864-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7864-1_71-1

- [41] BIAN, Xiqing, Baoqing SUN, Peiyan ZHENG, Na LI a Jian-Lin WU. Derivatization enhanced separation and sensitivity of long chain-free fatty acids: Application to asthma using targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry approach. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, 989, 59-70 [cit. 2025-05-23]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.08.009
- [42] WANG, Shan-Shan, Yun-Jun WANG, Jing ZHANG, Tuan-Qi SUN a Yin-Long GUO. Derivatization Strategy for Simultaneous Molecular Imaging of Phospholipids and Low-Abundance Free Fatty Acids in Thyroid Cancer Tissue Sections. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 2019-03-19, 91(6), 4070-4076 [cit. 2025-05-23]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b05680
- [43] WANG, Yonghui, Ira S KRULL, Carrie LIU a John D ORR. Derivatization of phospholipids. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, 793(1), 3-14 [cit. 2025-05-23]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(03)00359-3
- [44] MA, Hui-Fang, Fang WEI, Bang-Fu WU, Chen YANG, Ya XIE, Zong-Yuan WU, Xin LV a Hong CHEN. Profiling and quantification of aminophospholipids based on chemical derivatization coupled with HPLC-MS. *Journal of Lipid Research* [online]. 2019, 60(1), 121-134 [cit. 2025-05-23]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M089482
- [45] WANG, Xiang, Fang WEI, Ji-qu XU, et al. Profiling and relative quantification of phosphatidylethanolamine based on acetone stable isotope derivatization. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, 902, 142-153 [cit. 2025-05-23]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.11.003
- [46] HOLČAPEK, M., H. VIRELIZIER, J. CHAMOT-ROOKE, P. JANDERA a C. MOULIN. Trace Determination of Glycols by HPLC with UV and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detections. *Analytical Chemistry* [online]. 1999, 1999-07-01, 71(13), 2288-2293 [cit. 2025-05-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac981087y
- [47] PETERKA, Ondřej, Robert JIRÁSKO, Zuzana VAŇKOVÁ, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Denise WOLRAB, Jiří KULHÁNEK, Filip BUREŠ a Michal HOLČAPEK. Simple and Reproducible Derivatization with Benzoyl Chloride: Improvement of Sensitivity for Multiple Lipid Classes in RP-UHPLC/MS. *Analytical*

- Chemistry [online]. 2021, 2021-10-19, 93(41), 13835-13843 [cit. 2025-05-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c02463
- [48] ZHAO, Shuang, Xian LUO a Liang LI. Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, 2016-11-01, 88(21), 10617-10623 [cit. 2025-05-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b02967
- [49] GUO, Kevin, Fiona BAMFORTH a Liang LI. Qualitative Metabolome Analysis of Human Cerebrospinal Fluid by ¹³C-/¹²C-Isotope Dansylation Labeling Combined with Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2011, 2011-02-01, 22(2), 339-347 [cit. 2025-05-26]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1007/s13361-010-0033-4
- [50] AYCIRIEX, Sophie, Anne REGAZZETTI, Mathieu GAUDIN, Elise PROST, Delphine DARGÈRE, France MASSICOT, Nicolas AUZEIL a Olivier LAPRÉVOTE. Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 404(10), 3049-3059 [cit. 2025-05-26]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6396-6
- [51] GUTNIKOV, George. Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. 1995, 671, 71-89. ISSN 0378-4347.
- [52] MECKELMANN, Sven W., Stefan HELLHAKE, Maryvonne STEUCK, Michael KROHN a Nils Helge SCHEBB. Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* [online]. 2017, 130, 8-15 [cit. 2025-06-03]. ISSN 10988823. Dostupné z: doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.02.003
- [53] BOLLINGER, James G., Wallace THOMPSON, Ying LAI, Rob C. OSLUND, Teal S. HALLSTRAND, Martin SADILEK, Frantisek TURECEK a Michael H. GELB. Improved Sensitivity Mass Spectrometric Detection of Eicosanoids by Charge Reversal Derivatization. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, 2010-08-15, 82(16), 6790-6796 [cit. 2025-06-03]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac100720p