

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Sabina Tomášková

**CHARAKTERIZACE LIPIDŮ SE ČTYŘMI ESTEROVÝMI  
VAZBAMI V NOVOROZENECKÉM MÁZKU POMOCÍ HPLC/MS**

**CHARACTERIZATION OF LIPIDS WITH FOUR ESTER BONDS IN  
VERNIX CASEOSA BY HPLC/MS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Praha 2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a ústavu.

V Praze dne

Sabina Tomášková

## Poděkování

Tímto děkuji doc. RNDr. Josefovi Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Mé poděkování patří též RNDr. Vladimírovi Vrkoslavovi Ph.D. za odborný dohled a podnětné rady, díky nimž jsem získala cenné zkušenosti při práci v laboratoři a znalosti pro sepsování této práce. Dále děkuji Ing. Aleši Macharovi, Ph.D. (ÚOCHB AV ČR v Praze) za syntézu standardů estolidů.

## Abstrakt

Diplomová práce se věnuje analýze triacylglycerolových estolidů (TG-est) pomocí HPLC/MS. Tyto lipidy obsahují čtyři esterové vazby. Vyskytují se v některých rostlinných olejích a u savců slouží jako zásobní forma metabolicky významných estolidů mastných kyselin. Cílem této práce bylo prokázat existenci TG-est v novorozeneckém mázku a prozkoumat možnosti jejich analýzy v tomto materiálu. S využitím vysokorozlišující a tandemové hmotnostní spektrometrie byla prostudována spektra standardů TG-est. Byla navržena a optimalizovaná metoda pro HPLC TG-est v reverzním nevodném systému s využitím kolony Kinetex C18 a gradientové eluce acetonitrilem a 2-propanolem. Tato metoda byla použita pro analýzu frakce lipidů novorozeneckého mázku, přičemž bylo prokázáno, že TG-est se ve zkoumaném vzorku skutečně vyskytují. Pokusy zjednodušit lipidový vzorek před HPLC/MS analýzou pomocí frakcionace na TLC nebyly příliš úspěšné.

## Klíčová slova

Estolidy, novorozenecký mázek, tenkovrstvá chromatografie, triacylglyceroly, vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

## Abstract

Diploma thesis is devoted to the analysis of triacylglycerol estolides (TG-est) by HPLC/MS. These lipids contain four ester bonds. TG-est are part of some vegetable oils and in mammals function as a storage form of metabolically important fatty acid estolides. The aim of this thesis was to prove the existence of TG-est in vernix caseosa and explore the possibilities of analysis in this material. Standards of TG-est were studied with using high-resolution and tandem mass spectrometry. Was suggested and optimized HPLC method for TG-est in a reverse nonaqueous system with the use of column Kinetex C18 and gradient elution with acetonitrile and 2-propanol. This method was used for analysis vernix caseosa fraction, and it was shown that TG-est are present in the sample. Attempts to simplify the lipid sample before analysis HPLC/MS by TLC fractionation were not very successful.

## Key words

Estolides, vernix caseosa, thin-layer chromatography, triacylglycerols, high resolution mass spectrometry, high-performance liquid chromatography.

## Seznam použitých zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku ( <b>A</b> tmospheric <b>P</b> ressure <b>C</b> hemical <b>I</b> onization)
CID	kolizně indukovaná disociace ( <b>C</b> ollision- <b>I</b> nduced <b>D</b> issociation)
DB	dvojná vazba ( <b>D</b> ouble <b>B</b> ond)
ECN	<b>E</b> quivalent <b>C</b> arbon <b>N</b> umber
ESI	ionizace elektrosprejem ( <b>E</b> lectrospray <b>I</b> onization)
FA	mastná kyselina ( <b>F</b> atty <b>A</b> cid)
GC	plynová chromatografie ( <b>G</b> as <b>C</b> hromatography)
HCD	kolizní disociace při vyšších energiích ( <b>H</b> igher-Energy <b>C</b> ollisional <b>D</b> issociation)
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <b>H</b> igh- <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí ( <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography/ <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
MS	hmotnostní spektrometrie ( <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
NARP	chromatografie s obrácenými fázemi v nevodném prostředí ( <b>N</b> on- <b>A</b> queous <b>R</b> eserved- <b>P</b> hase Chromatography)
NPC	chromatografie s normálními fázemi ( <b>N</b> ormal- <b>P</b> hase <b>C</b> hromatography)
RPC	chromatografie s obrácenými fázemi ( <b>R</b> eserved- <b>P</b> hase <b>C</b> hromatography)
TLC	tenkovrstvá chromatografie ( <b>T</b> hin- <b>L</b> ayer <b>C</b> hromatography)
TG	triacylglycerol ( <b>T</b> riacyl <b>g</b> lycerol)
UVPD	fotodisociace ultrafialovým zářením ( <b>U</b> ltraviolet <b>P</b> hoto <b>d</b> issociation)
VC	novorozenecký mázek ( <b>V</b> ernix <b>C</b> aseosa)

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	- 9 -
1.1 Cíle diplomové práce .....	- 10 -
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	- 11 -
2.1 Novorozenecký mázek .....	- 11 -
2.1.1 Vznik novorozeneckého mázku .....	- 11 -
2.1.2 Struktura a složení novorozeneckého mázku.....	- 11 -
2.1.3 Funkce a vlastnosti novorozeneckého mázku.....	- 12 -
2.1.3.1 Hydratační schopnost .....	- 12 -
2.1.3.2 Antimikrobiální schopnost .....	- 12 -
2.1.3.3 Hojící schopnost.....	- 13 -
2.1.3.4 Antioxidační schopnost .....	- 13 -
2.2 Lipidová frakce novorozeneckého mázku.....	- 13 -
2.3 Estolidy triacylglycerolů .....	- 13 -
2.3.1 Triacylglycerolové estolidy v přírodě .....	- 14 -
2.3.2 Průmyslové využití a syntéza estolidů .....	- 15 -
2.4 Techniky analýzy lipidů .....	- 15 -
2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie v analýze lipidů .....	- 15 -
2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v analýze lipidů.....	- 16 -
2.4.2.1 Reverzní mód .....	- 17 -
2.4.2.1.1 Reverzní mód v nevodném prostředí .....	- 17 -
2.4.2.2 Normální mód .....	- 17 -
2.4.2.3 Chromatografie hydrofilních interakcí.....	- 18 -
2.4.2.4 Argentační chromatografie .....	- 18 -
2.4.3 Hmotnostní spektrometrie v analýze lipidů .....	- 18 -
2.4.3.1 Ionizace elektrosprejem.....	- 19 -
2.4.3.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	- 19 -
2.4.3.3 Kolizně indukovaná disociace .....	- 20 -
2.4.3.4 Vysokoenergetická kolizní disociace .....	- 20 -
2.4.3.5 Disociace ultrafialovým zářením .....	- 21 -
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	- 22 -
3.1 Chemikálie.....	- 22 -
3.2 Vzorek lipidů novorozeneckého mázku .....	- 22 -
3.3 Příprava roztoku mravenčanu amonného .....	- 22 -
3.4 Standardy lipidů .....	- 23 -
3.5 Přístroje a zařízení, pracovní parametry.....	- 24 -

3.6	Chromatografická separace lipidů .....	- 25 -
3.7	Nastavení hmotnostního detektoru .....	- 25 -
3.8	TLC separace lipidů .....	- 25 -
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE</b> .....	- 27 -
4.1	Výběr ionizační techniky pro estolidy triacylglycerolů .....	- 27 -
4.1.1	ESI spektrum estolidu triacylglycerolů .....	- 27 -
4.1.2	APCI spektrum estolidu triacylglycerolů .....	- 28 -
4.2	Fragmentační spektra standardu .....	- 30 -
4.2.1	Fragmentace CID .....	- 30 -
4.2.2	Fragmentace HCD.....	- 33 -
4.2.3	Fragmentace UVPD .....	- 35 -
4.3	Optimalizace podmínek HPLC/MS .....	- 36 -
4.3.1	Složky mobilní fáze.....	- 36 -
4.3.2	Stacionární fáze.....	- 38 -
4.3.3	Gradientový program .....	- 40 -
4.4	Výsledné měření reálného vzorku .....	- 42 -
4.5	Izolace estolidů z frakce 21 pomocí TLC .....	- 48 -
4.5.1	Optimalizace TLC .....	- 48 -
4.5.2	Výsledek TLC .....	- 49 -
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	- 51 -
6	Použitá literatura.....	- 52 -

# 1 ÚVOD

Estolidy triacylglycerolů (TG-est) jsou dosud málo prozkoumanou třídou lipidů, která byla popsána pouze z některých rostlinných olejů<sup>1</sup> nebo ze sekretu parakloakálních žláz australských vačnatců<sup>2</sup>. Jsou to lipidy, ve kterých jsou tři acylové řetězce připojené ke glycerolu prostřednictvím esterových vazeb. Jeden acylový řetězec, případně více, obsahuje hydroxylovou skupinu, která je dále esterifikovaná jinou mastnou kyselinou. Vznikají tak sloučeniny se čtyřmi esterovými vazbami a osmi kyslíky.

Během předchozích experimentů v laboratoři školitele bylo zjištěno, že lipidový extrakt novorozeneckého mázku obsahuje lipidy s osmi kyslíky, které by mohly být výše popsanými TG-est. Novorozenecký mázek, latinsky vernix caseosa, je biofilm, který pokrývá povrch lidského plodu během posledního trimestru těhotenství. Vzhledově je novorozenecký mázek bílý mazlavý povlak. Pokud není odstraněn, zůstává na pokožce novorozence několik hodin po porodu. Jeho hlavním úkolem je ochrana plodu před macerací v plodové vodě. Dále má pozoruhodné hojivé vlastnosti, které by se mohly využít při léčbě popálenin a péči o předčasně narozené děti. Díky jeho význačným vlastnostem by tak mohl být využit ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu. Přípravě syntetického preparátu s obdobnými vlastnostmi mázku zatím brání neúplné informace o chemickém složení mázku. Obecně je mázek složen z vody, proteinů a velmi komplexní směsi lipidů. Tento diplomový projekt věnuje pozornost jedné lipidové složce mázku, konkrétně charakterizaci TG-est.

## 1.1 Cíle diplomové práce

Cílem diplomového projektu je zjistit, zda novorozenecký mázek obsahuje TG-est a navrhnout metodu jejich analýzy. Jednotlivé dílčí úkoly jsou:

- Studium ionizace a fragmentace standardů TG-est
- Vývoj a optimalizace HPLC/MS<sup>n</sup> metody pro analýzu TG-est
- Charakterizace TG-est v novorozeneckém mázku

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Novorozenecký mázek

Novorozenecký mázek je znám pod latinským názvem vernix caseosa (VC). Doslovný překlad tohoto termínu je „sýrový lak“ a obecně toto spojení charakterizuje vzhled VC<sup>3</sup>. Ve skutečnosti se však jedná o velmi komplexní proteolipidový materiál, který je produkován fetálními mazovými žlázami<sup>4</sup>. Tímto biofilmem je pokryta pokožka plodu v posledním trimestru těhotenství a také pokožka novorozence po porodu. Jeho hlavní funkcí je ochrana pokožky plodu před macerací v plodové vodě. Vytváří tak jedinečnou bariéru mezi plodovou vodou a plodem a chrání jej před možnou infekcí. Po porodu pak usnadňuje adaptaci novorozence na nové prostředí mimo tělo matky. Pokud není po porodu mechanicky setřen, VC se po několika hodinách vysuší a spontánně odpadá<sup>5</sup>.

#### 2.1.1 Vznik novorozeneckého mázku

Pokožka plodu se vytváří již od 3. týdne těhotenství. Zprvu je tvořena jednou vrstvou kuboidních buněk, které jsou vytvořeny z embryonálního ektodermu. V 11. týdnu těhotenství se už pokožka skládá ze tří vrstev: bazálního, středního a povrchového peridermu. Pod peridermem se pak kůže vyvíjí a ve čtvrtém měsíci stáří plodu lze odlišit 4 vrstvy: stratum basale, spinosum, granulosum a corneum. Ve 21. týdnu těhotenství je kůže plně vyvinuta, periderm se odděluje a je nahrazován rohovou vrstvou zvanou stratum corneum. Odloučené buňky peridermu spolu se sekretem fetálních mazových žláz vytváří VC. Tvorba VC postupuje kраниokaudálně, tedy směrem shora dolů, a pokrývá plod až do porodu. Může být pokryt celý povrch kůže nebo pouze záhyby těla<sup>6</sup>.

#### 2.1.2 Struktura a složení novorozeneckého mázku

Složení VC je následující: voda (80 %), lipidy (10 %), proteiny (10 %) a stopové množství lanuga a odloučených buněk peridermu. Lipidy tvoří z 10 % tzv. bariérové lipidy, tj. cholesterol, volné mastné kyseliny a ceramidy. Zbývajících 90 % je tvořeno estery sterolů, voskovými estery a triacylglyceroly<sup>7</sup>. Na buněčné úrovni je VC tvořen zploštělými korneocyty o tloušťce 1-2  $\mu\text{m}$ . Přestože mázek obsahuje přes 80 % vody, je velmi viskózní. Je to dáno tím, že fetální korneocyty jsou obaleny amorfními lipidy a fungují jako balíčky zadržující vodu. Nejčastějším proteinem přítomným ve VC je keratin, kterým jsou

keratocyty tvořeny<sup>8</sup>. Existují interindividuální odchylky ve složení i množství mázku na pokožce novorozence. Podle studií je složení mázku ovlivněno například pohlavím nebo rasou<sup>9</sup>.

### **2.1.3 Funkce a vlastnosti novorozeneckého mázku**

VC působí jako hydrofobní bariéra a chrání tak pokožku plodu před macerací v plodové vodě. Pomáhá vývoji kůže a brání ztrátě tekutin a elektrolytů. Díky komplexnímu složení má mnoho dalších blahodárných vlastností, které by mohly být v budoucnosti využity v medicíně nejen u předčasně narozených, ale i dospělých jedinců. V budoucnu by syntetické náhražky VC mohly být využity pro péči o předčasně narozené děti, při léčbě popálenin nebo jiných kožních onemocnění. Níže jsou uvedeny příklady prospěšných vlastností mázku<sup>6</sup>.

#### **2.1.3.1 Hydratační schopnost**

Po porodu dochází k pomalému snižování hydratace pokožky. Novorozenci s ponechaným VC na kůži ji mají více hydratovanou než novorozenci, u kterých byl mechanicky odstraněn po porodu. Pokud je pokožka dospělého jedince ošetřena mázkem, pak vzrůstá její schopnost vázat vodu více než u neošetřené pokožky. Je uváděno, že VC má vyšší hydratační schopnost než běžně dostupné hydratační krémy<sup>6</sup>.

#### **2.1.3.2 Antimikrobiální schopnost**

VC obsahuje antimikrobiální proteiny, které jsou aktivní vůči bakteriálním a plísňovým patogenům. Mezi identifikované proteiny s antimikrobiálními vlastnostmi patří např. defensiny, katelicidiny, psoriasin, ubiquitin, lysozym a laktoferin. Širokospektrální působení těchto proteinů, zejména katelicidinů a defensinů, může napomáhat při zabránění vzniku rezistence u některých bakteriálních patogenů<sup>4</sup>. VC také obsahuje volné mastné kyseliny, především kyselinu palmitovou a linolovou, které rovněž vykazují antimikrobiální aktivitu. Podobně jako mikrobiální proteiny popsané výše, mastné kyseliny a monoacylglyceroly narušují cytoplazmatickou membránu bakterií a lipidový obal virů<sup>10</sup>.

### 2.1.3.3 Hojící schopnost

Schopnost hojení kožních poranění je jednou z dalších prokázaných funkcí VC. Dle studií po nanesení mázku na poraněnou pokožku dochází ke zrychlené regeneraci a dřívějšímu uzdravení poraněného místa. Vzhledem k vlastnostem jako je hydratační nebo protiinfekční schopnost by mohl mázek napomáhat při léčbě pacientů s popáleninami, kteří trpí v důsledku traumatu na dehydrataci pokožky<sup>4</sup>.

### 2.1.3.4 Antioxidační schopnost

Je známo, že těsně po porodu je novorozenec vystaven vysokému oxidačnímu stresu vlivem relativně vysoké koncentraci kyslíku v jeho novém prostředí. Jeho pokožka se s tím ale dokáže vyrovnat právě díky VC, který obsahuje vitamin E mající antioxidační vlastnosti. Je proto doporučeno, aby se po narození mázek z novorozenců mechanicky neodstraňoval, jelikož má pozitivní vliv na postnatální adaptaci novorozence<sup>4</sup>.

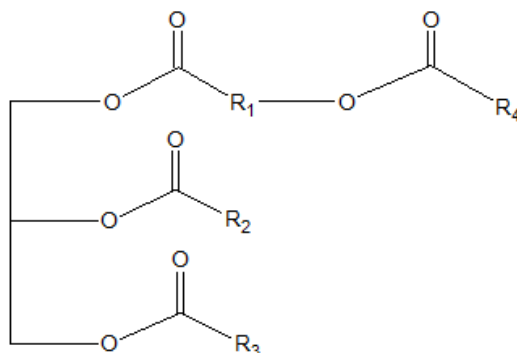
## 2.2 Lipidová frakce novorozeneckého mázku

Lipidy lze dělit do kategorií podle jejich chemické a strukturní podobnosti nebo na polární a nepolární (neutrální) lipidy na základě jejich celkové hydrofobicity. Mezi polární lipidy jsou řazeny fosfolipidy, sfingolipidy, fosfoacylglyceroly nebo glykolipidy. Mezi neutrální pak triacylglyceroly a vosky<sup>11</sup>. Pro zjištění podrobného složení VC byla provedena studie, díky níž byly charakterizovány jeho lipidové složky. Lipidový extrakt byl separován na silikagelových TLC destičkách s použitím mobilní fáze ether/diethylether/kyselina octová (80:20:1, v:v:v). Během tohoto experimentu bylo detekováno 8 zón. V zónách byly identifikovány postupně od startu po čelo chromatografické destičky tyto majoritní třídy lipidů: fosfolipidy, monoacylglyceroly, diacylglyceroly, cholesterol, mastné alkoholy, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a voskové estery/estery sterolů/skvalen<sup>3</sup>.

## 2.3 Estolidy triacylglycerolů

Estolid je obecný název pro lineární oligomerní polyester hydroxy mastných kyselin<sup>12</sup>. Strukturně jsou estolidy lipidy, ve kterých karboxylová skupina jedné mastné kyseliny tvoří esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou druhé mastné kyseliny. TG-est se tedy skládají ze tří acylových řetězců připojených ke glycerolu prostřednictvím jednotlivých esterových

vazeb, přičemž na jeden (nebo více) z těchto acylových řetězců, který obsahuje hydroxyskupinu, je esterovou vazbou připojen další acylový řetězec<sup>1</sup>. Takové lipidy s jednou estolidovou esterovou vazbou se někdy označují jako tetraacylglyceroly. Ve své struktuře tedy mají čtyři esterové vazby a oproti TG jejichž molekuly obsahují šest kyslíků, jsou tyto látky osmikyslíkaté<sup>13</sup>. Na Obrázku 1 je znázorněna struktura estolidu triacylglycerolu.



**Obrázek 1** Schematické znázornění struktury TG-est, kde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> a R<sub>4</sub> zobrazuje alkylový řetězec. Estolidová vazba může být na jakémkoliv acylu vázanému na glycerol.

### 2.3.1 Triacylglycerolové estolidy v přírodě

TG-est byly popsány v některých rostlinných olejích, například ze skočce obecného (*Ricinus communis*), kamaly filipínské (*Mallotus philippinensis*) či brukvovité rostliny *Physaria tenella*. Také byly popsány v semenech stromu kožokvětu lojonosného (*Sapium sebiferum*)<sup>3</sup>. Předmětem výzkumu TG-est byla také houba paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*), u které byla identifikována kyselina ricinolejová. Tato kyselina obsahuje ve své struktuře hydroxy skupinu, díky níž je možná biosyntéza TG-est<sup>14</sup>.

Přirozený výskyt TG-est byl potvrzen i u živočichů, a to v sekretu parakloakálních žláz australského vačnatce kusu liščího (*Trichorus vulpecula*). Lipidová frakce tohoto sekretu byla zkoumána pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Chromatogram ukázal komplexní směs, která obsahovala tři skupiny lipidů, přičemž nejdříve opouštěly kolonu TG-est<sup>2</sup>. Dle nejnovější studie byly TG-est objeveny také v tukové tkáni myši<sup>15</sup>.

Co se týká biosyntézy, v cytoplazmě vznikají „de novo“ nasycené mastné kyseliny až po kyselinu palmitovou. Mastné kyseliny, které mají vyšší počet atomů uhlíku, se vytvářejí

při procesu elongace v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondriích. Ty mohou být dále aktivovány vazbou na koenzym A, a poté esterifikovány za vzniku estolidu<sup>16</sup>.

### **2.3.2 Průmyslové využití a syntéza estolidů**

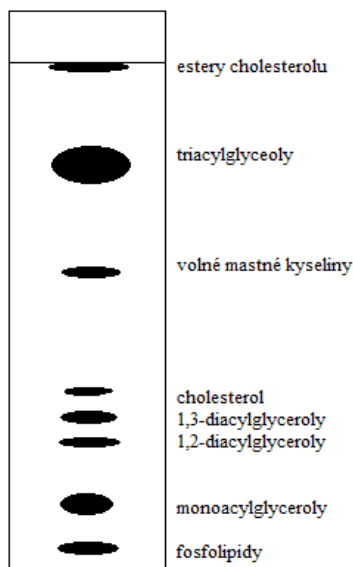
TG-est mají rozdílné fyzikální vlastnosti v porovnání s TG. Používají se pro zlepšení viskozity směsí a pro snížení teploty tuhnutí maziv<sup>17</sup>. Viskozitu sloučenin ovlivňují dva hlavní faktory, kterými jsou vodíkové vazby hydroxy skupin a sterický objem molekuly. Intermolekulární vodíkové vazby zvyšují sterickou velikost molekuly a tím i její viskozitu. Bylo studováno, že TG-est díky substituované hydroxy skupině eliminují vodíkovou vazbu a je tak snížena viskozita oleje. Viskozita pak lineárně roste v závislosti délky řetězců FA, tedy zvyšuje se vzrůstající délkou řetězců FA. Oxidační stabilita rostlinných olejů je nepříznivá díky většímu počtu nenasycených FA. Pokud je vytvořen TG-est z kyseliny olejové, tak se nejen zlepši teplota bodu tuhnutí, ale také se sníží celkové množství nenasycenosti v molekule, což vede ke zlepšení oxidační stability<sup>18</sup>.

Jedním ze způsobů průmyslové syntézy TG-est je esterifikace volných mastných kyselin, které jsou získávány z přírodních olejů. Jednou z možností je syntéza za vysokého tlaku a teploty z ricinolejové kyseliny, která je majoritní součástí ricinového oleje. Další možností syntézy je použití mastných kyselin z lesquerelly. Mastné kyseliny lesquerelly a ricinového oleje mají ve své struktuře hydroxy skupinu, která může být dále esterifikována jinou mastnou kyselinou<sup>18</sup>.

## **2.4 Techniky analýzy lipidů**

### **2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie v analýze lipidů**

Při metodě tenkovrstvé chromatografie (TLC) jsou jednoduché třídy lipidů separovány na silikagelu. Jako mobilní fáze se často využívá směsí hexanu a diethyletheru. Pro úspěšnou separaci volných mastných kyselin se přidává kyselina mravenčí, která potlačuje disociaci karboxylové skupiny. Bez přítomnosti kyseliny mravenčí by se mastné kyseliny separovaly mezi diacylglyceroly a monoacylglyceroly. Separace modelové směsi lipidů je znázorněna na Obrázku 2 (cit.<sup>19</sup>).



**Obrázek 2** TLC separace jednoduchých lipidů na silikagelu s využitím mobilní fáze hexan/diethylether/ kyselina mravenčí (80:20:2). Převzato a upraveno<sup>19</sup>.

Metoda TLC umožňuje předběžně identifikovat a zhruba kvantifikovat většinu tříd lipidů<sup>20</sup>. Pomocí TLC je možné dosáhnout separace komplexních směsí srovnatelné s jinými typy chromatografií. Vysokoúčinná TLC (HPTLC) používá silikagel s velmi malou velikostí částic, což umožňuje vynikající separaci s poměrně krátkými elučními časy<sup>21</sup>. TLC lze rovněž využít pro semipreparativní účely. Vzhledem k tomu, že lipidy s nenasycenými vazbami velmi snadno oxidují, je třeba lipidy izolovat krátce po ukončení separace na desce. Vzorky lipidů je pak vhodné uchovávat rozpuštěné v malém množství vhodného rozpouštědla, například v chloroformu, při teplotě -20 °C nebo nižší<sup>22</sup>.

#### 2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v analýze lipidů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v praxi běžně využívanou chromatografickou technikou k separaci lipidů. Je možné ji využít nejen jako analytickou techniku, ale i pro semipreparativní účely. Pro analýzu lipidů se nejčastěji využívá v reverzním, normálním, nebo HILIC módu. Další možností je použití argentační chromatografie, která separuje lipidy na základě počtu dvojných vazeb<sup>22</sup>.

#### 2.4.2.1 Reverzní mód

Reverzní mód (RPC) je typ chromatografie, kdy je použita nepolární stacionární fáze a vodná či středně polární mobilní fáze. Tato metoda uplatňuje princip rozdělovací chromatografie a také princip chromatografie s hydrofobní interakcí. V současnosti je RPC nejčastěji používaným systémem pro HPLC<sup>23</sup>. Při použití reverzní chromatografie dochází k separaci lipidů v rámci jedné třídy podle délky acylových řetězců. Nepolární látky se eluují později než látky polární<sup>24</sup>.

##### 2.4.2.1.1 Reverzní mód v nevodném prostředí

Pro analýzu lipidů se často používá reverzní mód HPLC v nevodném prostředí (NARP-HPLC). Jedná se o typ RP-HPLC, kdy je použita nepolární stacionární fáze a mobilní fází je pouze směs organických rozpouštědel bez přítomnosti vody. Při použití reverzního módu jsou TGs a jiné třídy lipidů eluovány v pořadí podle čísla ECN (Equivalent Carbon Number). Výpočet ECN je uveden v následující rovnici<sup>25</sup>:

$$ECN = CN - 2DB \quad (1)$$

přičemž *CN* (Carbon Number) je definováno jako počet uhlíků v acylových řetězcích a *DB* (Double Bond) jako počet dvojných vazeb<sup>25</sup>.

Při eluci se retenční časy TG zvyšují se zvyšujícím se ECN a v rámci jedné ECN skupiny jsou separovány podle délky acylových řetězců a počtu dvojných vazeb<sup>25</sup>.

#### 2.4.2.2 Normální mód

Normální mód je typ chromatografie, kdy je použita polární stacionární fáze, nejběžněji silikagel, a nepolární mobilní fáze, např. heptan. Tato metoda uplatňuje princip klasické adsorpční chromatografie. Na rozdíl od RPC jsou lipidy separovány na třídy dle polarit, nikoliv v rámci jedné třídy jako je tomu u RPC. Polární látky se eluují později než látky nepolární<sup>26</sup>.

#### 2.4.2.3 Chromatografie hydrofilních interakcí

Při chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC) se používá polární stacionární fáze a mobilní fáze je směsí vody a organického rozpouštědla. Uplatňuje se především při analýze látek, které jsou vysoce polární, a jsou málo zadržovány při RPC módu. Sloučeniny jsou separovány na základě hydrofilních interakcí. Při analýze lipidů se používá HILIC pro separaci polárních tříd lipidů podle jejich polární skupiny<sup>27</sup>.

#### 2.4.2.4 Argentační chromatografie

Při argentační chromatografii se používá jako stacionární fáze kolona na bázi silikagelu nebo katexu obsahující ionty stříbra a mobilní fáze bývá nepolární rozpouštědlo, například hexan. V analýze lipidů je separace založena na tvorbě slabých reverzibilních komplexů iontů stříbra s dvojnými vazbami a jsou tedy separovány primárně podle počtu dvojných vazeb v molekule a dále podle jejich cis/trans isomerie a polohy<sup>28</sup>.

### 2.4.3 Hmotnostní spektrometrie v analýze lipidů

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, při které jsou molekuly převedeny na ionty a rozlišeny podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výsledek měření je hmotnostní spektrum, což je graf závislosti relativní intenzity iontů na jejich  $m/z$ . Tato spektra slouží k určení elementárního nebo izotopového popisu vzorku, hmotnosti částic a molekul k objasnění jejich chemické identity nebo struktury. Na záznamu se nejintenzivnější signál nazývá základním píkem a je mu přiřazena 100% intenzita. Intenzita všech ostatních píků je vyjádřena relativní hodnotou vzhledem k základnímu píku<sup>29</sup>.

MS našla při analýze lipidů široké uplatnění díky vysoké citlivosti, možnosti strukturní analýzy a možnosti určení elementárního složení. Kvalita a množství získaných informací závisí na konkrétním druhu a konfiguraci použitého instrumentu – ionizační technice, typech a kombinaci hmotnostních analyzátorů. Pro analýzu nízkomolekulárních lipidů jsou využívány ionizační techniky elektronová (EI) nebo chemická (CI) ionizace<sup>30</sup>. Jako hlavní ionizační technika pro analýzu lipidů s vyšší molekulovou hmotností je v dnešní době používána ionizace elektrosprejem (ESI). Tato analýza byla navržena Hanem a Grossem v roce 2003. Při tomto experimentu bylo spojení ESI-MS použito pro přímou analýzu lipidů bez předseparace pomocí LC<sup>31</sup>. Dále jsou pro analýzu lipidů používány ionizační techniky jako je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického

tlaku (APPI), desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a desorpční elektrosprejová ionizace (DESI)<sup>29</sup>. V této práci byly použity dva způsoby ionizace, ESI a APCI, proto jim je věnována pozornost v dalších kapitolách.

#### 2.4.3.1 Ionizace elektrosprejem

Při ESI se vzorek ionizuje za atmosférického tlaku. V dnešní době je technika ESI nejpoužívanější ionizační technikou pro spojení HPLC/MS. Používá se pro látky středně polární až iontové, přičemž vznikají následující ionty:  $[M + H]^+$ ,  $[M - H]^-$  a aduktové ionty. Pro analýzu lipidů se do mobilní fáze často přidávají aditiva, nejčastěji amonné ionty, které tvoří amonné adukty s molekulami lipidů. Protože je ESI měkkou ionizační technikou, fragmentované ionty nejsou ve spektru pozorovány nebo jen ve velmi nízké intenzitě. ESI nelze použít se zcela nepolárními mobilními fázemi<sup>29</sup>.

#### 2.4.3.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Při APCI se vzorek stejně jako u ESI ionizuje za atmosférického tlaku. V dnešní době je technika APCI druhá nejčastěji používaná pro spojení HPLC/MS. Oproti ESI probíhá ionizace v plynné fázi a není tak vhodná pro ionizaci biomakromolekul. Používá se pro látky nepolární až středně polární a je tedy vhodná pro použití s nepolárními mobilními fázemi. Při APCI vznikají následující ionty:  $[M + H]^+$ ,  $[M - H]^-$ , a aduktové ionty se složkami mobilní fáze a aditivy v závislosti na složení mobilní fáze. APCI je měkká ionizační technika, ale v hmotnostních spektrech lipidů jsou běžně pozorovány fragmenty. APCI je o něco tvrdší než ESI<sup>29</sup>.

Kromě výběru ionizační techniky je pro analýzu lipidů dalším důležitým parametrem typ hmotnostního analyzátoru. Pro analýzu lipidů byla použita široká škála analyzátorů, např. sektorový magnetický, kvadrupólový, průletový, iontová past nebo orbitální past<sup>30</sup>. V této práci byl použit pro analýzu reálného vzorku hmotnostní analyzátor orbitální past (Orbitrap). Orbitrap je iontová past složená ze dvou vnějších elektrod a centrální elektrody. Ionty vstupující do Orbitrapu jsou zachyceny v rotačním pohybu kolem centrální elektrody a současně oscilují v ose této elektrody. Frekvence oscilace svazku iontů podél centrální elektrody je závislá na jejich  $m/z$ . Ionty různých  $m/z$  oscilují podél centrální elektrody při různých frekvencích, což vede k jejich oddělení. Na vnějších elektrodách je při průletu iontů

indukován proud. Z celkového průběhu indukovaného proudu jsou pomocí Fourierovy transformace získány hodnoty  $m/z$  iontů s vysokou přesností a správností. Orbitrap nejnovější generace poskytuje maximální rozlišení až 1 000 000 (pro  $m/z$  200) s chybou určení hodnoty  $m/z$  nižší než 1 ppm. Z naměřených spekter lze určit elementární složení iontů<sup>32</sup>.

Při analýze lipidů se často používají hybridní hmotnostní spektrometry, složené z více typů hmotnostních analyzátorů. Takové instrumenty umožňují měřit fragmentační spektra analyzovaných lipidů pro jejich strukturní charakterizaci. Nejčastěji jsou součástí hybridních hmotnostních spektrometrů iontové pasti nebo kvadrupóly, analyzátorů doby letu (TOF) a Orbitrap<sup>29</sup>. V předložené práci byly použity hybridní instrumenty s možností detekce iontů v orbitální pasti. Použité fragmentační techniky CID, HCD, UVPD jsou popsány níže.

#### 2.4.3.3 Kolizně indukovaná disociace

Kolizně indukovaná disociace (CID) je fragmentační technika MS pro fragmentaci iontů v plynné fázi<sup>33</sup>. Vybrané ionty, typicky molekulární ionty nebo protonované molekuly, jsou urychlovány pomocí elektrického potenciálu do kolizní cely, kde dochází ke srážkám s neutrálními částicemi (často heliem, dusíkem nebo argonem). Při srážce se část kinetické energie iontů přemění na jejich vnitřní energii, což má za následek štěpení vazby a rozpad molekulárního iontu na menší fragmenty. Tyto fragmentové ionty jsou pak dále analyzovány. CID nejčastěji probíhá v iontové pasti nebo v kvadrupólové kolizní cele<sup>34</sup>.

#### 2.4.3.4 Vysokoenergetická kolizní disociace

Vysokoenergetická kolizní disociace (HCD) je fragmentační technika MS specifická pro hmotnostní spektrometr s orbitrapem a C-pastí. Ionty jsou dávkovány C-pastí do HCD cely, kde dochází k CID. Vzniklé fragmenty jsou pomocí C-pasti následně dávkovány do Orbitrapu. Využívá se vyšší radiofrekvenční napětí, které slouží k zadržení většiny fragmentovaných iontů v C-pasti. Vyšší energie tedy není nutná k vyvolání fragmentace, ale k udržení fragmentovaných iontů v C-pasti. Navzdory jménu je HCD spíše nízkoenergetická CID technika<sup>35</sup>.

#### 2.4.3.5 Disociace ultrafialovým zářením

Disociace ultrafialovým zářením (UVPD) je fragmentační technika MS, která využívá energii dopadajících fotonů ke zvýšení vnitřní energie iontů. Prekurzorové ionty jsou zachyceny v iontové pasti a ozářeny UV světlem, které má formu laserových pulzů. Fotony jsou přímo absorbovány cílovými molekulami v závislosti na jejich UV absorpci. Jakmile je dosaženo dostatečně excitovaného stavu, překoná se energetická bariéra pro disociaci vazeb a dochází k fragmentaci<sup>36</sup>.

V této diplomové práci byla využita technika, která spojuje dvě výše zmíněné analytické techniky – spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Díky analýze HPLC/MS získáváme kvalitativní i kvantitativní informace. Chromatografická separace není vždy nutná, protože metoda založená na MS umožňuje určit molekulové hmotnosti různých složek vzorku. Taková analýza je rychlá, avšak poskytuje pouze základní informace o vzorku. Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá analýzou TG-est, je tato kapitola zaměřena na analýzu podobné třídy lipidů, a to TGs. Pro analýzu směsí TGs se často používá NARP-HPLC/MS v pozitivním modu s využitím APCI nebo ESI. Při analýze TGs se do mobilní fáze často přidávají amonné ionty pro zvýšení citlivosti. APCI i ESI v přítomnosti amonných iontů v mobilní fázi poskytují přednostně amonné adukty  $[M + \text{NH}_4]^+$ . Dále bývají ve spektrech detekovány ionty  $[M + \text{H}]^+$  a v případě APCI ionizace také fragmentové ionty odpovídající neutrálním ztrátám mastných kyselin<sup>37, 38</sup>.

Pro charakterizaci zastoupení mastných kyselin v přírodních směsích TGs je technika HPLC/MS vynikajícím nástrojem. Při použití CID je možné určit složení mastných kyselin v jednotlivých vzájemně separovaných TGs<sup>39</sup>. Ve spektrech se vyskytují diagnostické fragmenty odpovídající neutrálním ztrátám mastných kyselin. Je třeba poznamenat, že během této analýzy se získá pouze základní složení triacylglycerolu bez dalších strukturních informací o poloze dvojně vazby a izomerii či větvení mastné kyseliny. Na základě podobnosti struktury TG a TG-est byl uvedený přístup využit v této diplomové práci pro analýzu TG-est<sup>40</sup>.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

- chloroform: p.a., destilovaný, Penta (Praha, Česká Republika)
- diethylether: p.a., destilovaný, Penta (Praha, Česká Republika)
- mravenčan amonný: p.a.,  $\geq 97,0$  % (T), Fluka (St. Louis, USA)
- acetonitril, p.a.,  $\geq 99,9$  % LC-MS LiChrosolv (Německo) – zkratka ACN
- 2-propanol: p.a.,  $\geq 99,9$  %, LC-MS Chromasolv,  $> 99,9$ %, Fluka (St. Louis, USA) – zkratka IPA
- methanol: p.a.,  $\geq 99,8$  %, LC LiChrosolv (Německo) – zkratka MeOH
- hexan: p.a., destilovaný, Penta (Praha, Česká Republika)
- demineralizovaná voda připravená pomocí systému Milli-Q

### 3.2 Vzorek lipidů novorozeneckého mázku

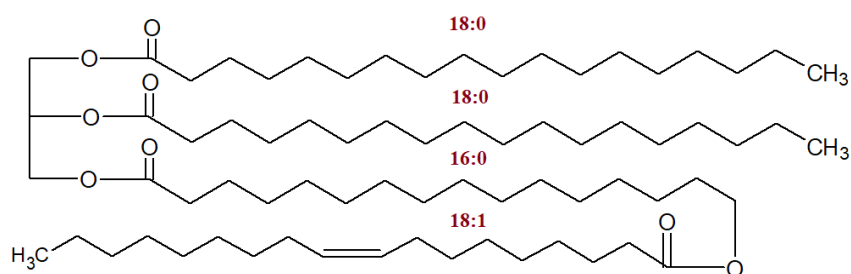
Vzorky novorozeneckého mázku byly odebrány zdravotnickým personálem na porodních sálech Gynekologicko-porodnické kliniky 1. lékařské fakulty UK v Praze v souladu se stanoviskem etické komise VFN v Praze (910/09 S-IV). Mázek byl uchováván v tmavých vialkách a umístěn v mrazáku při teplotě  $-25$  °C. Pro další použití byl vzorek novorozeneckého mázku pracovníky ÚOCHB AV ČR rozdělen pomocí kolonové LC Praze na frakce č. 1-30. V této práci byla pro měření použita frakce č. 21, ve které byl největší výskyt lipidů s osmi kyslíky. Koncentrace lipidů v tomto vzorku byla 10 mg/ml. Tato frakce byla dále dle potřeby ředěna chloroformem na požadovanou koncentraci a použita pro měření.

### 3.3 Příprava roztoku mravenčanu amonného

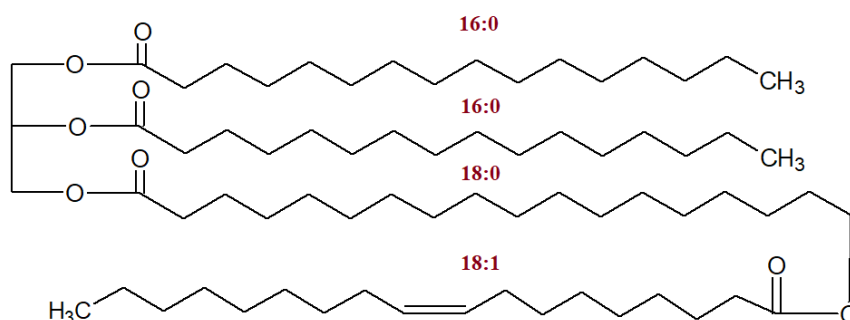
Pro analýzu byl připraven roztok mravenčanu amonného ( $M_r = 63,06$ ) o koncentraci 0,5 M rozpuštěním 7,88 g ve 250 ml demineralizované vody. Získaný roztok byl skladován v tmavé skleněné lahvi a umístěn v lednici při teplotě 4 °C.

### 3.4 Standardy lipidů

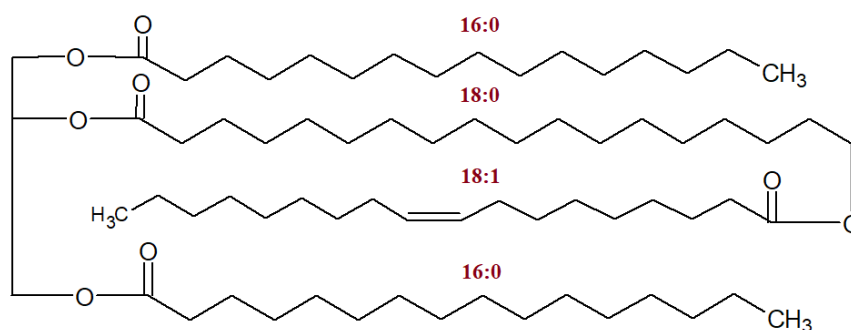
Standardy TG-est byly připraveny pracovníkem ÚOCHB AV ČR v Praze Ing. Alešem Macharou, Ph.D.. Tyto standardy byly rozpuštěny v chloroformu na zásobní koncentraci 10 mg/ml. Zásobní roztoky standardů byly uchovávány ve vialkách v mrazáku při -20 °C. Dle potřeb byly dále ředěny chloroformem na koncentraci použitou při měření. Struktura těchto látek je znázorněna níže na Obrázku 3, 4 a 5.



**Obrázek 3** TG-est 18:0\_18:0\_16-OAHPA (C<sub>73</sub>H<sub>138</sub>O<sub>8</sub>; M = 1143.03917 Da)



**Obrázek 4** TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHPA (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; M = 1115.00787 Da)



**Obrázek 5** TG-est 16:0\_18-OAHPA\_16:0 (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; M = 1115.00787 Da)

### 3.5 Přístroje a zařízení, pracovní parametry

- analytické váhy Mettler, AE 240-S (Mettler Toledo, Zürich, Švýcarsko)
- čerpadlo Dionex UltiMate 3000 Pump (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- LC/MS systém s LCQ Fleet
  - čerpadlo: Rheos Allegro (Flux Instruments, Reinach, Švýcarsko)
  - automatický dávkovač s kolonovým termostatem: Accela autosampler P/N 60057 – 60020 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
  - detektor: LCQ Fleet, 3D IT, se sondou pro APCI a ESI (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- LC/MS systém s LTQ Orbitrap XL
  - čerpadlo: Rheos 2200 (Flux Instruments, Reinach, Švýcarsko)
  - UHPLC čerpadlo: Dionex UltiMate 3000 ISO-3100 SD Isocratic pump (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
  - automatický dávkovač: PAL HTS autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Švýcarsko)
  - termostat: DeltaChrom CTC 100 (Watrex, Praha, Czech Republic)
  - detektor: LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS/IT, se sondou pro APCI a ESI (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- Orbitrap Fusion Lumos Tribid (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
  - UHPLC čerpadlo: Dionex UltiMate 3000 ISO-3100 SD Isocratic pump (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
  - detektor: Orbitrap Fusion Lumos Tribid, EASY-Spray source (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- software: Xcalibur, verze 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- kolony pro HPLC
  - Luna 5  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl 100 Å, LC 250 x 4.6 mm Column (Phenomenex, Kalifornie, USA)
  - Nova-Pak 4  $\mu\text{m}$  C18 60 Å 150 x 3,9 mm Column (Waters Corporation, Milford, USA)

- Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 100 Å HPLC150 x 3.0 mm Column (Phenomenex, Kalifornie, USA)
- Stacionární fáze pro TLC
  - TLC skleněná deska pokrytá  $\text{SiO}_2$ , 5 × 10 cm (připravena v laboratoři)
  - HPTLC Silica gel 60 RP-18, 20 × 10 cm (Merck Millipore, USA)
  - Nano-Silica XHL HPTLC Plates W/UV254, 10 × 10 cm (Sorbtech)

### 3.6 Chromatografická separace lipidů

Pro vysokorozlišovací kapalinovou chromatografii byly použity kolony, které jsou uvedené v kapitole 3.5 Přístroje a zařízení, pracovní parametry. Při měření byla kolona umístěna v termostatu s nastavenou teplotou 30 °C. Postkolonově (pomocí kapiláry připojené T-kusem za kolonou) byl kontinuálně dávkován 0,5 M roztok mravenčanu amonného o průtoku 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  pomocí vysokotlakého čerpadla Dionex. Vialky se vzorky byly vkládány do automatického dávkovače.

### 3.7 Nastavení hmotnostního detektoru

Parametry APCI a ESI zdroje byly nastaveny automatickým laděním přístroje na amonný adukt standardu TG-est pomocí přímého nástřiku. Standard byl dávkován mikrodávkovačem o průtoku 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Mobilní fáze se skládala z 70 % acetonitrilu a 30 % 2-propanolu o průtoku 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  pro APCI a 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  pro ESI. Průtok zmlžovacího plynu (sheath gas) byl 35 arbitárních jednotek a průtok pomocného plynu (auxiliary gas) byl 15 arbitárních jednotek. Teplota kapiláry byla 275 °C. K fragmentaci byla využita fragmentační technika CID, HCD a UVPD s různými hodnotami kolizní energie. Spektra byla měřena na LCQ Fleet, LTQ Orbitrap XL a Orbitrap Fusion Lumos Tribrid.

### 3.8 TLC separace lipidů

Pro tenkovrstvou chromatografii byly použity TLC desky, které jsou uvedené v kapitole 3.5 Přístroje a zařízení, pracovní parametry. Každá deska byla před nanesením vzorku promyta v čistící směsi chloroform/methanol 1:1 (v/v) a vysušena. V této práci byla využita analytická a preparativní TLC.

Analytická TLC byla prováděna za účelem určení polohy frakce TG-est. Pro tento účel byly používány standardy TG-est a frakce č. 21. Po nanesení vzorků a vyschnutí byla TLC deska umístěna do chromatografické vany obsahující malé množství mobilní fáze. Po vyvinutí mobilní fáze byla TLC deska vysušena na vzduchu a separované zóny byly vizualizovány pomocí koncentrované kyseliny sírové a horkovzdušné pistole.

Preparativní TLC byla prováděna za účelem izolace frakce TG-est. Po nanesení vzorků a vyschnutí byla TLC deska umístěna do chromatografické vany obsahující malé množství mobilní fáze. Po vyvinutí mobilní fáze byla TLC deska vysušena na vzduchu a separované zóny byly vizualizovány pomocí 0,05% roztoku primulinu s využitím UV lampy. Pomocí špachtle byla vyznačena frakce TG-est a seškrábnuta do skleněné kolonky s vrstvou silikagelu. Frakce byla následně vymyta diethyletherem, odpařena do konstantní hmotnosti a rozpuštěna v chloroformu na definovanou koncentraci. Získané vzorky byly uchovávány ve skleněných vialkách při teplotě -20 °C.

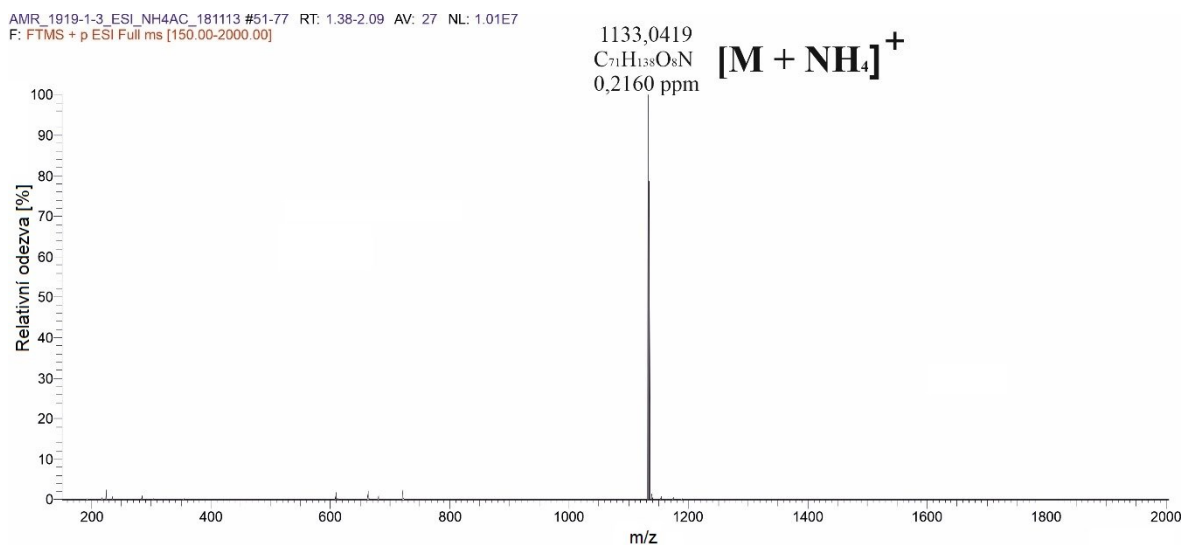
## 4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

### 4.1 Výběr ionizační techniky pro estolidy triacylglycerolů

Pro analýzu TG-est byly testovány dvě ionizační techniky – ESI a APCI. Cílem tohoto experimentu bylo vybrat optimální způsob ionizace zajišťující dostatečnou citlivost detekce a prozkoumat rozsah fragmentace TG-est při ionizaci. Měření bylo provedeno přímým nástřikem roztoků standardů na přístroji LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

#### 4.1.1 ESI spektrum estolidu triacylglycerolů

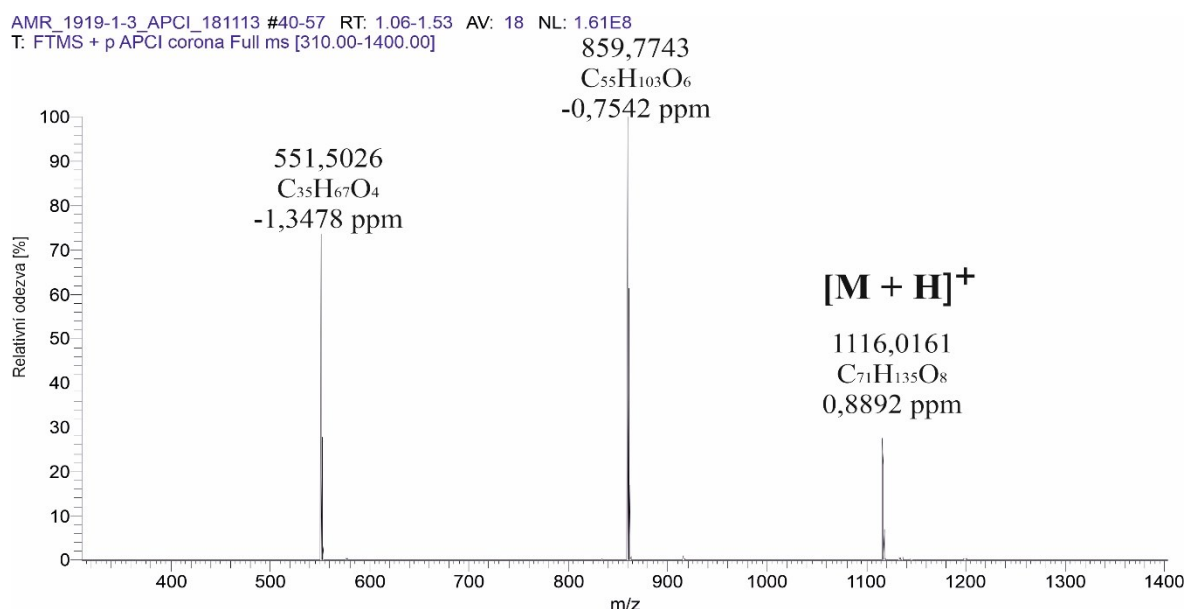
Standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $C_{71}H_{134}O_8$ ;  $M = 1115.00787$  Da) o koncentraci 0,2 mg/ml byl změřen přímým nástřikem do proudu acetonitrilu o průtoku 100  $\mu$ l/min. Pro danou koncentraci nebyl zaznamenán žádný signál, který by odpovídal měřenému standardu. TG-est se při použití techniky ESI efektivně neionizují. Dalším krokem bylo přidání roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 0,5 M ke standardu TG-est. Mravenčan amonný byl dávkován kontinuálně průtokem 3  $\mu$ l/min pomocí mikrostřikačky Hamilton umístěné v dávkovači do proudu mobilní fáze s analytem. Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 6. Za těchto podmínek standard poskytuje signál  $m/z$  1133,0419, který odpovídá elementárnímu složení  $C_{71}H_{138}O_8N$  (0,22 ppm). Elementární složení odpovídá amonnému aduktu  $[M + NH_4]^+$ . Při použití techniky ESI měřený standard TG-est v iontovém zdroji nefragmentuje a ve spektru je zaznamenán pouze amonný adukt TG-est.



**Obrázek 6** MS spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $c = 0,2$  mg/ml). Ionizační technika ESI s přidavkem 0,5 M mravenčanu amonného. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

#### 4.1.2 APCI spektrum estolidu triacylglycerolů

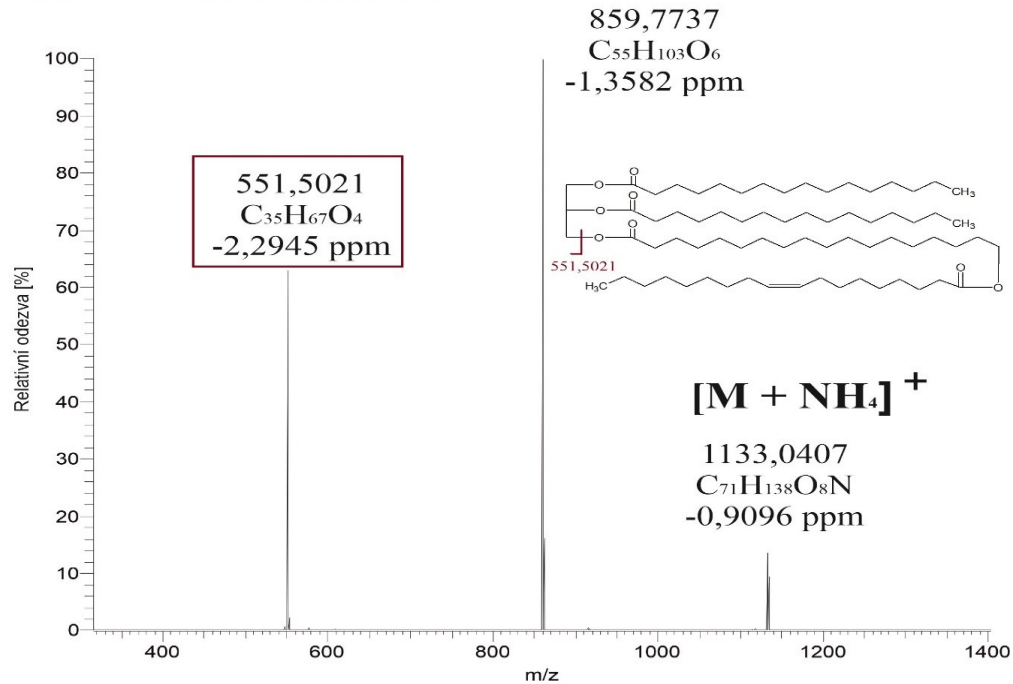
Standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA o koncentraci 0,2 mg/ml byl změřen přímým nástřikem do proudu acetonitrilu o průtoku 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 7. Na tomto spektru jsou TG-est detekovaný v podobě protonované molekuly  $[\text{M} + \text{H}]^+$  na  $m/z$  1116,0161 což odpovídá elementárnímu složení  $\text{C}_{71}\text{H}_{135}\text{O}_8$  (0,89 ppm). Dále jsou pozorovány fragmenty  $m/z$  859,7743 ( $\text{C}_{55}\text{H}_{103}\text{O}_6$ , -0,75 ppm) a 551,5026 ( $\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{O}_4$ , -1,35 ppm). Ion o poměru  $m/z$  859,7743 odpovídá neutrální ztrátě FA 16:0 odštěpením z glycerolu. Ion o poměru  $m/z$  551,5026 odpovídá neutrální ztrátě 18-OAHSA. Podobné APCI spektrum bylo získáno po přidání mravenčanu amonného do proudu mobilní fáze s analytem. V tomto spektru byly detekovány stejné ionty jako na Obrázku 7 a nově přibyl ion odpovídající aduktu  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ .



**Obrázek 7** – MS spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $c = 0,2 \text{ mg/ml}$ ). Ionizační technika APCI bez přídavku mravenčanu amonného. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

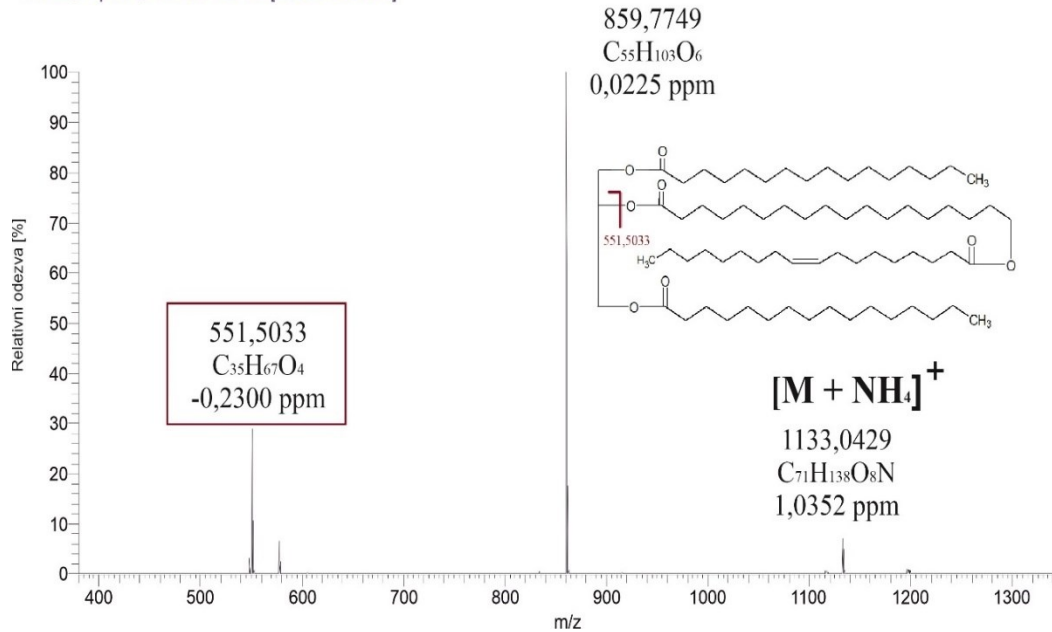
Dalším experimentem bylo měření spekter izomerů a porovnání získaných signálů. Pro měření byl použit standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $\text{C}_{71}\text{H}_{134}\text{O}_8$ ;  $M = 1115.00787 \text{ Da}$ ) a standard TG-est 16:0\_18-OAHSA\_16:0 ( $\text{C}_{71}\text{H}_{134}\text{O}_8$ ;  $M = 1115.00787 \text{ Da}$ ). Naměřená spektra jsou znázorněna níže (Obrázek 8 a 9.)

AMR-1919-1-3\_MSMS02\_181023173527 #75-82 RT: 2.04-2.23 AV: 8 NL: 3.00E7  
T: FTMS + p APCI corona Full ms [315.00-1400.00]



**Obrázek 8** MS spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA (c = 0,2 mg/ml). Ionizační technika APCI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

AMR-1921-3-1\_23102018 #28-34 RT: 0.80-0.97 AV: 7 NL: 2.74E8  
T: FTMS + p APCI corona Full ms [200.00-2000.00]



**Obrázek 9** MS spektrum standardu TG-est 16:0\_18-OAHSA\_16:0 (c = 0,2 mg/ml). Ionizační technika APCI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

Po porovnání výsledných spekter (obrázky č. 8 a 9) je vidět, že ion  $m/z$  551.50 vzniká v těchto dvou případech s odlišnou intenzitou signálů. Tímto experimentem bylo dokázáno následující – pokud je acylový zbytek s navázanou kyselinou (delší řetězec) umístěn na jednom z krajních uhlíků glycerolu, pak odpadá ochotněji a vzniká ion 551,5021 s cca dvounásobnou intenzitou signálu než při umístění delšího řetězce na prostředním uhlíku glycerolu. Tímto experimentem se potvrdil známý fakt z analýzy TG, kde jsou pozorovány rozdílné intenzity fragmentových iontů při izomerii<sup>41</sup>.

Samovolnou fragmentací ve zdroji dochází ke snížení intenzity molekulového aduktu TG-est, ale z hlediska výtěžnosti ionizace, jinak řečeno citlivosti detekce, byly techniky ESI a APCI s přidavkem mravenčanu amonného srovnatelné. APCI by bylo výhodné použít pouze v případě jednoduchých směsí TG-est a využít možnost identifikace polohy řetězce OAHFA. V případě komplexních směsí, jakým je VC je však výhodnější použít ESI s přidavkem amonné soli do mobilní fáze. Hlavní výhodou ESI oproti APCI je fakt, že při ní nedochází k fragmentaci ve zdroji a tvorbě dvou typů molekulových aduktů. Výskyt dvou typů molekulových aduktů při APCI by ve směsných spektrech komplexní směsi TG-est vedl k jejich překryvu. Výrazně by komplikoval identifikaci molekulových aduktů a hlavně by znemožnil výběr jednoho typu iontů pro měření fragmentačních spekter, čímž by vznikala komplikovaná směsná spektra TG-est různé molární hmotnosti. Navíc, při analýze velmi komplexního vzorku VC by výskyt fragmentů v MS spektru znesnadňoval interpretaci, protože elementární složení fragmentů TG-est odpovídá elementárnímu složení TGs a jejich fragmentů.

## 4.2 Fragmentační spektra standardu

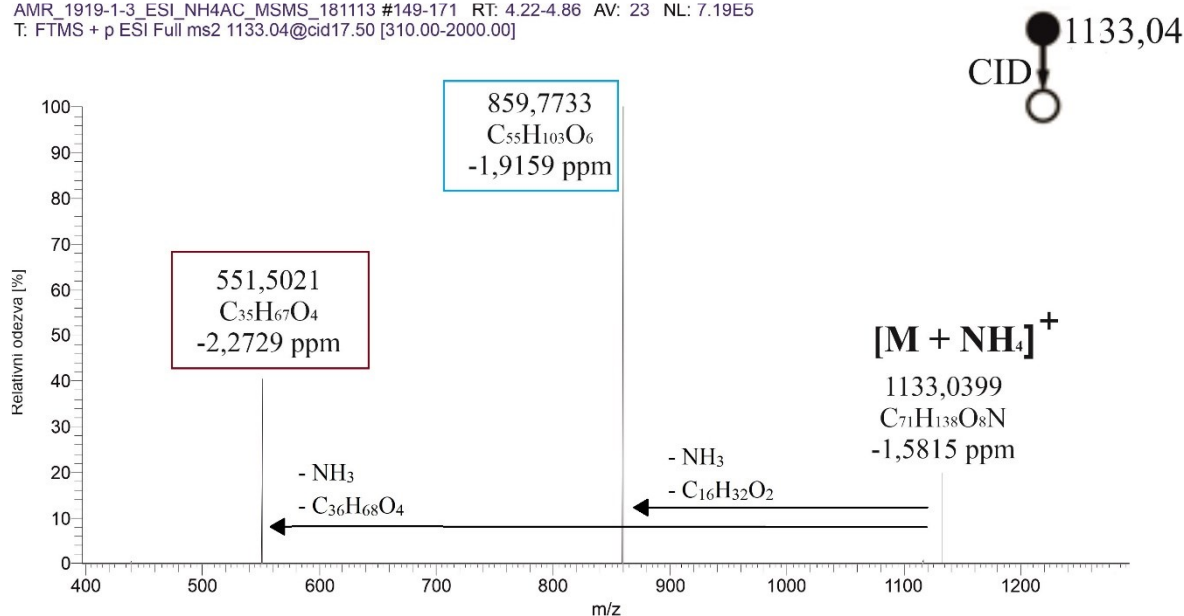
Pro analýzu standardů TG-est byly testovány tři fragmentační techniky – CID, HCD, UVPD. Cílem tohoto experimentu bylo vybrat optimální způsob fragmentace zajišťující dostatečnou citlivost detekce a prozkoumat rozsah fragmentací TG-est. Měření CID a HCD bylo provedeno přímým nástřikem roztoku standardu na přístroji LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu a měření UVPD bylo provedeno na přístroji Orbitrap Fusion Lumos Tribrid.

### 4.2.1 Fragmentace CID

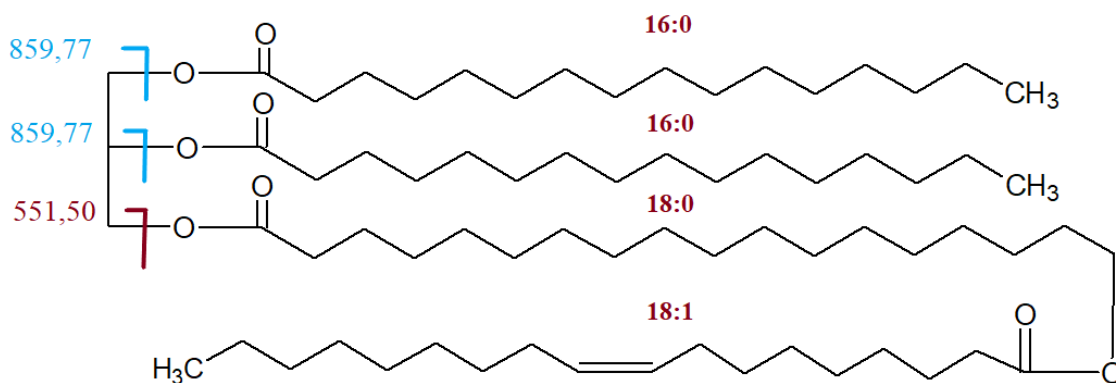
V této kapitole jsou popsána fragmentační spektra s využitím techniky CID. Standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $C_{71}H_{134}O_8$ ;  $M = 1115.00787$  Da) o koncentraci 0,2 mg/ml

byl změřen přímým nástřikem do proudu acetonitrilu o průtoku 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Během skenování byl přidáván roztok mravenčanu amonného o koncentraci 0,5 mg/ml pomocí pumpy Dionex s rychlostí průtoku 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Kolizní energie 18 %. Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 10. Na Obrázku 11 je znázorněno štěpení vazeb při MS<sup>2</sup> fragmentaci.

AMR\_1919-1-3\_ESI\_NH4AC\_MSMS\_181113\_#149-171 RT: 4.22-4.86 AV: 23 NL: 7.19E5  
T: FTMS + p ESI Full ms2 1133.04@cid17.50 [310.00-2000.00]



**Obrázek 10** MS<sup>2</sup>/CID spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA (c = 0,2 mg/ml). Ionizační technika ESI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

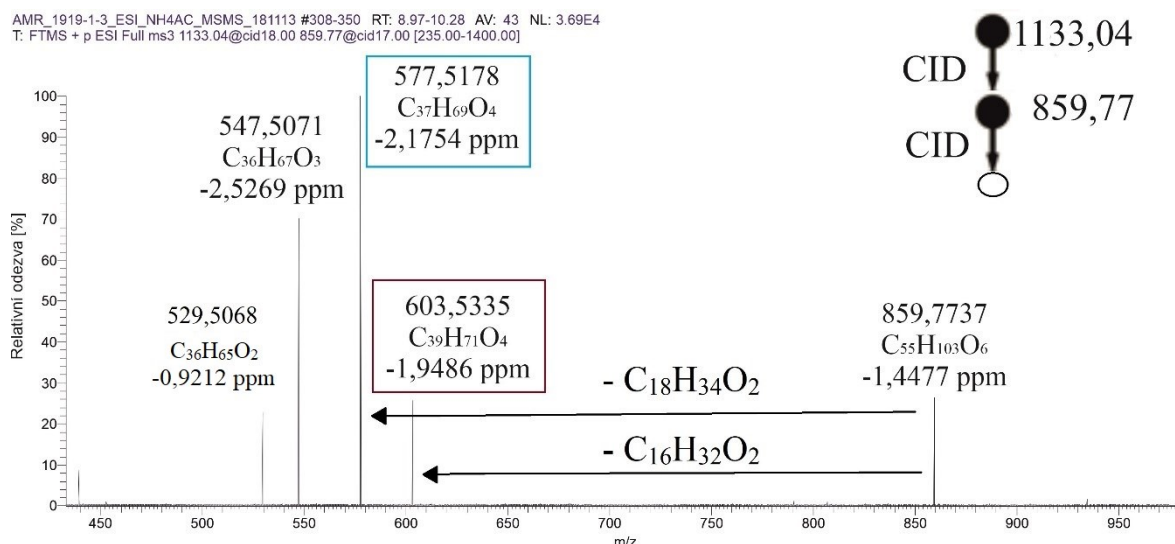


**Obrázek 11** MS<sup>2</sup>/CID fragmentace standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA (c = 0,2 mg/ml).

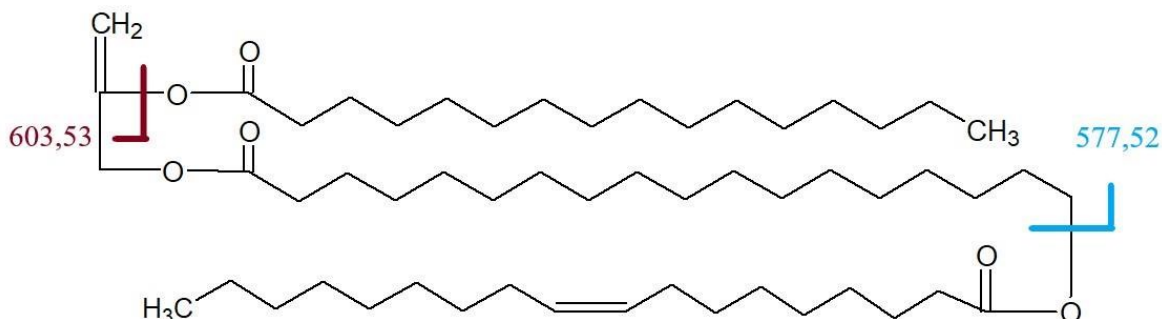
V MS<sup>2</sup> spektru amonného aduktu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA  $m/z$  1133.0399 (Obrázek 10) je nejvyšší signál pro  $m/z$  859,7733, což je dáno neutrální ztrátou kyseliny

FA 16:0 na krajním nebo prostředním uhlíku glycerolu. Méně intenzivní fragment  $m/z$  551,5021 vzniká odštěpením 18-OAHPA. Obdobné měření bylo provedeno i s použitím standardu TG-est 18:0\_18:0\_16-OAHPA ( $C_{73}H_{138}O_8$ ;  $M = 1143.03917$  Da) pro ověření, zda fragmentace probíhá stejným způsobem i u TG-est o jiné molekulové hmotnosti. Tato hypotéza byla potvrzena a při měření vznikaly fragmenty stejným způsobem.

V dalším experimentu byl proveden  $MS^3$  sken amonného aduktu o poměru  $m/z$  1133,0399 (kolizní energie 18 %) a iontu o poměru  $m/z$  859,7733 (kolizní energie 17 %). Pro měření byl použit standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHPA ( $C_{71}H_{134}O_8$ ;  $M = 1115.00787$  Da) o koncentraci 0,2 mg/ml. Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 12. Na Obrázku 13 je znázorněno štěpení vazeb při  $MS^3$  fragmentaci.



**Obrázek 12**  $MS^3$ /CID spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHPA ( $c = 0,2$  mg/ml). Ionizační technika ESI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.



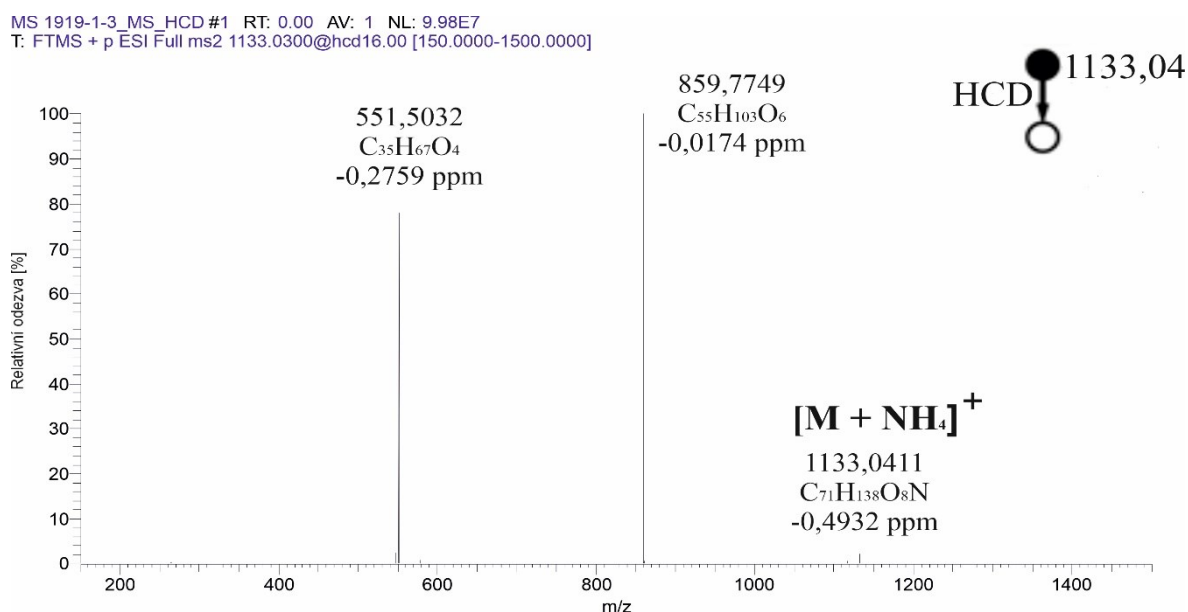
**Obrázek 13**  $MS^3$ /CID fragmentace standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHPA ( $c = 0,2$  mg/ml).

Provedením MS<sup>3</sup> bylo zjištěno, že ion o poměru  $m/z$  603,5335 (C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>4</sub>, -1,95 ppm) náleží fragmentu po neutrální ztrátě 2. kyseliny FA 16:0. Ion o poměru  $m/z$  577,5178 (C<sub>37</sub>H<sub>69</sub>O<sub>4</sub>, -2,18 ppm) náleží fragmentu po neutrální ztrátě kyseliny 18:1 z 18-OAHSA. Ion o poměru  $m/z$  547,5071 (C<sub>36</sub>H<sub>67</sub>O<sub>3</sub>, -2,53 ppm) pak dle elementárního složení náleží pravděpodobně acylovému iontu esterifikované hydroxykyseliny. Ion o poměru  $m/z$  529,5068 (C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>2</sub>, -0,92 ppm) odpovídá fragmentu po neutrální ztrátě vody od fragmentu o poměru  $m/z$  547,5071.

Při dalších měření byla vyzkoušena také fragmentace MS<sup>3</sup> iontu  $m/z$  551,5021, ale nebylo dosaženo dostatečné výtěžnosti iontů pro jejich interpretaci. Dále byla vyzkoušena fragmentace MS<sup>4</sup> ze získaných iontů z předchozího skenu (Obrázek 12). V MS<sup>4</sup> experimentu však opět nebylo dosaženo dostatečné výtěžnosti iontů.

#### 4.2.2 Fragmentace HCD

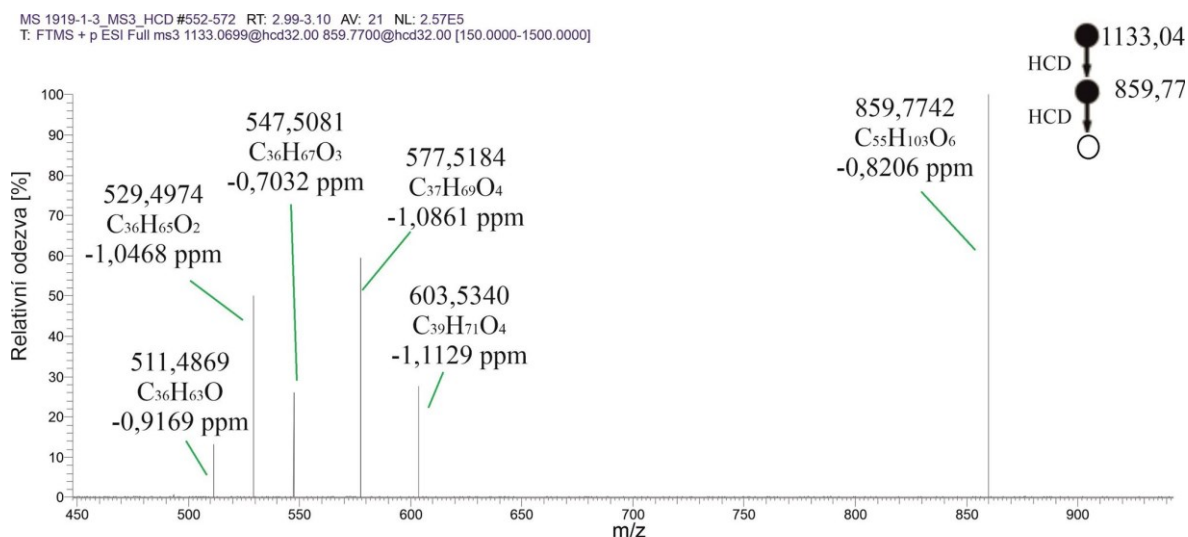
V této kapitole jsou popsána fragmentační spektra s využitím techniky HCD. Standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; M = 1115.00787 Da) o koncentraci 0,2 mg/ml byl změřen přímým nástřikem do proudu acetonitrilu o průtoku 100 µl/min. Během skenování byl přidáván roztok mravenčanu amonného o koncentraci 0,5 mg/ml pomocí pumpy Dionex s rychlostí průtoku 3 µl/min. Kolizní energie 16 %. Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 14.



**Obrázek 14** MS<sup>2</sup>/HCD spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA (c = 0,2 mg/ml). Ionizační technika ESI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

Provedením MS<sup>2</sup> skenu amonného aduktu bylo zjištěno, že vznikají stejné ionty jako při použití techniky CID a tato technika nepřinesla nové informace o fragmentaci standardu. Ve spektru opět pozorujeme ionty o poměru  $m/z$  859,7749 a 551,5032 odpovídající neutrálním ztrátám NH<sub>3</sub> + FA 16:0 a NH<sub>3</sub> + FA 18-OAHSAs. Vznik těchto iontů je již vysvětlen v kapitole 4.2.1 Fragmentace CID.

V dalším experimentu byl proveden MS<sup>3</sup> sken z amonného aduktu o poměru  $m/z$  1133,0411 (kolizní energie 32 %) a iontu o poměru  $m/z$  859,7749 (kolizní energie 32 %). Pro měření byl použit standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSAs (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; M = 1115.00787 Da) o koncentraci 0,2 mg/ml. Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 15.



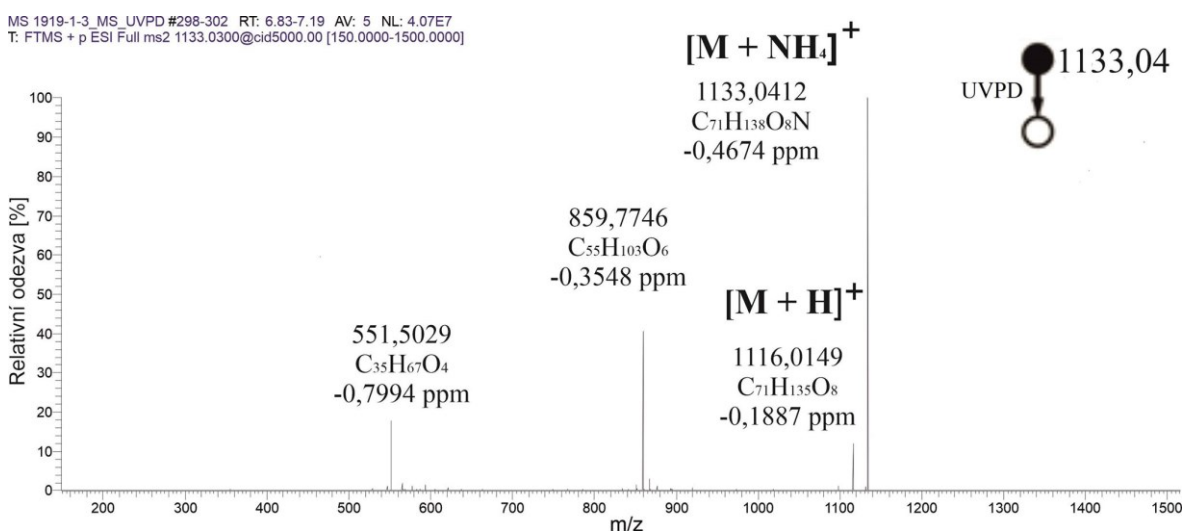
**Obrázek 15** MS<sup>3</sup>/HCD spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSAs (c = 0,2 mg/ml). Kolizní energie 32 %. Ionizační technika ESI. LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu.

Provedením MS<sup>3</sup> skenu z prekurzorového iontu 1133,0411 bylo zjištěno, že vznikají stejné ionty jako při použití fragmentační techniky CID. Technika HCD nepřinesla nové informace o fragmentaci standardu. Ve spektru opět pozorujeme ionty o poměru  $m/z$  603,5340; 577,5184; 547,5081; 529,4974. Tyto ionty jsou již vysvětleny v kapitole 4.2.1 Fragmentace CID. Nově je na tomto spektru pozorován ion  $m/z$  511,4869 (C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>O, -0,92 ppm); který odpovídá fragmentu po neutrální ztrátě vody z fragmentu  $m/z$  529,4974.

Dále bylo vyzkoušeno měření MS<sup>4</sup> ze získaných iontů z předchozího skenu, nicméně výtěžnost iontů opět nebyla dostatečná ani při zvýšení koncentrace analytu a rozšíření izolačních oken.

#### 4.2.3 Fragmentace UVPD

V této kapitole jsou popsána fragmentační spektra s využitím techniky UVPD. Standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; M = 1115.00787 Da) o koncentraci 0,2 mg/ml byl změřen přímým nástřikem do proudu acetonitrilu o průtoku 100 µl/min. Během skenování byl přidáván roztok mravenčanu amonného o koncentraci 0,5 mg/ml pomocí pumpy Dionex s rychlostí průtoku 3 µl/min. Byl proveden MS<sup>2</sup> sken z amonného aduktu o poměru *m/z* 1133,0412 (aktivační čas 5000 ms). Výsledné spektrum je znázorněno na Obrázku 16.



**Obrázek 16** MS<sup>2</sup>/UVPD spektrum standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa (c = 0,2 mg/ml). Ionizační technika ESI s přidavkem. Orbitrap Fusion Lumos Tribrid v pozitivním módu.

Provedením MS<sup>2</sup> skenu bylo zjištěno, že vznikají stejné ionty jako při použití technik CID a HCD a tato technika nepřinesla nové informace o fragmentaci standardu. Ve spektru opět pozorujeme ionty o poměru *m/z* 859,7746 a 551,5029. Tyto ionty jsou již vysvětleny v kapitole 4.2.1 Fragmentace CID. Navíc fragmentační spektrum obsahuje ion s intenzitou cca 10% odpovídající iontu [M + H]<sup>+</sup>. Efektivita fragmentace je nižší než při CID a HCD. Ani při nastavení nejvyššího možného aktivačního času 5000 ms nebylo dosaženo takového

stupně fragmentace, aby intenzita fragmentů převyšovala intenzitu prekurzoru. Z tohoto důvodu se již v dalších MS<sup>n</sup> fragmentacích nepokračovalo.

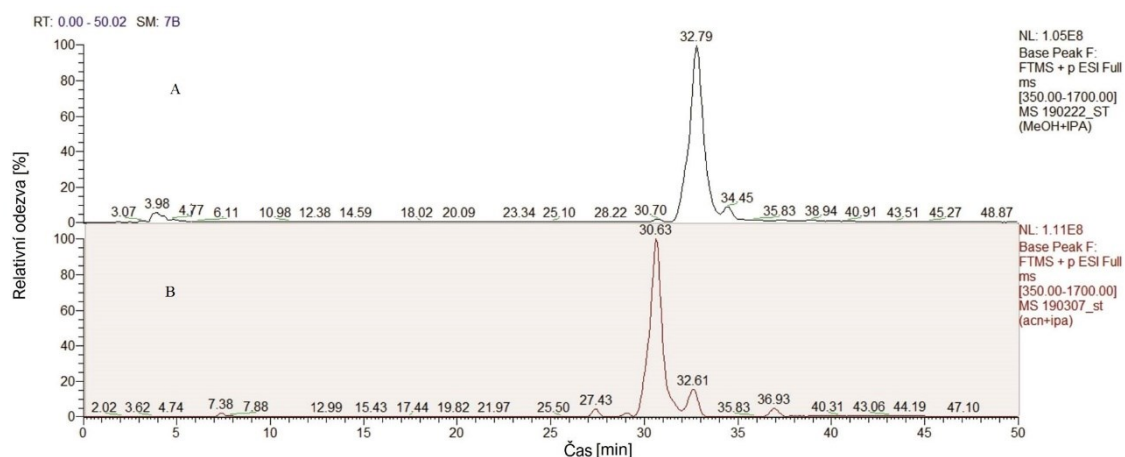
V této kapitole byly vyzkoušeny tři různé fragmentační techniky s cílem prozkoumat fragmentaci TG-est – CID, HCD a UVPD. Tímto experimentem bylo zjištěno, že výběr fragmentační techniky nemá příliš velký vliv na podobu fragmentačních spekter. Pro měření lze použít CID a HCD. UVPD je nejméně vhodná v důsledku nízké výtěžnosti fragmentace. Pro další experimenty byla vybrána fragmentace CID.

### 4.3 Optimalizace podmínek HPLC/MS

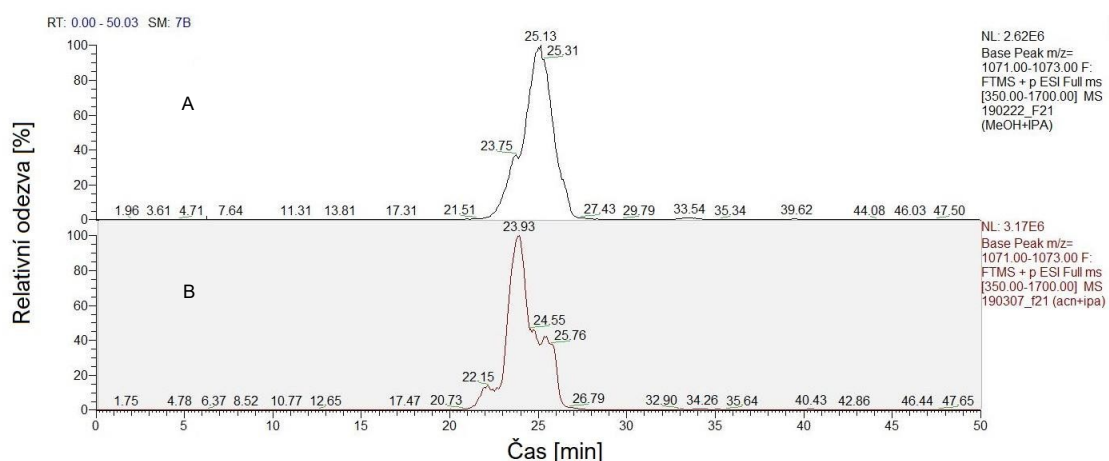
Dalším krokem byla optimalizace podmínek HPLC/MS. V první fázi optimalizace byla zvolena kolona C18 Nova-Pak, na které byla již v minulosti prováděna separace jiných lipidových frakcí VC a vykazuje dobrou separační účinnost při analýze nepolárních lipidů. Teplota kolonového termostatu byla nastavena na 30 °C. Pro měření byly použity standardy TG-est. Měření bylo prováděno na přístroji LCQ Fleet s ionizační technikou ESI v pozitivním módu. MS metoda byla automaticky naladěna na standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa (C<sub>71</sub>H<sub>134</sub>O<sub>8</sub>; Mr = 1115.00787 Da) pro přímý nástřik do proudu acetonitrilu o průtoku 100 µl/min. Mezi optimalizovanými parametry HPLC bylo složení mobilní fáze, typ kolony a délka gradientového programu.

#### 4.3.1 Složky mobilní fáze

Pro chromatografii byl použit standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa o koncentraci 0,1 mg/ml a 0,001 mg/ml. Postkolonově byl přidáván mravenčan amonný o koncentraci 0,5 M a průtoku 3 µl/min. Gradientová eluce byla nastavena na 50 minut. Složení gradientového programu bylo sestaveno na základě získaných výsledků minulých separací lipidů v laboratoři, více uvedeno v Tabulce 1. Testovány byly dvě kombinace rozpouštědel pro vytváření rozpouštědlového gradientu – MeOH/IPA a ACN/IPA. Porovnání výsledných chromatogramů je uvedeno na Obrázku 17. Majoritní pík o intenzitě 100 % odpovídá měřenému standardu. Ostatní malé píky jsou nečistoty ze syntézy standardu. Stejný experiment byl proveden s použitím vzorku izolovaného z VC, tedy frakce č. 21, o koncentraci 5 mg/ml. Porovnání výsledných chromatogramů je znázorněno na Obrázku 18. Pro porovnání byl vybrán nejintenzivnější ion TG-est *m/z* 1072,9433.



**Obrázek 17** HPLC/MS chromatogramy standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA ( $c = 0,1 \text{ mg/ml}$ ) při použití různých mobilních fází – A: MeOH/IPA a B: ACN/IPA. Ionizační technika ESI. Kolona Nova-Pak C18. LCQ Fleet.



**Obrázek 18** HPLC/MS chromatogramy frakce č. 21 ( $c = 5 \text{ mg/ml}$ ) rekonstruovaný pro  $m/z$  1072,9433 při použití různých mobilních fází – A: MeOH/IPA a B: ACN/IPA. Ionizační technika ESI. Kolona Nova-Pak C18. LCQ Fleet.

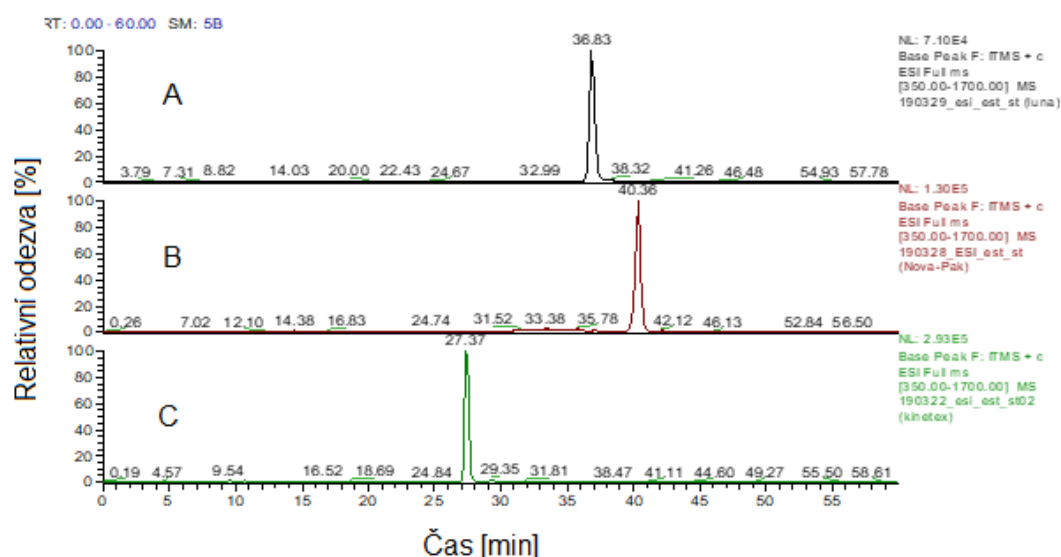
**Tabulka 1** - Složení gradientového programu. A: MeOH nebo ACN. B: IPA.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok mobilní fáze [ $\mu\text{l/min}$ ]
0	70	30	350
35	0	100	250
40	0	100	250
45	70	30	350
50	70	30	350

Na výsledném chromatogramu standardu naměřeném s mobilní fází MeOH/IPA (Obrázek 17) je retenční čas standardu 32,79 min. Při použití kombinace rozpouštědel ACN/IPA bylo pozorováno zkrácení retenčního času o cca 2 minuty. Šířka píku při základně je v obou případech stejná – cca 2 min. Při použití směsi TG-est z VC (Obrázek 18) byl pozorován rozdíl v účinnosti separace izomerů TG-est. Je zřejmé, že při kombinaci rozpouštědel ACN/IPA dochází k částečnému rozdělení izomerů obsažených ve vzorku. Také citlivost měření ve směsi rozpouštědel ACN/IPA byla o 20 % vyšší. Po tomto experimentu byla vybrána jako nejvhodnější mobilní fáze pro separaci TG-est ACN/IPA.

### 4.3.2 Stacionární fáze

Dalším optimalizovaným parametrem byl výběr chromatografické kolony. Pro chromatografii byl použit TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHTSA ( $C_{71}H_{134}O_8$ ;  $M = 1115.00787$  Da) o koncentraci 0,001 mg/ml. Postkolonově byl přidáván mravenčan amonný o koncentraci 0,5 M a průtoku 3  $\mu$ l/min. Testované byly tři kolony – Luna Phenyl-Hexyl, Nova-Pak C18 a Kinetex C18. Mobilní fáze byla připravena z ACN/IPA podle gradientového programu uvedeného v Tabulce 2. Porovnání výsledných chromatogramů je uvedeno na Obrázku 19.

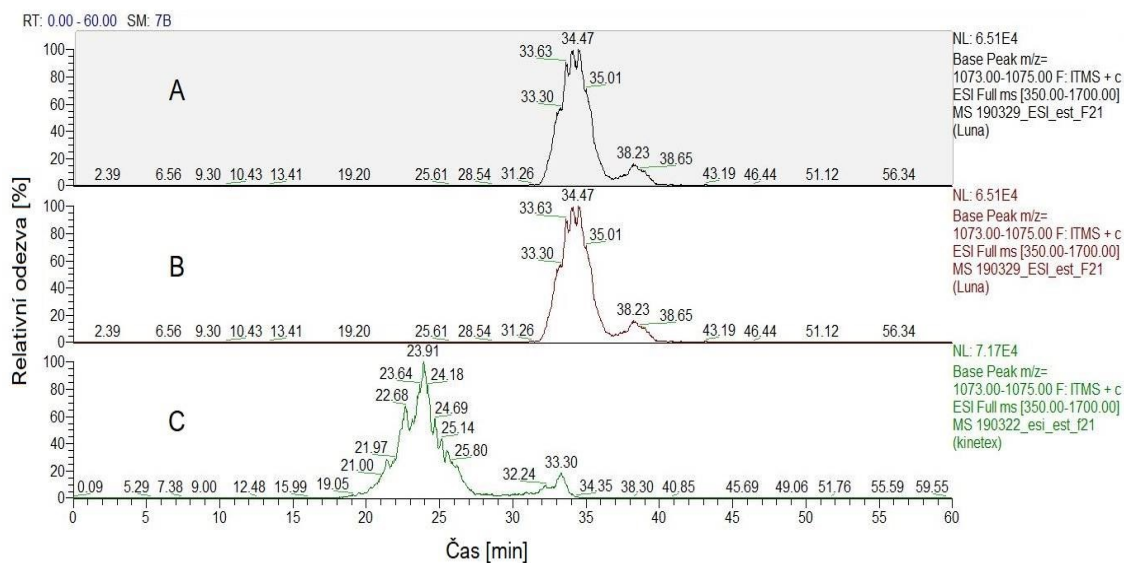


**Obrázek 19** HPLC/MS chromatogramy standardu TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHTSA ( $c = 0,001$  mg/ml) při použití různých stacionárních fází – A: Luna Phenyl-Hexyl, B: Nova-Pak C18, C: Kinetex C18. Ionizační technika. Mobilní fáze ACN/IPA. LCQ Fleet.

**Tabulka 2** Složení gradientového programu. A: ACN. B: IPA.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok mobilní fáze [ $\mu$ l/min]
0	70	30	150
35	0	100	120
55	0	100	120
60	70	30	150

Při porovnání výsledných chromatogramů na Obrázku 19 je zřejmé, že při použití chromatografické kolony Kinetex C18 je pík analytu oproti ostatním kolonám výrazně vyšší a užší. Ze zmíněných hledisek v porovnání s ostatními testovanými kolonami je Kinetex C18 nejlepší. Pro otestování selektivity kolon byl stejný experiment proveden s použitím vzorku izolovaného z VC (frakce č. 21) o koncentraci 5 mg/ml. Porovnání výsledných extrahovaných chromatogramů nejintenzivnějšího píku TG-est  $m/z$  1072,9433 je znázorněno na Obrázku 20. Dělení izomerů TG-est stejné molární hmotnosti se projevuje širší distribucí jeho iontu v HPLC/MS záznamu. Kolona Luna Phenyl-Hexyl je nejméně selektivní, protože v záznamu je signál sledovaného iontu v nejužší oblasti retenčních časů 32 min až 36,5 min (4,5 min). Zbývající dvě kolony mají podobnou schopnost separovat izomery TG-est při nastavených parametrech. Při použití Kinetex C18 a Nova-Pak C18 je záznam v rozsahu 19 min až 28 min (9 min) respektive 30 min až 40 min (10 min). Porovnáním všech parametrů se jako nejlepší z testovaných kolon ukázala kolona Kinetex C18.



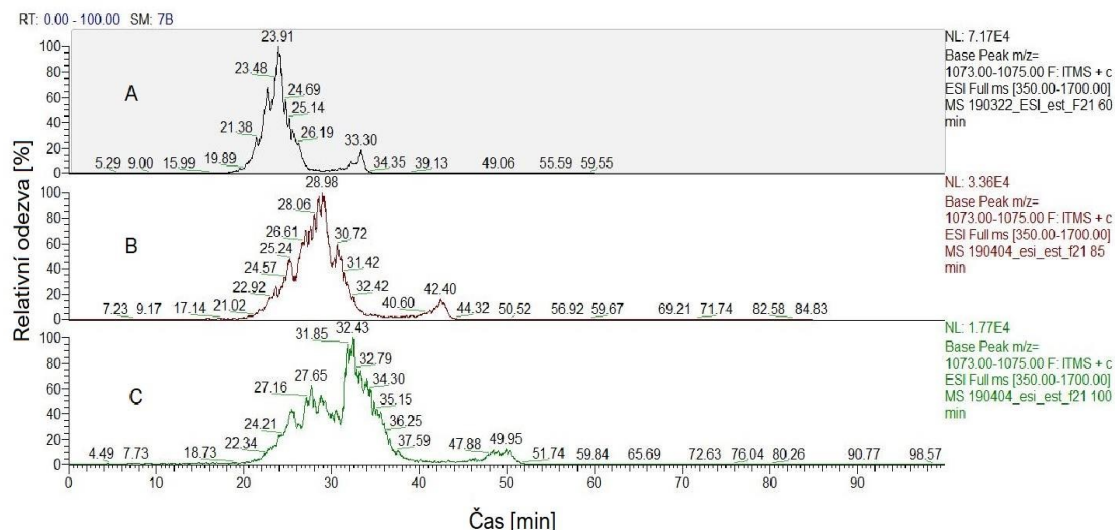
**Obrázek 20** HPLC/MS chromatogramy frakce č. 21 ( $c = 5$  mg/ml) při použití různých stacionárních fází – A: Luna Phenyl-Hexyl, B: Nova-Pak C18, C: Kinetex C18. Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. LC/Q Fleet.

Při použití kolony Kinetex C18 se analýza zkrátí díky nejnižším retenčním časům TG-est a její použití je vhodné i z hlediska selektivity. Porovnáme-li chromatogramy standardu a reálného vzorku, standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSA eluje na všech kolonách později, než je maximum signálu reálného vzorku. TG-est odpovídající molární hmotností syntetizovaného standardu je zastoupen ve vzorku jen ve stopovém množství. V reálném vzorku jsou TG-est s nižší molární hmotností a vyšším počtem dvojných vazeb.

### 4.3.3 Gradientový program

Dalším optimalizovaným parametrem bylo složení a délka gradientového programu. Ostatní podmínky byly zvoleny dle předchozí optimalizace – kolona Kinetex C18 a mobilní fáze ACN/IPA. Byl vyzkoušen program o délce 60, 85 a 100 minut. Počáteční podmínky byly nastaveny u všech analýz stejně, 70 % ACN a 30 % IPA. Byla měněna rychlost nárůstu koncentrace IPA. Gradientové programy jsou uvedeny v Tabulce 3, 4 a 5. V důsledku vysokého zpětného tlaku na koloně při použití vysokých koncentrací IPA bylo nutné snižovat průtok mobilní fáze. Měřeným vzorkem byla frakce č. 21 o koncentraci 5 mg/ml. Porovnání extrahovaných chromatogramů nejintenzivnějšího píku TG-est  $m/z$  1072,9433 je znázorněno na Obrázku 21. Jako nejvhodnější doba měření byla zvolena analýza v trvání

100 minut (Tabulka 5). Důvodem je širší eluční zóna TG-est s předpokladem lepšího separačního dělení v rámci izomerů.



**Obrázek 21** HPLC/MS chromatogramy frakce č. 21 (c = 5 mg/ml) při různé délce analýzy – A: 60 min., B: 85 min., C: 100 min. Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. Kolona Nova-Pak C18. LCQ Fleet.

**Tabulka 3** Složení 60minutového gradientového programu s nárůstem koncentrace IPA 2 %/min. A: ACN. B: IPA.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok mobilní fáze [ $\mu$ l/min]
0	70	30	150
35	0	100	120
55	0	100	120
60	70	30	150

**Tabulka 4** Složení 85minutového gradientového programu s nárůstem koncentrace IPA 1,4 %/min. A: ACN. B: IPA.

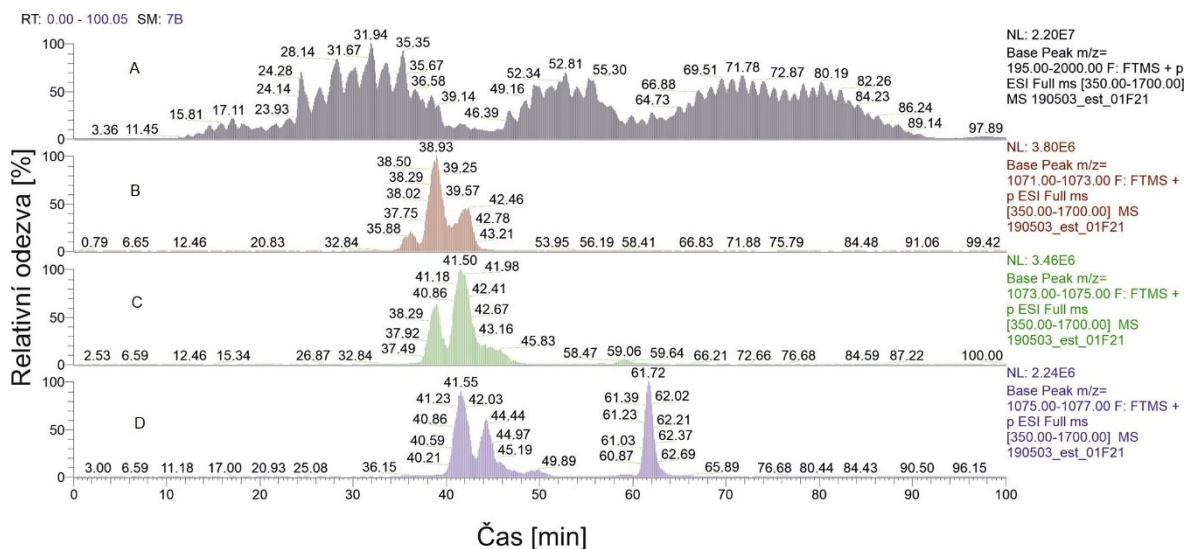
Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok mobilní fáze [ $\mu$ l/min]
0	70	30	150
50	0	100	120
75	0	100	120
80	70	30	120
85	70	30	150

**Tabulka 5** Složení 100minutového gradientového programu s nárůstem koncentrace IPA 1 %/min. A: ACN. B: IPA.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok mobilní fáze [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]
0	70	30	150
70	0	100	120
90	0	100	120
95	70	30	120
100	70	30	150

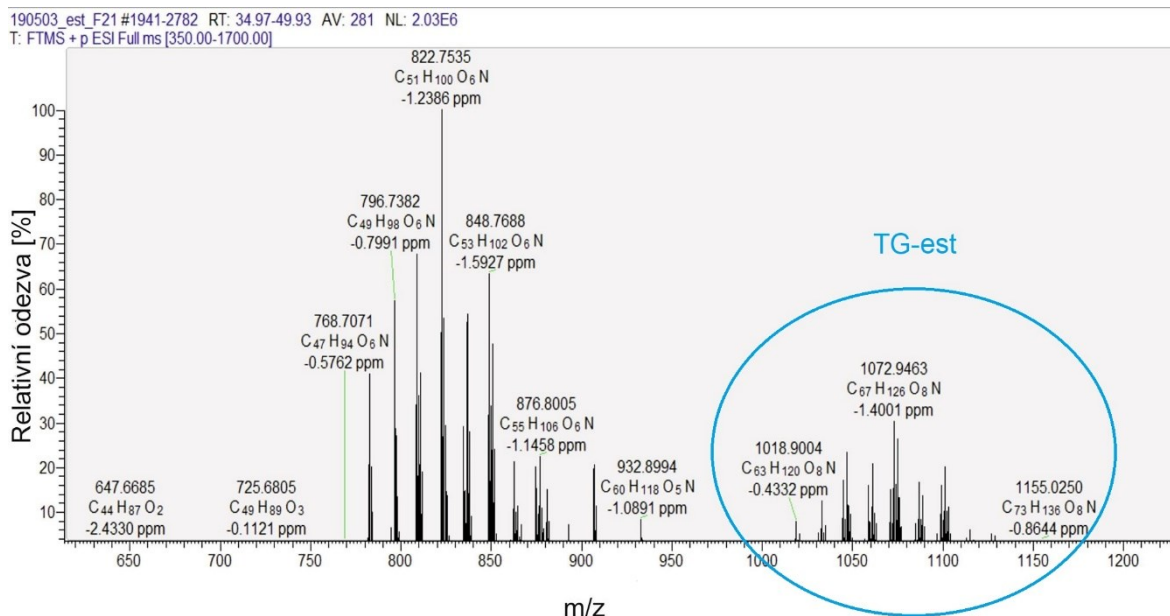
#### 4.4 Výsledné měření reálného vzorku

Pro výsledné měření reálného vzorku byla použita frakce č. 21 o koncentraci 10 mg/ml. Měření bylo prováděno na přístroji LCQ Orbitrap s ionizační technikou ESI v pozitivním módu. Postkolonově byl přidáván mravenčan amonný o koncentraci 0,5 M a průtoku 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Pro měření byly zvoleny optimální podmínky dle výsledků z předchozí kapitoly 4.4 Optimalizace podmínek HPLC/MS. Jako stacionární fáze byla použita kolona Kinetex C18. Jako mobilní fáze bylo použito složení ACN/IPA. Délka analýzy činila 100 minut a složení gradientového programu je uvedeno v Tabulce 5. Výsledný chromatogram spolu s extrahovanými nalezenými nejintenzivnějšími píky TG-est je uveden na Obrázku 22.



**Obrázek 22** HPLC/MS chromatogramy frakce č. 21 ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ ). Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. Kolona Nova-Pak C18. Délka analýzy 100 minut. A: celkový iontový proud. B: ion  $m/z$  1072,9463. C: ion  $m/z$  1074,9616. D: ion  $m/z$  1076,9706. LTQ Orbitrap XL.

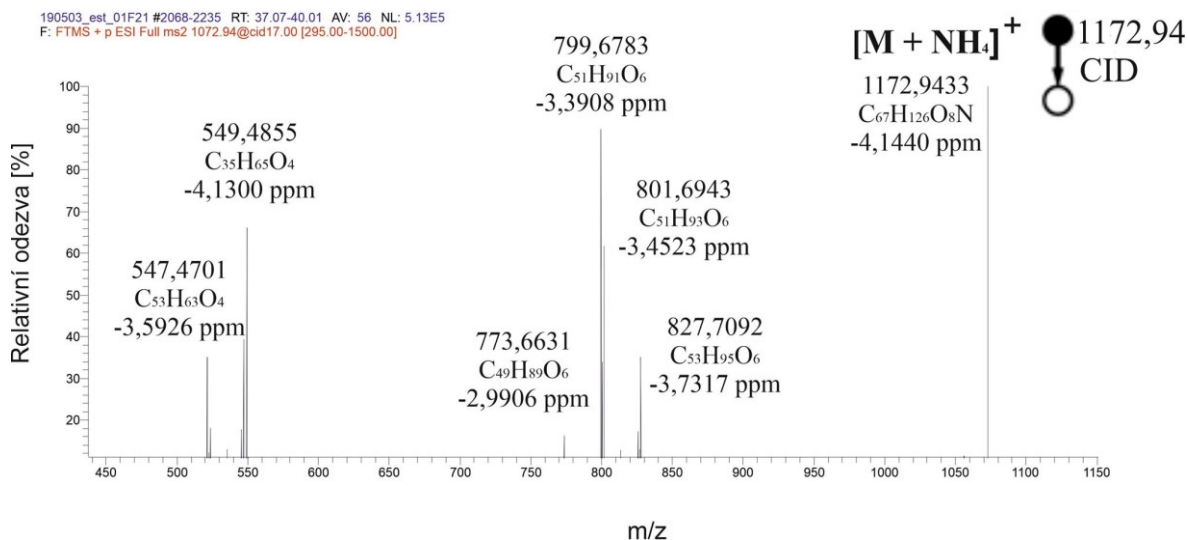
Na Obrázku 22 je znázorněn průběh chromatografie v celém rozsahu (A) spolu s extrahovanými píky TG-est  $m/z$  1072,9463 (B), 1074,9616 (C) a 1076,9706 (D). Eluční čas TG-est je v rozmezí cca od 35. až 50. minuty. MS spektrum integrované přes oblast eluce TG-est (35 až 50 min) je znázorněno na Obrázku 23. Spolu s TG-est se v této oblasti vyskytují ještě zbytky TG ( $m/z$  800 až 900). Třída TG je majoritní lipidová složka VC. Malé množství bylo přítomno v analyzované frakci obsahující TG-est.



**Obrázek 23** MS spektrum frakce č. 21 ( $c = 10$  mg/ml) integrované přes oblast eluce TG-est (35 až 50 min). Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. Kolona Nova-Pak C18. Délka analýzy 100 minut. LTQ Orbitrap XL.

Na výsledném MS spektru (Obrázek 23) je označena oblast TG-est z frakce č. 21. Distribuce iontů TG-est se pohybuje v rozmezí  $m/z$  990 až 1160. Z klastru TG-est je majoritní pík s nejintenzivnějším signálem  $m/z$  1072,9463 ( $C_{67}H_{125}O_8$ , -1,40 ppm). Tento ion byl dále vybrán jako prekurzor pro  $MS^2$ -CID fragmentace.

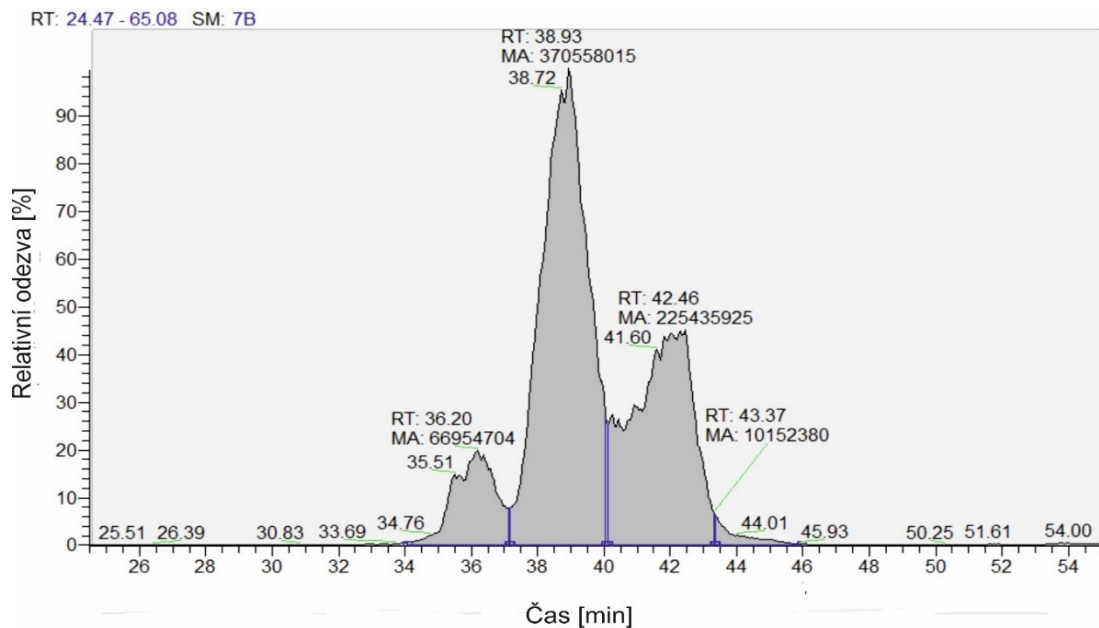
V následujícím experimentu byl proveden  $MS^2$  sken frakce č. 21 ( $c = 10$  mg/ml) z prekurzorového iontu o poměru  $m/z$  1072,9433, který byl nejintenzivnějším píkem v klastru TG-est (Obrázek 23). Výsledné  $MS^2$  spektrum prekurzorového iontu je znázorněno na Obrázku 24.



**Obrázek 24** MS<sup>2</sup> spektrum z precursorového ionu  $m/z$  1072,9433. Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. Kolona Nova-Pak C18. Délka analýzy 100 minut. Kolizní energie 17 %. LTQ Orbitrap XL.

Na výsledném MS<sup>2</sup> spektru (Obrázek 24) je pozorován precursorový ion v podobě amonného aduktu  $[M + NH_4]^+$  o poměru  $m/z$  1072,9433 a jeho fragmenty v rozsahu  $m/z$  440 až 580 a 770 až 830, které odpovídají neutrálním FA a OAHFA, podobně jako fragmentační spektra synteticky připravených standardů.

Na základě výše získaných dat v této kapitole a vytvoření rekonstruovaného chromatogramu, který byl integrován na 4 různé píky (1: 34–37 min., 2: 37–40 min., 3: 40–43,4 min., 4: 43,5–46 min.) pro nejintenzivnější ion  $m/z$  1072,9433 (Obrázek 25), bylo provedeno základní vyhodnocení díky MS<sup>2</sup> fragmentaci uvedené v Tabulce 6, kde jsou identifikovány neutrální ztráty FA a OAHFA u TG-est. Neutrální ztráty byly vyhodnoceny pro všechny 4 integrované píky.



**Obrázek 25** Rekonstruovaný chromatogram píku  $m/z$  1072,9433. Integrováno na 4 píky (1: 34–37 min., 2: 37–40 min., 3: 40–43,4 min., 4: 43,5–46 min.).

**Tabulka 6** Identifikace neutrálních ztrát FA a OAHFA z píku  $m/z$  1072,9433. Tučně výskyt nad 80 %.

Retenční čas [min]	34-37	37-40	40-43,5	43,5-46
Relativní plocha píku 1072,9433 [%]	2,1	59,3	37,8	0,8
FA	14:0 15:0 <b>16:0</b> 16:1 17:0 18:1 18:0	14:0 15:1 <b>16:1</b> 16:2 18:1	<b>14:0</b> 14:1 15:0 <b>16:1</b> 16:0 18:1	14:1 <b>16:1</b> 16:0 18:1 18:0
OAHFA	30:1 30:0 32:2 <b>32:1</b> 32:0 33:2 34:2 34:1	30:2 30:1 30:0 <b>32:2</b> 32:1 32:0 33:2 34:3 <b>34:2</b>	30:2 30:1 30:0 32:3 <b>32:2</b> 32:1 32:0 33:3 33:2 <b>34:3</b> 34:2	30:2 30:1 30:0 32:3 32:2 32:1 33:2 34:3 34:2

Na základě získaných dat z Tabulky 6 s počty uhlíků FA a OAHFA a počtu dvojných vazeb byla pro prekurzorový ion TG-est  $m/z$  1072,9433 (64:3) sestrojena Tabulka 7, ve které jsou navrženy možné kombinace složení FA a OAHFA pro 4 integrované píky (1: 34–37 min., 2: 37–40 min., 3: 40–43,4 min., 4: 43,5–46 min.). Výsledné složení se může vzájemně kombinovat dle umístění FA a OAHFA na glycerolovém skeletu.

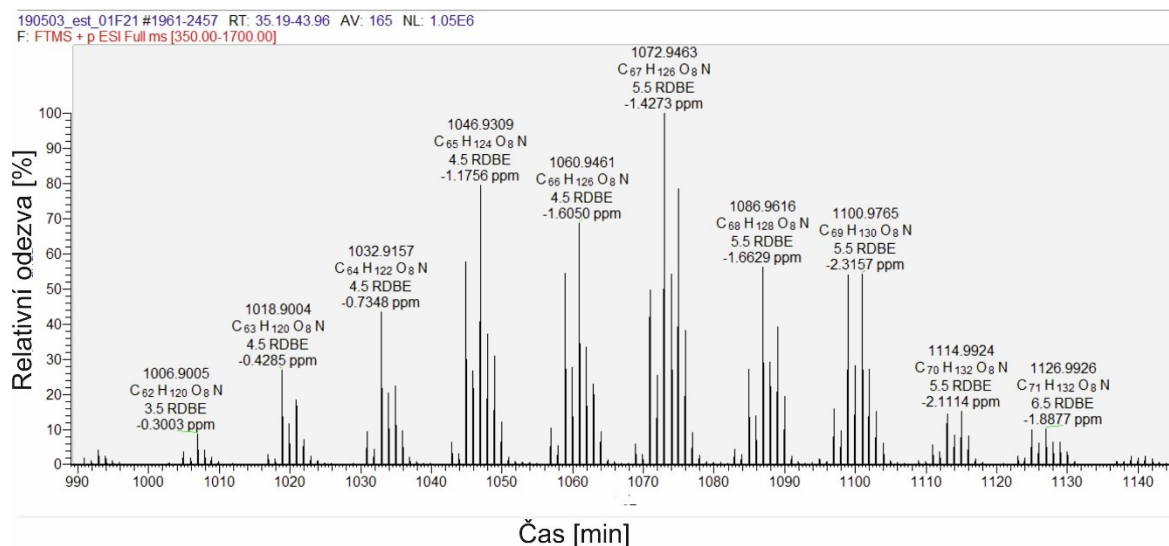
**Tabulka 7** Možné složení prekurzorového iontu TG-est  $m/z$  1072,9433 (64:3). Tučně výskyt nad 80 %.

Retenční čas píku [min]	FA	OAHFA	Složení TG-est
34-37	14:0 15:0 <b>16:0</b> 16:1 17:0 18:1 18:0	30:1 30:0 32:2 <b>32:1</b> 32:0 33:2 34:2 34:1	14:0_16:1_34:2, 14:0_18:1_32:2, 15:0_16:1_33:2, <b>16:0</b> _16:1_32:2, 16:1_16:1_ <b>32:1</b> , 16:1_18:1_30:1.
37-40	14:0 15:1 <b>16:1</b> 16:2 18:1	30:2 30:1 30:0 <b>32:2</b> 32:1 32:0 33:2 34:3 <b>34:2</b>	14:0_16:1_34:2, 14:0_18:1_32:2, <b>16:1</b> _16:1_32:1, <b>16:1</b> _16:2_32:0, <b>16:1</b> _18:1_30:1.
40-43,5	<b>14:0</b> 14:1 15:0 <b>16:1</b> 16:0 18:1	30:2 30:1 30:0 32:3 <b>32:2</b> 32:1 32:0 33:3 33:2 <b>34:3</b> 34:2	<b>14:0</b> _16:1_34:2, <b>14:0</b> _16:0_34:3, <b>14:0</b> _18:1_32:2, 14:1_16:0_34:2, 14:1_18:1_32:1, 15:0_15:0_34:3, 15:0_16:1_33:2, 15:0_16:0_33:3, <b>16:1</b> _16:1_32:1, <b>16:1</b> _16:0_32:2, <b>16:1</b> _18:1_30:1, 16:0_16:0_32:3, 16:0_18:1_30:2.

**Tabulka 7** pokračování

Retenční čas píku [min]	FA	OAHFA	Složení TG-est
43,5-46	14:1	30:2	14:1_16:0_34:2, 14:1_18:1_32:1, 14:1_18:0_32:2, <b>16:1_16:1_32:1</b> , <b>16:1_16:0_32:2, 16:1_18:1_30:1</b> , <b>16:1_18:0_30:2, 16:0_16:0_32:3</b> , 16:0_18:1_30:2.
	<b>16:1</b>	30:1	
	16:0	30:0	
	18:1	32:3	
	18:0	32:2	
		32:1	
		33:2	
		34:3	
		34:2	

Z fragmentačních MS<sup>2</sup> spekter nejvyššího píku  $m/z$  1072,9433 byly identifikovány FA se 14 až 18 atomy uhlíku a 0-2 dvojnými vazbami. Pro OAHFA bylo identifikováno 30 až 34 atomů uhlíku s 0-3 dvojnými vazbami. Ze spektra integrovaného píku přes retenční čas TG-est (Obrázek 26) bylo vyhodnoceno následující: TG-est mají 61 až 79 atomů uhlíku (maximální distribuce 67 atomů uhlíku) a 0 až 6 dvojných vazeb (nejčastěji 2 až 4 dvojně vazby). Viditelné ionty ve spektru  $m/z$  1000 až 1130 jsou shrnuty v Tabulce 8.



**Obrázek 26** Přibližné MS spektrum TG-est z frakce č. 21 ( $c = 10$  mg/ml). Ionizační technika ESI. Mobilní fáze ACN/IPA. Kolona Nova-Pak C18. Délka analýzy 100 minut. LTQ Orbitrap XL.

**Tabulka 8** Ionty TG-est nacházející se ve frakci č. 21. Nejintenzivnější ion  $m/z$  1072.9463 je v tabulce graficky označen. Tučně nejintenzivnější ion.

Ion $m/z$	Elementární složení	Počet dvojných vazeb	Chyba měření [ppm]
1006,9005	C <sub>62</sub> H <sub>120</sub> O <sub>8</sub> N	1	-0,30
1018,9004	C <sub>63</sub> H <sub>122</sub> O <sub>8</sub> N	2	-0,43
1032,9157	C <sub>64</sub> H <sub>122</sub> O <sub>8</sub> N	2	-0,73
1046,9309	C <sub>65</sub> H <sub>124</sub> O <sub>8</sub> N	2	-1,18
1060,9461	C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> O <sub>8</sub> N	2	-1,61
<b>1072,9463</b>	<b>C<sub>67</sub>H<sub>126</sub>O<sub>8</sub>N</b>	<b>3</b>	<b>-1,43</b>
1086,9616	C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> O <sub>8</sub> N	3	-1,66
1100,9765	C <sub>69</sub> H <sub>130</sub> O <sub>8</sub> N	3	-2,32
1114,9924	C <sub>70</sub> H <sub>132</sub> O <sub>8</sub> N	3	-2,11
1126,9926	C <sub>71</sub> H <sub>132</sub> O <sub>8</sub> N	4	-1,89

## 4.5 Izolace estolidů z frakce 21 pomocí TLC

Přestože je možné frakci č. 21 přímo analyzovat pomocí HPLC/MS, stále je poměrně velmi komplexní směsí lipidů. Z tohoto důvodu byla pro dosažení maximální citlivosti při analýze TG-est vyzkoušena izolace pomocí tenkovrstvé chromatografie. Cílem této metody bylo pokusit se separovat a izolovat samotné TG-est od ostatních složek frakce.

### 4.5.1 Optimalizace TLC

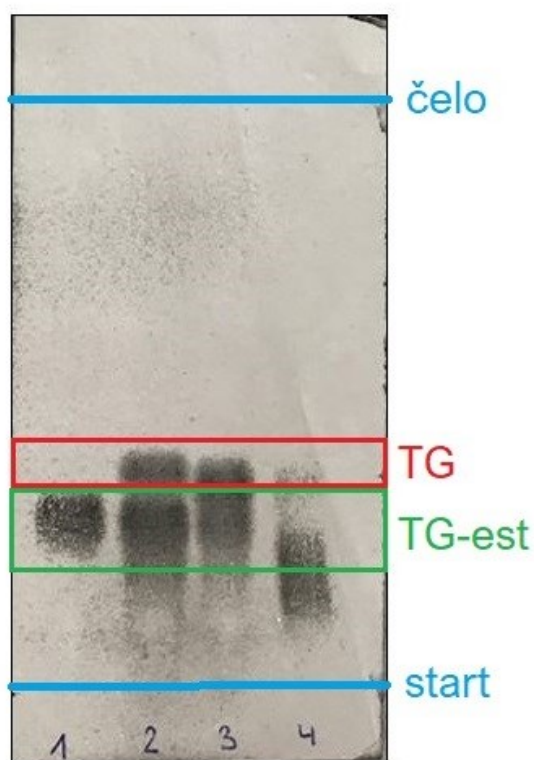
Optimalizovanými parametry bylo složení mobilní a stacionární fáze. Na TLC desku byly nanášeny pro porovnání dělicí schopnosti standardy TG-est o koncentraci 1 mg/ml.

Testované mobilní fáze: hexan, 20 % diethylether, 0,1 % kyselina mravenčí; hexan, 25 % diethylether 0,1 % kyselina mravenčí; hexan, 30 % diethylether 0,1 % kyselina mravenčí. Testované stacionární fáze: TLC deska připravená v laboratoři, pokrytá SiO<sub>2</sub>, 5 × 10 cm; HPTLC Silica gel 60 RP-18, výrobce Merck Millipore, 20 × 10 cm; Nano-Silica XHL HPTLC Plates W/UV254, výrobce Sorbtech, 10 × 10 cm.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo při použití mobilní fáze o složení 20 % diethylether v hexanu s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí a stacionární fáze komerční deska NanoSilica XHL HPTLC W/UV254, výrobce Sorbtech, 10 × 10 cm. Doba vyvíjení byla cca 10 minut.

#### 4.5.2 Výsledek TLC

Výsledná analytická chromatografie byla prováděna již za zjištěných optimálních podmínek. Jako mobilní fáze byl použit hexan s 20 % diethyletheru a 0,1 % kyseliny mravenčí. Jako stacionární fáze byla použita TLC deska Nano-Silica XHL HPTLC W/UV254. Do pozice č. 1 byl nanesen standard TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa. Do pozice č. 2 byl nanesen standard TG-est 18:0\_18:0\_16-OAHPA. Do pozice č. 3 byl nanesen stejný standard jako do pozice č. 2, ale s přidavkem TGs. Všechny standardy byly nanášeny o koncentraci 1 mg/ml. Do pozice č. 4 byla nanesena frakce č. 21 o koncentraci 1 mg/ml. Doba vyvíjení byla cca 10 minut. Detekce byla provedena postříkáním  $H_2SO_4$  a následným vysušením desky. Výsledek TLC je uveden na Obrázku 27. Na získaném chromatogramu TLC je patrné, že standard použitý v pozici č. 1 je bez výrazné příměsi vedlejších produktů jeho syntézy, zatímco v pozici č. 2 je standard znečištěn TGs. Pro další porovnání s frakcí č. 21 a označení TG-est byl tedy použit standard z pozice č. 1.



**Obrázek 27** TLC deska s nanesenými standardy a frakcí č. 21. 1: TG-est 16:0\_16:0\_18-OAHSa. 2: TG-est 18:0\_18:0\_16-OAHPA. 3: TG-est 18:0\_18:0\_16-OAHPA + TG. 4: frakce č. 21. Mobilní fáze hexan:diethylether (80:20) s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí.

Dalším krokem bylo provedení semipreparativní chromatografie s cílem izolovat z frakce č. 21 pouze TG-est. Jako mobilní fáze byl použit hexan s 20 % diethyletheru a 0,1 % kyseliny mravenčí. Jako stacionární fáze byla použita TLC deska Nano-Silica XHL HPTLC W/UV254. Na dvě TLC desky byla rovnoměrně nanášena frakce č. 21 o koncentraci 5 mg/ml a objemu 450  $\mu$ l. Po vyvinutí byla použita detekce pomocí primulinu. S použitím TLC separace standardu byla označena oblast TG-est. Sorbent byl z označeného místa seškrábnut do připravené kolonky a eluován etherem. Po odpaření etheru byl výtěžek zvážen. Ze dvou TLC desek bylo získáno 0,59 mg materiálu, což odpovídalo výtěžku přibližně 26 %. Získaný materiál byl rozpuštěn chloroformem na koncentraci 5 mg/ml. Vzorek byl otestován nástřikem do proudu 0,2 ml acetonitrilu přivedeného do hmotnostního spektrometru LCQ Fleet za použití APCI iontového zdroje. Po vyhodnocení získaného záznamu se ve vzorku nenacházely hledané osmikyslíkaté látky, což bylo pravděpodobně způsobeno malým výtěžkem chromatografie. Tato výtěžnost lze ovlivnit navýšením nanášeného množství frakce č. 21 a počtu TLC desek. Nicméně po interpretaci chromatogramu byly ve vzorku stále majoritní píky TGs a nedošlo tedy k požadované separaci estolidů od TGs. Z tohoto důvodu se již v experimentu nepokračovalo a získaný vzorek nebyl pro další analýzu použit.

## 5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala charakterizací TG-est pomocí HPLC/MS. S využitím syntetizovaných standardů byla studována jejich ionizace. Byly vyzkoušeny dva způsoby ionizace – ESI a APCI. Jako optimální způsob ionizace pro TG-est byla zvolena technika ESI v přítomnosti amonných solí. Při této ionizaci byla pozorována tvorba amonných aduktů. Dále byly porovnávány fragmentační techniky CID, HCD a UVPD. Všechny techniky poskytovaly podobná MS<sup>2</sup> a MS<sup>3</sup> spektra, avšak technika UVPD vykazovala malou účinnost fragmentace. Pro další experimenty byla zvolena technika CID, nicméně HCD i CID techniky jsou pro strukturní charakterizaci TG-est vhodné.

Metoda HPLC/MS byla optimalizována pro charakterizaci směsi TG-est izolované z VC. Optimalizovanými parametry bylo složení stacionární a mobilní fáze a gradientový program. Optimální podmínky byly zvoleny následovně: ionizační technika ESI, kolona Kinetex C18, mobilní fáze ACN/IPA a byl vybrán vhodný gradient s nárůstem koncentrace IPA 1 %/min. S využitím optimalizované HPLC/MS metody byla charakterizována směs TG-est získaná z VC. Bylo zjištěno, že TG-est izolované z VC obsahují 61-79 uhlíků a 0-6 dvojných vazeb. Z fragmentačních spekter MS<sup>2</sup> nejvyššího píku MS byly identifikovány mastné kyseliny se 14 až 18 atomy uhlíku a 0-2 dvojnými vazbami. Pro OAHFA bylo identifikováno 30 až 34 atomů uhlíku s 0-3 dvojnými vazbami.

Vzhledem k tomu, že použitá lipidová frakce VC obsahující TG-est byla stále poměrně komplexní směsí a neobsahuje pouze TG-est, byla provedena separace pomocí TLC. Pro tuto metodu bylo optimalizováno složení mobilní a stacionární fáze. Jako optimální mobilní fáze bylo zvoleno hexan:diethylether (80:20) s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí a jako optimální stacionární fáze byla zvolena deska Nano-Silica XHL HPTLC Plates W/UV254, výrobce Sorbtech, 10 × 10 cm. Vzorek získaný touto separací byl měřen pomocí HPLC/MS, nicméně i přes pokusy izolovat samotné TG-est tato metoda nebyla úspěšná a vzorek byl stále i po TLC separaci velmi komplexní směsí lipidů.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Zhang H., D. J. H. Olson, D. Van, R. W. Purves a M. A. Smith. Rapid identification of triacylglycerol-estolides in plant and fungal oils. *Industrial Crops and Products*. 2012, **37**(1), 186–194.
- 2 McLean S., N. W. Davies, D. S. Nichols a B. J. McLeod. Triacylglycerol Estolides, a New Class of Mammalian Lipids, in the Paracloacal Gland of the Brushtail Possum (*Trichosurus vulpecula*). *Lipids*. 2015, **50**(6), 591–604.
- 3 Tollin M., G. Bergsson, Y. Kai-Larsen, J. Lengqvist, J. Sjøvall, W. Griffiths, G. V. Skúladóttir, Á. Haraldsson, H. Jorvall, G. H. Gudmundsson a B. Agerberth. Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids, and their interactions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2005, **62**(19–20), 2390–2399.
- 4 Singh G. a G. Archana. Unraveling the mystery of vernix caseosa. *Indian Journal of Dermatology*. 2008, **53**(2), 54–60.
- 5 Monteagudo B., J. Labandeira, E. León-Muinos, R. Romarís, A. Ramírez-Santos, D. González-Vilas, R. Fernández-Prieto a J. Toribio. Influence of Neonatal and Maternal Factors on the Prevalence of Vernix Caseosa. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2011, **102**(9), 726–729.
- 6 Čihař M. Neonatologické listy. *Česká neonatologická společnost nemocnice Na Bulovce*. 19/2013, 55.
- 7 Visscher M. a V. Narendran. Vernix Caseosa: Formation and Functions. *Newborn and Infant Nursing Reviews*. 2014, **14**(4), Skin Care in the Neonate, 142–146.
- 8 Rissmann R., M. H. M. Oudshoorn, R. Zwier, M. Ponec, J. A. Bouwstra a W. E. Hennink. Mimicking vernix caseosa—Preparation and characterization of synthetic biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, **372**(1), 59–65.
- 9 Visscher M., V. Narendran, W. L. Pickens, A. A. Laruffa, J. Meinzen-Derr, K. Allen a S. B. Hoath. Vernix Caseosa in Neonatal Adaptation. *Journal of Perinatology*. 2005, **25**(7), 440–446.
- 10 Akinbi H. T., V. Narendran, A. K. Pass, P. Markart a S. B. Hoath. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004, **191**(6), 2090–2096.
- 11 Rampler E., H. Schoeny, B. M. Mitic, Y. El Abiead, M. Schwaiger a G. Koellensperger. Simultaneous non-polar and polar lipid analysis by on-line combination of HILIC, RP and high resolution MS. *Analyst*. 2018, **143**(5), 1250–1258.
- 12 Horchani H., A. Bouaziz, Y. Gargouri a A. Sayari. Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012, **75**, 35–42.

- 13 Lin J. a G. Q. Chen. Structural characteristics of the molecular species of tetraacylglycerols in lesquerella (*Physaria fendleri*) oil elucidated by mass spectrometry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017, **10**, 167–173.
- 14 Mantle P. G., L. J. Morris a S. W. Hall. Fatty acid composition of sphaelial and sclerotial growth forms of *Claviceps purpurea* in relation to the production of ergoline alkaloids in culture. *Transactions of the British Mycological Society*. 1969, **53**(3), 441–447.
- 15 Tan D., M. E. Ertunc, S. Konduri, J. Zhang, A. Michel Pinto, Q. Chu, B. B. Kahn, D. Siegel a A. Saghatelian. Discovery of FAHFA-Containing Triacylglycerols and Their Metabolic Regulation. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, **141**.
- 16 Ding N., Q. Qi, X. Gu, R. Zuo, J. Liu a Z. Yang. De novo synthesis of sphingolipids is essential for decidualization in mice. *Theriogenology*. 2018, **106**, 227–236.
- 17 Greco-Duarte J., E. D. Cavalcanti-Oliveira, J. A. C. Da Silva, R. Fernandez-Lafuente a D. M. G. Freire. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. *Fuel*. 2017, **202**, 196–205.
- 18 Isbell T. A., B. A. Lowery, S. S. Dekeyser, M. L. Winchell a S. C. Cermak. Physical properties of triglyceride estolides from lesquerella and castor oils. *Industrial Crops and Products*. 2006, **23**(3), 256–263.
- 19 Christie W. W. a X. Han. *Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. 4. ed. Bridgwater: Oily Press, 2010. Oily Press lipid library, 24.
- 20 Eibler D., S. Kruger, K. Skírnisson a W. Vetter. Combined thin layer chromatography and gas chromatography with mass spectrometric analysis of lipid classes and fatty acids in malnourished polar bears (*Ursus maritimus*) which swam to Iceland. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1046**, 138–146.
- 21 Cheng S., S. M. Bhat, Ch. Lee a J. Shiea. Thin layer chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry for characterizing herbal compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2018, **434**, 264–271.
- 22 Basic Principles of HPLC, MS & LC-MS. Chemyx Inc [online]. 8. listopad 2017. [cit. 2019-07-27]. Dostupné z: <https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/>
- 23 Malviya R., V. Bansal, O. Prakash Pal a P. Kumar Sharma. High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010, **2**, 22–26.
- 24 Donot F., G. Cazals, Z. Gunata, D. Egron, J. Malinge, C. Strub, A. Fontana a S. Schorr-Galindo. Analysis of neutral lipids from microalgae by HPLC-ELSD and APCI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2013, **942–943**, 98–106.

- 25 Lída M., M. Holčapek a H. Sovová. Comparison of various types of stationary phases in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography–mass spectrometry of glycerolipids in blackcurrant oil and its enzymatic hydrolysis mixture. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(47), 23rd International Symposium on Microscale Bioseparations, 8371–8378.
- 26 Sommer U., H. Herscovitz, F. K. Welty a C. E. Costello. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. *Journal of Lipid Research*. 2006, **47**(4), 804–814.
- 27 Pham T. H., M. Zaeem, T. A. Fillier, M. Nadeem, N. P. Vidal, Ch. Manful, S. Cheema, M. Cheema a R. H. Thomas. Targeting Modified Lipids during Routine Lipidomics Analysis using HILIC and C30 Reverse Phase Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 1–15.
- 28 Nocun M. a J. T. Andersson. Argentation chromatography for the separation of polycyclic aromatic compounds according to ring number. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1219**, 47–53.
- 29 De Hoffman E. a V. Stroobant. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3. ed., reprinted. Chichester: Wiley, 2011.
- 30 LI L., J. Han, Z. Wang, J. Liu, J. Wei, S. Xiong a Z. Zhao. Mass Spectrometry Methodology in Lipid Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(6), 10492–10507.
- 31 Han X. a R. W. Gross. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*. 2003, **44**(6), 1071–1079.
- 32 Rajski Ł., M. d. M. Gómez-Ramos a A. R. Fernández-Alba. Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1360**, 119–127.
- 33 Sleno L. a D. A. Volmer. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*. 2004, **39**(10), 1091–1112.
- 34 Murphy R. C. a P. H. Axelsen. Mass Spectrometric Analysis of Long-Chain Lipids. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011, **30**(4), 579–599.
- 35 Olsen J. V., B. Macek, O. Lange, A. Makarov, S. Horning a M. Mann. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods*. 2007, **4**(9), 709–712.
- 36 Brodbelt J. S. Photodissociation mass spectrometry: New tools for characterization of biological molecules. *Chemical Society reviews*. 2014, **43**(8), 2757–2783.

- 37 De. O. Silva R., M. G. G. De Menezes, R. C. De Castro, C. De A. Nobre, M. A. L. Milhome a R. F. Do Nascimento. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. *Food Chemistry*. 2019, **297**, 124934.
- 38 Holčapek M. a P. Jandera. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, **92**(4), 278–286.
- 39 Chen L., B. Xie, L. Li, W. Jiang, Y. Zhang, J. Fu, G. Guan a Y. Qiu. Rapid and Sensitive LC–MS/MS Analysis of Fatty Acids in Clinical Samples. *Chromatographia*. 2014, **77**(17–18), 1241–1247.
- 40 Holčapek M., P. Jandera, P. Zderadička a L. Hrubá. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, **1010**(2), 195–215.
- 41 Mottram H. R., S. E. Woodbury a R. P. Evershed. Identification of Triacylglycerol Positional Isomers Present in Vegetable Oils by High Performance. In: *Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 1240–1252.