

OBSAH

OBSAH.....	1
1. ÚVOD.....	4
Cíl diplomové práce:	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 LIPIDY A JEJICH ROZDĚLENÍ	7
2.1.1 NEUTRÁLNÍ LIPIDY.....	7
2.1.1.1. Vosky	7
2.1.1.2. Acylsteroly	7
2.1.1.3. Alkyl(alkenyl)diacylglyceroly	8
2.1.1.4. Triacylglyceroly	8
2.1.1.5. Neesterifikované (volné) mastné kyseliny.....	9
2.1.1.6. Diacylglyceroly	9
2.1.1.7. Neesterifikovaný (volný) cholesterol	9
2.1.1.8. Monoacylglyceroly	10
2.1.2 POLÁRNÍ LIPIDY.....	10
2.1.2.1. Fosfatidová kyselina	11
2.1.2.2. Difosfatidyl glycerol (kardiolipin)	11
2.1.2.3. Fosfatidylcholin (lecitin)	12
2.1.2.4. Fosfatidylethanolamin (kefalin)	12
2.1.2.5. Fosfatidylserin.....	12
2.1.2.6. Lysofosfatidylcholin.....	13
2.1.2.7. Fosfatidylinositol	13
2.1.2.8. Plasmalogeny	13
2.1.2.9. Sfingomyeliny.....	14

2.1.2.10.	Glykolipidy (glykosfingolipidy, cerebrosidy)	14
2.1.3	METABOLISMUS ACYLGLYCEROLŮ A SFINGOLIPIDŮ	15
2.1.3.1.	Triacylglyceroly	15
2.1.3.2.	Diacylglyceroly	18
2.1.3.3.	Monoacylglyceroly	19
2.1.3.4.	Kardiolipin.....	21
2.1.3.5.	Fosfatidylethanolamin.....	22
2.1.3.6.	Lysofosfatidylethanolamin	24
2.1.3.7.	Fosfatidylcholin	24
2.1.3.8.	Lysofosfatidylcholin.....	26
2.1.3.9.	Sfingomyelin	26
2.1.3.10.	Fosfatidylserin.....	28
2.1.3.11.	Lysofosfatidylserin	29
2.1.3.12.	Fosfatidylinositol	29
2.2	EVAPORATIVNÍ DETEKTOR ROZPTYLU SVĚTLA.....	31
2.2.1	STRUČNÁ HISTORIE	31
2.2.2	PRINCIPY FUNKCE ELSD	31
2.2.3	VÝHODY A NEVÝHODY ELSD	33
2.2.4	SROVNÁNÍ ELSD S OSTATNÍMI DETEKTORY.....	34
2.3	ANALYTICKÝ PŘÍSTUP	35
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	APARATURA	38
3.2	REAGENCIE	38
3.3	PRACOVNÍ POSTUPY	39
3.3.1.	PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ	39
3.3.2.	CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM.....	40

3.3.3.	EXTRAKCE LIPIDŮ	40
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
4.1.	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI.....	42
4.1.1.	TRIACYLGLYCEROLY	42
4.1.2.	ESTERY CHOLESTEROLU	45
4.1.3.	VOLNÝ CHOLESTEROL	47
4.1.4.	CERAMID	49
4.1.5.	KARDIOLIPIN	51
4.1.6.	FOSFATIDYLETHANOLAMIN.....	53
4.1.7.	FOSFATIDYLCHOLIN	55
4.1.8.	FOSFATIDYLSERIN	57
4.1.9.	SFINGOMYELIN	59
4.1.10.	LYSOFOSFATIDYLCHOLIN.....	61
4.2.	PRAKTICKÉ APLIKACE	64
5.	ZÁVĚŘ.....	69
6.	LITERATURA	70

1. ÚVOD

Lipidy jsou důležitou složkou živé hmoty a zahrnují heterogenní skupinu sloučenin, která většinou obsahuje v molekule jednu či více mastných kyselin. Společnou vlastností lipidů je relativní nerozpustnost ve vodě a naopak dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech (např. diethylether, chloroform, hexan). Jejich název je odvozen z řeckého „lipos“, tj. tučný. Lipidy mají řadu důležitých biologických funkcí, mj. jsou důležitou složkou potravy pro svou vysokou energetickou hodnotu, obsah esenciálních mastných kyselin a v tučných rozpustných vitamínů (A, D, E, K).

Význam pro biologii a medicínu:

V těle slouží tuk jako zdroj energie a je uložený do zásoby v tukové tkáni. Má též význam jako tepelný izolátor v podkožní tkáni a v okolí některých orgánů. Nepochopitelně lipidy vytvářejí také elektrickou izolaci a ta umožňuje rychlé šíření depolarizačních vln podél myelinizovaných nervových vláken. Nervová tkáň obsahuje velké množství lipidů, které jsou součástí buněčných a mitochondriálních membrán.

Transportní formou lipidů v krvi jsou lipoproteiny, které jsou složeny z jednoduchých lipidů (cholesterolu a jeho esterů, triglyceridů a fosfolipidů) a specifických proteinů zvaných apolipoproteiny. Znalost biochemie lipidů je nezbytná pro pochopení řady jevů, které jsou ve středu zájmu současné medicíny, jako např. aterosklerosa, obezita a význam nenasycených mastných kyselin pro výživu a zdraví (1).

Lipidy rozdělujeme na jednoduché a složené:

1. Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin s různými typy alkoholů.
 - a) Sterol estery jsou estery mastných kyselin se sterolem, u obratlovců je charakteristický cholesterol (jako minoritní složka jsou zastoupeny i rostlinné steroly – beta-sitosterol a kampesterol).
 - b) S glycerolem vytvářejí mastné kyseliny tři typy esterů – mono- di- a triglyceridy.
 - c) Vosky charakterizujeme jako estery mastných kyselin s vyšším jednosytným alkoholem.

2. Složené lipidy mají základ jednoduchých lipidů – mastná kyselina a alkohol a navíc obsahují zbytek kyseliny fosforečné, která je dále esterifikována s dusíkatou basí, aminokyselinou nebo jinou sloučeninou (např. inositol).
Rozlišujeme glycerofosfolipidy, kde je alkoholem glycerol, a sfingofosfolipidy, kde je alkoholickou složkou aminoalkohol sfingosin.
3. Glykolipidy (glykosfingolipidy) obsahují mastnou kyselinu, sfingosin a sacharidovou část.
4. Ostatní složené lipidy – např. sulfolipidy a aminolipidy, popřípadě jsou do této skupiny řazeny lipoproteiny.
5. Prekursory a odvozené lipidy – prostaglandiny, steroidy, lipofilní vitamíny, karotenoidy (1).

V lidském (obecně savčím) organismu rozlišujeme lipidy na cirkulující a membránové.

Cirkulující lipidy ve formě lipoproteinů se skládají z esterů cholesterolu (60-70% celkového cholesterolu) a triglyceridů v nepolárním jádru a z fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a volného cholesterolu v polárním obalu.

Membránové lipidy, které zajišťují fluiditu i další funkce membrán, zahrnují jako hlavní fosfolipidové třídy fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, sfingomyelin a jako minoritní fosfolipidy kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, lysofosfatidylcholin a lysofosfatidylethanolamin (2).

Cíl diplomové práce:

- 1. Vývoj a optimalizace metody HPLC ve spojení s evaporativním detektorem rozptylu světla**
- 2. Určení funkce kalibračních závislostí pro jednotlivé lipidové třídy**
- 3. Aplikace metody na stanovení lipidového profilu v mozkové tkáni a krevní plasmě.**

2. TEORETICKÁ ČÁST

Lipidy představují velice početnou heterogenní skupinu sloučenin, jejichž klasifikace je značně složitá a nabízí více variant.

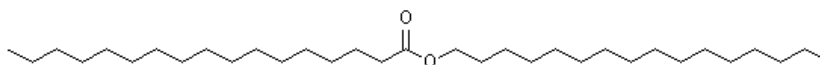
2.1 LIPIDY A JEJICH ROZDĚLENÍ

Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů, sterolů či glycerolu. V analytické praxi je výhodné jejich rozdělení podle chromatografického chování na silikage-lu na nepolární (neutrální, NL), které se pohybují v nepolární mobilní fázi (uhlovodík-diethylether-kyselina octová) a polární (PL), které se dělí v polární mobilní fázi (chloroform-methanol-voda, často s přidáním kyseliny octové nebo amoniaku). Strukturní vzorce a jejich systematické i triviální názvy včetně zkratk ukazují obr. 1 až 12. Podle tohoto chromatografického chování řadíme mezi nepolární lipidy také volné mastné kyseliny, parciální glyceridy a volné steroly, přestože obsahují volnou (neesterifikovanou) funkční skupinu.

2.1.1 NEUTRÁLNÍ LIPIDY

2.1.1.1. Vosky

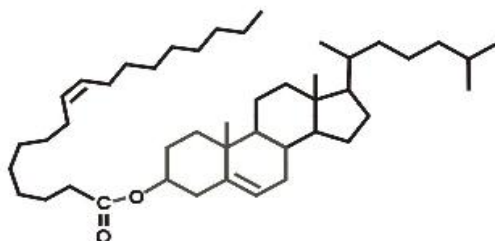
Chemickým složením jsou to estery mastných kyselin a alifatických alkoholů. Nalezneme je především v povrchové vrstvě plodů a listů, kde slouží jako ochrana, dále pak u některých živočišných tkání (např. Harderova žláza potkana).



Obr. 1 1-hexadecyl hexadecaonát (wax ester, WE)

2.1.1.2. Acylsteroly

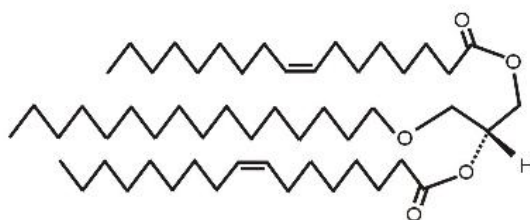
Představují zásobní a transportní formu cholesterolu v savčím organismu či jiného sterolu u jiných živočišných druhů. Nacházejí se především v jádře plasmatických lipoproteinů, kde umožňují regulovaný transport lipidů v organismu, a jako zásobní forma v intracelulárním prostoru.



Obr. 2 Cholesteryl-9Z-oktadecenoát (cholesteryl ester, CE)

2.1.1.3. Alkyl(alkenyl)diacylglyceroly

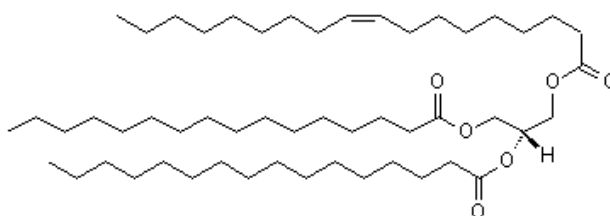
Pro tuto lipidovou třídu jsou známy také názvy etherlipid, glycerylether diester (GEDE), systematicky sn-1-alkyl(alkenyl)-2,3-diacylglycerol. Na sn-1 uhlíkovém atomu má ethericky vázaný alkyl (alkenyl), na dalších dvou atomech uhlíku je esterově vázaná mastná kyselina. Vyskytují se v některých živočišných tkáních.



Obr. 3 1-O-hexadecyl-2,3-bis-(7Z-hexadecenyl)-sn-glycerol (glyceryletherdiester, GEDE)

2.1.1.4. Triacylglyceroly

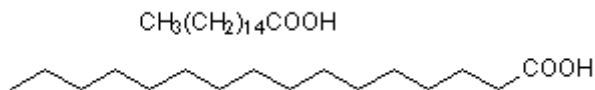
Vznikají esterifikací všech tří hydroxylových skupin glycerolu. Představují základ živočišných tuků a rostlinných olejů. Jsou kvantitativně nejdůležitější zdroj energie. Výskyt v organismu je obdobný jako u esterů cholesterolu, navíc jsou podstatnou složkou tukové tkáně.



Obr. 4 1,2-dihexadekanoyl-3-(9Z-oktadecenyl)-sn-glycerol (triglyceride, TG)

2.1.1.5. Neesterifikované (volné) mastné kyseliny

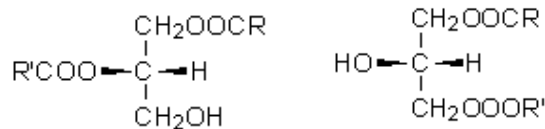
Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Většina z nich má sudý počet uhlíkových atomů a nerozvětvené řetězce. U savců se délka řetězce pohybuje od C12 do C22. Základní funkcí je přívod energie do tkání, v plasmě jsou volné mastné kyseliny vázané na albumin. Příklad mastné kyseliny v obr. 5.



Obr. 5 Kyselina palmitová (free fatty acid, FFA)

2.1.1.6. Diacylglyceroly

Rozeznáváme sn-1,2- a sn-1,3-diacylglycerol. 1,2-diacylglycerol je společným prekursorem triacylglycerolů a glycerofosfolipidů, nebo může být jejich metabolitem po hydrolytickém štěpení lipasami či fosfolipasou C.

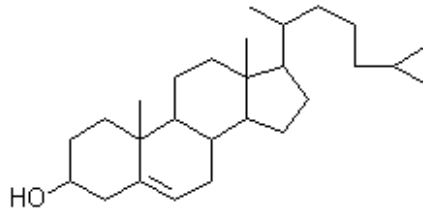


Obr. 6 sn-1,2-diacylglycerol a sn-1,3-diacylglycerol (diglyceride, DG)

2.1.1.7. Neesterifikovaný (volný) cholesterol

Cholesterol (FC) je pravděpodobně nejznámější steroid díky tomu, že je o něm často slyšáno v souvislosti s atherosklerosou. Jeho biochemická funkce je však také velmi významná, protože je prekursorem velkého počtu steroidů, mezi které řadíme žlučové kyseliny, nadledvinové a pohlavní hormony, vitaminy D, srdeční glykosidy a některé alkaloidy. Ze strukturního hlediska mají všechny steroidy podobné cyklické jádro podobající se fenanthrenu (kruhy A, B a C), ke kterému je připojen cyklopentanový kruh D (Obr. 7). Každý z šestiuhlíkových kruhů steroidního jádra může existovat buď v „židličkovém“ nebo „vaničkovém“ uspořádání, je to dáno asymetrií molekuly, díky které existuje množství stereoisomerů. Židličková konformace převažuje v přirozeně se vyskytujících stereoidech, protože představuje stabilnější

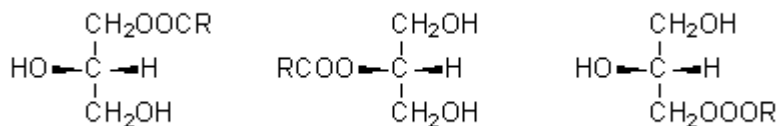
konformaci. Cholesterol je zásadní složkou většiny tkání, nejvíce rozšířen je pak v nervové tkáni. Dále ho nalezneme jako zásadní složku plasmatické membrány a obalu lipoproteinů krevní plasmy. Časté je i jeho spojení s mastnými kyselinami, kdy je ve formě cholesterylesteru. Je přítomný v tucích živočišných, nikoli však v rostlinných (1).



Obr. 7 Cholest-5-en-3β-ol (free cholesterol, FC)

2.1.1.8. Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly vznikají pomocí lipas štěpením 1,2diacylglycerolu a pak bývají substrátem pro acylaci aktivovanou mastnou kyselinou při synthese triacylglycerolu (2).



Obr. 8 sn-1-monoacylglycerol, sn-2-monoacylglycerol, sn-3-monoacylglycerol (monoglyceride, MG)

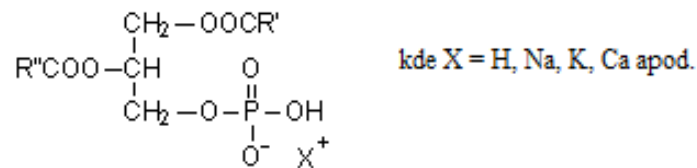
2.1.2 POLÁRNÍ LIPIDY

Polární lipidy jsou díky svým vlastnostem základem struktury biologických membrán. Dělení polárních lipidů může být jednak podle alkoholové složky na glycerolipidy a sfingolipidy, nebo podle charakteru polární složky na glykolipidy a fosfolipidy. Mezi fosfolipidy řadíme kyselinu fosfatidovou a fosfatidylglycerol, fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, lysofosfolipidy, plasmalogeny a sfingomyeliny. Všechny tyto lipidy jsou řazeny mezi fosfoacylglyceroly, kromě sfingomyelinu, který nemá jako alkoholovou

složku glycerol. Fosfoacylglyceroly můžeme pokládat za deriváty kyseliny fosfatidové, ve které je kyselina fosforečná esterifikována s – OH skupinou příslušného alkoholu (1).

2.1.2.1. Fosfatidová kyselina

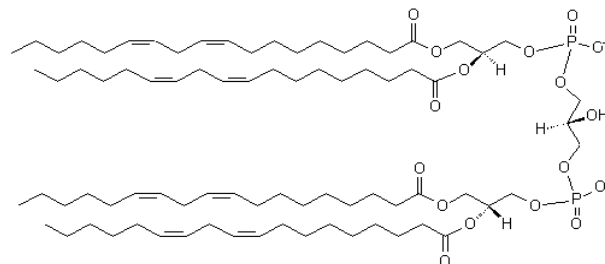
Kyselina fosfatidová (Obr. 9) je důležitým mezistupněm při syntese triacylglycerolů a fosfoglycerolů, ale ve tkáních je její množství minimální (1). Je minoritní složkou některých biologických membrán. Vzniká působením fosfolipasy D na glycerofosfolipid (2).



Obr. 9 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforečná kyselina (phosphatidic acid, PA)

2.1.2.2. Difosfatidyl glycerol (kardiolipin)

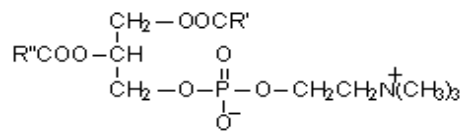
Kardiolipin je hlavním lipidem mitochondriálních membrán (Obr. 10). Vzniká v mitochondriích esterifikací glycerolu dvěma molekulami kyseliny fosfatidové v poloze 1 a 3. Je součástí většiny biologických membrán, kde je zastoupen v různých množstvích podle druhu membrány. Je významnou složkou srdečního svalu. Kardiolipin byl poprvé izolován v myokardu, proto dostal toto pojmenování. U dospělých jedinců je jeho charakteristickým znakem vysoký obsah kyseliny linolové (cca 80%).



Obr. 10 1,3bis(sn-3'-fosfatidyl)-sn-glycerol (cardiolipin, CL)

2.1.2.3. Fosfatidylcholin (lecitin)

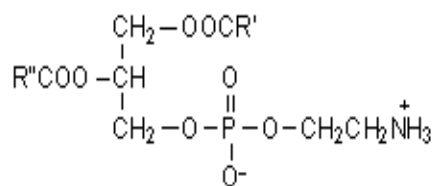
Lecithin se vyskytuje v buněčných membránách; jde o fosfoacylglycerol (glycerolfosfolipid), který obsahuje aminoalkohol cholin (Obr. 11). Je to nejvíce zastoupený fosfolipid buněčné membrány živočišných tkání a často majoritní lipidová složka rostlinných membrán a některých mikroorganismů. Představuje velkou část tělních zásob cholinu, který je důležitý pro přenos nervového vzruchu.



Obr. 11 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforylcholin (phosphatidylcholine, PC)

2.1.2.4. Fosfatidylethanolamin (kefalin)

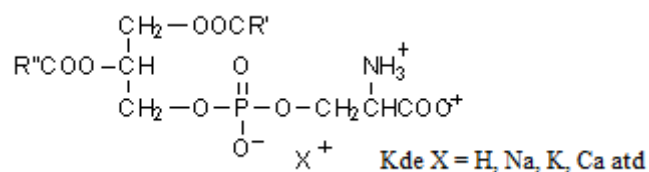
Kefalin se liší od fosfatidylcholinu jen tím, že cholin je nahrazen ethanolaminem (Obr. 12). Je druhým nejhojněji vyskytujícím se fosfolipidem v živočišných a rostlinných tkáních a může být majoritní třídou v mikroorganismech (3). Je charakteristický vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Diacylderivát obsahuje jako minoritní složku i tzv. plasmalogen, který je typický alkylem (alkenylem) navázaným vinyl-etherovou vazbou na C1 uhlíkovém atomu.



Obr. 12 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforylethanolamin (phosphatidylethanolamine, PE)

2.1.2.5. Fosfatidylserin

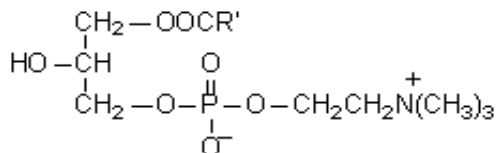
Fosfatidylserin obsahuje místo ethanolaminu aminokyselinu serin (Obr. 13). Je to je slabě kyselý lipid a proto je často izolován z tkání ve formě solí. Vzniká z fosfatidylethanolaminu reakcí katalysovanou fosfatidylethanolaminserintransferasou. Je minoritní složkou biologických membrán, větší zastoupení (do 10% celkového lipidu) má pouze v erythrocytech a myelinových pochvách.



Obr. 13 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforylserin (phosphatidylserine, PS)

2.1.2.6. Lysofosfatidylcholin

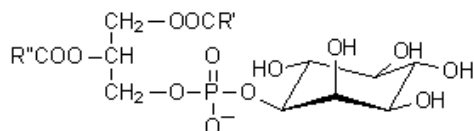
Lysofosfatidylcholin obsahuje pouze jednu mastnou kyselinu v molekule, obvykle v poloze sn-1 (Obr. 14). Občas je přítomen v tkáních jako minoritní komponenta. Je více rozpustný ve vodě než většina ostatních lipidů a proto může docházet ke ztrátám v průběhu extrakce (3).



Obr. 14 1-acyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-fosforylcholin (lysophosphatidylcholine, LPC)

2.1.2.7. Fosfatidylinositol

Fosfatidylinositol (Obr. 15) je minoritní složkou biologických membrán a je rovněž prekursorem tzv. „druhého posla“. Obsahuje inaktivní formu inositolu - myoinositol; obvykle je složkou živočišných, rostlinných a mikrobiálních lipidů. Často je v živočišných tkáních doprovázen malým množstvím fosfatidylinositol-4-fosfátem a fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem. Tyto sloučeniny mají v živočišných buňkách velmi rychlý metabolismus a jejich diacylglycerolový metabolit je důležitý v regulaci životně důležitých procesů (3).

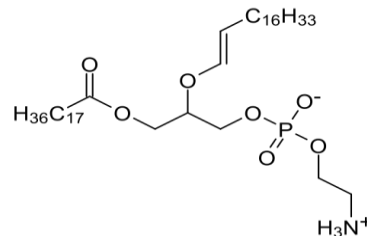


Obr. 15 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforylinositol (phosphatidylinositol, PI)

2.1.2.8. Plasmalogeny

Plasmalogeny se vyskytují v mozku a svalch, kde představují téměř 10 % fosfolipidů (Obr.

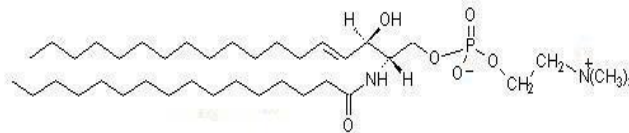
16). Strukturou se podobají fosfatidylethanolaminu, ale obsahují etherovou vazbu na sn-1 uhlíku místo esterové vazby normálně zastoupené v acylglycerolech. Alkylový zbytek vázaný etherovou vazbou bývá zpravidla nenasycený alkohol. V některých případech může být ethanolamin nahrazen cholinem, serinem nebo inositolem.



Obr. 16 1-alkenyl-2-acyl-sn-glycerol-3-fosforethanolamin (plasmalogen)

2.1.2.9. Sfingomyeliny

Sfingomyeliny jsou rovněž důležitou složkou nervového systému (Obr. 17). Byly zjištěny ve všech živočišných tkáních, ale nejsou přítomny v rostlinách a mikroorganismech. Při hydrolytickém štěpení z nich vzniká mastná kyselina, kyselina fosforečná, cholin a komplexní aminoalkohol sfingosin. Neobsahují vůbec glycerol. Kombinace sfingosinu s mastnou kyselinou je známá jako ceramid, který se v mnoha fyzikálních vlastnostech podobá fosfatidylcholinu (3).

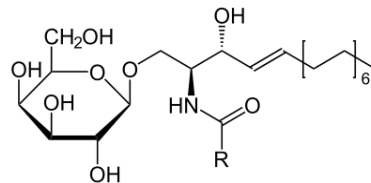


Obr. 17 N-acyl-D-sfingosin-1-fosfocholin (Sphingomyelin, SM)

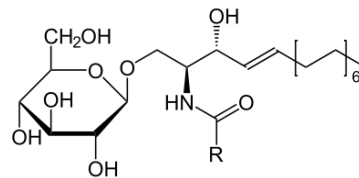
2.1.2.10. Glykolipidy (glykosfingolipidy, cerebrosidy)

Glykolipidy mají důležitou roli v nervové tkáni a v buněčné membráně. Glykolipidy jsou široce rozšířené ve všech tkáních, zvláště pak v nervové tkáni, například v mozku. Vyskytují se hlavně ve vnějším listu plasmatické membrány, kde přispívají k buněčným povrchovým sacharidům. Nejdůležitějšími glykolipidy vyskytujícími se v živočišných tkáních jsou glykosfingolipidy. Obsahují ceramid a jeden nebo dva cukry. Ceramid je ester sfingosinu, na jehož aminoskupině je esterově navázaná mastná kyselina. Při další esterové vazbě hydroxylové skupiny sfingosinu a jednoduchého cukru vzniká cerebrosid. Dva nejjednodušší glykolipidy jsou galaktosylceramid a glukosylceramid. **Galaktosylceramid** (Obr. 18) je hlavním glykos-

fingolipidem mozku a nervové tkáně. Obsahuje hodně charakteristických C24 mastných kyselin, například kyselinu cerebronovou. Galaktosylceramid může být přeměněn na galaktosylceramidsulfát, který se nachází ve velkém množství v myelinu. **Glukosylceramid** (Obr. 19) je převažující jednoduchý glykosfingolipid extraneurálních tkání, ale nalezneme ho i v mozku (1).



Obr. 18 β -D-Galaktosylceramid



Obr. 19 β -D-Glukosylceramid

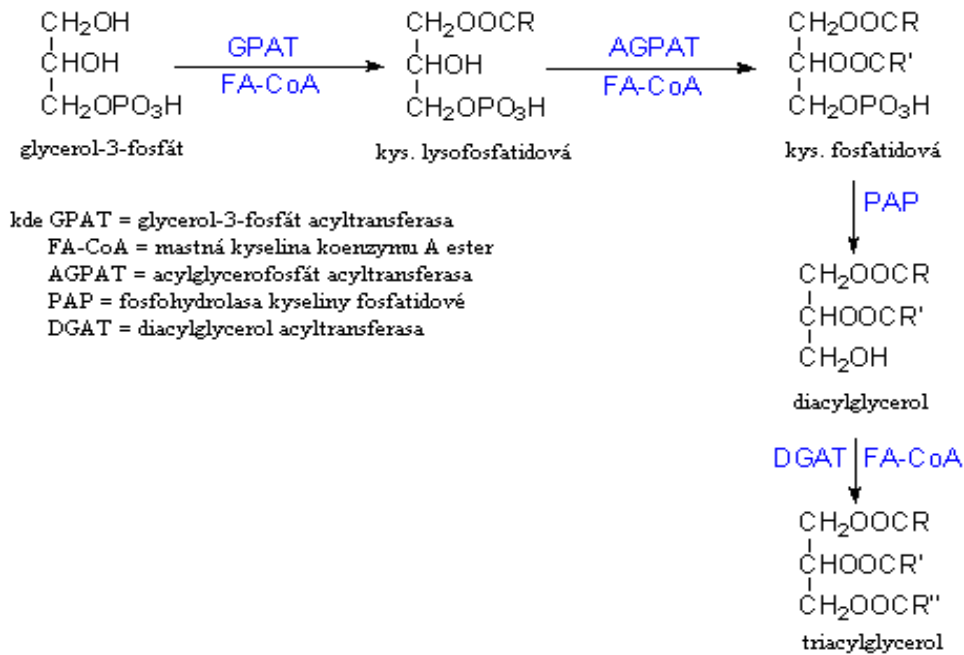
2.1.3 METABOLISMUS ACYLGLYCEROLŮ A SFINGOLIPIDŮ

Acylglyceroly jsou majoritními lipidy v lidském těle. Triacylglyceroly (TG) jsou označovány také triglyceridy či neutrální tuky, jejich funkcí u živočichů je zásoba energie. Jsou nejhojněji vyskytující se třídou lipidů, i přesto, že se nevyskytují v biologických membránách. Naopak fosfolipidy jsou majoritními složkami plasmatické membrány a ostatních membrán. Glykosfingolipidy tvoří 5-10% z celkového množství lipidů plasmatické membrány (1).

2.1.3.1. Triacylglyceroly

Synthesy TG jsou schopny všechny eukaryotické organismy, dokonce i některé prokaryoty. Nejaktivnějším orgánem pro syntézu TG v živočišné říši jsou játra a střevo, jako zásobárna pak slouží především tuková tkáň; ukládány jsou v cytoplasmě ve formě tzv. lipidových kapének (v anglické literatuře označovaných „lipid droplets“, „fat globules“, „oil bodies“, „lipid particles“, „adiposomes“), které jsou obaleny monovrstvou fosfolipidů a hydrofobních proteinů (perlipiny v tukové tkáni, oleosiny v semenech). Tyto lipidové kapénky jsou dnes považovány za orgány s vlastním charakteristickým metabolismem, nikoliv již za tukové kapky.

Biosynthesa probíhá dvěma cestami: přes *sn*-glycerol-3-fosfát v játrech a tukové tkáni a přes monoacylglycerol ve střevě. Třetí způsob biosynthesy ve zrajících semenech rostlin a některých zvířecích tkáních probíhá za působení diacylglycerol transferasy. Nejvýznamnější je první způsob, pojmenovaný podle objevitele Kennedyho cesta (4), kterým je syntetisováno více než 90% jaterních triacylglycerolů (obr. 20).



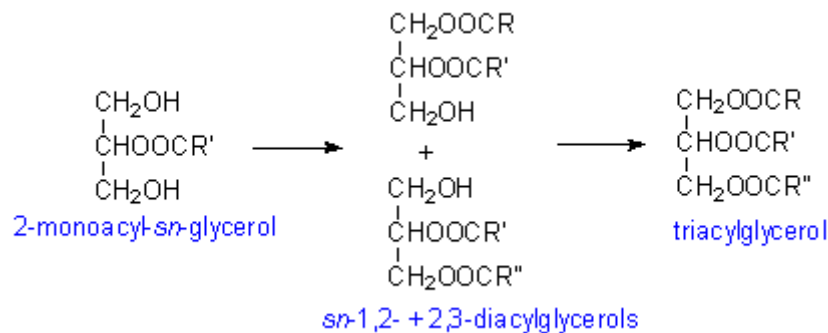
Obr. 20 Biosynthesa triacylglycerolů Kennedyho cestou

Za zdroj glycerolu podle tohoto schématu byl považován *sn*-glycerol-3-fosfát jako produkt glykolysy, v menší míře pak jako výsledek působení glycerol kinasy na volný glycerol. V poslední době však začíná převládat názor, že převážná část glycerolu je syntetisována *de novo* glyceroneogenesí přes pyruvát (5).

Následující reakce probíhají v endoplasmatickém retikulu. Prekursor *sn*-glycerol-3-fosfát je esterifikován mastnou kyselinou pocházející z esteru s koenzymem A (reakce je katalysována glycerol-3-fosfát acyltransferasou, GPAT) na posici *sn*-1 za tvorby kyseliny lysofosfatidové, a ta je acylována enzymem acylglycerofosfát acyltransferasou na posici *sn*-2 na kyselinu fosfatidovou, která je prekursorem v biosynthese všech glycerolipidů. Fosfátová skupina je odštěpena za katalysy fosfohydrolasou (PAP). Výsledný 1,2-diacyl-*sn*-glycerol je acylován diacyl-

glycerol acyltransferasou (DGAT) na triacyl-*sn*-glycerol. Protože aktivita tohoto enzymu je v celém procesu nejnižší, určuje tento krok rychlost reakce.

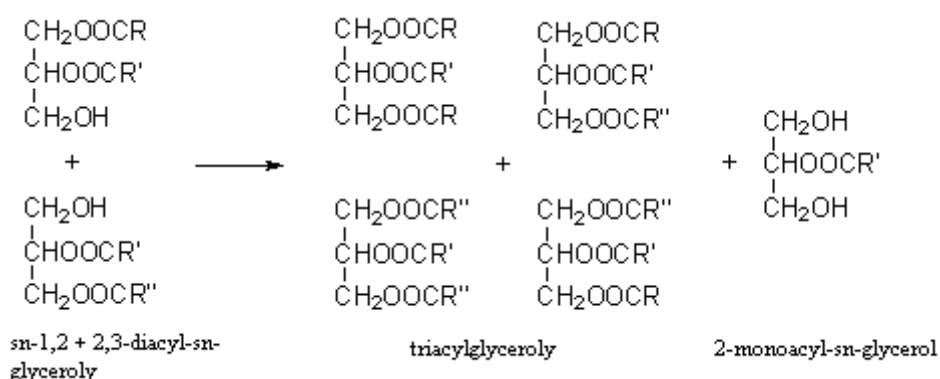
V enterocytech je po jídle až 75% triacylglycerolů tvořeno cestou monoacylglycerolu. 2-monoacyl-*sn*-glyceroly a volné mastné kyseliny jsou odštěpeny z triacylglycerolů v potravě pankreatickou lipasou; jsou pak acylovány acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferasou za tvorby *sn*-1,2-diacylglycerolů a *sn*-2,3-diacylglycerolů. Ty jsou dále acylovány acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferasou na triacylglyceroly podle následujícího schématu:



Obr. 21 Vznik triacylglycerolů v enterocytech

Třetí, nejméně prozkoumaná cesta tvorby triacylglycerolů, využívá transacylace mezi dvěma racemickými diacylglyceroly nezávisle na acyl-CoA. Reakce je katalysována diacylglycerol transacylasou a vedlejším produktem je 2-monoacyl-*sn*-glycerol (viz následující schema na obr. 22).

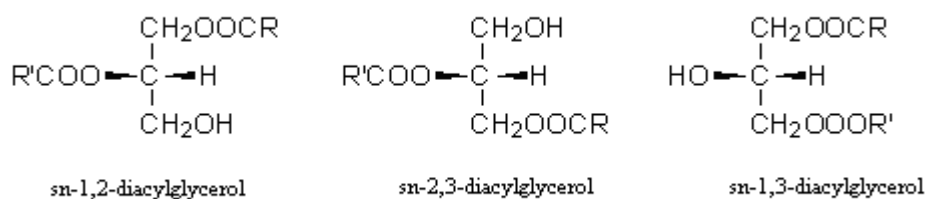
Triacylglyceroly jsou pro organismus nezbytné, ale jejich nadměrná akumulace v tukové tkáni vede k řadě metabolických poruch (obesita, insulinová resistence, steatohepatitida, kardiomyopatie).



Obr. 22 Transacylace racemických diacylglycerolů

2.1.3.2. Diacylglyceroly

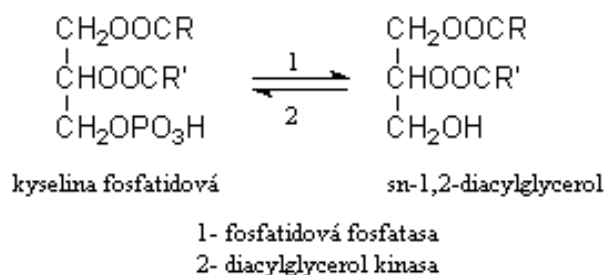
Diacylglyceroly (diglyceridy) jsou estery glycerolu, ve kterém jsou dvě hydroxylové skupiny esterifikovány s mastnými kyselinami; jsou známy tři stereochemické formy znázorněné na obr. 23.



Obr. 23 Stereochemické formy diacylglycerolů

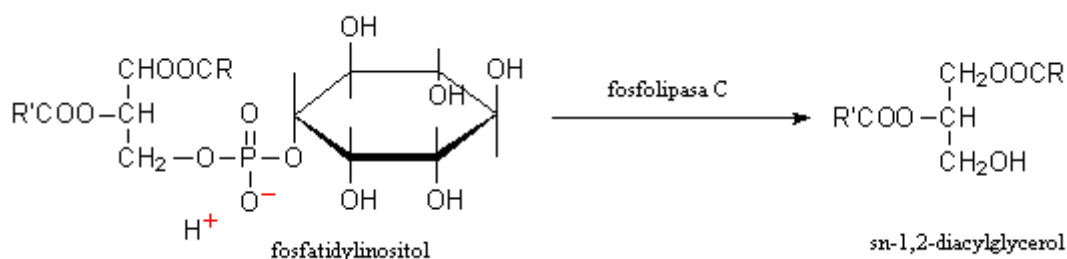
Racemická směs *sn*-1,2- a 2,3-diacylglycerolů bývá někdy nazývána α,β -diacylglyceroly. *sn*-1,3-Diacylglyceroly jsou nazývány α,α' -diacylglyceroly. α,β -Diacylglyceroly vznikají jako meziprodukt při hydrolyse triacylglycerolů pankreatickou lipasou a dalšími hydrolytickými enzymy v živočišných tkáních, v semenech pak působením rostlinných lipas. Z technologického hlediska jsou důležité vzhledem k tomu, že ovlivňují fyzikální vlastnosti potravinových olejů. V nedávné době byl uveden na trh potravinový olej obsahující až 80% 1,3-diacylglycerolů jako nutriční podpora s benefičním účinkem nízkého vstřebávání odštěpených 1(3)-monoacylglycerolů do tkání (6).

sn-1,2-Diacylglyceroly jsou minoritní složkou většiny tkání, ale významnou vzhledem ke své roli druhých poslů v mnoha buněčných procesech. Vznikají několika mechanismy, např. jako meziproduct biosynthesy i katabolismu triacyl-*sn*-glycerolů a biosynthesy některých fosfolipidů (PC, PE, PS). Následující schema (obr. 24) ukazuje tuto reversibilní reakci, která má velkou biologickou důležitost v obou směrech.



Obr. 24 Reversibilní reakce kyselina fosfatidová-diacylglycerol

Ve vztahu k signální funkci je důležitá tvorba *sn*-1,2-diacylglycerolů spolu s vodorozpustnými inositol fosfáty za působení enzymu fosfolipasy C (obr. 25).



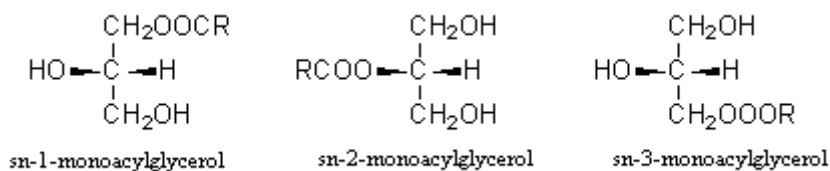
Obr. 25 Vznik diacylglycerolu z fosfatidylinositolu

Diacylglyceroly ve většině buněk a organel mají vysoký obsah polyenových mastných kyselin pro správnou funkci druhých poslů. V buněčné membráně jsou vázány prostřednictvím silných hydrofobních interakcí na specifické proteiny, čímž ovlivňují fyzikální vlastnosti membránové dvojvrstvy (např. aktivity membránově vázaných enzymů).

2.1.3.3. Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly (monoglyceridy) jsou estery glycerolu, ve kterém je pouze jedna hydroxy-

lová skupina esterikována s mastnou kyselinou. Stejně jako diglyceridy existují ve třech stereochemických formách (obr. 26).



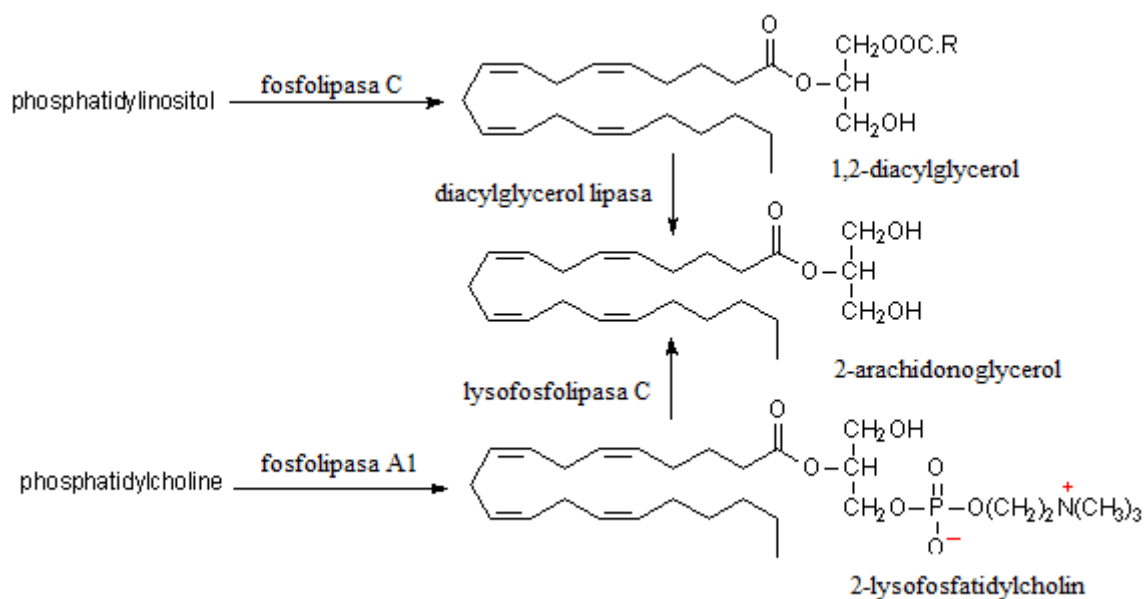
Obr. 26 Isomery monoacylglycerolů

Isomery 1- a 3- nejsou rozlišovány a jsou nazývány α -monoacylglyceroly, 2-isomery jsou nazývány β -monoacylglyceroly. Jsou minoritní složkou většiny živočišných i rostlinných tkání, jejich akumulace je však zanedbatelná – vzhledem k charakteru detergentů by měly na membránu rozkladný účinek. Naopak jsou podstatnou složkou komerčně vyráběných detergentů.

2-monoacylglyceroly jsou majoritním konečným produktem trávení tuků ve střevě pomocí pankreatické lipasy. Jsou vychytávány střevními buňkami, metabolisovány na triacylglyceroly a ty pak lymfou transportovány do jater. V živočišných buňkách jsou katabolisovány monoacylglycerol lipasou za tvorby glycerolu a volných mastných kyselin. Tento enzym je vysoce exprimován v buňkách zhoubných nádorů; vysoká lipolytická aktivita zvyšuje hladinu volných mastných kyselin v nádorových buňkách, kde se podílí na tvorbě protumorigenních signálních lipidů.

Za zvláštní zmínku stojí 2-arachidonoylglycerol, produkt katabolismu fosfatidylinositolu, který je endogenním ligandem pro kanabinoidní receptory. Vyskytuje se v mnoha orgánech v koncentracích řádově nmol/g tkáně. Mechanismus jeho vzniku ukazuje obr. 27.

Současné poznatky naznačují, že 2-arachidonoylglycerol je messengerová molekula, která reguluje transmissi signálu, a účastní se jako mediátor zánětlivých reakcí a imunitních odpovědí. Dále může sloužit jako prekursor prostanoidů vázaných na glycerol. Při isomerisaci na 1,3-isomer svou biologickou aktivitu ztrácí.



Obr. 27 Schema produkce arachidonoylglycerolu

2.1.3.4. Kardiolipin

Biosynthesa kardiolipinu probíhá obdobně jako u ostatních fosfolipidů za účasti stejných intermediátů (kyselina fosfatidová, cytidin difosfát diacylglycerol). Finální krok je však unikátní reakcí, která je odlišná u eukaryotů a prokaryotů. U eukaryotů je to jediný fosfolipid, který je syntetisován v mitochondriích a ne v cytosolu endoplasmatického retikula. Mechanismy obou reakcí ukazuje obr. 28.

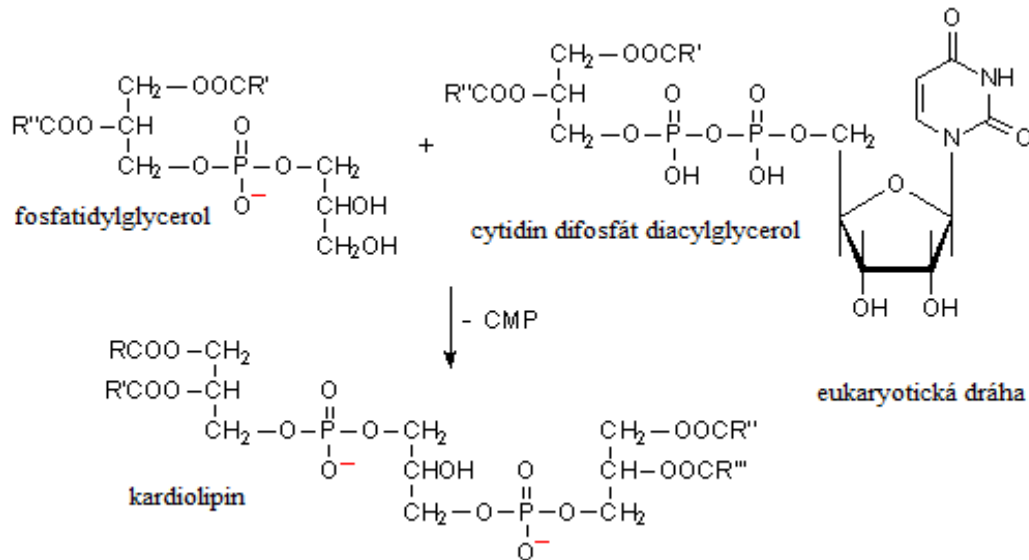
Katabolismus kardiolipinu probíhá za působení fosfolipasy A2, která odštěpí acylové skupiny, a také specifické mitochondriální fosfolipasy D, která jej hydrolysuje na kyselinu fosfatidovou a fosfatidylglycerol. Tento krok je zvláště významný za podmínek oxidativního stresu.

Kardiolipin je specifickou lipidní složkou mitochondrií a proto je jeho biologická funkce pro tyto orgány zcela zásadní. Je lokalizován především na vnitřní straně membrány, kde interaguje s řadou mitochondriálních proteinů. Výsledkem je aktivace enzymů, především těch, které se účastní oxidativní fosforylace a fotofosforylace, jejichž výsledkem je tvorba ATP.

Další funkcí kardiolipinu v energetickém metabolismu je ukotvení dvou kinas, mitochondriální kreatin kinasy a nukleosid-difosfát kinasy, na místo kontaktu vnitřní a vnější mitochondriální membrány. Za účasti proteinů nesoucích ADP, ATP a fosfát je usnadněn transport roztoků mezi vnitřní membránou a maticí mitochondrie.

Kardiolipin se také účastní procesu apoptozy živočišných buněk interakcemi s řadou specifických

kých proteinů (včetně cytochromu c). Enzym účastnící se této reakce funguje jako peroxidasa specifická pro hydroperoxydi kardiolipinu, ale ne pro jiné majoritní fosfolipidy.



Obr. 28 Biosynthesa kardiolipinu

Kardiolipin je považován za důležitý kofaktor pro translokaci cholesterolu z vnější na vnitřní stranu mitochondriální membrány; ve steroidogenních tkáních aktivuje štěpení bočního řetězce cholesterolu a stimuluje tak steroidogenezí. Váže se specificky na DNA eukaryotického chromatinu a ovlivňuje tak významně regulaci genové exprese. V plasmatických lipoproteinech má antikoagulační funkci.

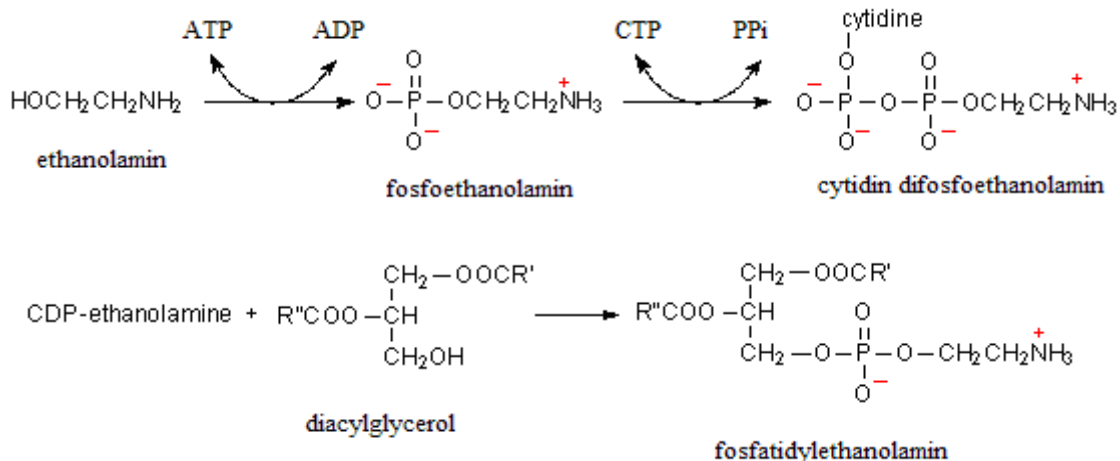
Změněné složení mastných kyselin, případně přítomnost lysoformy, jsou známy u některých závažných onemocnění (dětská kardiomyopatie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba).

2.1.3.5. Fosfatidylethanolamin

Biosynthesa fosfatidylethanolaminu de novo probíhá u živočichů i rostlin společnou cestou, jak schematicky ukazuje obr. 29.

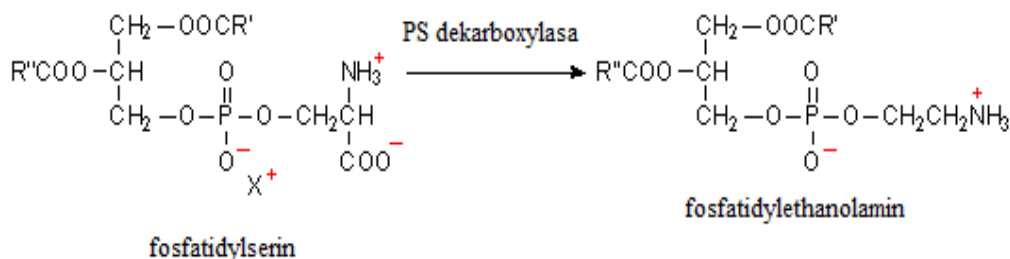
Ethanolamin v rostlinách vzniká dekarboxylací serinu, u živočichů je získáván z potravy (malá část pochází z katabolismu sfingolipidů). Prvním krokem biosynthesy je fosforylace pomocí cytosolického enzymu ethanolamin kinasy; další krok – reakce produktu s cytidin trifosfátem za tvorby cytidin difosfoethanolaminu - limituje rychlost celé reakce. Poslední krok je

katalyzován membránově vázaným enzymem endoplasmatického retikula CDP-ethanolamin:diacylglycerol ethanolamin fosfotransferasou.



Obr. 29 Hlavní cesta biosynthesy fosfatidylethanolaminu

Vedle této hlavní cesty existují ještě další tři minoritní-cesty, jejichž základem je dekarboxylace fosfatidylserinu podle následujícího schématu (obr. 30).



Obr. 30 Minoritní cesta biosynthesy fosfatidylethanolaminu

Další dva způsoby biosynthesy fosfatidylethanolaminu jsou enzymatická reakce ethanolaminu s fosfatidylserinem, nebo recyklace lysofosfatidylethanolaminu.

Fosfatidylethanolamin je vedle fosfatidylcholinu majoritní složkou membránové dvojvrstvy. Složení polární „hlavy“ mu dává konický tvar a umožňuje vazbu vodík-protein prostřednictvím ionisovatelné aminoskupiny. Na rozdíl od fosfatidylcholinu je spolu s fosfatidylserinem lokalizován na vnitřní straně membrány. Podílí se významně na jejich biologických funkcích (transport, produkce energie, biosynthesa, signalisace, komunikace). V živočišných tkáních

hraje fosfatidylethanolamin významnou úlohu v membránách srdce během ischemie, podílí se na sekreci nascentních VLDL lipoproteinů z jater, na rozštěpení membrány, je prekursorem anandamidu; dále je donátorem ethanolaminové komponenty v biosynthese glykosylfosfatidylinositolového ukotvení pro řadu povrchových membránových proteinů.

U diabetiků byly detekovány stopové koncentrace glukosylovaného fosfatidylethanolaminu; jeho adukty s hydroxyalkenaly jsou produktem hydroperoxidace nenasycených mastných kyselin (např. 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal odvozený od n-6 mastných kyselin). Tyto sloučeniny mohou za podmínek oxidativního stresu *in vivo* ovlivnit vlastnosti biologických membrán.

2.1.3.6. Lysofosfatidylethanolamin

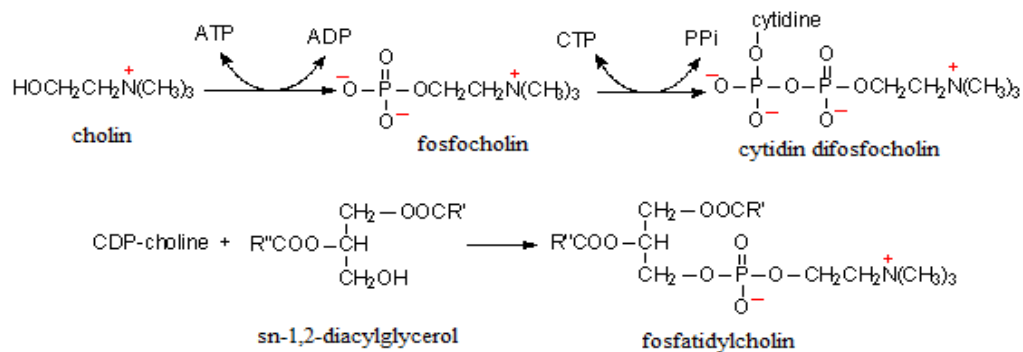
Lysofosfatidylethanolamin vzniká hydrolysou fosfatidylethanolaminu pomocí fosfolipasy A₂, jako součást deacylačního/reacylačního cyklu, která kontroluje celkové složení molekulárních druhů.

V rostlinách je lysofosfatidylethanolamin specifickým inhibitorem fosfolipasy D, klíčového enzymu pro degradaci membránových fosfolipidů během raného stadia stárnutí. Zpomaluje tak stárnutí listů, květů a již sklizených plodů, a pro tento účel našel komerční využití ve sprayích, které stimulují zrání plodů a zpomalují jejich uvadání.

2.1.3.7. Fosfatidylcholin

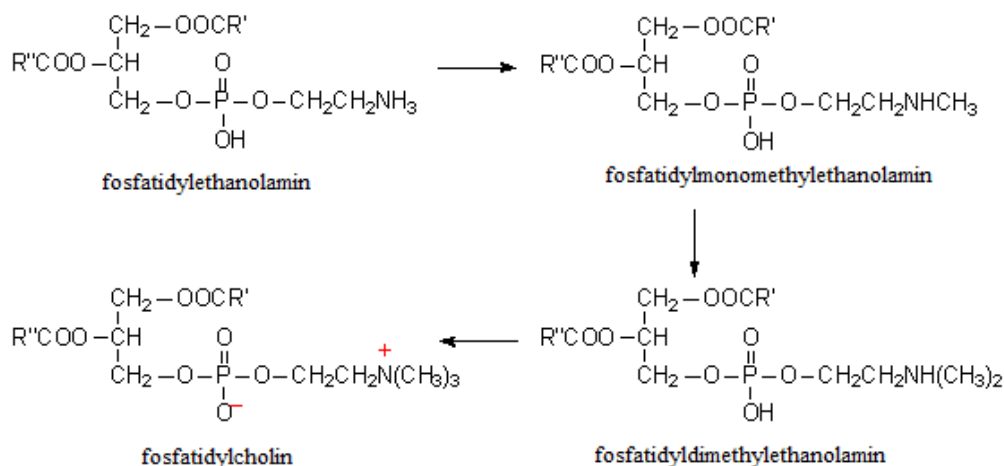
Pro biosynthesu fosfatidylcholinu u živočichů, rostlin a mikroorganismů je známo několik mechanismů. Samotný cholin není živočišnými buňkami syntetisován, je esenciálním nutriem, a musí být získán v dietě ve formě lipidů obsahujících cholin. Jakmile je zachycen buňkou, je ihned fosforylován cholin kinasou v cytoplasmě na fosfocholin, který reaguje s cytidin trifosfátem (CTP) na cytidin difosfocholin (CDP). Membránově vázaný enzym CDP-cholin:1,2-diacylglycerol cholinofosfotransferasa v endoplasmatickém retikulu katalysuje reakci CDP s *sn*-1,2-diacylglycerolem za tvorby fosfatidylcholinu. Tato hlavní cesta syntesy fosfatidylcholinu u rostlin a živočichů je analogická se syntesou fosfatidylethanolaminu. Schematicky je znázorněna na obr. 31.

Tato reakce se výrazně liší od syntesy fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu a kardiolipinu. Oba typy využívají nukleotidů, ale u druhé skupiny je kovalentně vázán přímo na intermediát (tj. cytidin difosfát diacylglycerol).



Obr. 31 Hlavní cesta biosynthesy fosfatidylcholinu

Druhou cestou biosynthesy fosfatidylcholinu popisuje schema na obr. 32. Zahrnuje postupnou metylaci fosfatidylethanolaminu *S*-adenosylmethioninem jako zdrojem methylových skupin; meziprodukty jsou mono- a dimethyl-fosfatidylethanolamin, reakce je katalysována enzymem fosfatidylethanolamin *N*-methyltransferasou. Tato cesta je charakteristická pro játra.



Obr. 32 Jaterní syntéza fosfatidylcholinu

Fosfatidylethanolamin *N*-methyltransferasa je velmi důležitý enzym zvláště při deficienci cholinu v potravě. Biosyntéza fosfatidylcholinu v játrech je důležitá pro sekreci plasmatických lipoproteinů (VLDL a HDL) i pro řadu dalších fyziologických funkcí. Vedlejším produktem biosynthesy fosfatidylcholinu z fosfatidylethanolaminu je konverse *S*-adenosylmethioninu na *S*-adenosylhomocystein, který je v játrech hydrolysován na adenosin a homocystein. Zvýšené hladiny homocysteinu v plasmě jsou rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění a infarkt myokardu.

Třetí cesta biosynthesy fosfatidylcholinu přímo kondensací cholinu s CDP-diacylglycerolem byla popsána u bakterií symbiotickými s rostlinami (zdrojem cholinu je hostitelská rostlina). Díky cylindrickému tvaru molekuly vytváří fosfatidylcholin dvojvrstvy, a je tedy výhodným strukturním prvkem biologických membrán. Řetězce nenasycených mastných kyselin jsou ohnuté a ovlivňují tak fluiditu membrán. Tato vlastnost je pro funkci membrán velmi důležitá. Další funkcí fosfatidylcholinu je podíl na signalisaci prostřednictvím generace diacylglycerolu. Jako prekursor sfingomyelinu také ovlivňuje mnoho metabolických procesů sfingomyelinového cyklu. Je rovněž prekursorem kyseliny fosfatidové, lysofosfatidylcholinu, faktoru aktivujícího destičky a fosfatidylserinu.

2.1.3.8. Lysofosfatidylcholin

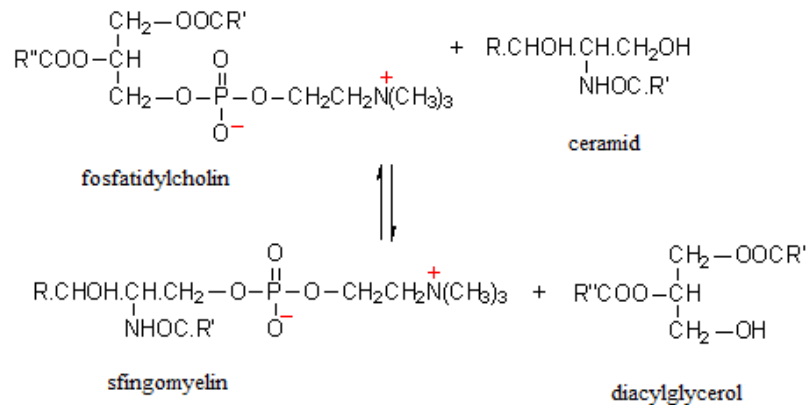
Lysofosfatidylcholin je v malých množstvích přítomen ve většině tkání. Vzniká hydrolysou fosfatidylcholinu enzymem fosfolipasou A2 jako součást deacylačního/reacylačního cyklu, který kontroluje celkové složení molekulárních druhů. V plasmě živočichů vzniká působením specifického enzymu sekretovaného játry - lecithin:cholesterol acyltransferasy (LCAT), který katalysuje přenos mastné kyseliny z pozice *sn*-2 fosfatidylcholinu na volný cholesterol za tvorby esteru cholesterolu. Identifikace vysoce specifické fosfolipasy A2 v peroxisomech, která generuje 2-arachidonoyl lysofosfatidylcholin, naznačuje jeho účast v tvorbě eikosanoidů a v signalisaci. Lysofosfatidylcholin má *in vitro* prozánětlivé vlastnosti a je znám jako patologická komponenta oxidovaných lipoproteinů LDL v plasmě a atherosklerotických lesích.

2.1.3.9. Sfingomyelin

Biosynthesa sfingomyelinu vychází z přenosu fosforylcholinu z fosfatidylcholinu na ceramid. Reakce je katalysována ceramid-cholin fosfotransferasou (sfingomyelin synthasou) a je při ní uvolněn diacylglycerol, jak ukazuje schema na obr. 33. Probíhá v plasmě a v Golgiho aparátu a vyžaduje přítomnost specifické transportní molekuly pro ceramid (CERT).

Sfingomyelin byl dlouho považován za alternaci fosfatidylcholinu při stavbě membrány, kde se uplatňuje jako chemicky odolná složka vnější vrstvy. Obě sloučeniny se však liší vazební kapacitou pro vodík a fyzikálními vlastnostmi. Sfingomyelin má u sfingoidní base amidovou vazbu na pozici 2 a hydroxylovou na pozici 3, z nichž obě mohou vázat vodík. Fosfatidylcholin má dvě esterově vázané karbonylové skupiny, které fungují pouze jako akceptor vodíku.

Stupeň desaturace alkylových skupin se u obou lipidů značně liší, což implikuje jejich různé ovlivnění membránové struktury.



Obr. 33 Biosynthesa řingomyelinu

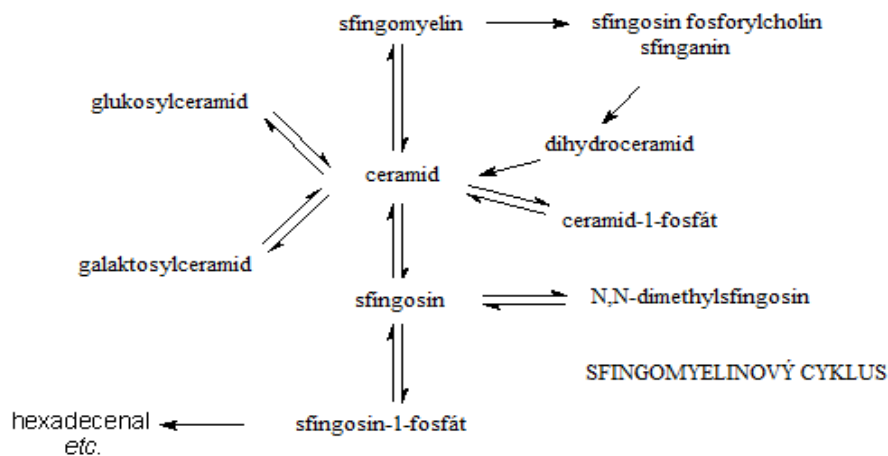
Podle posledních poznatků má řingomyelin značnou afinitu k cholesterolu a obvykle jsou lokalizovány společně ve specifických membránových subdoménách (raftech) a na povrchu lipoproteienových částic.

Jako součást tzv. řingomyelinového cyklu slouží řingomyelin spolu s dalšími biologicky aktivními řingolipidy též jako prekursor ceramidů, basí s dlouhým řetězcem a řingosin-1-fosfátu. Schema cyklu ukazuje obr. 34.

U živočichů je řingomyelin primárním zdrojem ceramidu a jeho metabolitů, které umožňují spuštění apoptosy a další metabolické změny. Reakce probíhá ve většině buněčných organel. Klíčovými enzymy pro tuto přeměnu jsou řingomyelinasy, které se funkcí podobají fosfolipase C. Deficience některého z enzymů má za následek akumulaci řingomyelinu v buňkách a tkáních např. u Niemann-Pickovy choroby.

Potravním zdrojem řingolipidů jsou vejce, maso a mléčné produkty. Jako hlavní polární lipid mléka mají řingolipidy význam pro dětskou výživu. V experimentálních studiích byl pozorován vliv řingolipidů v dietě na inhibici karcinogese, redukci LDL cholesterolu, zvýšení HDL cholesterolu, a zmírnění symptomů zánětlivé střevní choroby. Na rozdíl od glycerolipidů nejsou řingolipidy hydrolysovány pankreatickými enzymy; ve střevě jsou štěpeny alkalickou řingomyelinasou na ceramid a dále neutrální ceramidasou na volné mastné kyseliny a řingosin. řingosin je absorbován, částečně reesterifikován, zbytek je konvertován na kyselinu

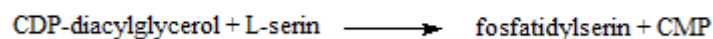
palmitovou a acylován do triacylglycerolu chylomikronů. Snížení obsahu endogenního sfingomyelinu v membránách střevních buněk by mohlo snížit vychytávání dietního cholesterolu.



Obr. 34 Sfingomyelinový cyklus

2.1.3.10. Fosfatidylserin

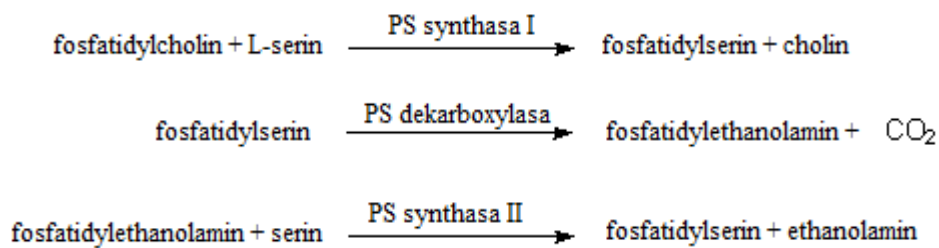
Aminokyselinu serin je schopna syntetisovat většina organismů. U živočichů ji produkují prakticky všechny typy buněk. Prokaryotické organismy syntetisují fosfatidylserin obdobně jako další fosfolipidy, tj. reakcí L-serinu s CDP-diacylglycerolem (obr. 35). Většina takto vzniklého fosfatidylserinu je dekarboxylována na fosfatidylethanolamin, z něj pak methyloací vzniká fosfatidylcholin; fosfatidylserin je tedy základním prekusorem fosfolipidů.



Obr. 35 Biosynthesa fosfatidylserinu u prokaryotů

U živočichů probíhá biosynthesa fosfatidylserinu dvěma cestami, které vyžadují rozdílné enzymy (PS syntasou I a II, a PS dekarboxylasu) s různými substráty a lokací v buňce. Synthesa probíhá v endoplasmatickém retikulu buňky, nebo v mitochondriální membráně, výměnnou reakcí L-serinu s fosfatidylcholinem nebo fosfatidylethanolaminem, katalysovanou PS syntasou I. Tato reakce je přísně závislá na iontech kalcia a nevyžaduje další zdroj energie. Nově vzniklý lipid je transportován do mitochondrií, kde je dekarboxylován na fosfatidylethanolamin; ten se vrací do endoplasmatického retikula a je přeměněn zpět na fosfatidylserin působením PS syntasy II. Schema reakce ukazuje obr. 36. Přítomnost fosfatidylserinu

v cytosolických lupíncích endosomů a lysosomů umožňuje těmto kompartmentům vazbu na specifickou doménu proteinů. Vysoká koncentrace tohoto anionického lipidu má za následek negativní povrchový náboj, ke kterému se mohou vázat polykationické proteiny. Fosfatidylserin je také esenciálním kofaktorem protein kinasy C, klíčového enzymu signálové transdukce. V destičkách zvyšuje aktivaci prothrombinu na thrombin. Některé choroby jsou charakteristické tvorbou protilátek proti fosfatidylserinu (thrombosa, opakovaný spontánní potrat). Fosfatidylserin je také klíčovou složkou komplexu lipid-kalcium-fosfát, který je důležitý při tvorbě kostní hmoty. V mozku a retině má fosfatidylserin vysoký obsah kyseliny dokosahexaenové, která je pro správnou funkci těchto orgánů velmi důležitá. Možnost dietní suplementace fosfatidylserinem ke snížení rizika demence a kognitivní dysfunkce zatím nebyla dostatečně průkazná.



Obr. 36 Biosynthesa fosfatidylserinu u eukaryotů

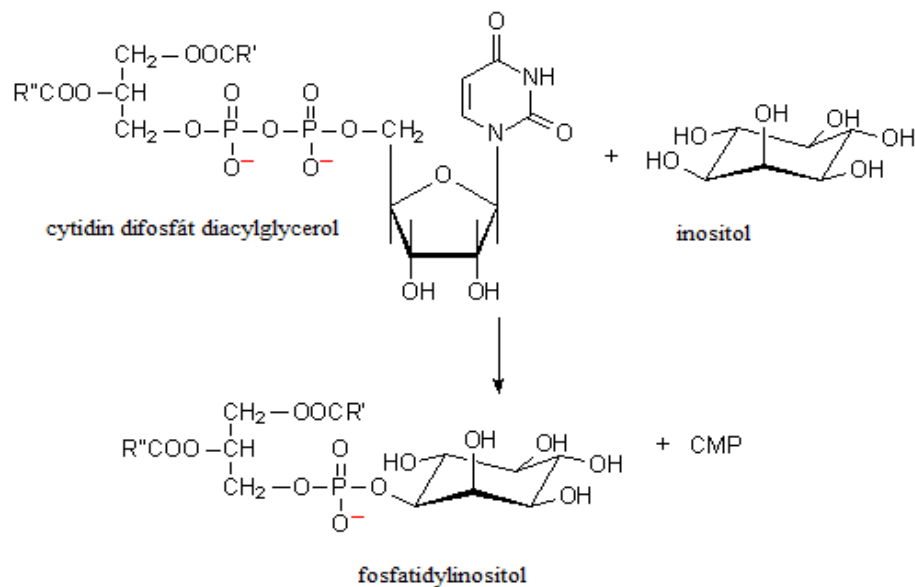
2.1.3.11. Lysofosfatidylserin

Lysofosfatidylserin vzniká deacylací fosfatidylserinu, mastná kyselina je výhradně v poloze *sn*-1. Je znám jako mediátor řady biologických pochodů. Je přítomen v poškozených tkáních (tumor, popáleniny, vyloučení transplantovaného štěpu), v buněčné signalisaci má pravděpodobně podobnou funkci jako kyselina lysofosfatidová. Lysofosfatidylserin je generován při poškození buněk, a má schopnost difundovat a přenášet informaci dalším, především žírným buňkám. Usnadňuje odstraňování aktivovaných a odumírajících neutrofilů. Specificky stimuluje degranulaci žírných buněk – je to vlastnost, kterou další lysofosfolipidy nemají.

2.1.3.12. Fosfatidylinositol

Fosfatidylinositol hraje důležitou úlohu jednak jako součást membrány, jednak jako účastník

esenciálních metabolických procesů, a to v rostlinné i živočišné říši. Je to kyselý (aniontový) fosfolipid, který sestává z kyseliny fosfatidové, na kterou je prostřednictvím fosfátové skupiny vázán inositol (hexahydroxycyklohexan). U většiny organismů je ve formě *myo*-D-inositolu, ale u rostlin se vyskytuje občas i forma *skýlo*- a *chiro*-inositolu. Nejvíce je zastoupen v mozku, kde představuje asi 10% celkových fosfolipidů, v malém množství je zastoupen ve všech typech buněk. Biosynthesa probíhá obdobně jako u fosfatidylglycerolu (a tudíž i kardiolipinu) z prekursoru CDP-diacylglycerolu reakcí katalysovanou enzymem CDP-diacylglycerol inositol fosfatidyltransferasou (fosfatidylinositol synthasou). Tento enzym je lokalizován převážně v endoplasmatickém retikulu, ale vyskytuje se i v plasmatické membráně (např. v kvasinkách) téměř výlučně na cytosolické straně dvojvrstvy. Do dalších membrán se dostává vesikulárním transportem nebo pomocí specifických transferových proteinů. Schema biosynthesy ukazuje obr. 37.



Obr. 37 Biosynthesa fosfatidylinositolu

U živočichů je fosfatidylinositol primárním zdrojem kyseliny arachidonové pro biosynthesu eikosanoidů, která je odštěpena fosfolipasou A2 z polohy *sn*-2 glycerolu. Jeho deriváty – fosfatidylinositol fosfáty (polyfosfoinositidy) - jsou důležité pro vazbu proteinů na rozhraní membrány a jejich regulaci. Jako polyanionické sloučeniny jsou velmi efektivní u nespecifických elektrostatických interakcí s proteiny. Fosfatidylinositol a jeho fosfáty jsou hlavním

zdrojem diacylglycerolů, které slouží jako signální molekuly v živočišné i rostlinné říši. Signalisace se uskutečňuje prostřednictvím rodiny vysoce specifických enzymů známých jako fosfolipasa C. Dále regulují skupinu nejméně dvanácti příbuzných enzymů známých souhrnně jako protein kinasa C, která kontroluje důležité buněčné funkce (diferenciaci, proliferaci, metabolismus, apoptosu). Produktem katabolismu fosfatidylinositolu je 2-arachidonoyl glycerol, endogenní ligand kanabinoidních receptorů.

2.2 EVAPORATIVNÍ DETEKTOR ROZPTYLU SVĚTLA

2.2.1 STRUČNÁ HISTORIE

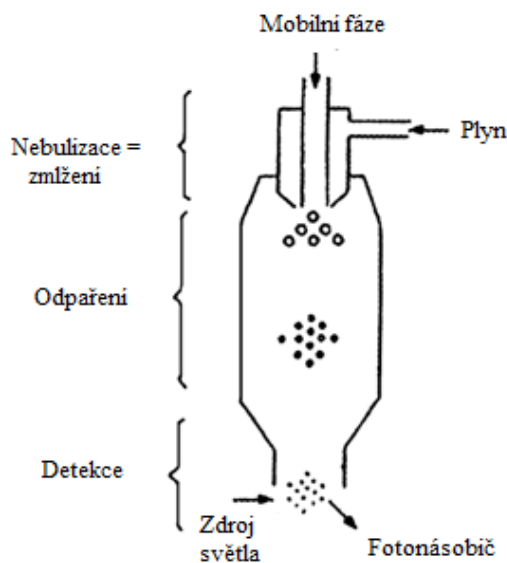
Pojem evaporativní detektor rozptylu světla (evaporative light-scattering detector, ELSD) pro HPLC byl poprvé popsán v roce 1978 Charlesem Worthem (7) a Stolyhwoem (8) v roce 1983. V roce 1980 uvedla jako první ELSD na trh firma Applied Chromatography Systems (ACS) z Británie. V roce 1982 publikoval Macrae s kolektivem (9) jako první aplikaci ACS ELSD pro analýzu lipidů. Jejich ELSD chromatogram ukázal separaci molekulárních druhů triacylglycerolů ze sojového a světlicového oleje. První metodu pro separaci lipidových tříd pomocí ACS ELSD detekce publikoval Christie v roce 1985 (10). Během dalších 10 let byl zvýšen zájem díky výhodnosti ELSD pro analýzu lipidů a byla vyvinuta řada HPLC metod s použitím tohoto detektoru. Během posledních 20 let se stal ELSD detektor velmi cenným nástrojem pro chemiky a biochemiky zabývajícími se lipidy.

2.2.2 PRINCIPY FUNKCE ELSD

Evaporativní detektor rozptylu světla slouží především k detekci látek, které ve své molekule neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor. Jako příklad je možné uvést detekci fosfolipidů, mastných kyselin, oligo- /polyethyleneglykolů, polyvinylchloridu, polymethylmethakrylátu, dextrinů aj. Je to universální detektor, u něhož můžeme použít gradientovou eluci bez ovlivnění nulové linie (11).

Detekce netěkavých analytů pomocí tohoto detektoru vyžaduje nejprve odpaření mobilní fáze v nebuliseru (obr. 38). V zásadě platí, že nebuliser v ELSD je podobný vstřikovači paliva v moderním automobilu, který vstřikuje benzín se vzduchem a vytváří plynnou směs na v přesném poměru benzín:vzduch. V nebuliseru je kapalina vytékající z kolony spolu s velkým ob-

jemem plynu (obvykle dusík nebo vzduch) protlačena pod vysokým tlakem přes jehlu za vzniku disperse kapiček. Po vstřikování směs vstupuje do vyhřívané unášecí trubice, kde je více těkavá mobilní fáze odpařena. Výsledkem je pak mlha tvořená částicemi suchého vzorku a parami rozpouštědla. Vzorek je směřován do detekční cely přes světelný zdroj (není zde specifický požadavek na vlnovou délku) a stupeň rozptylu světla je úměrný hmotnosti analyzované látky. Jako světelný zdroj se používají jednoduché žárovky do projektoru s širokým spektrem světla, nebo laserový zdroj světla s velmi úzkým rozsahem vlnových délek. Výstup z fotodetektoru je obvykle analogový signál. U moderních systémů HPLC je analogový signál převeden na digitální, a dále zpracován pomocí integračního software. V současné době jsou ELSD přístroje vyráběné a prodávané společnostmi Alltech (Northfield, IL), Sedex (Sedere Co Alfortville, Cedex, Francie), Shimadzu a Richard Scientific, ESA (Chelmsford, MA), Eurosep (Cergy, Pointoise Cedex, Francie), Polymer Laboratories (Amherst, MA) a Waters Co (Milford, MA).



Obr. 38 Schema ELSD (Převzato z <http://www.sedere.com/USA/products.html>)

Existují tři základní typy konfigurací ELSD:

1. Všechna rozprašovací směs vstupuje do odpařovací komory a přechází do fotosensoru.
2. Výstup kolony je rozdělen pomocí děliče na vstup do ELSD, zbytek je odkloněn do dalšího detektoru nebo do kolektoru frakcí pro další zpracování.

3. Rozprašovací směs je přeměřována do komory, která obsahuje "past" ke shromažďování rozpouštědel, které kondensují na bocích komory, a po odstranění kondensátu je směs plynné fáze nesena do fotodetektoru. (11)

2.2.3 VÝHODY A NEVÝHODY ELSD

Odezva detektoru odpovídá všem přítomným netěkavým analytům, jinak řečeno odezva detektoru by měla být úměrná hmotnosti přítomných analytů. Aby byl lineární dynamický rozsah detektoru co největší, musí se velikost solvatovaných částic analytu kontrolovat a měla by být jednotná desolvatace. Velikost částic analytu určuje, jak se dopadající světlo rozptýlí. Tvorba kapiček analytu v nebuliseru a jejich velikost v závislosti na složení mobilní fáze je možné s určitou mírou predikovat - závisí na průtoku mobilní fáze, viskozitě a hustotě mobilní fáze. Rozptyl světla se pak měří v takovém úhlu vůči excitujícímu paprsku, aby byly co nejvíce eliminovány polarizační efekty. Linearita detektoru závisí tudíž také na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu. Obecně je linearita ELS detektoru výrazně nižší než detektoru UV, protože musí být mobilní fáze těkavější než analyt, což vyplývá z principu ELSD. Na mobilní fázi jsou kladeny určité limitující požadavky – vedle rozpouštědel by se měly používat pokud možno takové pufrы, které velmi snadno těkají (mravenčanové, octanové) obdobně jako při detekci MS. Detektor ELS je citlivý k použité mobilní fázi, protože ta významně ovlivňuje šum detektoru. Technika ELSD je technikou destruktivní, a proto musí být detektor zařazen jako poslední detektor v serii (8).

Nebulisace vzorku pro ELSD může být teoreticky provedena jakýmkoliv typem inertního plynu, z praktického hlediska jsou nejpoužívanějšími dusík a vzduch. Složení a průtok mobilní fáze jsou pro HPLC-ELSD důležitými faktory. Většina organických rozpouštědel je snadno nebulisovatelná, stejně jako i malé množství vody. U většího množství vody a vyšších průtoků je pak třeba zvýšit teplotu detektoru. Pro zvýšení polarizace mobilní fáze se používají těkavé kyseliny (octová, mravenčí), těkavé dusíkaté base (hydroxid amonný, triethylamin) a těkavá činidla (například tetraalkylamoniumfosfát). U většiny sestav HPLC výrobci tvrdí, že jejich jednotky dokážou zpracovat rozpouštědlo s průtokem od 1-2 ml/min. V praxi bylo ověřeno, že pro malé průměry kolon (2-3 mm ID) jsou nízké průtoky (0,2 – 0,5 ml/min) výhodnější (11). Nevýhodou ELS detektoru je, že vztah mezi hmotností a plochou píku není lineární. Někteří autoři popisují tento vztah jako sigmoidální, exponenciální či „téměř lineární“. V praxi se

může ELSD používat pro kvantitativní analýsu, pokud jsou pečlivě konstruované vícebodové kalibrace pro každou sloučeninu, kterou chceme analyzovat.

2.2.4 SROVNÁNÍ ELSD S OSTATNÍMI DETEKTORY

Evaporativní light scattering detektor se též nazývá hmotový detektor a před všemi ostatními detektory má výhodu citlivosti a univerzálnosti.

UV-VIS detektory jsou nejběžnějšími a nejlevnějšími typy detektorů pro HPLC. Jsou nedeštruktivní a většinou jsou schopny měřit v rozmezí 190-750 nm. Většina lipidů (včetně nasyčených tuků) absorbuje při vlnové délce 205 nm, což je velmi blízko absorpční organických rozpouštědel nutných pro mobilní fázi. Proto tento detektor není pro analýsu lipidů příliš vhodný. Jen lipidy, které mají konjugované vazby nebo aromatické kruhy vykazují silnou absorpci v UV spektru.

Refraktometrické detektory jsou nedeštruktivní detektory, které jsou velmi oblíbené pro svou univerzálnost i nízkou pořizovací cenu. Moderní refraktometrické detektory jsou velmi citlivé, ale pro analýsu lipidů mají určitá omezení. Musí být ale zajištěna konstantní teplota a složení mobilní fáze. Vztah mezi hmotností a plochou píku bývá obvykle lineární (12). Omezené použití pro stanovení lipidů spočívá v tom, že lze použít pouze isokoratickou eluci.

Fluorescenční detektory jsou také nedeštruktivní. Tento typ detektorů může být vhodný pro detekci některých druhů lipidů, které lze derivatisovat fluoroforem. Jsou výrazně citlivější než detektory UV-VIS.

Radioisotopové detektory jsou destruktivní a poskytují velmi citlivou detekci pro lipidy označené radioisotopem. Ke značení se většinou využívá isotopů ^3H , ^{14}C , ^{35}S a ^{32}P . Řada radioaktivně značených standardů lipidů i jejich prekursorů je dnes komerčně dostupná. Značení lze volit buď celkové, tj. všechny atomy v molekule, nebo selektivní, s označením pouze určité skupiny. Výjimkou není ani dvojité značení.

Elektrochemické detektory jsou účinné pro analýsu fenolů, katecholaminů, cukrů, glykopeptidů a některých antibiotik. Detekce je možná jen pro snadno oxidovatelné nebo redukovatelné látky, takže z lipidů jsou potenciálně účinné pouze pro detekci glykolipidů.

Plamenové ionizační detektory pro HPLC jsou vhodné pro mnoho druhů lipidových analýs, protože stejně jako ELSD jsou „hmotové“ nebo „univerzální“, tzn., že detekují všechny netěkavé analyty a nevyžadují, aby obsahoval zvláštní chromofor, či fluorofor.

Hmotnostní spektrometrický detektor je považován za typ detektoru pro HPLC, ačkoliv detekuje hmotu jen u látek, u kterých dojde k ionisaci a to buď elektrosprejem či ionisací za atmosférického tlaku (13).

2.3 ANALYTICKÝ PŘÍSTUP

Pro metabolické studie je třeba primární rozhodnutí, které lipidy či jejich komponenty budou pro daný problém nejvíce vypovídající. Pravděpodobně nejvhodnější kombinací se jeví stanovení profilu lipidových tříd, a dále zastoupení mastných kyselin v jednotlivých složkách, které má obvykle větší výpovědní hodnotu než jejich stanovení v celkovém lipidu. Základní hodnotou je gravimetrické stanovení celkového lipidu v daném biologickém vzorku.

Pro stanovení obsahu všech lipidových tříd, neutrálních i polárních, lze využít pouze kapalinové chromatografie. Nejstarším způsobem separace je tenkovrstevná chromatografie, která v prvním kroku s nepolární mobilní fází (heptan-diethylether-kyselina octová) umožní rozdělení neutrálních lipidů (sterol estery, triacylglyceroly volné mastné kyseliny parciální glyceridy, volný cholesterol), přičemž polární lipidy se v tomto systému nepohybují. Po izolaci z materiálu tenké vrstvy mohou být rozděleny dalším vyvíjením. Nejdokonalejší rozdělení fosfolipidů poskytuje dvourozměrná tenkovrstevná chromatografie, kterou lze rozdělit všechny fosfolipidy, včetně lysoforem. Vyhodnocení se provádí buď densitometricky in situ, nebo po separaci z materiálu vrstvy a převedení lipidního fosforu na fosfomolybdenanový komplex spektrofotometricky. Tato analytická metoda se stále v praxi využívá díky své nenáročnosti na přístrojové vybavení. Pro preparativní účely je tato technika nejvýhodnější s fluorescenční detekcí. Složení mobilní fáze se odvíjí od separovaných lipidových tříd, zde ukázka několika systémů (14):

- Separace neutrálních lipidů s mobilní fází: hexan-diethylether-kyselina octová (80:20:1), polární lipidy zůstávají na startu. Pořadí eluovaných lipidů dle klesajících R_f hodnot: WE nebo SE, GEDE, TG, FA, FS, DG, MG, PL
- Separace polárních lipidů s mobilní fází: chloroform-methanol-kyselina octová, voda (60:50:1:4), neutrální lipidy se pohybují s čelem. Pořadí eluovaných lipidů dle klesajících R_f hodnot: NL, CL, PE, PI, PS, PC, SM, LPL
- Separace polárních lipidů a MG s dvojitým vyvíjením – první systém: hexan-aceton (3:1) oddělí MG a další vyvíjení v systému: chloroform-methanol-kyselina octová-

voda (80:13:8:0,3) rozdělí polární lipidy v následujícím pořadí dle klesajících R_f hodnot: CL, PA, CM, PG, PE

- Separace polárních lipidů a fosfátů PI v systému: methanol-chloroform-30% amoniak-voda (90:54:5:5,5) v následujícím pořadí dle klesajících R_f hodnot: PE, PC, PI, PI-monofosfát, PI-difosfát
- Dvourozměrná separace neutrálních a polárních lipidů. Všechny lipidové třídy, včetně jejich lysoformů, nelze rozdělit jedním vyvíjením, nejlepší separace se dosahuje vyvíjením ve dvou směrech. První systém: chloroform-methanol-30% amoniak-voda (90:54:5:5,5), separuje tyto skupiny v následujícím pořadí klesajících R_f hodnot: NL, CL, FA+CM+PE+PC, GS+LPE, PI+SM, PA+PS+LPC, LPS+LPI, nerozdělené skupiny byly separovány v druhém systému, který obsahoval chloroform-methanol-acetonkyselina octová-voda (60:20:80:20:10) a to ve směru kolmém na první vyvíjení

Pro velké serie vzorků je tento způsob příliš manuálně náročný, a proto byly vypracovány alternativy snadnějšího zpracování. Na počátku 80. let se rozšířila metoda tekovrstevné chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (TLC-FID), která jako stacionární fázi využívala křemenné tyčinky o průměru cca 1 mm se speciálně zakotveným silikagelem. Po vyvíjení byly separované látky spalovány v plamenovém ionizačním detektoru, který byl modifikací detektoru pro plynovou chromatografii. Spálením vzorku se zároveň regenerovala stacionární fáze pro další analýsu. Tento způsob umožňoval postupné vyvíjení, např. po vyvinutí neutrálních lipidů byl separovaný vzorek spálen těsně nad startem, kde zůstaly fosfolipidy, a v dalším kroku byla provedena jejich separace po celé délce tyčinky. Metoda poskytovala z analytického hlediska značné výhody, nanášení vzorku však bylo manuálně náročné, kapacita tyčinky byla 1 μ l vzorku o obsahu cca 200 μ g látky. Nevýhodou byla i určitá nestabilita tyčinek, kalibrační závislosti bylo po každých cca 20 analýsách kontrolovat, a životnost většinou nepřesáhla 100 analýs (15).

Velkým přínosem proto byla možnost využití HPLC díky uvedení dvou typů universálních (hmotových) detektorů - evaporativního detektoru rozptylu světla a plamenového ionizačního detektoru. Oba detektory umožňují gradientovou eluci (na rozdíl od refraktometrického detektoru), stacionární fáze může být normální i reversní, a pro jednotlivé problémy lze volit různé kombinace mobilních fází.

Jako normální fáze slouží silikagel (-Si-OH), alumina (-Al-OH), fáze s chemicky vázanými skupinami jako jsou diol $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$, aminopropyl $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$, a

kyanopropyl $-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$) (16). Příkladem reversní fáze jsou fáze s chemicky vázanými skupinami C8, C18 (oktadecyl silica, ODS) a C30. Pro normální mobilní fázi jsou typickými rozpouštědly hexan/isopropanol/voda nebo chloroform/methanol/voda. V tomto systému jsou eluovány nejdříve nepolární lipidy a následně se eluují lipidové třídy s rostoucí polaritou. Pořadí eluce je obdobné jako na tenké vrstvě: SE, TG, FS, FA, CM, CL, PE, PI, LPE, PS, PC, SM, LPC (10). U reversní fáze slouží jako mobilní fáze nejčastěji směs methanol/acetonitril/voda. V této sestavě dochází nejdříve k eluci polárních lipidů a následně lipidů s postupně klesající polaritou (11).

První analýza lipidů pomocí HPLC-ELSD byla publikována Christiem v roce 1985 (10). Použil jako biologický vzorek plasmu potkaních samic. Využil ternárního gradientu isooktan/tetrahydrofuran (99:1), isopropanol/chloroform (4:1) a isopropanol/voda (1:1). Jako první se eloval ester cholesterolu a jako poslední sfingomyelin. V práci z roku 1986 (17) už doporučuje změnu uhlovodíku na hexan, který má nižší viskozitu, je snadnější ho zmlžít a celý systém může pracovat v oblasti nižších tlaků. Navíc do třetí složky s vodou a isopropanolem přidal 0,5 mM serin a triethylamin o pH 7,5 pro zvýraznění rozlišení minoritních složek (18).

Nepolární lipidové třídy jsou nejlépe separovatelné, když jsou rozpuštěny v nepolárním rozpouštědle, jako je hexan. Polární lipidy jsou v hexanu špatně rozpustné, optimálně jsou rozpustné v polární směsi rozpouštědel jako je chloroform/methanol (85/15, v/v).

Bylo vyvinuto mnoho aplikací HPLC-ELSD, pomocí nichž lze separovat či kvantifikovat molekulární třídy nepolárních a polárních lipidů. Preparativní TLC nebo normální HPLC mohou být využity pro sběr jednotlivých lipidových tříd, které pak mohou být dále analysovány jako molekulární druhy (nejčastěji RP-HPLC), nebo může být stanoven profil mastných kyselin, což je stále nejfrekventovanější typ analýzy pro metabolické studie.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 APARATURA

Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu spojeném s evaporativním detektorem rozptylu světla, jeho součásti jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 Sestava aparatury

Beta 10 Gradientní čerpadlo (Ecom, Praha)
PL-EMD 950 Evaporative Mass Detector (Polymer Laboratories, UK)
DG 4014 Vakuový degasser (Ecom, Praha)
Termostat kolony (Ecom, Praha)

3.2 REAGENCIE

Všechny použité reagensy i analytické standardy byly nejvyšší dostupné čistoty. Jejich přehled udává tabulka 2 a, b.

Tab. 2 a: Seznam použitých rozpouštědel

Propan-2-ol (Chromservis, ČR)
Hexan pro HPLC (Chromservis, ČR)
Heptan pro HPLC (Chromservis, ČR)
Methanol pro chromatografii (Chromservis, ČR)
Chloroform (Chromservis, ČR)
Kyselina octová (Chromservis, ČR)
Tetrahydrofuran (Chromservis, ČR)
Triethylamin (Fluka, Švýcarsko)
Voda (Millipore, ČR)

Tab. 2 b: Analytické standardy

Sfingomyelin z vaječného žloutku (Sigma, SRN)
N-oleyl cerebrosid z hovězího mozku (Sigma, SRN)
L- α -lysofosfatidylcholin (Sigma, SRN)
L- α -fosfatidylinositol (sodná sůl) ze soji (Sigma, SRN)
Cholesterol oleát (Sigma, SRN)
Triolein (Sigma, SRN)
Fosfatidylserin (Sigma, SRN)
Kardiolipin (Sigma, SRN)
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (Sigma, SRN)
D- α -fosfatidylethanolamin, dipalmitoyl (c16:0) (Sigma, SRN)

3.3 PRACOVNÍ POSTUPY

3.3.1. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

Zásobní roztoky analytických standardů byly připraveny v koncentraci 10 mg/ml, jako rozpouštědlo sloužil pro neutrální lipidy n-heptan, pro volný cholesterol n-heptan s přidávkem 2% methanolu. Roztoky fosfolipidů byly z převážné většiny připraveny v chloroformu, pouze v případě fosfatidylserinu, lysofosfatidylcholinu, sfingomyelinu a ceramidu ve směsi chloroform-methanol 95:5. Schema ředění ukazuje tabulka 3.

Tabulka 3: Ředění kalibračních roztoků

Č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Standard (μ l)	5	10	15	25	50	75	100	150	200	250	300	400	500
Rozp. (μ l)	495	490	485	475	450	425	400	350	300	250	200	100	0
Nástřik (μ g)	2	4	6	10	20	30	40	60	80	100	120	160	200

3.3.2. CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM

Experimentální uspořádání bylo převzato z literatury (19). Jako stacionární fáze sloužila kolona Lichrospher 100 DIOL o rozměrech 4,6x250 mm, velikost částí 5 µm (Merck, SRN). Mobilní fáze byla tříložková, ve složení:

A: hexan-tetrahydrofuran 99:1 (v/v),

B: isopropanol-chloroform-kyselina octová 82:20:0,01 (v/v/v),

C: isopropanol-voda-triethylamin 47:47:6 (v/v/v).

Průtok mobilní fáze byl konstantní 0,5 ml/min. Gradient mobilní fáze udává tab. 4. Vzorčky byly natřikovány mechanicky injektorem typu Rheodyne, dávkovací smyčka měla objem 20 µl.

Tab. 4: Gradient mobilní fáze

Krok	Čas	A (%)	B (%)	C(%)
0	0	100	0	0
1	5	95	5	0
2	10	85	15	0
3	15	40	60	0
4	33	40	51	9
5	55	40	51	9
6	60	40	60	0
7	65	100	0	0
8	70	100	0	0

3.3.3. EXTRAKCE LIPIDŮ

Celkový lipid byl z tkáně a krevního séra extrahován metodou dle Folche (20), s použitím dichlormethanu místo chloroformu (21). Vzorek zmražené tkáně (cca 200 mg) byl homogenisován nožovým homogenisátorem ve 2 ml methanolu, nože byly opláchnuty 2x2 ml dichlor-

methanu. Po 15 min třepání byla směs zfiltrována do další nádoby, přidán 1 ml vody, fáze se rozdělily po cca 12 hodinovém stání při 4°C. Poté byla do předem zvážené zkumavky odebrána spodní organická fáze, k původnímu vzorku přidáno 4 ml směsi dichlormethan-methanol 2:1, a po cca tříhodinové stání opět odebrána spodní organická fáze a spojena s prvním podílem. Vzorek byl vysušen při teplotě lázně 80°C v dusíkové atmosféře a obsah lipidů určen gravimetricky. Pro analýzu HPLC by vzorky ředěny na koncentraci 5 mg/ml.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Při uvádění metody do provozu bylo nejdříve třeba ověřit experimentální podmínky uváděné v literatuře (19). Protože hlavním cílem bylo připravit metodu pro analýsu mozkové tkáně, jako stacionární fáze byla zvolena kolona Lichrospher-DIOL, která je v literatuře uváděna jako stabilnější ve srovnání s prostým silikagelem (22). Jako mobilní fáze byla zvolena podle literatury tříslušková směs s osmistupňovým gradientem, který je uveden v tabulce 4 (19). Postupně byly změřeny retenční časy všech složek, které jsou přítomny v biologickém materiálu - triacylglyceroly, estery cholesterolu, volný cholesterol, ceramid, kardiolipin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin, fosfatidylserin, sfingomyelin, lysofosfatidylcholin. Po ověření, že jsou jednotlivé látky uspokojivě rozděleny, byla ještě otestována stabilita roztoků. Je obecně známo, že zředěné roztoky bývají méně stabilní než koncentrované. Především roztoky fosfolipidů v chloroformu se ukázaly jako málo stabilní, a proto byl každý roztok připravován těsně před nástřikem. Dále byly proměřeny jednotlivé kalibrační závislosti. Cílem bylo změřit co největší množství bodů kalibrační závislosti, o které je známo, že není lineární, aby bylo možno určit její funkci. Tato funkce pak sloužila k výpočtu koncentrací jednotlivých složek ve vzorku.

4.1. KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI

4.1.1. TRIACYLGLYCEROLY

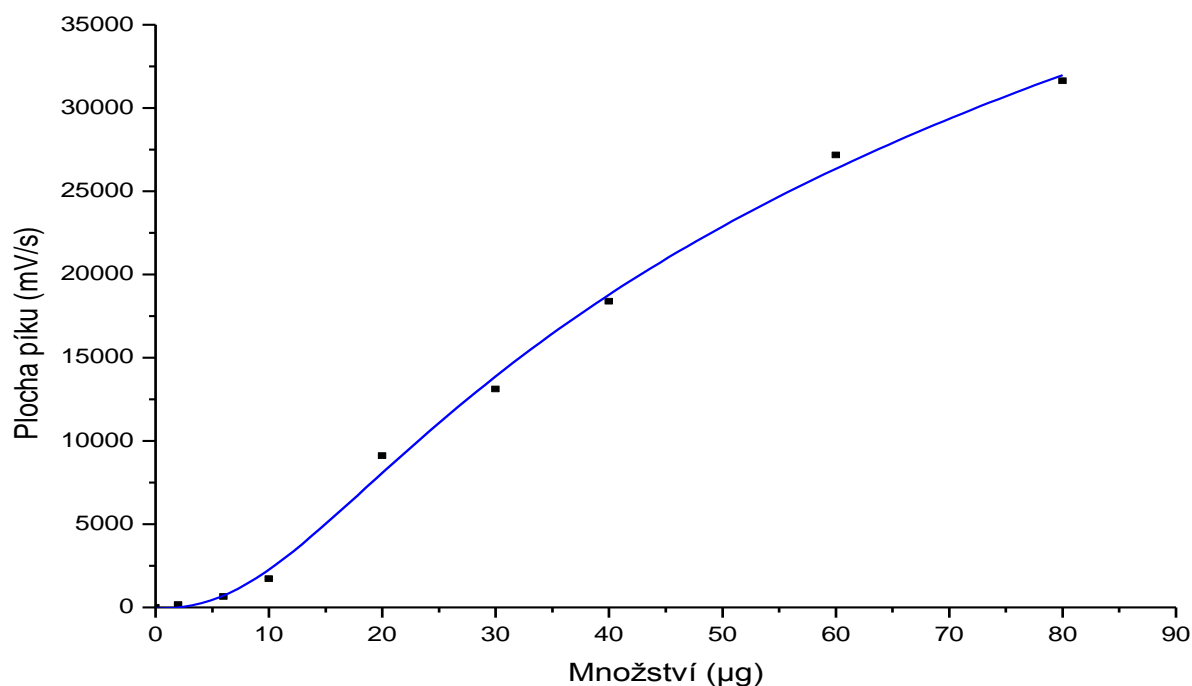
Triacylglyceroly poskytují v daném analytickém systému symetrický pík s retenčním časem $4,64 \pm 0,14$ min. Závislost plochy a výšky píku na nastříkovaném množství (kalibrační roztoky v koncentračním rozsahu 0,1-4,0 mg/ml) ukazuje obr. 39 a, b. Ve shodě s literárními údaji není závislost lineární, a dá se popsat několika typy rovnic. Přehledně je uvádí tabulka 5, včetně korelačních koeficientů pro závislost ploch i výšek píků.

Pro triacylglyceroly vyhovuje nejlépe závislost charakterisovaná rovnicí $y=a+bx+cx^2$, tj. kvadratická funkce, a to pro plochy i výšky píků. Úzké symetrické píky mají obdobný průběh kalibrační závislosti ploch i výšek. Rovnice pod grafy označují aktuální funkci optimálního propojení naměřených bodů pomocí software Origin, kterému kvadratická rovnice nevyhovovala. Mez detekce vyjádřená pomocí poměru signál/šum (3:1) je pro triacylglyceroly $0,04 \mu\text{g}$ v nastříkovaném množství, mez stanovení vyjádřená tímtož poměrem 10:1 je $0,12 \mu\text{g}$.

Literatura uvádí korelační koeficienty pro kalibrační závislosti od 50 ng do 20 µg nastříkovaného množství (23), v naší práci je rozsah pro triacylglyceroly čtyřnásobný.

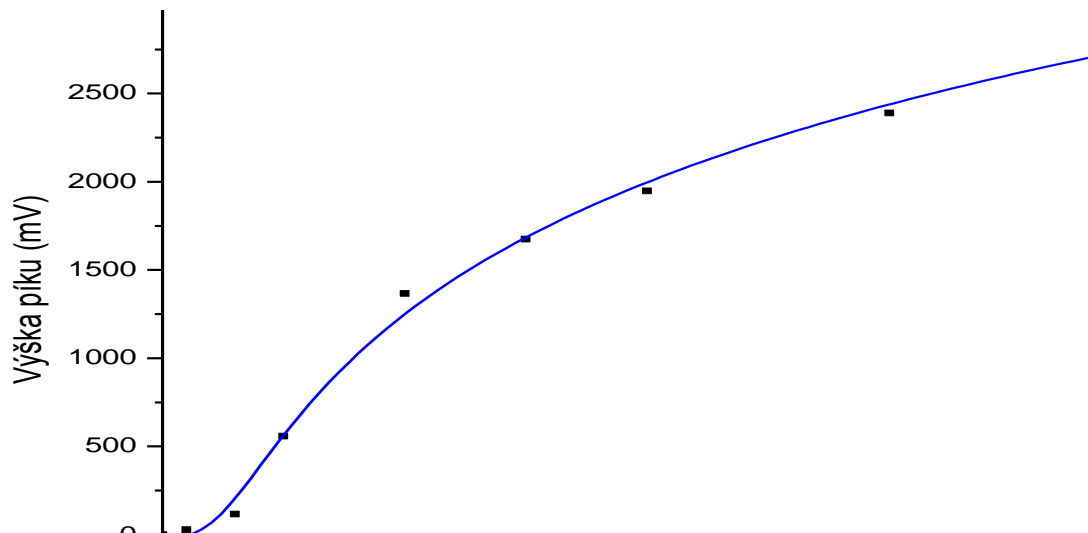
Tab. 5: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro triacylglyceroly

Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9107	0,8564
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9898	0,9566
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,9126	0,9684
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9904	0,9525
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9910	0,9903
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,6368	0,7661
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9540	0,9758
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,9126	0,9781



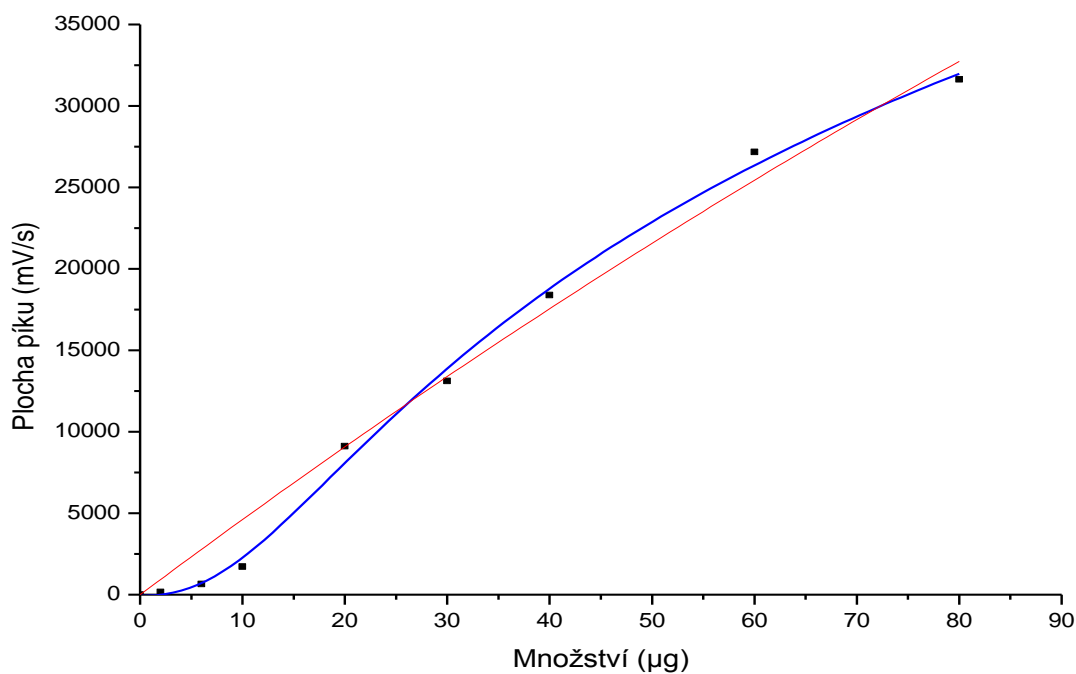
Obr. 39 a: Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro TG

Pro rovnici: $y = 6839,752 * \ln(0,003 * x^3 + \sqrt{x^2 + 218,067}) - 18489,229$, kde $R = 0,9980$



Obr. 39 b: Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro TG

Pro rovnici: $y = 363,924 * \ln(122,773 * x^3 + \sqrt{x^2 + 9,782 * 10^8}) - 3782,829$, kde $R = 0,9974$



Obr. 39 c: Porovnání proložení pro plochy píků TG, kde červeně znázorněná je

kvadratická závislost, modře závislost $y = A * \ln(B * x^3 + \sqrt{C + x^2}) + D$.

4.1.2. ESTERY CHOLESTEROLU

Estery cholesterolu poskytují rovněž symetrický pík s retenčním časem $7,01 \pm 0,09$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 40 a, b mají rovněž obdobný průběh. Závislost není lineární, pro plochy dosáhla nejvyššího korelačního koeficientu závislost mocninová $y=ax^b$, pro výšky závislost kvadratická $y=a+bx+cx^2$, jak ukazuje tabulka 6.

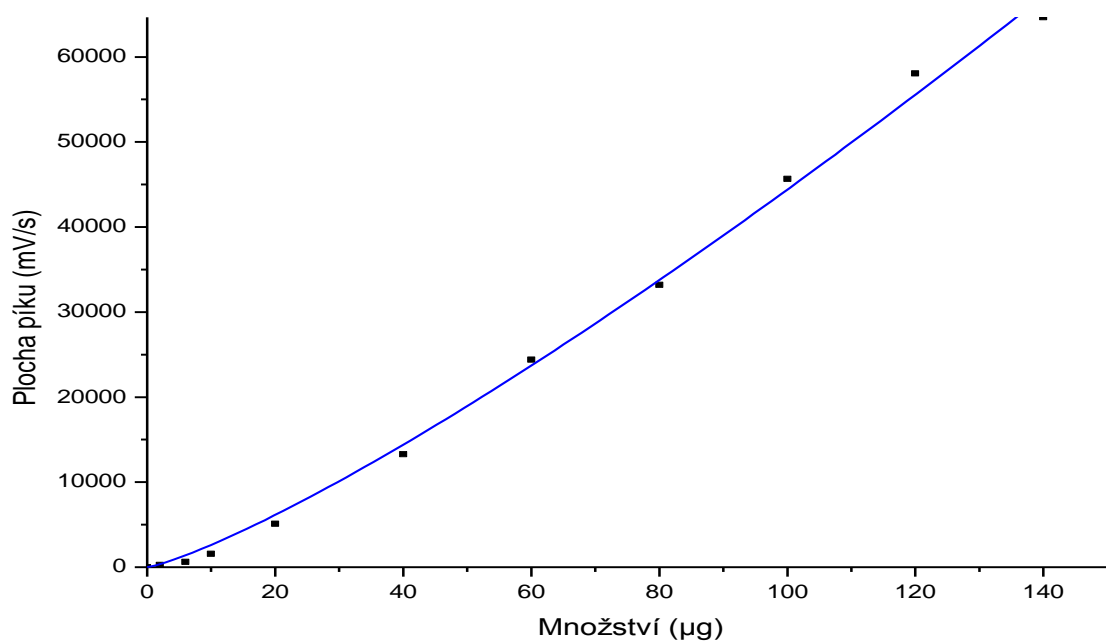
I pro estery cholesterolu uvádí literatura (23) nejvyšší nastříkované množství 20 μg , naše závislost má rozsah do 140 μg , tj. 7x vyšší.

Tab. 6: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro estery cholesterolu

Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9567	0,9736
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9982	0,9988
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8673	0,8595
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9959	0,9925
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9971	0,9992
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,5528	0,5519
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9423	0,9319
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8673	0,8595

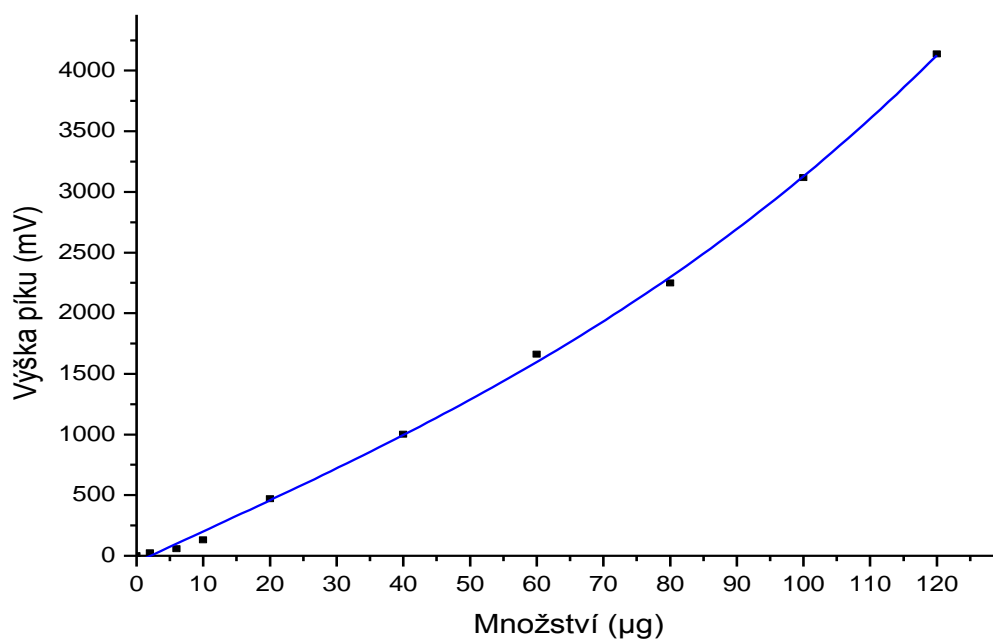
Kolona Lichrospher DIOL poskytuje nedokonalé rozdělení esterů cholesterolu a triacylglycerolů, jak bude ukázáno na záznamu lipidů krevního séra, a proto není pro analýsu krevních lipidů nejvhodnější. V literatuře jsou však uváděny její výhody týkající se stability fáze i dobrého rozdělení fosfolipidů, které byly v popředí zájmu této práce (22).

Mez detekce je pro estery cholesterolu 0,04 μg v nastříkovaném množství, mez stanovení je 0,13 μg . Závislost byla měřena do 140 μg nastříkovaného množství, dalším zvyšováním koncentrace nastříkovaného vzorku docházelo k ohybu závislosti. Estery cholesterolu patří, stejně jako další neutrální lipidy, mezi tzv. vysokoodezvové lipidy. Tento jev závisí na konsistenci látky rozptýlené v detektorové cele.



Obr. 40a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro CE

Rovnice mocniny: $y = 33,127 * x^{1,229}$, kde $R = 0,9982$



Obr. 40b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro CE

Kvadratická rovnice: $y = 0,126x^2 + 18,981x$, kde $R = 0,9992$

4.1.3. VOLNÝ CHOLESTEROL

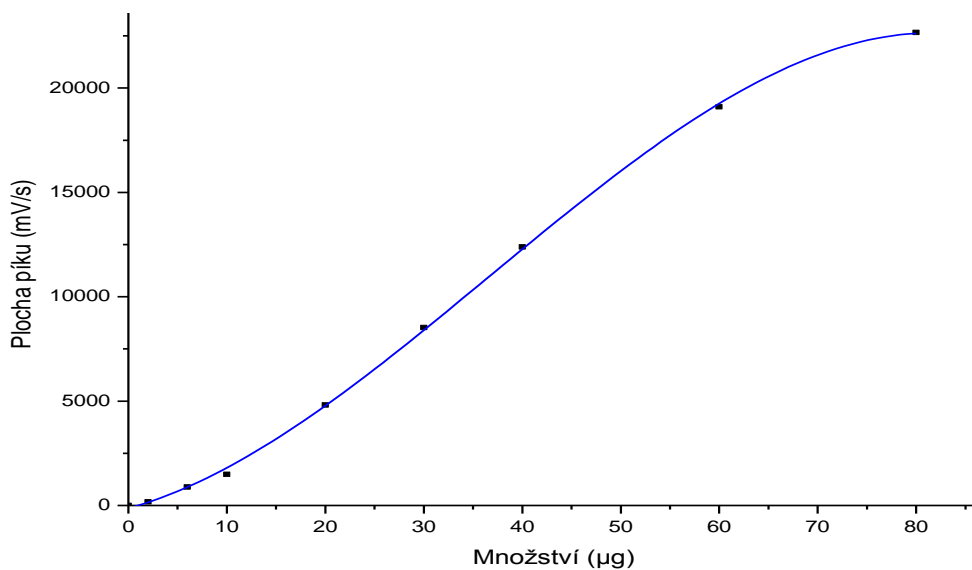
Volný cholesterol poskytuje rovněž štíhlý pík s retenčním časem $15,95 \pm 0,16$ min, Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 41 a, b mají rovněž obdobný průběh. Od předchozích lipidových tříd se liší tím, že již v nižším koncentračním rozmezí (do 80 μg) je patrný klasický tvar tzv. S-křivky. Oproti literatuře bylo měřeno do čtyřnásobného rozsahu. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy rovnice přímky $y=a+bx$ (24), hodnota pro kvadratickou závislost je však velmi blízká. Kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$ nejlépe vyhovovala pro kalibrační závislost pomocí výšek píků, jak ukazuje tabulka 7.

Tab. 7: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro volný cholesterol

Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9263	0,8866
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9932	0,9882
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8930	0,9453
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9944	0,9785
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9941	0,9956
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,6093	0,7071
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9446	0,9733
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8930	0,9453

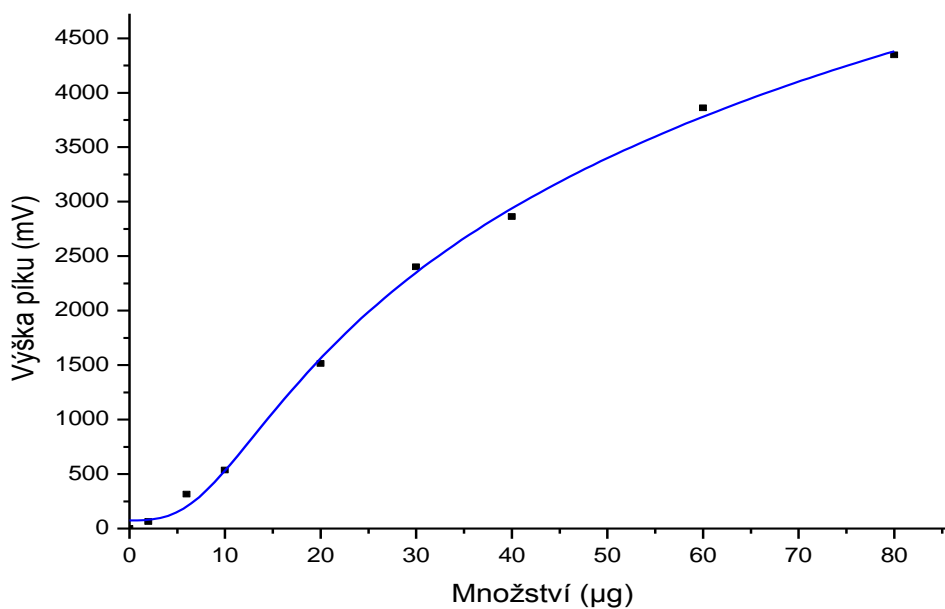
Volný cholesterol je jako jediná složka lipového profilu chemicky čistá látka, zatímco všechny ostatní složky představují směs esterů, ve které je zastoupeno cca 30 mastných kyselin různé délky řetězce i různého stupně nenasycenosti. Ze všech sledovaných látek má volný cholesterol nejnižší mez detekce – 0,01 μg , i mez stanovitelnosti – 0,05 μg v nastříkovaném množství.

I když se křivky pro závislost ploch a výšek navzájem vizuálně podobají, je vidět, že u výšek dochází dříve k esovitému zakřivení, píky se při vyšších koncentracích začnou poněkud rozšiřovat, závislost je lépe vyjádřena pomocí ploch. Rovnice, které nejlépe vystihují propojení experimentálních bodů, jsou podobné jako u triacylglycerolů odlišné od závislostí známých z literatury – polynom třetího stupně pro plochy a složitější závislost pro výšky.



Obr. 41a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro FC

Rovnice pro třetí polynom: $y = -0,068x^3 + 7,499x^2 + 114,575x$, kde $R = 0,9998$



Obr. 41b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro FC

Pro rovnici: $y = 698,882 * \ln(3,402 * x^3 + \sqrt{x^2 + 1,358 * 10^7}) - 5663,773$, kde $R = 0,9987$

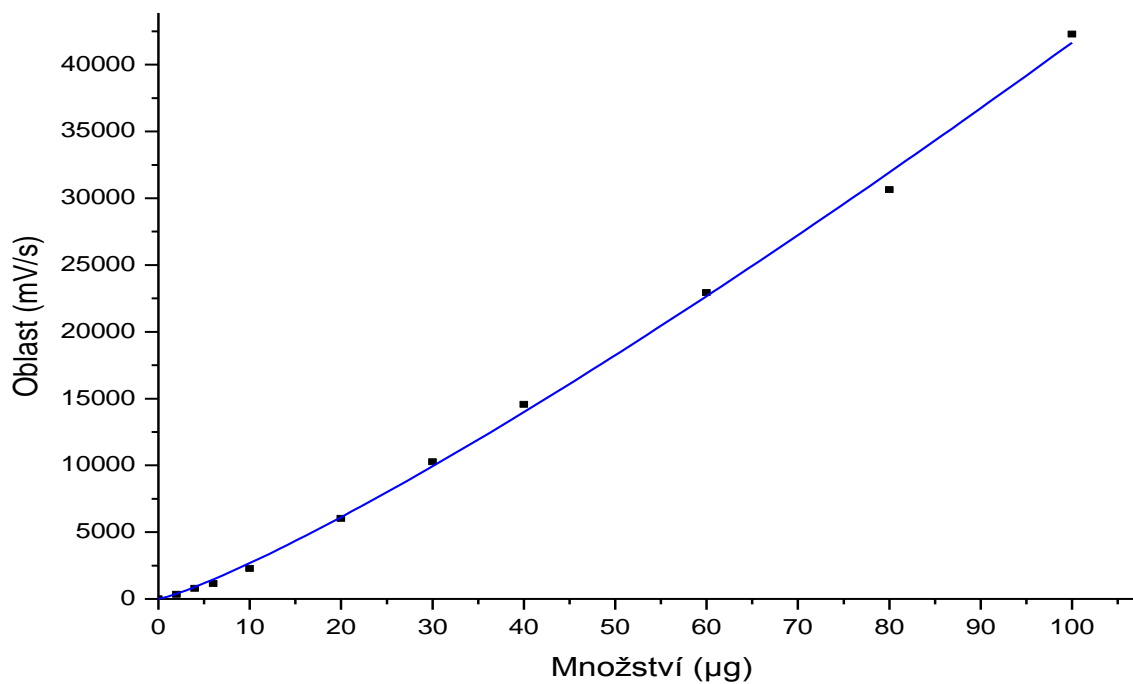
4.1.4. CERAMID

Ceramid je eluován jako první v pořadí polárních lipidů s retenčním časem $21,87 \pm 0,09$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 42 a, b mají na první pohled odlišný průběh. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy mocninná závislost $y=ax^b$, která byla v literatuře také používána (25), ale velmi blízké hodnoty dosahuje i korelační koeficient pro závislost kvadratickou $y=a+bx+cx^2$; u výšek vychází nejvyšší korelační koeficient pro rovnici přímky $y=a+bx$, velmi blízkých hodnot ale dosahují i závislost mocninná a kvadratická, jak ukazuje tabulka 8. Optimální proložení experimentálních bodů pro plochy dává mocninná závislost v souladu s výpočtem, průběh závislosti pro výšky ale vystihoval nejlépe polynom třetího stupně. Měření bylo provedeno v rozsahu 2-100 μg , tj. pětkrát vyšším než uvádí literatura pro korelační koeficienty uvedené v tabulce.

Tab. 8: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro ceramid

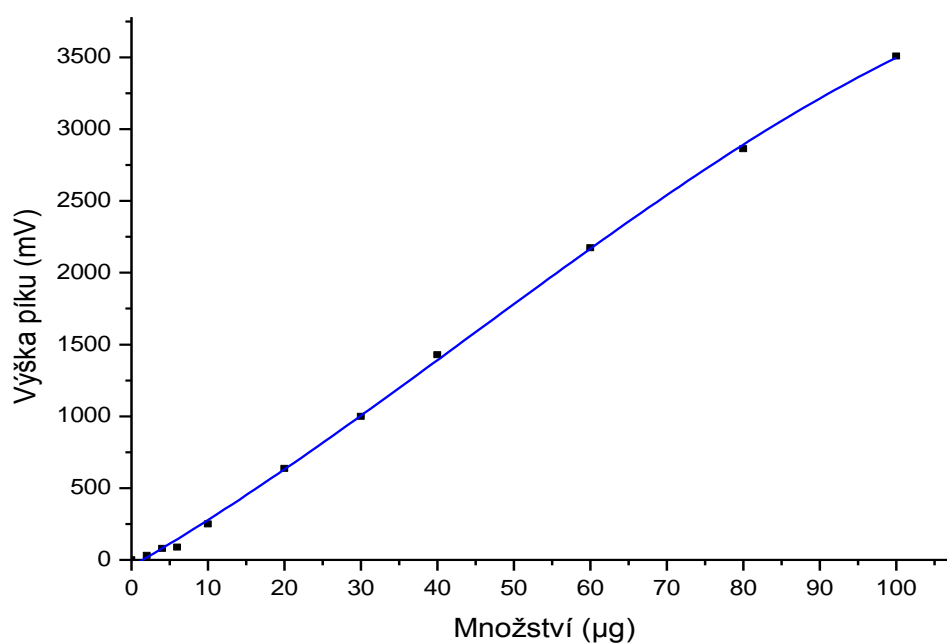
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9631	0,9439
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9992	0,9988
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8726	0,9002
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9969	0,9992
$y=a+bx+bx^2$	0,99-1,00	0,9991	0,9985
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,5899	0,6267
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9403	0,9581
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8726	0,9002

Ceramid patří mezi vysokoodezvoové lipidy, podle pohyblivosti na silikagelu v mobilní fázi heptan-diethyl ether-kyselina octová se řadí k neutrálním lipidům. Mez detekce byla obdobná jako u neutrálních lipidů – 0,04 μg v nastříkovaném množství, rovněž i mez stanovitelnosti – 0,12 μg .



Obr. 42a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro CER

Mocninná rovnice: $y = 172,896 * x^{1,191}$, kde $R = 0,9992$



Obr. 42b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro CER

Rovnice pro třetí polynom: $y = -0,002x^3 + 0,279x^2 + 26,399x$, kde $R = 0,9992$

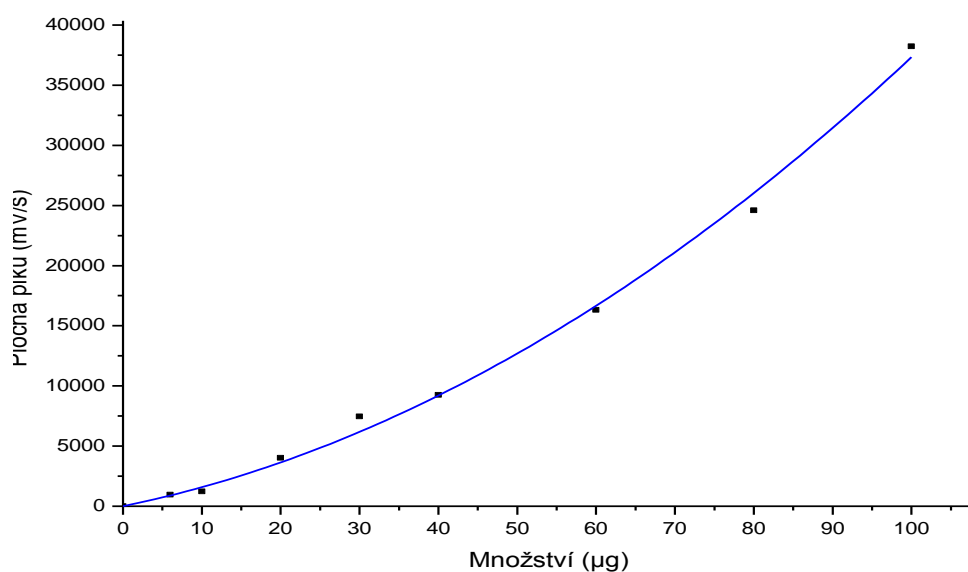
4.1.5. KARDIOLIPIN

Kardiolipin je první v pořadí fosfolipidů s retenčním časem $30,81 \pm 0,37$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 43 a, b mají na pohled obdobný průběh. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$, která byla také publikovaná (26), ale jen napatrně nižší hodnotu má mocninná závislost $y=ax^b$; u výšek je tomu obráceně, nejvyšší hodnoty dosahuje závislost mocninná, hodnota pro kvadratickou závislost je jen nepatrně nižší, jak ukazuje tabulka 9. Optimální proložení experimentálních bodů v tomto případě souhlasí s výpočtem. Měření bylo provedeno rovněž v rozsahu 2-100 μg v nastříkovaném množství.

Tab. 9: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro kardiolipin

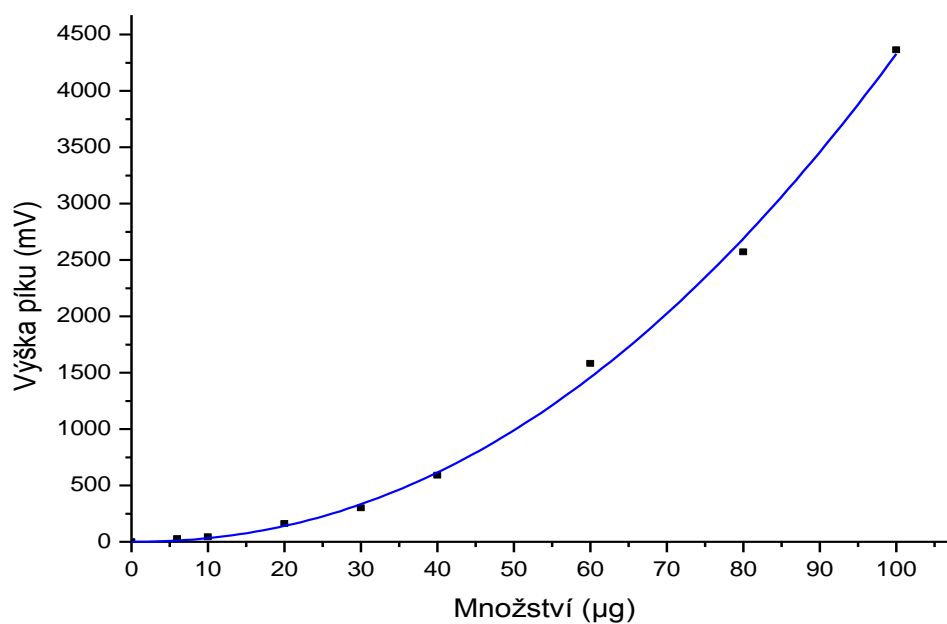
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9860	0,9889
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9964	0,9990
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8659	0,7992
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9788	0,9478
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9979	0,9989
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,6620	0,5578
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,8859	0,8226
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8659	0,7992

Kardiolipin vykazuje na tenké vrstvě v mobilní fázi chloroform-methano-voda nejvyšší pohyblivost. Je to pravděpodobně způsobeno strukturou molekuly, která je složena ze dvou molekul kyseliny fosfatidové esterifikované s glycerolem. V molekule není base ani aminokyselina a dá se tedy předpokládat menší polarita než u ostatních fosfolipidů. Má ve srovnání s ostatními fosfolipidy symetričtější a užší pík. Začíná se ale již projevovat nižší odezva detektoru, mez detekce je 0,21 μg a mez stanovitelnosti 0,71 μg v nastříkovaném množství.



Obr. 43a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro CL

Kvadratická rovnice: $y = 2,387x^2 + 134,532x$, kde $R = 0,9979$



Obr. 43b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro CL

Rovnice mocniny: $y = 0,238x^{2,13}$, kde $R = 0,9990$

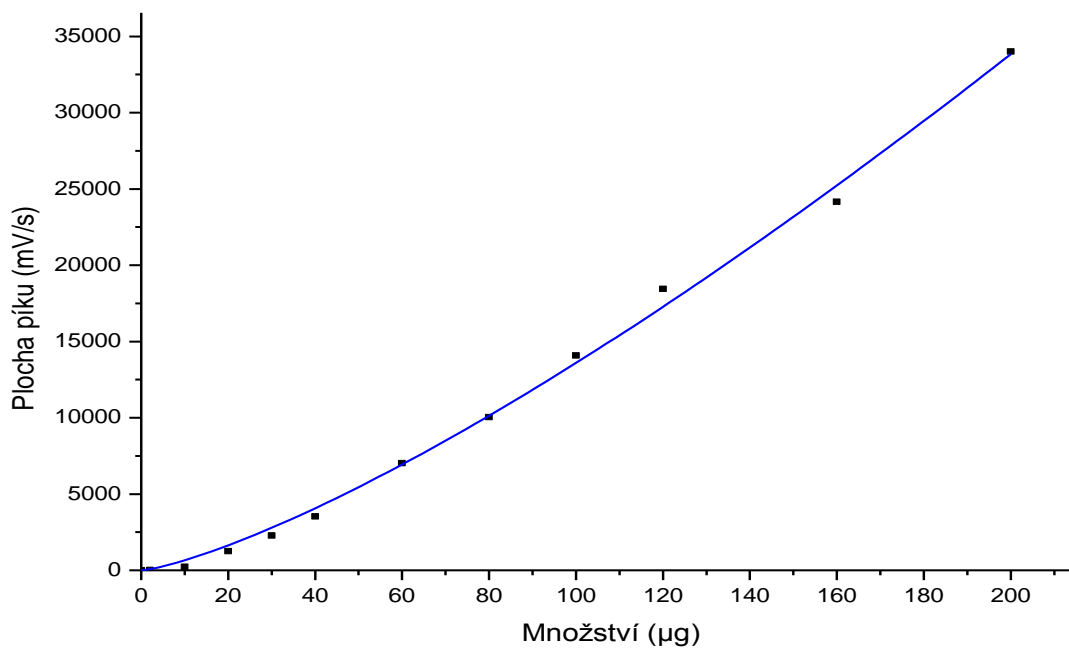
4.1.6. FOSFATIDYLETHANOLAMIN

Další v pořadí eluce je fosfatidylethanolamin s retenčním časem $34,60 \pm 0,19$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 44 a, b mají podobně jako u kardiolipinu obdobný průběh. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy i výšky mocninná závislost $y=ax^b$, která byla použita i v literatuře (25), ale jen nepatrně odlišné jsou hodnoty pro závislost kvadratickou $y=a+bx+cx^2$, jak ukazuje tabulka 10. Optimální proložení experimentálních bodů souhlasí s výpočtem, jako tomu bylo u kardiolipinu. Rozsah kalibrační závislosti byl 2-200 μg v nastříkovaném množství, tj. desetkrát vyšší než uvádí literatura (23).

Tab. 10: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro fosfatidylethanolamin

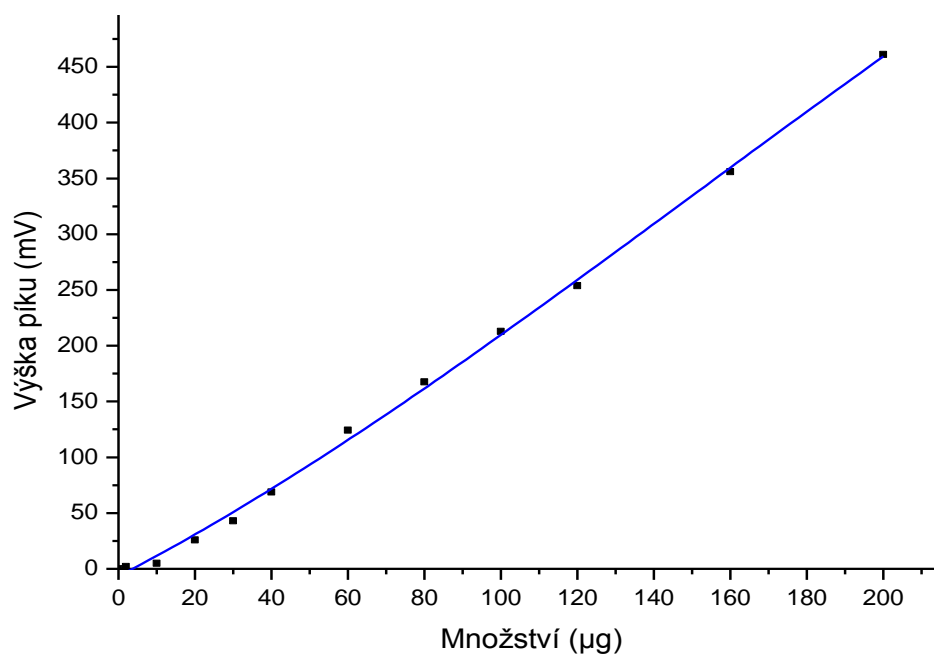
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9613	0,9534
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9985	0,9992
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,7942	0,8273
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9922	0,9980
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9978	0,9985
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,4082	0,4603
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9143	0,9398
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,7942	0,8323

Fosfatidylethanolamin je jedním z nízkoodezvových lipidů. Na tenké vrstvě v mobilní fázi chloroform-methanol-voda je druhým nejpohyblivějším fosfolipidem (po kardiolipinu); v molekule obsahuje basi ethanolamin, která se podílí na její polaritě. Mez detekce je 4,64 μg a mez stanovitelnosti 15,46 μg v nastříkovaném množství.



Obr. 44a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro PE

Rovnice mocniny: $y = 31,695 * x^{1,316}$, kde $R = 0,9985$



Obr. 44b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro PE

Rovnice mocniny: $y = 1,039x^{1,151}$, kde $R = 0,9992$

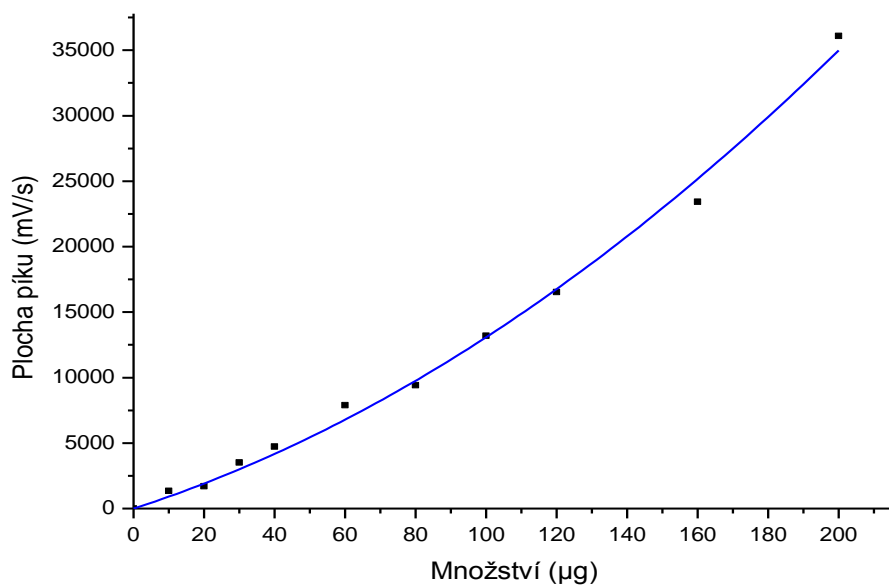
4.1.7. FOSFATIDYLCHOLIN

Fosfatidylcholin je chemicky trimethylfosfatidylethanolamin, obsahuje v molekule basi cholin; jeho eluční čas v daném analytickém systému je $37,35 \pm 0,05$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 45 a, b mají, tak jako u předchozích dvou fosfolipidů, obdobný průběh. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy i výšky kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$, která byla použita i v literatuře (26), jen nepatrně odlišné jsou hodnoty pro závislost mocninnou $y=ax^b$, jak ukazuje tabulka 11. Vzhledem k nepatrným rozdílům hodnot korelačních koeficientů můžeme říci, že tyto tři fosfolipidy mají podobné chromatografické chování. Optimální proložení experimentálních bodů rovněž souhlasí s výpočtem. I zde byl rozsah kalibrační závislosti 2-200 μg .

Tab. 11: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro fosfatidylcholin

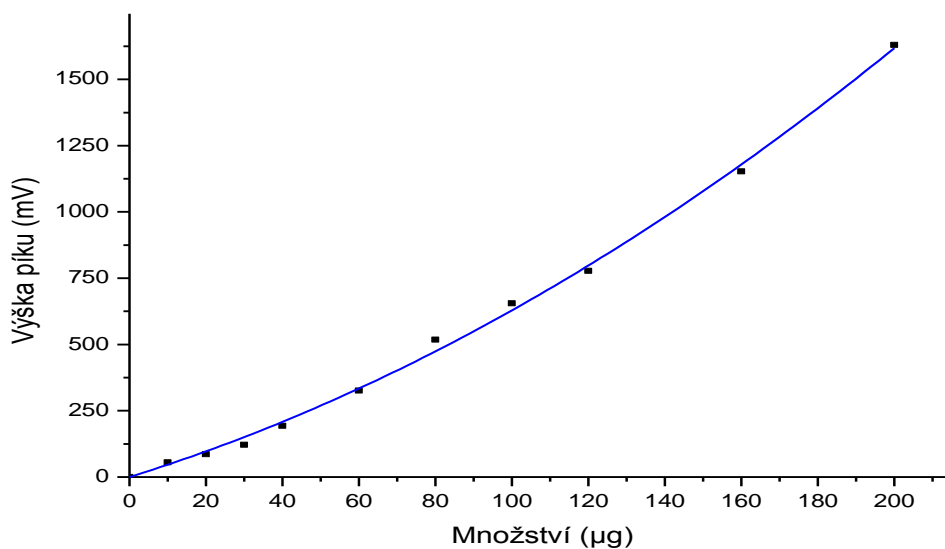
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9826	0,9736
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9950	0,9987
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8630	0,8793
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9824	0,9903
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9971	0,9989
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,6328	0,6460
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,8980	0,9095
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8630	0,8793

Fosfatidylcholin je dalším nízkodezvovým fosfolipidem, jeho meze detekce a stanovitelnosti jsou nižší než u fosfatidylethanolaminu, 2,42 μg a 8,07 μg v nastříkovaném množství. Pořadí eluce je v tomto systému stejné jako na tenké vrstvě s mobilní fází chloroform-methanol-voda.



Obr. 45a Kalibrační závislost šířky píku na nastříkovaném množství pro PC

Kvadratická rovnice: $y = 0,442x^2 + 86,641x$, kde $R = 0,9971$



Obr. 45b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro PC

Kvadratická rovnice: $y = 0,018x^2 + 4,481x$, kde $R = 0,9989$

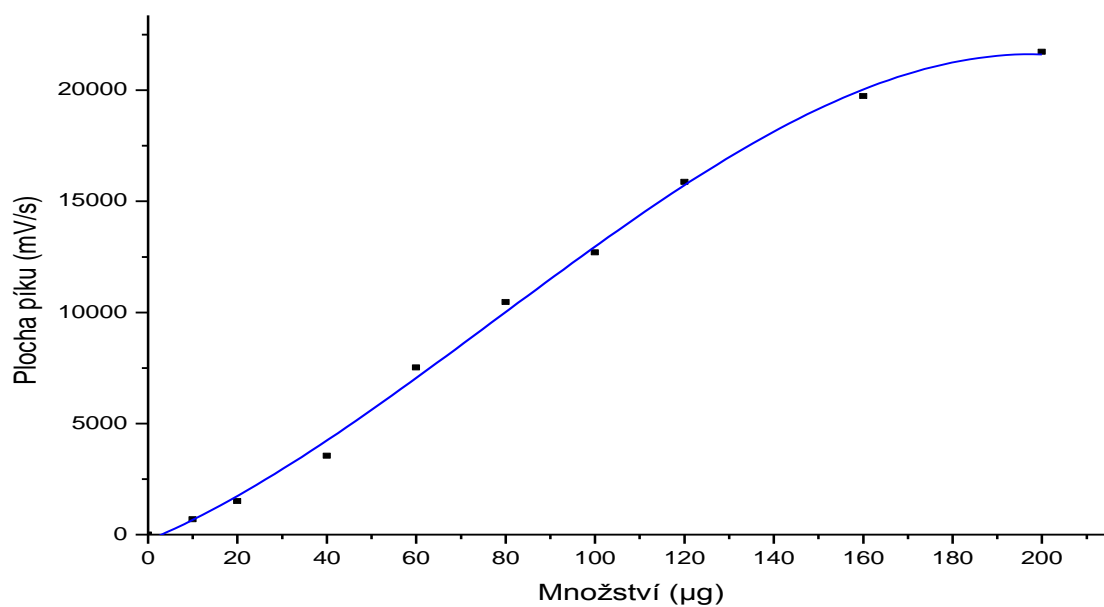
4.1.8. FOSFATIDYLSERIN

Fosfatidylserin obsahuje v molekule místo base aminokyseliny serin; jeho eluční čas v daném analytickém systému je $43,72 \pm 0,15$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 46 a, b mají vizuálně odlišný průběh, u ploch je patrný tvar S-krivky. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy i výšky kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$, která byla použita i v literatuře (26) jen nepatrně odlišné jsou hodnoty pro závislost mocninnou $y=ax^b$, jak ukazuje tabulka 12. Vzhledem k nepatrným rozdílům hodnot korelačních koeficientů můžeme říci, že tyto tři fosfolipidy mají podobné chromatografické chování. Optimální proložení experimentálních bodů ale zobrazil lépe polynom třetího stupně. Závislost byla měřena pro 2-200 μg v nastříkovaném množství.

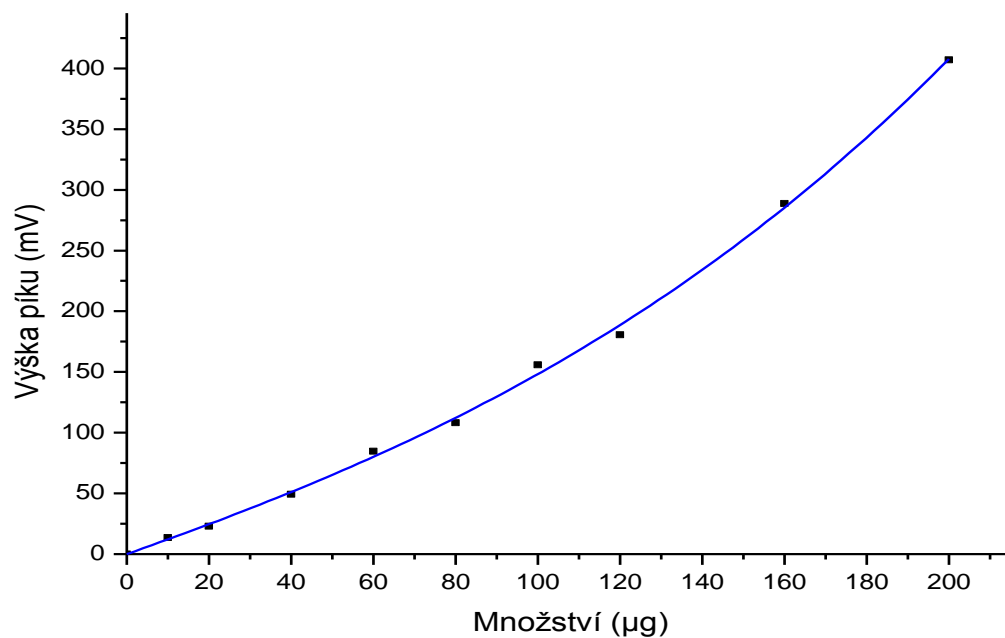
Tab. 12: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro fosfatidylserin

Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9091	0,9805
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9898	0,9979
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,9476	0,8571
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9888	0,9840
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9942	0,9990
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,7745	0,6402
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9566	0,8952
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,9476	0,8571

Fosfatidylserin je, tak jako předchozí tři fosfolipidy, také nízkoodezvoým lipidem. Mez detekce byla 0,68 μg , mez stanovitelnosti 2,28 μg v nastříkovaném množství. Na tenké vrstvě je jeho oddělení od fosfatidylcholinu a sfingomyelinu obtížné, je třeba zvýšit polaritu mobilní fáze chloroform-methanol-voda přidáním kyseliny octové nebo amoniaku, případně použít dvojrozměrné tenké vrstvy. Z tohoto hlediska je metoda HPLC výhodnější (27).



Obr. 46a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro PS
 Rovnice třetího polynomu: $y = -0,004x^3 + 0,924x^2 + 74,915x$, kde $R = 0,9985$



Obr. 46b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro PS
 Rovnice třetího polynomu: $y = 3,036 \cdot 10^{-6} x^3 + 0,017x^2 + 4,530x$, kde $R = 0,9994$

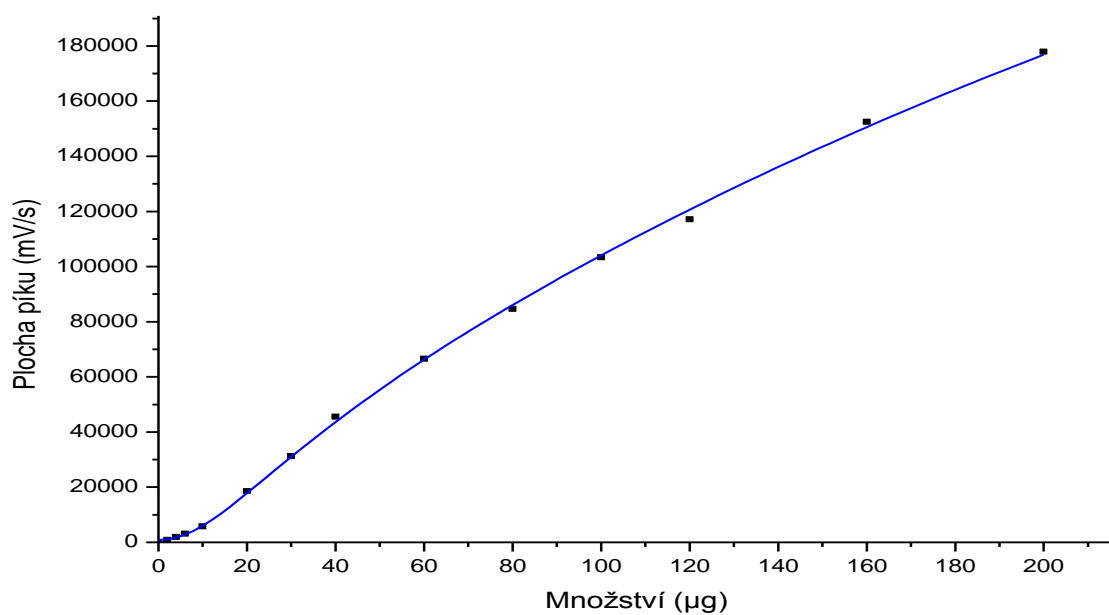
4.1.9. SFINGOMYELIN

Sfingomyelin obsahuje v molekule aminoalkohol sfingosin, mastnou kyselinu a fosforylcholin; jeho eluční čas v daném analytickém systému je $45,51 \pm 0,19$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 47 a, b mají obdobný průběh, u výšek však dochází k charakteristickému esovitému zakřivení v podstatně nižších koncentracích. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$, která byla použita i v literatuře (26). Jen nepatrně odlišná byla hodnota pro závislost mocninnou $y=ax^b$, jak ukazuje tabulka 13. U výšek dosáhla nejvyššího korelačního koeficientu závislost mocninná, dobře by vyhovovala i závislost logaritmická. Optimální proložení experimentálních bodů zobrazila nejlépe složitá logaritmická závislost.

Tab. 13: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro fosfatidylserin

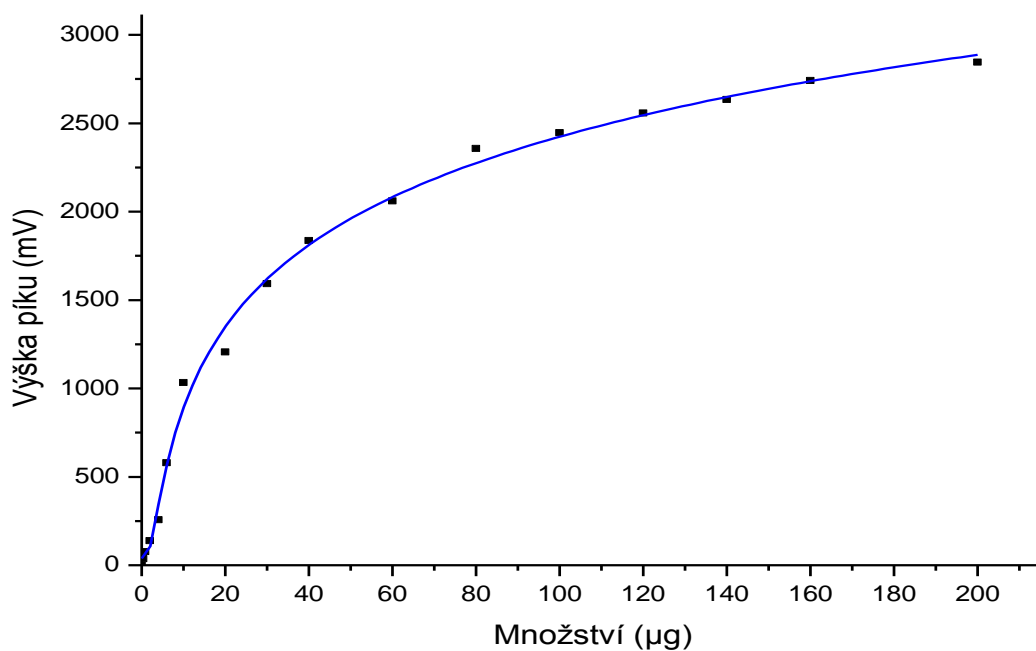
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9171	0,7601
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9976	0,9818
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,9042	0,9744
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9949	0,8501
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9994	0,9546
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,5990	0,7045
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9769	0,9538
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,9042	0,9812

Sfingomyelin je, na rozdíl od ostatních fosfolipidů, vysokoodezvočným lipidem. Liší se tím, že tvoří dvojitý pík, jehož původ je v literatuře přisuzován přítomnosti hydroxykyselin (23). Mez detekce byla $0,05 \mu\text{g}$, mez stanovitelnosti $0,18 \mu\text{g}$ v nastříkovaném množství. Tvar kalibrační závislosti pro výšky vzhledově připomíná závislost pro triacylglyceroly a volný cholesterol, zakřivení je výraznější. Je to způsobeno postupným rozšiřováním píku při malé změně výšky (28). Pro přehled ukazují obr. 49 záznam všech píků kalibrační závislosti.



Obr. 47a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro SM

Pro rovnici: $y = 53223,307 * \ln(4,929 * 10^{-5} * x^3 + 475,869) - 163212,977$, kde $R = 0,9997$



Obr. 47b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro SM

Pro rovnici: $y = 222,812 * \ln(542,306 * x^3 + \sqrt{x^2 + 1,469 * 10^8}) - 2057,514$, kde $R = 0,9979$

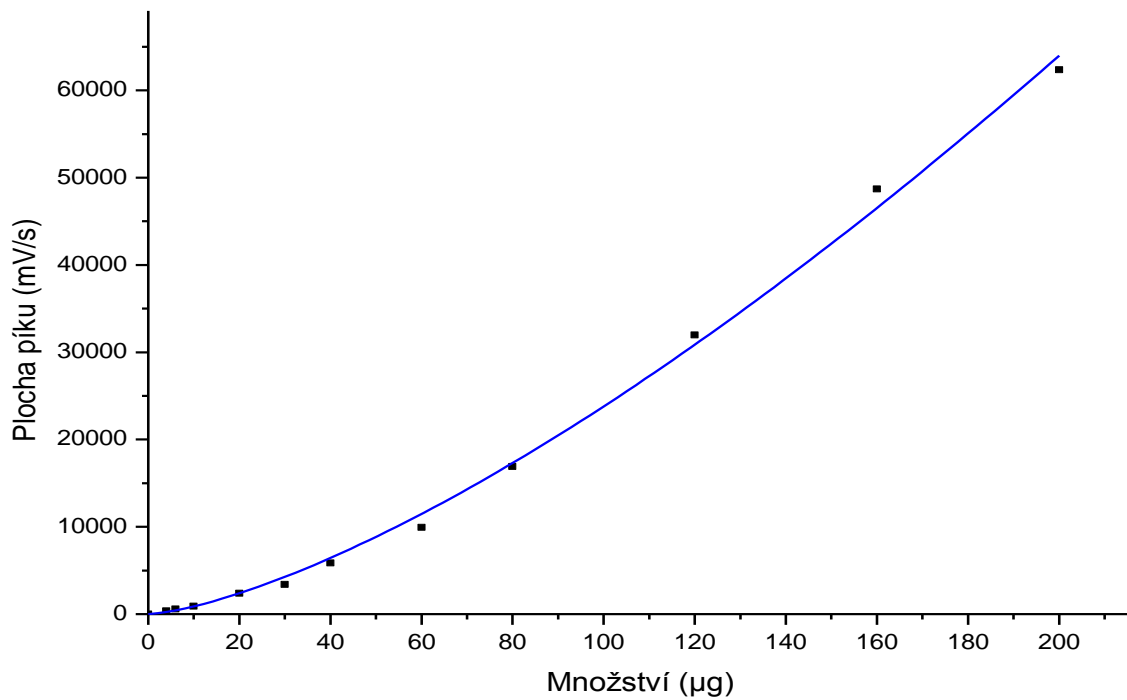
4.1.10. LYSOFOSFATIDYLCHOLIN

Lysofosfatidylcholin je chemicky trimethylfosfatidylethanolamin, obsahuje v molekule basi cholin; jeho eluční čas v daném analytickém systému je $55,97 \pm 0,09$ min. Závislosti plochy a výšky píku na nastříkovaném množství na obr. 45 a, b mají obdobný průběh, u výšek se dříve projevuje zakřivení. Nejvyššího korelačního koeficientu dosáhla pro plochy mocninná závislost $y=ax^b$, na druhém místě je kvadratická závislost $y=a+bx+cx^2$. Pro výšky dosahuje nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu rovnice přímky, druhou nejvyšší hodnotu má závislost mocninná, jak ukazuje tabulka 14. Optimální proložení experimentálních bodů rovněž souhlasí s výpočtem pro plochy, závislost výšek nejlépe vystihuje rovnice polynomu třetího stupně.

Tab. 14: Korelační koeficienty kalibračních závislostí pro lysofosfatidylcholin

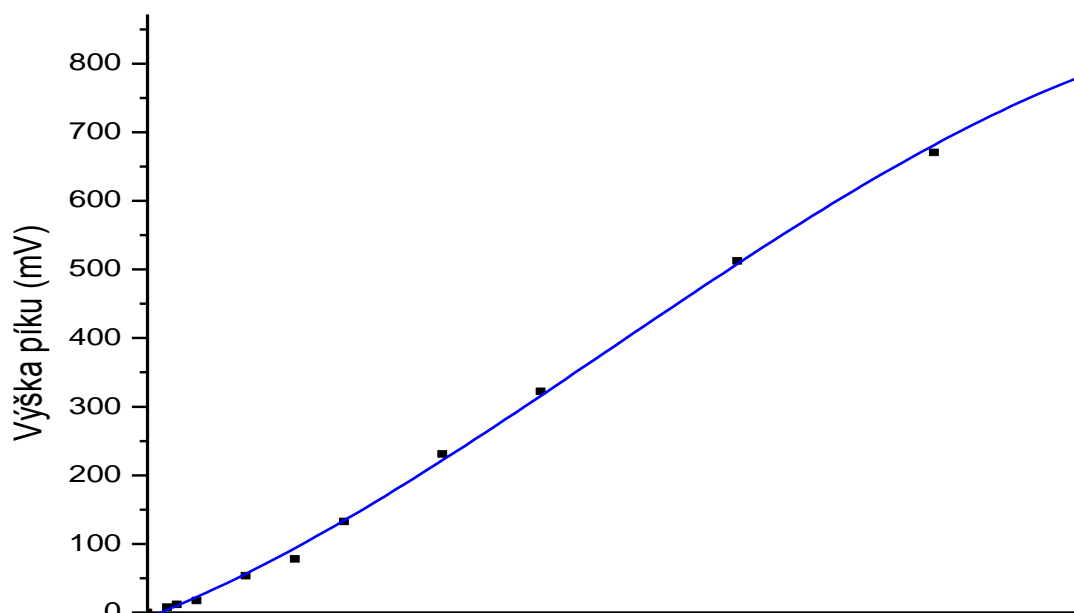
Rovnice	R z literatury (23)	R (plochy)	R (výšky)
$y=ae^{bx}$	0,86-0,89	0,9648	0,9422
$y=ax^b$	0,98-1,00	0,9986	0,9976
$y=a+b\ln x$	0,72-0,91	0,8153	0,8806
$y=a+bx$	0,98-1,00	0,9876	0,9982
$y=a+bx+cx^2$	0,99-1,00	0,9974	0,9970
$y=a+b/x$	0,58-0,73	0,5110	0,6010
$y=a+b\sqrt{x}$	0,97-0,99	0,9079	0,9515
$y=a+b\log x$	0,89-0,95	0,8153	0,8806

Lysofosfatidylcholin je nízkodezvočným lipidem, mez detekce činila $2,92 \mu\text{g}$, mez stanovitelnosti $9,75 \mu\text{g}$ v nastříkovaném množství. Je posledním eluovaným fosfolipidem s nejmenší pohyblivostí, stejné chování má i na silikagelu s mobilní fází chloroform-methanol-voda. Na chromatografickém chování lipidů se zřejmě podílí polarita jednotlivých složek, která ovlivňuje interakce se stacionární i mobilní fází. Klasická separace na silikagelu se od presentované metody liší převším tím, že systém chloroform-methanol-voda je homogenní, zatímco jednotlivé složky gradientu nejsou v celém průběhu dokonale mísitelné a separace probíhá v heterogenní fází (29).



Obr. 48a Kalibrační závislost plochy píku na nastříkovaném množství pro LPC

Rovnice mocniny: $y = 33,238 * x^{1,427}$, kde $R = 0,9986$

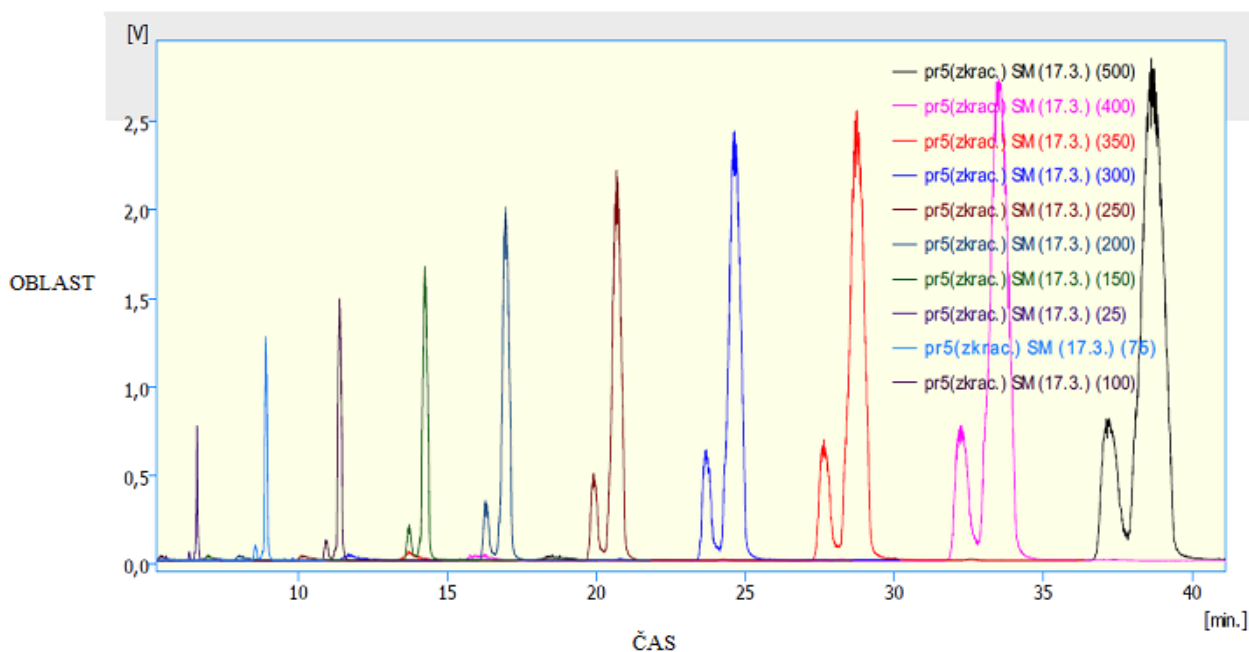


Obr. 48b Kalibrační závislost výšky píku na nastříkovaném množství pro LPC

Rovnice třetího polynomu: $y = -8,737 * 10^{-5} + 0,025x^2 + 2,455x$, kde $R = 0,9994$

Průběh kalibračních závislostí je zřejmě ovlivněn tvarem píků, které jsou výslednicí chromatografického procesu. Je možné, že změna stacionární fáze tvary píků ovlivní, větší vliv ale má složení mobilní fáze. Složení mobilní fáze, které podle literárních údajů bylo využito v několika biologických studiích, je ve větší části gradientu heterogenní – jednotlivé složky jsou jen omezeně mísitelné. Pokus modifikovat složení tak, aby výsledná směs byla homogenní, nebyl úspěšný, vedl ke zhoršenému dělení. Předmětem dalšího studia proto bude především prozkoumání dalších systémů ze složek, které budou vzájemně lépe mísitelné.

V porovnání s literaturou byly naše kalibrační závislosti měřeny ve 4-10 násobném rozsahu nastříkovaného množství. U některých lipidů (TG, FC, PS, SM) bylo pouhým okem patrné esovité zakřivení, které nemůže být vystiženo některou z jednoduchých funkcí uvedených v tabulce pro každou měřenou sloučeninu. Tyto funkce vyhovovaly pro závislosti s nižším rozsahem, kdy k zakřivení ještě nedocházelo. Esovité křivky jsou známými závislostmi ve více oborech, a proto moderní software nabízí programy pro jejich optimální vyhodnocení. Nejběžnější je proložení polynomem; obecně platí, že čím vyšší stupeň polynomu, tím dokonalejší proložení experimentálních bodů. Je rovněž zřejmé, že na koncové části křivky není vhodné měřit obsah složky. Jednotlivé složky lipidového profilu se však svým obsahem značně liší, a proto může nastat situace, kdy vhodné naředění vzorku pro správné změření majoritních složek může zvýšit chybu pro stanovení složek minoritních. Tuto situaci lze vyřešit dvojitým nástřikem vzorku o různých koncentracích.



Obr. 49 Chromatogramy, z nichž byla určena kalibrační křivka sfingomyelinu

4.2. PRAKTICKÉ APLIKACE

Pro ověření metody byl sestaven syntetický kontrolní vzorek. Výsledek jeho analýsy ukazuje tabulka 15. Z tabulky je zřejmé, že se dosahuje výtěžností v rozsahu 83 až 95 %. Chromatogram kontrolního vzorku ukazuje obr. 50.

Tab. 15: Stanovení kontrolního vzorku

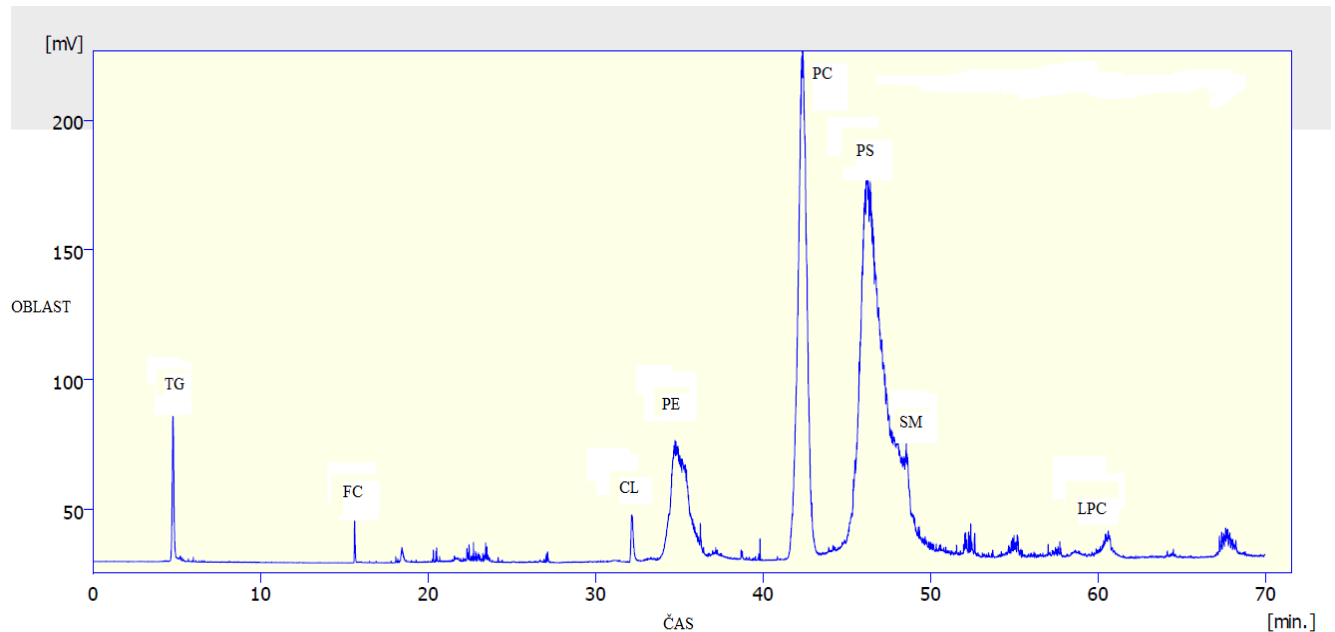
Lipidová třída	Dáno [$\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$]	Nalezeno [μg]	Nalezeno [%]
TG	1,33	1,21 \pm 0,03	91,1
FC	1,33	1,10 \pm 0,07	82,5
CL	1,33	1,27 \pm 0,03	95,3
PE	45,3	39,7 \pm 0,96	87,6
PC	26,7	23,5 \pm 3,09	88,3
PS	80	71,3 \pm 0,19	89,1
SM	2,67	2,30 \pm 0,03	86,2
LPC	4	3,30 \pm 0,20	82,5

Výsledky představují průměr ze 3 měření

Syntetický vzorek obsahoval jako hlavní složky fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin, a fosfatidylcholin. Při vysokém obsahu fosfatidylserinu dochází k jeho nedokonalému oddělení od sfingomyelinu; dělení se zlepšuje při nižších koncentracích. Protože fosfatidylserin není dominantní složkou buněčných membrán, bude možné tento kritický pár stanovit.

Kalibrační závislosti i kontrolní vzorek byly měřeny s průtokem 0,5 ml/min (aparatura neumožňovala průtokový gradient). Při zvýšení průtoku docházelo k nežádoucímu zvýšení tlaku. Po cca 200 analýsách se však provozní tlak snížil, a proto jsme vyzkoušeli opět zvýšení průtoku na 0,7 ml/min. Zkrátila se doba analýsy, ale dělení kritického páru se nezhoršilo. Proto

jsme za tohoto průtoku ověřili platnost kalibrace a biologické vzorky analysovali již za nových podmínek. Výrazně se snížilo kolísání odezvy detektoru, které bylo za nižšího průtoku zvláště patrné za přítomnosti složky C (isopropanol-voda-triethylamin). Důvod se nám nepodařilo objasnit, domníváme se, že ke zlepšení došlo vlivem změny poměrů v měrné cele. Tento problém by do budoucna měl vyřešit novější typ detektoru.



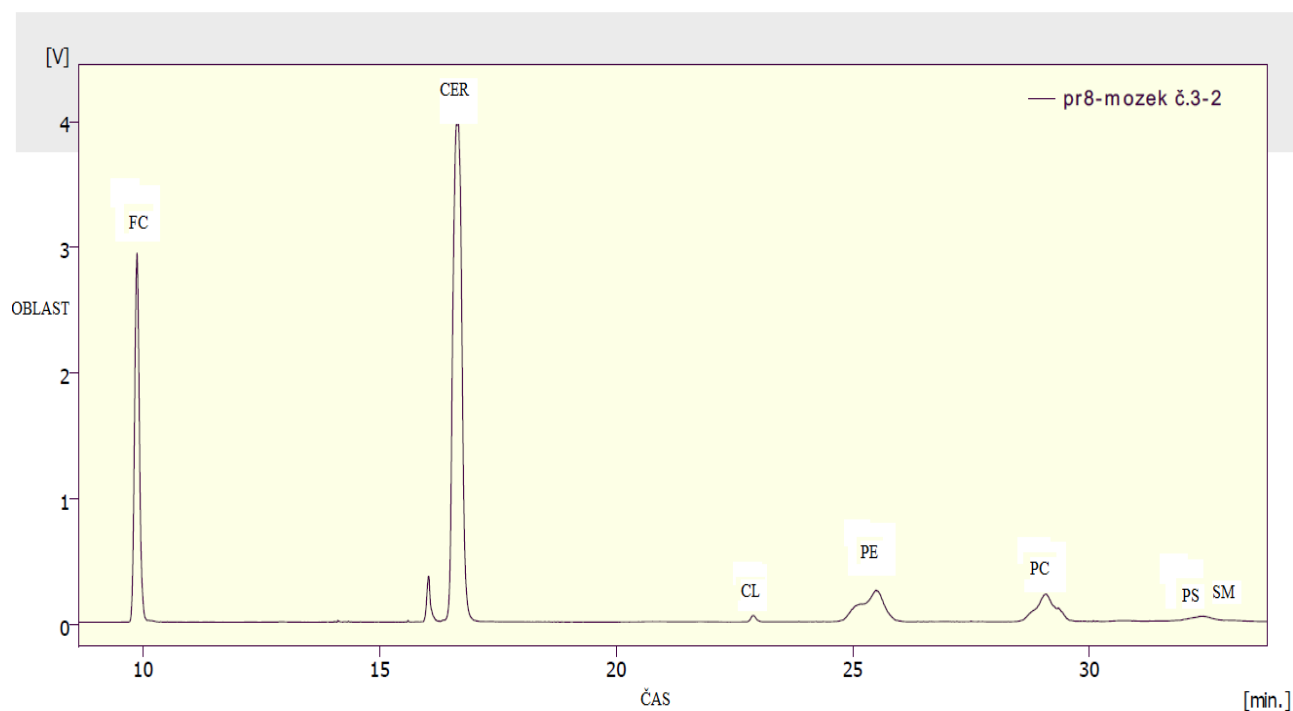
Obr. 50 Chromatogram kontrolního vzorku

Dále byly analysovány vzorky myší mozkové tkáně a lidského krevního séra optimalisovanou HPLC metodou. Obsah lipidových tříd v mozkové tkáni myších samic a mláďat uvádí tabulka 16. V literatuře se nám nepodařilo najít práci, která by se zabývala analysou mozkové tkáně u myší; všechny publikované práce se týkají laboratorních potkanů. Analysu mozkové tkáně myší, avšak speciálně geneticky upravených, popisují jen dvě práce (30,31). Fosfolipidy byly separovány tenkovrstevnou chromatografií a kvantifikovány spektrofotometricky po převedení na fosfomolybdenovou modř. Neutrální lipidy byly stanoveny pomocí komerčních setů. V práci nebyly kvantifikovány ceramidy ani kardiolipin. Posoudit jsme tedy mohli pouze vzájemné relace cholesterolu a hlavních fosfolipidů, které byly srovnatelné. Chromatogramy lipidů mozkové tkáně myší matky a mláďate jsou uvedeny na obr. 51 a 52.

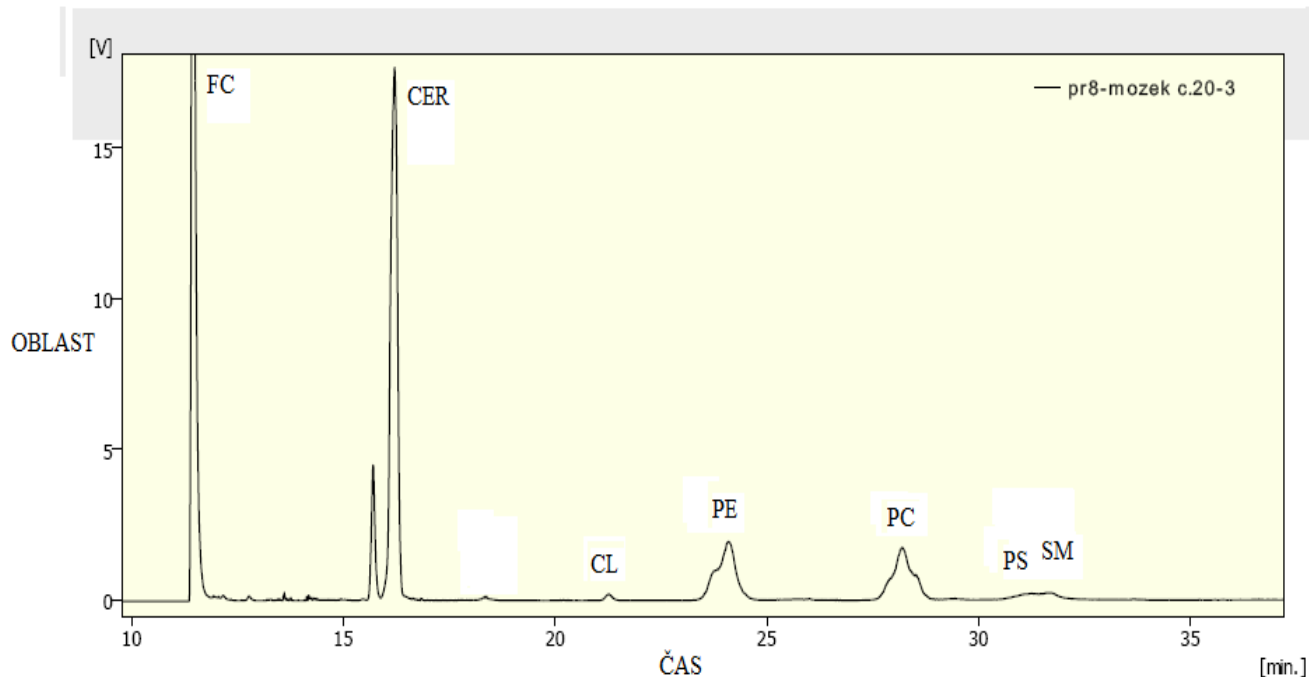
Tab. 16: Obsah lipidových tříd v mozku myších samic a mláďat

Č.	FC	CER	CL	PE	PC	PS	SM
3	21,9±2,59	23,4±2,54	0,84±0,03	21,0±2,14	27,9±2,64	3,96±0,15	0,16±0,01
4	28,0±3,11	26,0±3,03	0,39±0,02	18,2±2,06	24,1±2,53	3,03±0,18	0,25±0,02
20	30,9±3,08	20,3±2,49	0,63±0,03	19,3±2,01	24,3±2,47	4,23±0,39	0,14±0,01
21	27,7±2,79	21,3±2,17	0,31±0,02	26,5±2,68	21,6±2,25	2,25±0,10	0,24±0,01

Výsledky jsou vyjádřeny v mg/100 mg celkového lipidu a jsou průměrem z 3 měření. Samice jsou označeny č. 3 a č. 4, mláďata č. 20 a č. 21.

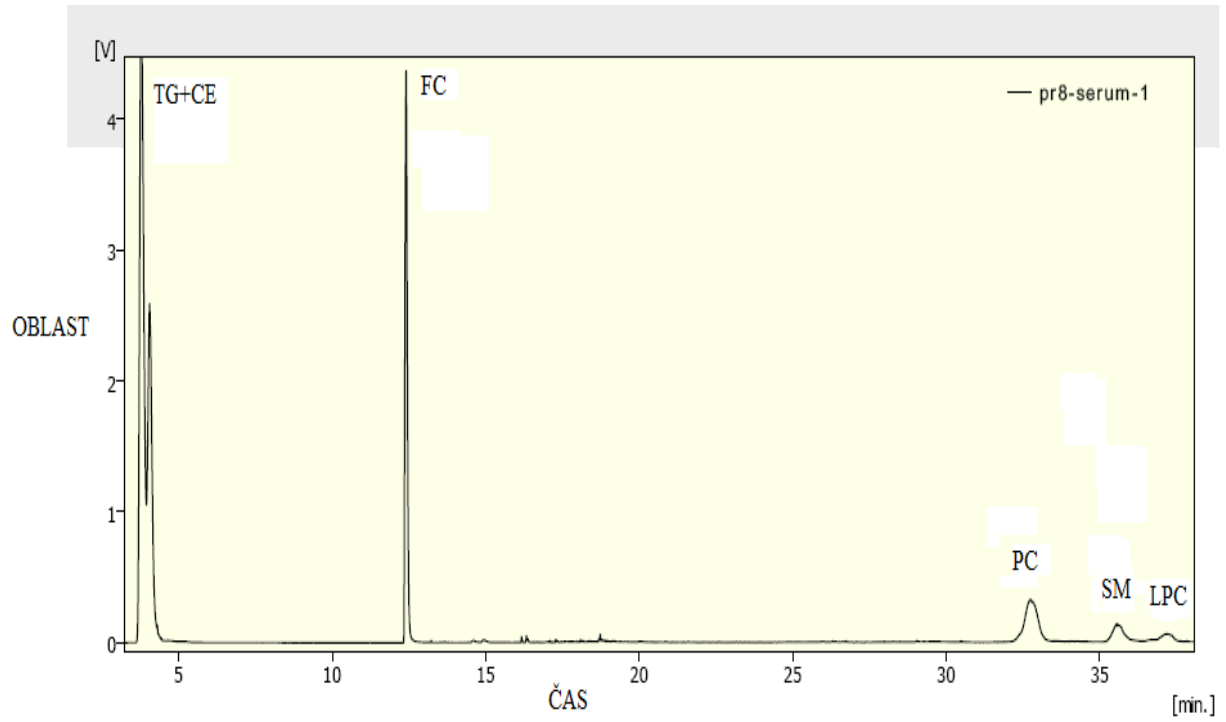


Obr. 51 Analýza lipidů ve tkáni mozku myší matky č. 3 metodou HPLC-ELSD



Obr. 52 Analýza lipidů mozkové tkáně myšního mláděte č. 20 metodou HPLC-ELSD

Dále jsme pouze informativně analysovali celkový lipidový extrakt smíšeného lidského krevního séra (Obr. 53). Hlavním fosfolipidem krevního séra je fosfatidylcholin, sfingomyelin a lysofosfatidylcholin jsou přítomny pouze ve velmi malých koncentracích. Neutrální lipidy – estery cholesterolu a triacylglyceroly – tvoří na koloně Lichrospher-diol kritický pár, který při velkém nadbytku některé ze složek nebude rozdělený. K tomuto případu dochází u poruch lipidového metabolismu, hypercholesterolemii nebo hypertriglyceridemii, a tato kolona není pro tento typ analýzy vhodná. Neutrální lipidy krevního séra jsou však i pro výzkumné účely stanovovány automatickými analyzátoři s využitím komerčních enzymatických setů, a tato stanovení podléhají celostátní kontrole kvality. Stanovovanými parametry jsou celkový cholesterol a triacylglyceroly, ale modifikací metody lze stanovit místo celkového cholesterolu pouze cholesterol volný (vyřazením enzymu cholesterol esterasy). Stanovení fosfolipidů tímto rutinním způsobem však bylo před přibližně 10 lety zrušeno, a pro některé výzkumné studie jsou chybějícím parametrem, který by i na koloně Lichrospher-diol mohl být stanovován.



Obr. 53 Chromatogram celkového lipidu lidského krevního séra

5. ZÁVĚR

Byla uvedena do provozu metoda stanovení lipidového profilu pomocí HPLC-ELSD. Kalibrační závislosti jednotlivých složek nejsou lineární, ve většině případů odpovídají mocninné nebo kvadratické závislosti. Pro jednotlivé složky byly určeny rovnice, které optimálně proloží experimentálně získaná data. V některých případech (triacylglyceroly, volný cholesterol, fosfatidylserin, sfingomyelin) vyhovoval optimálnímu proložení experimentálních bodů polynom 3. stupně. Na základě těchto rovnic pak byly určeny koncentrace jednotlivých složek v syntetickém kontrolním vzorku a ve vzorcích mozkové tkáně myších samic a třicetidených mláďat. Metodu bude možné využít pro biologickou studii.

6. LITERATURA

- 1) Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A and Roewll V. W: Harperova biochemie, kap. 16 Fysiologicky významné lipidy, H&H, Praha 2002
- 2) D. Voet J. G.: Biochemie, kap. 11 Lipidy a membrány, Victoria Publishing, Praha 1995
- 3) Christie W. W. : HPLC and Lipids – A practical guide, Pergamon Press, 1987
- 4) Kennedy E. P. and Weiss S. B. (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides, *J. Biol. Chem.*, 222, 193-214
- 5) Nye C. K, Hanson R. W and Kalhan S. C. (2008) Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat, *J. Biol. Chem.*, 283, 27565-27574
- 6) Christie W. W.: Diacylglycerols <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/dg/index.html> (2009)
- 7) Charlesworth J. M. (1978) Evaporative analyzer as a mass detektor for HPLC, *Anal.Chem.*, 50, 1414-1420
- 8) Stolyhwo, Colin A. and Guichon G. (1983) Use of light scattering as a detektor principle in liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 265, 1-18
- 9) Macrae R., Trugo L. C., and Dick J. (1982) The mass detektor: A new detection system for carbohydrate and lipid analysis, *Chromatographia*, 15, 476-478
- 10) Christie W. W. (1985) Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, *J. Lipid Research*, 26, 507-512
- 11) Lin J.-T. (Ken) and McKeon T. A.: HPLC of Acyl Lipids, kap. 5 The Evaporative Light-Scattering Detector as a Tool for the Analysis of Lipids by HPLC, Nakladatelství HNB, New York 2005
- 12) Moreau R. A. (1994) Quantitative analysis of lipids by HPLC with a flame ionization detektor or an evaporative light scattering detector, in *Lipid Chromatographic Analysis*, (T.Shibamoto, ed), 251-272, Marcel Dekker, Inc., New York
- 13) Moreau R. A.: The evaporative light-scattering detector as a tool for the analysis of lipids by HPLC, in *HPLC of Acyl Lipids*, pp. 97-100, HNB Publishing, New York 2005
- 14) Cartwright I. J.: Separation and analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Methods Mol. Biol.* 19, 1993,153-67.
- 15) Ackman R. G.: Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol*, 72, 1981, 205-52.
- 16) U. D. Neue: *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, pp. 164-182, Wiley VCH, New York 1997
- 17) Christie W. W. (1986) Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the „mass detektor“, *J. Chromatogr.*, 361, 396-399
- 18) Christie W. W. The evaporative light-scattering detektor in the high-performance liquid chromatography of lipids, <http://www.lipidlibrary.co.uk/select.html> (2004)

- 19) Conforti F. D, Harris C. H. and Rinehart J. T (1993) High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector, *J. Chromatogr.*, 645, 83-88
- 20) Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957) *J. Biol. Chem.*, 226, 497 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
- 21) Carlson L. A. (1985) *Clin. Chim. Acta* 149,89 Extraction of lipids from human whole serum and lipoproteins and from rat liver tissue with methylene chloride-methanol: a comparison with extraction with chloroform-methanol.
- 22) Stith B. J., Hall J., Ayres P., Waggoner L., Moore J.D and Shaw W.A. (2000) Quantification of major classes of *Xenopus* phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Lipid Res.*, 41, 1448-1454
- 23) Lutzke B. S. and Braughler J. M. (1990) An improved method for the identification and quantification of biological lipids by HPLC using laser light-scattering detection, *J. Lipid Res.*, 31, 2127-2130
- 24) Breton L., Serkiz B., Volland J.-P. and Lepagnol J. (1989) A new rapid method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection, *J. Chromatogr.*, 497, 243-249
- 25) Vila A. S., Castellote-Bargalló A. I., Rodríguez-Palmero-Seuma M. and López-Sabater M. C. (2003) High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids, *J. Chromatogr.*, 1008, 73-80
- 26) Redden P. R. and Huang Y.-S. (1991) Automated separation and quantification of lipid fractions by high-performance liquid chromatography and mass detection, *J. Chromatogr.*, 567, 21-27
- 27) Homan R. and Anderson M. K. (1998) Rapid separation and quantification of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection, *J. Chromatogr. B*, 708, 21-26
- 28) Grizard G., Sion B., Bauchart D., Boucher D. (2000) Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection, *J. Chromatogr. B*, 740, 101-107
- 29) Bünger H and Pison U. (1995) Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection, *J. Chromatogr. B*, 672, 25-31
- 30) Ma K., Langenbach R., Rapoport S.I., Basselin M. (2007) Altered brain lipid composition in cyclooxygenase-2 knockout mouse, *J. Lipid Res.*, 48, 848-854
- 31) Rosenberger T. A., Villacreses N. E., Conteras M. A., Bonventre J. V. and Rapoport S. I. (2003) Brain lipid metabolism in the cPLA₂ knockout mouse, *J. Lipid Res.*, 44, 109-117