

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Lenka Šubčíková

ANALÝZA DIESTERŮ DIOLŮ V NOVOROZENECKÉM
MÁZKU POMOCÍ HPLC/APCI-MS²

Analysis of diol diesters in vernix caseosa using
HPLC/APCI-MS²

Diplomová práce

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

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a grantu GAČR P206/12/0750.

Prohlášení

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

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

V Praze dne 6. května 2014

Abstrakt

Novorozenecký mázek je přirozený biofilm pokrývající pokožku lidského plodu od třetího trimestru těhotenství. Má hydratační, regenerační a antimikrobiální účinky. Složky novorozeneckého mázku zodpovědné za tyto jeho vlastnosti by mohly být využity ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Z tohoto důvodu je analyzováno jeho celkové složení. Lipidová složka novorozeneckého mázku se skládá ze skvalenu, voskových esterů, esterů sterolu, diesterů 1,2-diolů, triacylglycerolů, volných mastných kyselin, mastných alkoholů, cholesterolu, diacylglycerolů, monoacylglycerolů a fosfolipidů.

Tato práce je zaměřena na strukturní analýzu diesterů 1,2-diolů nacházejících se v novorozeneckém mázku. Byly optimalizovány podmínky pro jejich separaci pomocí HPLC. Byla použita Nova-Pak C18 kolona a jako mobilní fáze byl zvolen gradient acetonitril:ethylacetát. Před vstupem do APCI zdroje byl postkolonově přidáván mravenčan amonný, který v prostředí APCI sondy tvořil s diestery 1,2-diolů amonné adukty $[M+18]^+$ pozorované ve spektru. MS metoda zahrnovala celkem osm skenovacích událostí, jednu pro MS spektrum, jednu pro MS^2 spektrum prekurzorových iontů a šest pro MS^3 spektra. V další části měření byla určena poloha dvojných vazeb u nenasycených diesterů 1,2-diolů fragmentací jejich aduktů $[M+C_3H_5N]^+$.

Ze získaných dat bylo identifikováno přes 2200 diesterů 1,2-diolů lišících se délkami alkoholů a kyselin a retenčním chováním.

Klíčová slova: Novorozenecký mázek, voskové estery, diestery 1,2-diolů, HPLC/APCI MS

Abstract

Vernix caseosa is a natural biofilm which covers the skin of a human fetus from the third trimester of pregnancy. It has hydrating, regenerating and anti-microbial effects. The components responsible for these properties of vernix caseosa could be used in the pharmaceutical and cosmetic industries. For this reason, the total composition is analyzed. The lipid components of vernix caseosa consist of squalene, wax esters, sterol esters, 1,2-diol diesters, triacylglycerides, free fatty acids, fatty alcohols, cholesterol, diacylglycerides, monoacylglycerides and phospholipids .

This study is focused on structure analysis of the 1,2-diol diesters of vernix caseosa. Conditions were optimized for the HPLC separation. Nova -Pak C18 column was used and a gradient of acetonitrile:ethyl acetate was chosen as a mobile phase. Before entering the APCI source ammonium formate was added; ammonium adducts $[M + 18]^+$ were formed. Eight scan events was set in MS method. One for the full scan spectrum, second for MS² spectrum of the precursor ions and six MS³ data-dependent spectra. The position of the double bonds of unsaturated 1,2-diol diesters was determined by fragmentation of their $[M + C_3H_5N]^+$ adducts.

There were identified over 2200 of 1,2-diol diesters differing in lengths of alcohol and fatty acid chains, and retention behavior.

Keywords: Vernix caseosa, wax esters, 1,2-diol diesters, HPLC/APCI MS

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení a čas, který mi věnoval při vypracovávání mé diplomové práce a celému týmu hmotnostní spektrometrie ÚOCHB Praha za trpělivost a technickou podporu.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při psaní diplomové práce.

Seznam použitých zkratek

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ECN	Ekvivalentní počet uhlíkových atomů ($ECN = CN - 2DB$, kde CN je počet uhlíků a DB je počet dvojných vazeb)
EI	Elektronová ionizace
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
MALDI-TOF	Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě

Obsah

1 Úvod.....	9
1.1 Cíle diplomové práce.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Novorozenecký mázek.....	10
2.1.1 Funkce.....	10
2.1.1.1 Regenerační účinky.....	10
2.1.1.2 Antimikrobiální a antibakteriální účinky.....	11
2.1.1.3 Antioxidativní účinky.....	11
2.1.1.4 Termoregulace.....	11
2.1.1.5 Diagnostické využití novorozeneckého mázku.....	11
2.1.2 Složení.....	12
2.1.2.1 Lipidová frakce.....	12
2.1.2.2 Proteinová frakce.....	12
2.2 Analýza vybraných skupin lipidů v novorozeneckém mázku a v podobných matricích... 13	
2.2.1 Rozdělení lipidů do jednotlivých tříd.....	13
2.2.1.1 Chromatografické metody.....	13
2.2.2 Analýza mastných kyselin.....	14
2.2.2.1 Analýza na základě bodu varu.....	14
2.2.2.2 Klasické chromatografické metody.....	15
2.2.2.3 Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu a hmotnostní detekcí.....	15
2.2.2.4 Nukleární magnetická resonance mastných kyselin.....	16
2.2.3 Analýza alkoholů s dlouhým řetězcem.....	16
2.2.3.1 Derivatizace alkoholů.....	16
2.2.3.2 Dioly.....	17
2.2.4 Analýza esterů karboxylových kyselin s dioly.....	17
2.2.4.1 Monoestery a diestery s dlouhými karboxylovými řetězci a diolem s krátkým řetězcem.....	17
2.2.4.2 Voskové estery.....	18
2.2.5 Určování polohy dvojných vazeb u mastných kyselin	18
2.2.5.1 Oxidativní štěpení	18
2.2.5.2 Fragmentace pomocí hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku.....	19
2.3 Diestery diolů.....	19
2.3.1 Biosyntéza voskových esterů.....	19
2.3.2 Použití diesterů diolů.....	20
2.3.3 Diestery 1,2-diolů v novorozeneckém mázku.....	21
2.3.3.1 Analýza složení diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku po jejich hydrolyze.....	21
2.3.3.2 Složení diesterů diolů v mázku.....	21
2.3.3.3 Srovnání diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku a mazových sekretech jiných savců.....	22
2.4 Nomenklatura.....	23
3 Experimentální část.....	24
3.1 Chemikálie, přístroje a laboratorní vybavení.....	24
3.2 Pracovní postupy.....	25
3.2.1 Příprava vzorků a standardů provedená pracovníky ÚOCHB Praha.....	25
3.2.1.1 Odběr vzorků.....	25
3.2.1.2 Izolace diesterů 1,2-diolů.....	25
3.2.1.3 Syntéza standardů.....	26
3.2.2 Vlastní práce.....	26
3.2.2.1 Příprava roztoku vzorku.....	26
3.2.2.2 Příprava roztoku mravenčanu amonného.....	27
3.2.2.3 Příprava roztoků standardů.....	27
3.2.2.4 Chromatografická separační metoda pro diestery 1,2-diolů.....	28
3.2.2.5 Nastavení hmotnostního detektoru.....	28

3. 2. 2. 6 Vyhodnocování dat	29
4 Výsledky a diskuze.....	35
4. 1 Optimalizace separační metody na přístroji LCQ Fleet.....	35
4. 1. 1 Řešení fragmentací ve zdroji a výskytu radikál kationtů ve spektru.....	36
4. 1. 2 Porovnání různých mobilních fází.....	37
4. 2 Optimalizace separační metody na přístroji LTQ Orbitrap.....	38
4. 2. 1 Porovnání různých gradientů mobilní fáze acetonitril – ethylacetát na vzorku.....	41
4. 2. 2 Výběr optimální mobilní fáze a optimálního gradientu na směsi standardů	44
4. 2. 3 Ověření separace na směsi standardů č. 2.....	48
4. 3 Optimalizace MS metody.....	49
4. 4 Určování poloh dvojných vazeb.....	55
4. 5 Diestery 1,2-dioly nalezené v novorozeneckém mázku.....	58
5 Závěr.....	60
6 Seznam použité literatury.....	61
Přílohy.....	67
Příloha A.....	67
Příloha B.....	68
Příloha C.....	69
Příloha D.....	70
Příloha E.....	71
Příloha F	72
Příloha G	73
Příloha H.....	74
Příloha I.....	75

1 Úvod

Novorozenecký mázek je přirozený biofilm pokrývající pokožku lidského plodu od třetího trimestru těhotenství. Mimo jiné má i hydratační, regenerační a antimikrobiální účinky. Složky novorozeneckého mázku zodpovědné za tyto jeho vlastnosti by mohly být využity ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Z tohoto důvodu je analyzováno jeho celkové složení. Lipidová složka novorozeneckého mázku se skládá ze skvalenu, voskových esterů, esterů sterolu, diesterů 1,2-diolů, triacylglycerolů, volných mastných kyselin, mastných alkoholů, cholesterolu, diacylglycerolů, monoacylglycerolů a fosfolipidů.

Jednou z lipidových tříd jejíž přesné složení nebylo dosud uspokojivě objasněno jsou diestery 1,2-diolů. Ty byly v minulosti analyzovány až po rozštěpení na samostatné mastné kyseliny a dioly. Tato práce je zaměřena na strukturní analýzu diesterů 1,2-diolů jako celku.

1.1 Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce je strukturní analýzy diesterů 1,2-diolů pocházejících ze vzorku novorozeneckého mázku.

Dílní cíle jsou:

- Literární rešerše na dané téma
- Vyvinutí separační metody pro diestery 1,2-diolů pomocí HPLC na obrácené fázi
- Vyvinutí MS metody pro fragmentaci diesterů 1,2-diolů na jednotlivé složky
- Optimalizace MS metody pro určení polohy dvojných vazeb diesterů 1,2-diolů

2 Teoretická část

2.1 Novorozenecký mázek

Novorozenecký mázek (*Vernix caseosa*) je bílý, krémovitý, přirozený biofilm, který pokrývá pokožku lidského plodu od počátku třetího trimestru těhotenství. Pokud není ihned po porodu odstraněn, chrání pokožku novorozence a pomáhá jí v přizpůsobení se novým podmínkám během prvního týdne postnatálního vývoje¹.

Název „Vernix caseosa“ se poprvé objevil v roce 1846 v *Dunlison dictionary of Medical Sciences*¹. První část názvu – „vernix“ pochází z latinského „vernition“, což znamená „lak“ a druhá část „caseous“ znamená v latině „sýrovitý“².

Stejně jako ostatní orgány, i pokožka plodu prochází před porodem sérií programovaných změn, které usnadňují adaptaci na chladné prostředí bohaté na mikroby, ve kterém se novorozenec nachází po porodu. Pokožka novorozence je nově vystavena bakteriím, slunečnímu svitu, vysoušení a dalším pro ni nezvyklým vlivům².

U předčasně narozených dětí (<28. týden a <1000g) je *statum corneum* (nejvrchnější vrstva kůže) ještě nedostatečně vyvinutá a chybí i ochranná vrstva novorozeneckého mázku^{1,2}.

2.1.1 Funkce

Mázek působí jako protektivní vrstva proti mechanickému odírání plodu při průchodu pohlavním ústrojím ženy během porodu¹. Má regenerační, antimikrobiální a antioxidantní účinky a je diskutována jeho role v termoregulaci novorozenců. Rovněž je použitelný pro diagnostické účely.

2.1.1.1 Regenerační účinky

Analýza volných aminokyselin ukazuje na vysoký obsah asparaginu (34,7 %) a glutaminu (22,7 %) v novorozeneckém mázku³. Glutamin je znám jako trofický faktor vývoje fetálního střeva a je důležitý i pro rychle proliferující tkáň a lymfocyty. Novorozenecký mázek urychluje kožní metabolismus *in vitro* zvyšováním glukósové spotřeby. Příznivě může účinkovat i na zraněné porodní cesty¹.

2. 1. 1. 2 Antimikrobiální a antibakteriální účinky

Bylo pozorováno, že se přítomnost mázku na agarové půdě zastavuje růst bakterií *Bacillus megaterium*⁶, *Candida albicans*⁶, *Staphylococcus aureus*⁷ a bakterií rodu *Klebsiella*⁷. Ve vzorku byly nalezeny proteiny ze skupiny defenzinů, lysozym, lidský cathelicidin a psoriazin, které jsou dobře známy svou antimikrobiální a antibakteriální aktivitou⁶.

2. 1. 1. 3 Antioxidativní účinky

Předpokládá se, že, díky obsahu vitamínu E a melaninu má novorozenecký mázek antioxidační účinky. Porod vyvolává vysoký oxidativní stres a zmíněné látky mohou pomoci tento stres překonat⁵.

2. 1. 1. 4 Termoregulace

V děloze je plod v prostředí plodové vody a neohrožuje ho tedy dehydratace ani výkyvy okolní teploty. Po porodu je regulace obsahu vody na povrchu těla novorozence klíčová nejen pro termoregulaci, ale i pro zabránění vysychání strata cornea. Studie *ex utero* (vně dělohy) ukázala, že novorozenecký mázek má schopnost podílet se na osmoregulaci³. Přestože je novorozenecký mázek z 80 % tvořen vodou, má vysokou viskozitu, což naznačuje, že voda v mázku není rozložena rovnoměrně, ale vyskytuje se převážně v „buněčných houbách“¹. Po narození se voda vystavená vzdušnému prostředí odpařuje z povrchu těla a tím může dojít k nebezpečnému ochlazení pokožky novorozence. Při studiích bylo zjištěno, že pokožka novorozence pokrytá novorozeneckým mázkem má nízkou výparnou plochu, což dobře koresponduje s představou, že korneocyty bohaté na vodu jsou obklopeny hydrofóbní lipidovou hmotou³. Přes veškeré vyspělé techniky péče o předčasně narozené děti, je termoregulace v prvních hodinách života stále velkým problémem. Z tohoto důvodu doporučují někteří lékaři, ponechat novorozenecký mázek na pokožce⁴ a nechat ho odloučit přirozenou cestou, což nastává zhruba 5 dní po porodu¹. Jiní autoři však uvádějí, že novorozenecký mázek neovlivňuje termoregulaci novorozenců prokazatelným způsobem⁵.

2. 1. 1. 5 Diagnostické využití novorozeneckého mázku

Analýza novorozeneckého mázku v plodové vodě je vhodným prognostickým nástrojem

pro určení zralosti plodu¹. Rovněž bylo ověřeno, že novorozenecký mázek může být diagnostickým nástrojem k prokázání užívání drog (testováno na kokainu) matkou během těhotenství⁸. Dále byly v novorozeneckém mázku nalezeny biomarkery atopického ekzému⁹.

2. 1. 2 Složení

Novorozenecký mázek se skládá z 80,5 % vody, 9,2 %, lipidů a 10,3 % proteinů¹.

2. 1. 2. 1 Lipidová frakce

V novorozeneckém mázku byly nalezeny tyto hlavní lipidové frakce: skvalen, voskové estery, estery sterolu, diestery 1,2-diolů, triacylglyceroly, volné mastné kyseliny, mastné alkoholy, cholesterol, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a fosfolipidy¹⁰.

Volné mastné kyseliny tvoří z 50 % nasycené mastné kyseliny, mononenasycené mastné kyseliny tvoří 11,4 % a polynenasycené mastné kyseliny 15,0 % (24 % volných mastných kyselin nebylo identifikováno)¹¹. U triacylglycerolů a voskových esterů převládají nevětvené nenasycené mastné kyseliny. Větvené mastné kyseliny (téměř stejný podíl *iso* a *anteiso* konfirmace) se nacházejí převážně u esterů sterolů. Délka řetězců nalezených mastných kyselin se pohybuje mezi 14 – 32 uhlíky¹².

Poloha dvojných vazeb u mastných kyselin vyskytujících se v novorozeneckém mázku byla určována oxidační metodou (viz kap. 2. 2. 5. 1). Směsný vzorek methylesterů mononenasycených mastných kyselin z několika vzorků novorozeneckého mázku byl rozdělen do frakcí podle délky řetězce a podle větvení preparativní plynovou chromatografií. Převládající pozice dvojných vazeb byla $\Delta 6$ (C14 a C15) a $\Delta 9$ (C16 – C20). Nalezené mononenasycené mastné kyseliny byly o délce 13 – 32 uhlíků pro nevětvené řetězce a 13 – 28 uhlíků u větvených řetězců¹³.

2. 1. 2. 2 Proteinová frakce

Pomocí 2D gelové elektroforézy v mázku separováno 41 proteinů¹⁴. Byly identifikovány pomocí laserové desorpce a ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu a (MALDI-TOF) s hmotnostní detekcí (MS), kapalinové chromatografie s MS² detekcí a kombinací obou metod. Asi polovina z nich je součástí přirozeného imunitního systému a třetina má pravděpodobně antimikrobiální účinky¹⁴. V nejnovější studii, zaměřené na biomarkery atopického ekzému v novorozeneckém mázku, se uvádí, že bylo separováno

a identifikováno 203 proteinů pomocí kapalinové chromatografie (LC)/MS². Nejvíce zastoupené proteiny v novorozeneckém mázku byly hydrolázy (14,4 %), proteázy (10,8%) a enzymové modulátory (10,8 %)⁹.

2. 2 Analýza vybraných skupin lipidů v novorozeneckém mázku a v podobných matricích

Lipidová frakce byla nejčastěji izolována metodou podle Folche. Prvním krokem je extrakce lipidů roztokem chloroform:methanol 2:1 (V/V) a následná filtrace. Druhým krokem je odstranění nelipidických látek promytím minimálně pětinasobným objemem vody, než je objem filtrátu¹⁵.

Po izolaci lipidové frakce byly lipidy rozděleny do jednotlivých tříd pomocí klasické chromatografie a dále analyzovány. Během analýz zabývajících se složením novorozeneckého mázku, a jemu podobných směsí nacházejících se u jiných organismů, bylo použito mnoho separačních a detekčních technik, od klasické chromatografie až po nukleární magnetickou rezonanci. Složení diesterů 1,2-diolů bylo částečně objasněno při analýzách mastných kyselin, esterů a alkoholů s dlouhým řetězcem nacházejících se v novorozeneckém mázku.

2. 2. 1 Rozdělení lipidů do jednotlivých tříd

Lipidová složka novorozeneckého mázku je velmi složitá směs skládající se z mnoha lipidových tříd. Pro jejich další analýzu je bylo třeba nejprve separovat do jednotlivých tříd.

2. 2. 1. 1 Chromatografické metody

Složení lipidů nacházejících se v lanolinu ovčí vlny bylo identifikováno za pomoci preparativní chromatografie na tenké vrstvě (TLC) v kombinaci s plamenovým ionizačním detektorem (FID), která sloužila k charakterizaci lipidových tříd, a plynové chromatografie (GC) s MS detekcí (elektronová i chemická ionizace), která charakterizovala směs z pohledu molekulových hmotností. Při eluci TLC mobilní fází pro nepolární lipidy¹⁶ byly nalezeny píky odpovídající monoesterům, diesterům, triacylglycerolům, volným mastným kyselinám, alkoholům a sterolům. Při eluci mobilní fází pro polární lipidy¹⁷ byly nalezeny

píky odpovídající derivátům cholesterolu, ceramidům, hydroxykyselinám a diolům¹⁷. Tyto skupiny byly přesněji charakterizovány na GC-MS a rozděleny celkem do osmnácti skupin¹⁷. Velmi dobře se v separaci lipidových tříd uplatňuje argentační TLC s dusičnanem stříbrným^{18, 19}.

Alternativní separační technikou k TLC je sloupcová chromatografie na deaktivovaném florisilu²⁰. Lipidové třídy mohou být rovněž separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na silikagelu nebo oxidu hlinitém²¹. V posledních letech bývá stále častěji k separaci lipidových tříd používána hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), která má tu výhodu, že kolona dobře snáší vysoce polární i vysoce nepolární mobilní fáze²².

2. 2. 2 Analýza mastných kyselin

Nejčastěji se mastné kyseliny pomocí GC analyzují ve formě jejich methylesterů. Methylestery mastných kyselin jsou připravovány několika různými postupy methylesterifikace, například pomocí diazomethanu²³ nebo fluoridu boritého v methanolu²⁴. Nejpoužívanější technikou jsou obecně chromatografické metody, ale lze využít i nukleární magnetickou rezonanci (NMR) a MALDI-TOF.

2. 2. 2. 1 Analýza na základě bodu varu

Dnes již nepoužívanou metodou analýzy mastných kyselin byla analýza na základě bodu varu. Volné mastné kyseliny produkované lidskými mazovými žlázami byly zkoumány ve vzorcích vlasů pocházejících z kadeřnických salonů. Volné mastné kyseliny byly převedeny na methylestery a byly separovány podle délky řetězce destilací. Bylo zjištěno, že většina volných mastných kyselin v lidských vlasech produkovaných mazovými žlázami je nevětvená²⁵, oproti volným mastným kyselinám nacházejícím se v lanolínu²⁶. Na základě bodu varu methylesterů mastných kyselin, byly identifikovány nasycené mastné kyseliny o počtu uhlíků 7 – 22, převládající mastné kyseliny byly 16:0 (36 %) a 18:0 (26 %). Nenasycené mastné kyseliny byly odděleny od nasycených krystalizací, oxidovány a dále analyzovány ve formě dihydroxykyselin. Dostatečné množství pro interpretaci bylo pouze u nenasycených kyselin o délce řetězce 14 – 18 uhlíků a převládajících polohách dvojných vazeb $\Delta 6$ ^{cit. 25}.

2. 2. 2. 2 Klasické chromatografické metody

Methyl větvené nasycené mastné kyseliny nalezené v novorozeneckém mázku byly separovány pomocí GC²⁷ a kapilární GC-MS. Touto metodou bylo nalezeno 35 monomethyl a 46 dimethyl větvených mastných kyselin o celkové délce řetězce C11-C18. Celkově byly nalezeny tři skupiny dimethyl větvených mastných kyselin: s terminálním *iso* methylem, s terminálním *anteiso* methylem a neobsahující ani jednu z těchto poloh. Celkově dominovalo 4-methyl větvení ve všech zkoumaných skupinách větvených mastných kyselin^{27, 28}. Kromě preparativní GC se k frakcionaci methylesterů mastných kyselin využívá i HPLC na reversní fázi (C18 kolona, methanol jako mobilní fáze). Ta pak bývá následovaná buď GC s elektronovou nebo HPLC s chemickou či elektronovou ionizací a MS detekcí jednotlivých frakcí. Touto metodou bylo separováno 113 různých mastných kyselin ve vzorku novorozeneckého mázku. Rovněž byl určen počet dvojných vazeb a methylových větvení pro jednotlivé kyseliny. V mnoha případech byla určena i poloha větvení²⁹.

Další užitečnou metodou k určování větvení nasycených mastných kyselin je GC-MS² s elektronovou ionizací (EI). Tato metoda byla testována na celkem třiceti nasycených methyl-větvených mastných kyselinách. Mastné kyseliny s větvením v poloze *iso* tvořily fragmentační iont [M-43], což odpovídá ztrátě terminálního isopropylu. Mastné kyseliny větvené v poloze *anteiso* tvořili dva fragmentační ionty odpovídající ztrátám na obou stranách methylového řetězce [M-29] a [M-57]^{cit. 27}.

2. 2. 2. 3 Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu a hmotnostní detekcí

Mastné kyseliny lze rovněž analyzovat pomocí MALDI-TOF MS. Největším problémem této analýzy je volba vhodné matrice, neboť matrice obvykle užívané v MALDI proteomických analýzách velkých molekul mají vysoké odezvy v oblasti nízkých hodnot m/z odpovídajících i m/z mastných kyselin. Tento problém může být vyřešen použitím meso-tetrakis(pentafluorofenyl)porfyrinu (CAS: 25440-14-6) jako matrice. Meso-tetrakis(pentafluorofenyl)porfyrin je matrice o poměrně vysoké molekulové hmotnosti a nevyskytují se u ní signály $< 500 m/z$. Dále může být jako matrice použit 9-aminoacridin (CAS: 90-45-9) a mastné kyseliny mohou být detekovány v negativním módu³⁰.

Pro měření v negativním módu se rovněž velmi dobře osvědčila silně bazická matrice

1,8-bis(dimethyl-amino)naftalen (CAS: 20734-58-1), které se říká „protonová houba“ (proton sponge)³¹. Další možností je použití anorganické matrice (grafit). Tato metoda ale vykazuje poměrně špatné odezvy³⁰.

2. 2. 2. 4 Nukleární magnetická resonance mastných kyselin

V analýze nenasycených mastných kyselin se uplatňuje ¹H NMR a ¹³C NMR^{cit. 32}. Pro NMR analýzu obsahu linolové, linolenové a olejové kyseliny v rostlinných olejích byly v ¹H NMR nejvhodnější terminální methylové protony a divinylové protony a v ¹³C NMR analýze omega-2 uhlíky a divinylové uhlíky. Data získaná pomocí této analýzy se dobře shodovala s daty z GC analýzy³². Byla zkoušena i analýza mastných kyselin pomocí metody ³¹P NMR. Mastné kyseliny ochotně reagují s chlorofosfánem za vzniku sloučenin, které mohou být snadno rozlišitelné v ³¹P NMR chemických posunech³³.

2. 2. 3 Analýza alkoholů s dlouhým řetězcem

EI-MS spektra nederivatizovaných alifatických alkoholů jsou špatně interpretovatelná, molekulový iont má jen malou odezvu (do 10 % hlavního iontu). *Iso* methyl větvené alkoholy sice mají viditelnou ztrátu terminálního methylu, ale opět jen o malé intenzitě < 10 % odezvy hlavního iontu. Mononenasyčené alkoholy mají spektra velmi podobná nasyceným alkoholům. Obecně lze říci, že nederivatizované alkoholy se dají identifikovat jen porovnáním spekter se spektry z knihovny.

2. 2. 3. 1 Derivatizace alkoholů

Jednou z používaných derivatizací alkoholů je acetylace anhydridem kyseliny octové²³. V EI-MS spektru je hlavní iont o *m/z* odpovídající ztrátě acetylu [M-60]⁺ a ve spektru se nově objevuje iont odpovídající protonované kyselině octové (*m/z* = 61, [CH₃COOH + H]⁺). Ani tato spektra však nejsou příliš průkazná, zvláště pro složité směsi alkoholů. Asi nejpoužívanějším derivatizačním činidlem pro GC analýzu alifatických alkoholů je trimethylsilylether. Jeho hlavním přínosem je zvýšení těkavosti a snížení polaritý dané molekuly. U nenasycených alkoholů dochází ke ztrátě trimethylsilyloxy skupiny³⁴. Dalším používaným derivatizačním činidlem je trifluoracetát³⁵.

2. 2. 3. 2 Dioly

Dioly vyskytující se ve voskových esterech novorozeneckého mázku mají OH skupiny v poloze 1 a 2, což bylo potvrzeno na TLC porovnáním se syntetickými standardy³⁶.

Separace enantiomerů 1,2-diolů v podobě bis-L-acetylmandelátů byla provedena na TLC. Jako stacionární fáze sloužil silikagel G a jako mobilní fáze byl použit benzen:diethylether (97:3, V/V)³⁷.

2. 2. 4 Analýza esterů karboxylových kyselin s dioly

Esterovou vazbu je možno identifikovat spektrofotometricky. Estery reagují s hydroxylaminem za vzniku kyseliny hydroxamové a ta tvoří v přítomnosti trojmocného železa poměrně stabilní červeno fialový komplex³⁸. Na monoesterech a diesterech skládajících se z dlouhého karboxylového řetězce a diolu s krátkým řetězcem bylo ověřeno, že je možno identifikovat složení monoesterů a diesterů pomocí EI-MS bez předchozí chromatografické separace³⁹. U voskových esterů se osvědčila identifikace pomocí kombinace MS a MS² spekter z elektronové i chemické ionizace po chromatografické separaci⁴⁰⁻⁴².

2. 2. 4. 1 Monoestery a diestery s dlouhými karboxylovými řetězci a diolem s krátkým řetězcem

Monoestery a diestery ethandiolu, propandiolu a butandiolu byly měřeny pomocí EI-MS s nízkou (6 – 12 eV) i vysokou (70 eV) energií elektronů. Monoestery poskytovaly poměrně složitá spektra, ze kterých bylo možno dle charakteristických štěpení (v pozici 2,3 nebo 3,4) identifikovat nejen délku karboxylového řetězce, ale i délku diolu, a to i ve směsi. U nenasyčeným monoesterů byla spektra špatně reprodukovatelná a příliš nesouhlasila se spektry nasycených monoesterů. Diestery diolů vykazovaly hlavní píky pro $[M - RCOO]^+$ ionty. Dioly esterifikované dvěma stejnými kyselinami měly ve spektru jeden hlavní pík, dioly esterifikované různě dlouhými kyselinami měly dva hlavní píky. Bylo tedy zjištěno, že monoestery i diestery diolů je možno identifikovat hmotnostní spektrometrií i bez předchozí chromatografické separace³⁹.

2. 2. 4. 2 Voskové estery

Voskové mono- a diestery nalezené u stěhovavého bahenního jespáka rezavého (*Calidris canutus*) byly analyzovány pomocí GC-MS a GC-MS² s elektronovou i chemickou ionizací. Spektra elektronové ionizace byla velmi složitá a neobsahovala molekulové ionty. Spektra chemické ionizace poskytla píky odpovídající molekulám o celkovém počtu uhlíků 32 – 48. Porovnáním obojích spekter byl získán dobrý přehled o voskových esterech jako celku i o jejich přesném složení⁴⁰.

Voskové estery z novorozeneckého mázku byly analyzovány argentační HPLC-MS² s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Retenční chování voskových esterů bylo ovlivňováno nejen celkovou délkou řetězce, ale i počtem dvojných vazeb a *cis* a *trans* izomerií. APCI spektra voskových esterů byla jednoduchá a obsahovala [M+H]⁺ ionty. MS² spektra obsahovala fragmenty, které pomáhaly identifikovat strukturu voskových esterů⁴¹. Tato data byla porovnána s daty získanými optimalizovanou HPLC/APCI MS metodou. Voskové estery zde byly separovány na obrácené fázi (kolona Nova-Pak C18, mobilní fáze gradient acetonitril:ethylacetát). Eluční pořadí voskových esterů odpovídalo jejich ECN (equivalent carbon number, rozdíl počtu uhlíků a dvojnásobku počtu dvojných vazeb) číslům. U voskových esterů se stejným ECN dříve eluovaly ty více nenasycené. Větvené voskové estery měly kratší retenční čas než nevětvené⁴².

2. 2. 5 Určování polohy dvojných vazeb u mastných kyselin

Poloha dvojně vazby je určována po methylesterifikaci mastných kyselin, nebo u intaktních lipidů. Mezi používané metody určování polohy dvojně vazby patří oxidativní štěpení a MS² aduktů [M+C₃H₅N]⁺.

2. 2. 5. 1 Oxidativní štěpení

Methylestery mastných kyselin byly podrobeny oxidativnímu štěpení na dvojně vazbě působením manganistanu a jodistanu podle metody Von Rudloffa⁴³. Při první oxidaci (manganistanem) se v místě dvojně vazby na obou uhlících naváže hydroxylová skupina (pH = 8 – 9), nebo se na jednom z nich naváže hydroxylová skupina a na druhém oxoskupina (pH = 7 – 8). Při druhé oxidaci (jodistanem) se přeruší původně nenasycená uhlíková vazba. Výsledkem jsou tedy dvě látky, přičemž jejich uhlíkové řetězce pochází

z opačných stran původní nenasyčené vazby, které jsou dále separovány na GC⁴³.

2. 2. 5. 2 Fragmentace pomocí hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku

Další možnost jak určit polohu dvojně vazby u methylesterů mastných kyselin je pomocí HPLC/APCI-MS². Principem je tvorba nenasyčených sloučenin s iontem C₃H₅N⁺ vznikajícího reakcemi acetonitrilu (mobilní fáze) v plynné fázi v APCI zdroji. Výsledkem reakce je iont [M + C₃H₅N]⁺. Při fragmentaci dochází ke štěpení C-C vazeb na každé straně dvojně vazby. Z MS² spekter fragmentů tohoto iontu lze dopočítat polohu dvojně vazby na původní molekule. Tato metoda byla vyzkoušena na identifikaci známých nenasyčených mastných kyselin pocházejících z oleje obsaženém v semenech černého rybízu. Byly identifikovány všechny dosud známé nenasyčené kyseliny, vyskytující se v tomto oleji, a několik jich bylo dokonce nově objeveno. Citlivost HPLC/APCI-MS² je srovnatelná s GC/EI-MS^{cit. 44}. Výhodou této metody je, že poloha dvojně vazby se dá určovat i na celé molekule (např.: triacylglycerol, voskové estery) bez nutnosti methylesterifikace mastných kyselin. Získá se tak celkový přehled o molekule, včetně délek jednotlivých mastných kyselin a poloh dvojných vazeb⁴⁵.

2. 3 Diestery diolů

Nejčastěji se v mazových sekretech živočichů objevují diestery 1,2-diolů (savci)⁴⁶ a diestery 2,3-diolů (převážně ptáci)^{47, 48}. Biosyntéza voskových esterů je složitý děj, kterého se účastní mnoho enzymových komplexů. Diestery diolů a jejich části bývají využívány hlavně v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Diestery 1,2-diolů nacházející se v novorozeneckém mázku byly zatím analyzovány jen z pohledu mastných kyselin a diolů uvolněných jejich hydrolýzou.

2. 3. 1 Biosyntéza voskových esterů

Detailní průběh jednotlivých kroků biosyntézy u různých organismů a příslušné enzymy zodpovědné za regulaci těchto kroků jsou popsány v mnoha odborných článcích^{49, 50, 51, 52} a nejsou předmětem této práce. Obecně je prvním krokem biosyntézy prodlužování řetězců alifatických mastných kyselin na velmi dlouhé nasycené mastné kyseliny, které jsou prekurzory voskových esterů. To se děje ve dvou krocích. Prvním krokem je *de novo*

syntéza C16 a C18 nasycených mastných kyselin z acetylkoenzymu A (propionylkoenzym A pro biosyntézu mastných kyselin s lichým počtem uhlíků), probíhající v plastidech⁴⁹. Syntéza *de novo* probíhá přes čtyři hlavní reakce: kondenzace, redukce, dehydratace a další redukce za spotřeby NADPH⁵². Podílí se na ní enzymy tvořící komplex pro syntézu mastných kyselin. Druhým krokem je prodloužení řetězců vždy o dva uhlíky (malonylACP) na prekurzory voskových esterů (C20 – C34). Prodlužování probíhá v endoplasmatickém retikulu za účasti elongáz mastných kyselin navázaných na membránu⁴⁹.

Dalším krokem biosyntézy voskových esterů je syntéza alkoholových částí voskových esterů z velmi dlouhých mastných kyselin. Tento proces probíhá dvěma různými cestami. První cestou je redukce acylů. Touto cestou vznikají primární alkoholy a následně voskové estery. Druhou cestou je dekarboxylace, která vede ke vzniku alkanů, přes aldehydy, sekundární alkoholy nebo ketony⁵².

Redukce acylů probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku jsou velmi dlouhé mastné kyseliny redukovány na aldehydy a ty jsou ve druhém kroku dále redukovány na primární alkoholy. Dále dochází k syntéze voskových esterů za účasti dalších membránových enzymů⁴⁹.

Dekarboxylace začíná redukcí velmi dlouhých mastných kyselin na aldehydy. Ty jsou dekarboxylovány na alkany s lichým počtem uhlíků. Alkany mohou být hydroxylací převedeny na sekundární alkoholy, ze kterých se po oxidaci tvoří ketony⁴⁹.

Biosyntéza nenasycených mastných kyselin vychází rovněž z *de novo* syntetizovaných nasycených mastných kyselin, převážně z kyseliny C16 a C18. Druhým krokem je tvorba dvojných vazeb v poloze $\Delta 6$ nebo $\Delta 9$ (viz kap. 4) v endoplasmatickém retikulu. Třetím krokem biosyntézy je prodlužování vzniklých řetězců o libovolný počet C2 skupin až na požadovanou délku kyseliny⁵³.

2. 3. 2 Použití diesterů diolů

1,2-dioly s dlouhými řetězci mají široké uplatnění v kosmetickém průmyslu, jsou složkou mnoha zvláčňujících a hydratačních krémů a vlasových kondicionérů⁵⁴.

Směs diolů s kratšími nevětvenými řetězci (C5 – C10) byla patentována jako antimikrobiálně působící směs, použitelná například proti akné, tělesnému pachu⁵⁵ a v antiseptické a toaletní kosmetice⁵⁶. V kosmetickém průmyslu bývají využívány

i polynenasycené mastné kyseliny a estery diolů⁵⁷.

Diestery diolů o celkovém celkovém počtu uhlíků 11 – 30 a s alifatickým řetězcem mohou být použity jako nízkokalorické tukové náhražky v potravinách a farmaceutických přípravcích⁵⁸.

2. 3. 3 Diestery 1,2-diolů v novorozeneckém mázku

Složení diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku bylo analyzováno po jejich hydrolýze. Nalezené mastné kyseliny a dioly byly porovnány s mastnými kyselinami a dioly pocházejícími z mazových sekretů dalších savců.

2. 3. 3. 1 Analýza složení diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku po jejich hydrolýze

Bylo zjištěno, že dioly nacházející se v diesterech novorozeneckého mázku jsou převážně nasycené. Nejprve byly pomocí GC (kolona polyesterová – EGSSX) analyzovány 1,2-dioly. Separační data byla porovnána s daty 1,2-diolů po hydrogenaci, při které byly hydroxylové skupiny ochráněny převedením diolů na acetonidy⁵⁹. Změny v chromatogramu nebyly pozorovány. Volné dioly byly oxidovány kyselinou jodistou a při GC analýze se vzniklé aldehydy separovaly na základě uhlíkového čísla⁶⁰. Byly nalezeny čtyři homologické řady odpovídající *iso* izomerům, *anteiso* izomerům, nevětveným řetězcům a větveným řetězcům s jiným větvením⁶¹. *Iso* a *anteiso* polohy větvení byly ověřeny ještě oxidací volných diolů manganistanem draselným⁶². Mastné kyseliny pocházející z diesterů 1,2-diolů byly analyzovány ve formě methylesterů na GC-MS stejným způsobem jako frakce všech mastných kyselin nalezených v novorozeneckém mázku⁵³.

2. 3. 3. 2 Složení diesterů diolů v mázku

Diestery 1,2-diolů tvoří asi 3 %⁵³ - 7 %²³ lipidové frakce z novorozeneckého mázku. Kromě diesterů 1,2-diolů se v novorozeneckém mázku vyskytují ještě diestery α -hydroxykyselin esterifikované buď na karboxylové skupině sterolem či dlouhým alkoholem, nebo esterifikované na hydroxylové skupině nesubstituovanou mastnou kyselinou. Diestery 1,2-diolů nad těmito dalšími diestery výrazně převažují⁶¹. Bylo ověřeno, že dvojnásobné vazby u diesterů 1,2-diolů se nacházejí jak u kyselin, tak u diolů. Mastné kyseliny izolované z frakce diesterů 1,2-diolů byly v rozsahu počtu uhlíků

12-34^{cit. 53} a dioly v rozsahu 20 – 24 uhlíků²³. Dioly v novorozeneckém mázku mají hydroxylové skupiny v poloze 1 a 2 ^{cit. 36}. Mezi dioly převládají větvené (91,3 %) nad nevětvenými (8,7 %). U větvených diolů výrazně převládá poloha *iso* (71,7 % z celkového množství větvených i nevětvených diolů) nad polohou *anteiso* (19,1 %), jiná větvení jsou zastoupena minimálně (0,5 %)⁶¹.

Mastné kyseliny nalezené v novorozeneckém mázku byly ze 70,8 % nevětvené (z toho 53,5 % nasycené a 46,5 % mononenasycené) a 29,2 % bylo větvených (96,2 % nasycené, 3,8 % mononenasycené). U větvených mastných kyselin převládala poloha *iso* nad polohou *anteiso*. Převládající polohy dvojných vazeb byly $\Delta 6$ a $\Delta 9$ ^{cit. 53}.

2. 3. 3. 3 Srovnání diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku a mazových sekretech jiných savců

Diestery 1,2-diolů byly nalezeny například v lanolinu produkovaném mazovými žlázami ovčí³⁶, v mazovém sekretu makaka⁶³, myši, zlatého křečka, morčete a krysy (u té se vyskytují i diestery 2,3-diolů)⁴³. Podobné, ne však identické diestery 1,2-diolů (odlišnosti v chování na TLC a IR spektrometrii) byly nalezeny i u psů⁴⁶.

Nejčastěji se vyskytující mastné kyseliny v lidském novorozeneckém mázku (C16 a C18) byly majoritní i u myši a krysy, i když u nich byly poměrně významně zastoupeny i delší mastné kyseliny (C20 a C22). Naopak mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků byly u všech zkoumaných živočichů zastoupeny jen minoritně, kromě C17 mastné kyseliny (16 %) u morčete, C15 mastné kyseliny v novorozeneckém mázku (13 %) a C21 mastné kyseliny u psa (16 %). Zastoupení 1,2-diolů se naopak u žádných dvou pozorovaných živočichů neshodovalo. U krysy je majoritně (65 %) zastoupen diol o délce 16 uhlíků, v novorozeneckém mázku jsou to dioly o počtu uhlíků 20 – 24 (všechny > 10 %), u myši diol o počtu uhlíků 20, u morčete C21 (45 %) diol a C22 (20 %) diol a u psa to byly dioly o délce 18 – 23 uhlíků (všechny > 10 %). Co se týče větvení, tak nasycené nevětvené mastné kyseliny převažovaly u morčete, nasycené nevětvené mastné kyseliny převažovaly u psa a krysy a nenasycené mastné kyseliny převažovaly u myši. V novorozeneckém mázku bylo složení těchto tří skupin přibližně stejné (28,5 – 37 %). Nasycené nevětvené dioly převažovaly u myši a krysy, nasycené větvené dioly převažovaly u psa a v novorozeneckém mázku a u morčete byla více než polovina diolů nenasycených⁴⁶. Při porovnání mastných kyselin v poloze 1 a 2 u zlatého syrského křečka a švýcarské albino

myši se ukázalo, že zatímco u křečka jsou v poloze 1 převážně kratší mastné kyseliny (14-20 uhlíků) a v poloze 2 převládají delší mastné kyseliny (22-26 uhlíků) a myši je tomu přesně naopak a v poloze 1 převládají delší mastné kyseliny (20-24 uhlíků), zatímco v poloze dva převládají kratší mastné kyseliny o počtu uhlíků > 19 ^{cit. 64}. Výrazně kratší mastné kyseliny v poloze 1 byly nalezeny i u makaka (C4 a C5, převážně větvené). V poloze 2 se nacházely delší mastné kyseliny (C14-C27), a to větvené i nevětvené⁶³.

2. 4 Nomenklatura

Syntetizované standardy (viz kap. 3. 2. 1. 3) byly pojmenovány v souladu s IUPAC nomenklaturou a v práci byly dále značeny zkráceným zápisem v podobě počet uhlíků:počtu dvojných vazeb (CN:DB) diolu//CN:DB mastné kyseliny_CN:DB druhé mastné kyseliny (př.: 10:0//16:0_16:0). Stejným způsobem byly značeny i nalezené diestery 1,2-diolů (Příloha I). Rozdělení mastných kyselin znakem „_“ znamená, že není jisté, která kyselina je v poloze 1, a která v poloze 2^{cit. 66}.

Poloha dvojných vazby může být upřesněna dvojným způsobem. Využívá se k tomu buď Δx nebo $n-x$ nomenklatura. U Δx značení se poloha dvojných vazby na uhlíku x počítá od karboxylového uhlíku mastné kyseliny. Většinou bývá zvykem upřesnit konfiguraci dvojných vazby předponami *cis-* a *trans-*. Například kyselina palmitolejová by byla označena jako C16:1 ($\Delta 9$ -cis). Označení $\Delta 9$ tedy znamená, že se dvojná vazba nachází mezi uhlíky 9 a 10^{cit. 65}. Tato nomenklatura byla použita u citovaných publikací zabývajících se polohami dvojných vazeb mastných kyselin ve vernixu⁵³.

Nomenklatura $n-x$ (také omega- x , ω - x) naopak počítá polohu dvojných vazby na uhlíku x od koncového (omega, ω) uhlíku (methylová skupina). Kyselina palmitolejová by tedy byla značena jako C16:1($n-7$). Toto označení klasifikuje mastné kyseliny podle cesty jejich biosyntézy u živočichů. Tato nomenklatura se využívá i v nutriční literatuře v podobě omega- x . V technických dokumentech je podle IUPAC upřednostňována $n-x$ nomenklatura před omega- x nomenklaturou⁶⁵. V této práci byla použita nomenklatura $n-x$, protože poloha dvojných vazby byla určována od konce řetězců.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie, přístroje a laboratorní vybavení

- Acetonitril: p.a., $\geq 99,9$ %, LC-MS Chromasolv, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Ethylacetát: p.a., $\geq 99,7$ %, HPLC Chromasolv, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- 2-propanol: p.a., $\geq 99,9$ %, LC-MS Chromasolv, Fluka (St. Louis, USA)
- mravenčan amonný: p.a., $\geq 97,0$ % (T), Fluka (St. Louis, USA)
- chloroform: p.a., destilovaný, stabilizovaný 1% ethylalkoholem, Penta (Praha, Česká Republika)

- analytické váhy: Mettler, AE 240-S (Mettler Toledo, Zürich, Švýcarsko)

LC/MS systém s LCQ Fleet:

- čerpadlo: Rheos Allegro (Flux Instruments, Reinach, Švýcarsko)
- automatický dávkovač: Accela autosampler P/N 60057 – 60020 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- termostat: LCT 460 PT (Labio, Praha, Česká Republika)
- detektor: LCQ Fleet, 3D IT, se sondou pro APCI (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)

LC/MS systém s LTQ Orbitrap:

- čerpadlo: Rheos 2200 (Flux Instruments, Reinach, Švýcarsko)
- UHPLC čerpadlo: Dionex Ultimate 3000 ISO-3100 SD Isocratic pump (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- automatický dávkovač: PAL HTS autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Švýcarsko)
- kolona: C18, Nova-Pak, 4 μ m, 3,9 x 300 (+ 150) mm (Waters, Milford, USA)
- termostat: DeltaChrom CTC 100 (Watrex, Praha, Czech Republic)
- detektor: LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS/IT, se sondou pro APCI (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)

- software: Xcalibur, verze 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)
- vialky o objemu 2 ml s víčky se septem
- mikrodávkovače Hamilton: 10, 25, 250 a 500 μ l (Hamilton Company, Reno, USA)
- parafilm: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- peekové kapiláry, spojovací ferule a T-kus: Upchurch Scientific (Oak Harbor, USA)
- skleněné zásobní lahve s fritami (kovové) na mobilní fáze
- skleněná zásobní láhev na mravenčan amonný
- hliníková fólie

3. 2 Pracovní postupy

3. 2. 1 Příprava vzorků a standardů provedená pracovníky ÚOCHB Praha

3. 2. 1. 1 Odběr vzorků

Vzorky novorozeneckého mázku (cca 1,0 g) byly odebírány zdravotním personálem v souladu se stanoviskem Etické komise VFN v Praze (910/09 S-IV) na porodních sálech Gynekologicko-porodnické kliniky 1. lékařské fakulty UK v Praze. Vzorky použité v této práci byly odebrány z kůže z právě narozených zdravých holčiček, které přišly na svět přirozeným porodem v řádném termínu. Mázek byl uchováván v tmavých vialkách při $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. 2. 1. 2 Izolace diesterů 1,2-diolů

Vzorek byl extrahován v 50 ml směsi chloroform:methanol 2:1 (V/V). Suspenze byla přefiltrována přes kolonku obsahující přečištěnou vatu a silikagel. Byl přidán bezvodý síran hořečnatý a vzorek byl opět přefiltrován. Rozpouštědla byla odstraněna na vakuové odparce a pod proudem argonu, čímž bylo získáno 78 mg lipidového extraktu.

Lipidový extrakt (cca 20 mg) byl separován na skleněných TLC destičkách (9x12 cm) pokrytých vrstvou silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit hexan:diethyléter 93:7 (V/V). Zóny byly vizualizovány pomocí rhodaminu 6G (0,05 % v ethanolu) a UV světla. Zóna odpovídající diesterům 1,2-diolů (R_f 0,46 – 0,52) byla převedena na malou skleněnou kolonku obsahující přečištěnou vatu a silikagel. Lipidová složka byla eluována

diethyletherem, který byl odpařen pod proudem argonu. Rezidua byla rozpuštěna v chloroform:methanol 2:1 (V/V). Vzorek (1 mg/ml) byl uskladněn při teplotě -25 °C.

3. 2. 1. 3 Syntéza standardů

Chlorid mastné kyseliny byl přidán do roztoku dekan-1,2-diolu (respektive hexadekan-1,2-diolu) v bezvodém pyridinu. Roztok byl míchán 72 hodin za laboratorní teploty, a poté zředěn etherem. Dále byl roztok přečištěn. Rozpouštědlo bylo odpařeno *in vacuo* a olejová rezidua byla odstraněna pomocí flash chromatografie.

Připravené standardy:

- 2-[(E)-oktadec-11-enoyl]oxydecyl (E)-oktadec-11-enoát
dále značeno: 10:0//18:1(n-7t)_18:1(n-7t)
- 2-[(Z)-oktadec-9-enoyl]oxydecyl (Z)-oktadec-9-enoát
dále značeno: 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9)
- 2-[(Z)-oktadec-6-enoyl]oxydecyl (Z)-oktadec-6-enoát
dále značeno: 10:0//18:1(n-12)_18:1(n-12)
- 2-[oktadekanoyl]oxydecyl oktadekanoát
dále značeno: 10:0//18:0_18:0
- 2-[hexadekanoyl]oxydecyl hexadekanoát
dále značeno: 10:0//16:0_16:0
- 2-[(Z)-oktadec-9-enoyl]oxyhexadecyl (Z)-oktadec-9-enoát
dále značeno: 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9)

3. 2. 2 Vlastní práce

3. 2. 2. 1 Příprava roztoku vzorku

Vzorek o koncentraci 10 mg/ml byl zředěn 10x na koncentraci 1,0 mg/ml ve směsi acetonitril:chloroform 10:9 (V/V). Takto připravený vzorek byl skladován ve skleněné vialce utěsněné parafilmem v lednici při teplotě 4 °C.

3. 2. 2. 2 Příprava roztoku mravenčanu amonného

Roztok mravenčanu amonného ($M_r = 63,06$) o koncentraci 50 mmol/L byl připraven rozpuštěním 315 mg ve 100 ml 2-propanol:destilovaná voda 9:1. Roztok byl skladován ve skleněné lahvi v lednici při teplotě 4°C.

3. 2. 2. 3 Příprava roztoků standardů

- Standard pro přímý nástřik: Standard 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9) ($M_r = 702,65$) byl rozpuštěn v acetonitrilu na výslednou koncentraci 0,3 mmol/L.
- Standard s přidavkem amonných iontů pro přímý nástřik: Bylo smícháno 100 μ l standardu pro přímý nástřik (30 mmol/L), 100 μ l roztoku mravenčanu amonného (100 mmol/L) a 100 μ l acetonitrilu na výslednou koncentraci standardu 0,1 mmol/L.
- Směs standardů č. 1: Do vialky bylo odváženo 5,66 mg standardu 10:0//18:0_18:0 ($M_r = 706,68$), 5,21 mg standardu 10:0//16:0_16:0 ($M_r = 650,62$), 6,29 mg standardu 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9) ($M_r = 786,75$) a 5,62 mg standardu 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9) ($M_r = 702,65$) a rozpuštěno v 1,0 ml chloroformu. Takto připravená směs měla koncentraci každého standardu 8 mmol/L. Směs byla naředěna chloroformem na koncentraci standardů 0,08 mmol/L. Směs standardů byla uchovávána ve skleněné vialce utěsněné parafilmem v lednici při teplotě 4 °C.
- Směs standardů č. 2: Do vialky bylo odváženo 5,66 mg standardu 10:0//18:0_18:0, 5,21 mg standardu 10:0//16:0_16:0, 6,29 mg standardu 16:0//18:1(n-9)_18:1 a po 5,62 mg standardů 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9), 10:0//18:1(n-7t)_18:1(n-7t) a 10:0//18:1(n-12)_18:1(n-12) a rozpuštěno v 1,0 ml chloroformu. Takto připravená směs byla naředěna chloroformem na koncentraci standardů 0,08 mmol/L. Směs standardů byla uchovávána ve skleněné vialce utěsněné parafilmem v lednici při teplotě 4 °C
- Směs standardů č. 3: Do vialky bylo odváženo po 5,62 mg standardů 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9), 10:0//18:1(n-7t)_18:1(n-7t), 10:0//18:1(n-12)_18:1(n-12)

a rozpuštěno v 1,0 ml chloroformu. Takto připravená směs byla naředěna chloroformem na koncentraci standardů 0,08 mmol/L. Směs standardů byla uchovávána ve skleněné vialce utěsněné parafilmem v lednici při teplotě 4°C.

3. 2. 2. 4 Chromatografická separační metoda pro diestery 1,2-diolů

Dvě Nova-Pak C18 (4 μm, 3,9 x 300 + 150 mm, Waters) kolony spojené peekovou kapilárou byly umístěny do termostatu nastaveného na 30 °C.

Kapilára pro postkolonovou úpravu mobilní fáze byla připojena pomocí T-kusu za kolonu a průtok mravenčanu (50 mmol/L) byl nastaven na 9 μl/min. Mravenčan byl dávkován pomocí vysokotlakého čerpadla (Dionex Ultimate 3000).

Vzorek, byl umístěn do automatického dávkovače ve vialce s víčkem, ze kterého bylo odstraněno septum, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku látkami obsaženými v septu.

Po ustálení teploty APCI zdroje a kapiláry detektoru bylo nadávkováno 10 μl vzorku na kolonu. Počáteční složení mobilní fáze bylo 70 % acetonitrilu a 30 % ethylacetátu. Gradient separační metody byl 0,5 % ethylacetátu/min při průtoku 0,70 ml/min do 100 % ethylacetátu (t = 140 min).

3. 2. 2. 5 Nastavení hmotnostního detektoru

Parametry APCI zdroje a vnitřní optiky byly nastaveny automatickým laděním přístroje na amonný adukt standardu s využitím standardu s přidavkem amonných iontů pro přímý nástřik (viz kap. 3. 2. 2. 3). Standard byl přidáván pomocí mikrodávkače rychlostí 10 μl/min. Mobilní fáze se při ladění přístroje skládala z 80 % ethylacetátu a 20 % acetonitrilu, při průtoku 700 μl/min. Teplota odpařování a teplota vyhřívání kapiláry byla nastavena manuálním laděním na stejný standard ve stejné mobilní fázi. Optimální teplota odpařování bylo 270 °C a optimální teplota kapiláry byla 170°C. Proud pro koronový výboj byl nastaven na 7 μA. Dusík sloužil jako zmlžovací (sheat) plyn (průtok 32 arbitrárních jednotek) i pomocný (auxiliary) plyn (průtok 17 arbitrárních jednotek).

Detekční metoda obsahovala osm skenovacích událostí (scan events). První byl sken spektra od 400 do 1500 *m/z*. Druhou byl sken MS² spektra nejintenzivnějšího iontu ze seznamu prekurzorových iontů (amonné adukty diesterů 1,2 diolů) s normalizovanou kolizní energií 28 – 30 % (podrobněji viz Tab. 1).

Tabulka 1: Normalizovaná kolizní energie pro MS² fragmentaci v závislosti na *m/z*.

<i>m/z</i>	Normalizovaná kolizní energie [%]
700 - 800	28
801 – 900	29
901 - 1000	30

K fragmentaci byla použita metoda kolizně indukované disociace (CID). Třetí až osmou skenovací událostí byl sken MS³ (opět CID fragmentace) spektra prvního až šestého nejintenzivnějšího fragmentu zjištěného ve druhé skenovací události. Byla použita normalizovaná kolizní energie 32 %. Spektra byla měřena na iontové pasti. Toto měření bylo provedeno celkem šestkrát, přičemž v MS² spektru byl postupně fragmentován 1. - 6. nejintenzivnější iont ze seznamu prekurzorových iontů.

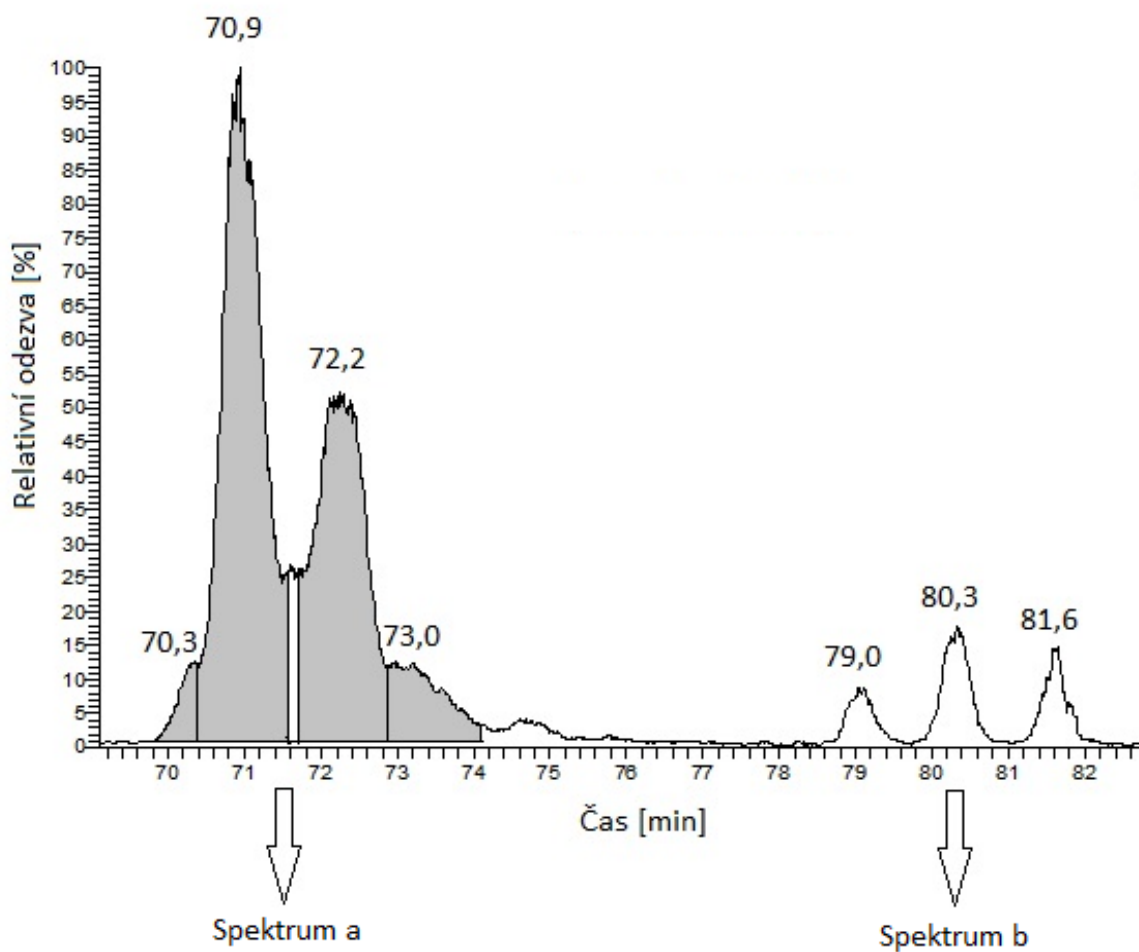
Seznam prekurzorových iontů byl vytvořen pro ionty [M+NH₄]⁺ všech teoreticky možných diesterů 1,2-diolů s počtem uhlíků 49 – 65 a počtem dvojných vazeb 0 – 4.

Pro určení poloh dvojných vazeb obsahovala metoda dvě skenovací události. V první bylo změřeno spektrum pro *m/z* 400 – 1500, ve druhé události bylo změřeno spektrum MS² (CID) partnerských iontů s hmotou vyšší o 37 Da než prekurzorové amonné adukty nenasycených diesterů 1,2-diolů nalezených ve vzorku při předchozím měření. Jednalo se o adukty nenasycených diesterů 1,2-diolů s acetonitrilem ([M + 55]⁺), které jsou využívány právě pro určování poloh dvojných vazeb.

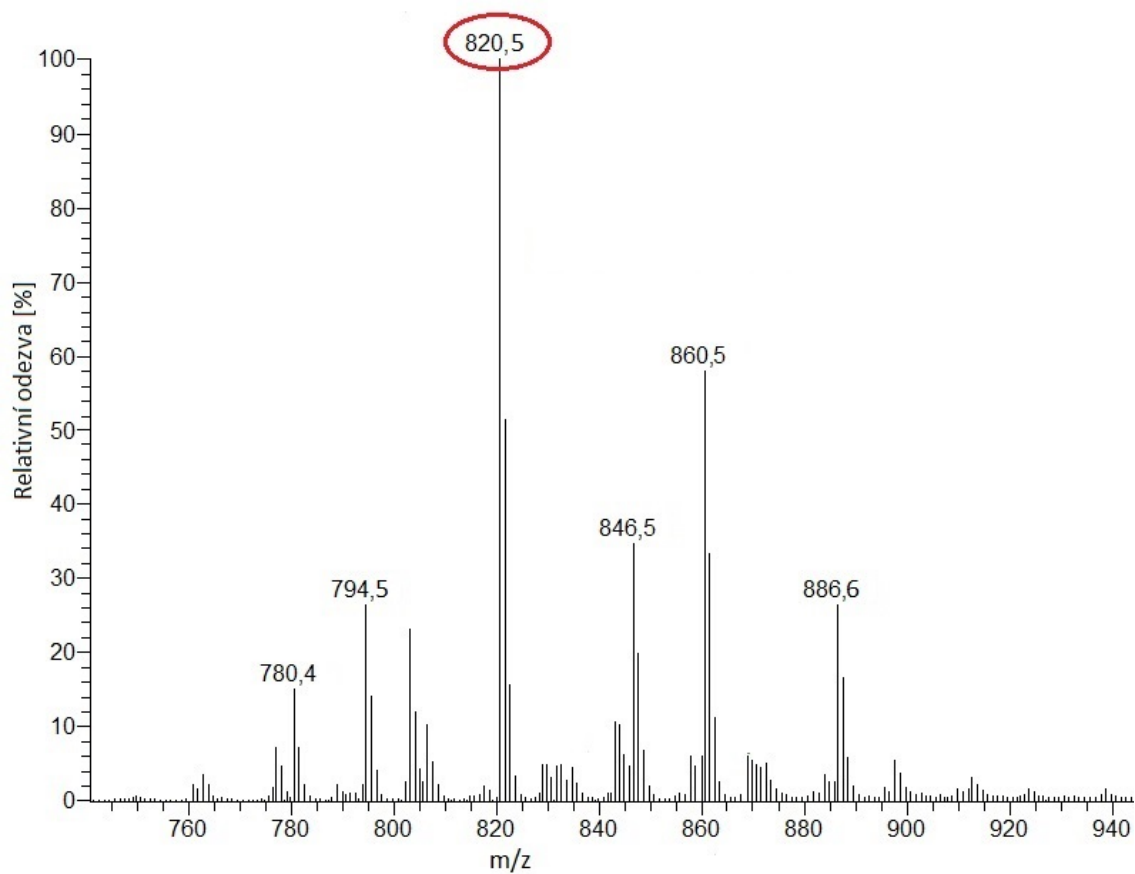
Byla použita normalizovaná kolizní energie 29 %. Spektra byla měřena na iontové pasti.

3. 2. 2. 6 Vyhodnocování dat

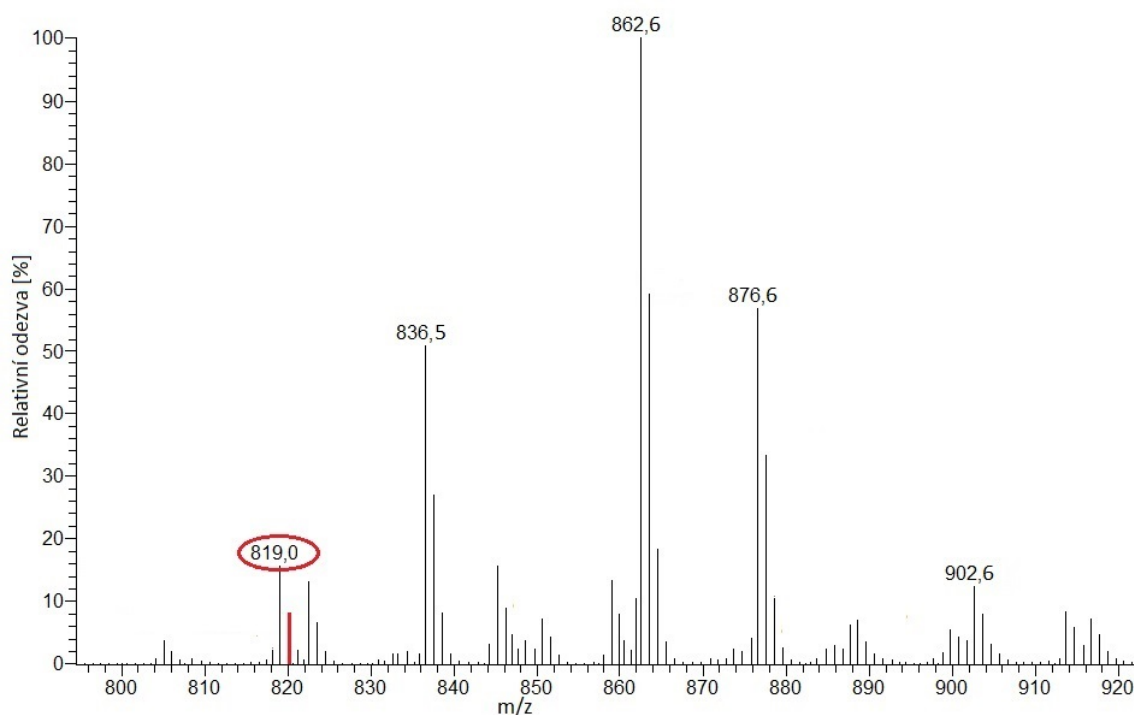
V prvním kroku byl v záznamu MS celého spektra postupně pro každou hodnotu *m/z* odpovídající amonnému aduktu diesteru 1,2-diolu o celkovém počtu uhlíků 49 – 65 a počtu dvojných vazeb 0 – 4 vytvořen rekonstruovaný chromatogram. V základním MS spektru bylo podle hodnoty *m/z* zkontrolováno, zda se nejedná o izotopické píky (Obr. 1, 2a a 2b). Izotopické píky byly pro další zkoumání vyloučeny, pro píky odpovídající dané hodnotě *m/z* byla zaznamenána plocha s příslušným retenčním časem.



Obrázek 1: Rekonstruovaný chromatogram pro iont o m/z 820,5 (amonný adukt diesteru 1,2-diolu s celkovým počtem uhlíků 53 a jednou dvojnou vazbou) a ukázka vyloučení píků, které odpovídají izotopickým píkům (retenční čas 79,0, 80,3 a 81,6 minuty), tj. diesteru diolu s jinou hodnotou m/z , měřeno na iontové pasti, separováno v gradientu acetonitril – ethylacetát, vyhlazený záznam, zpracováno v programu Xcalibur (Qual Browser).

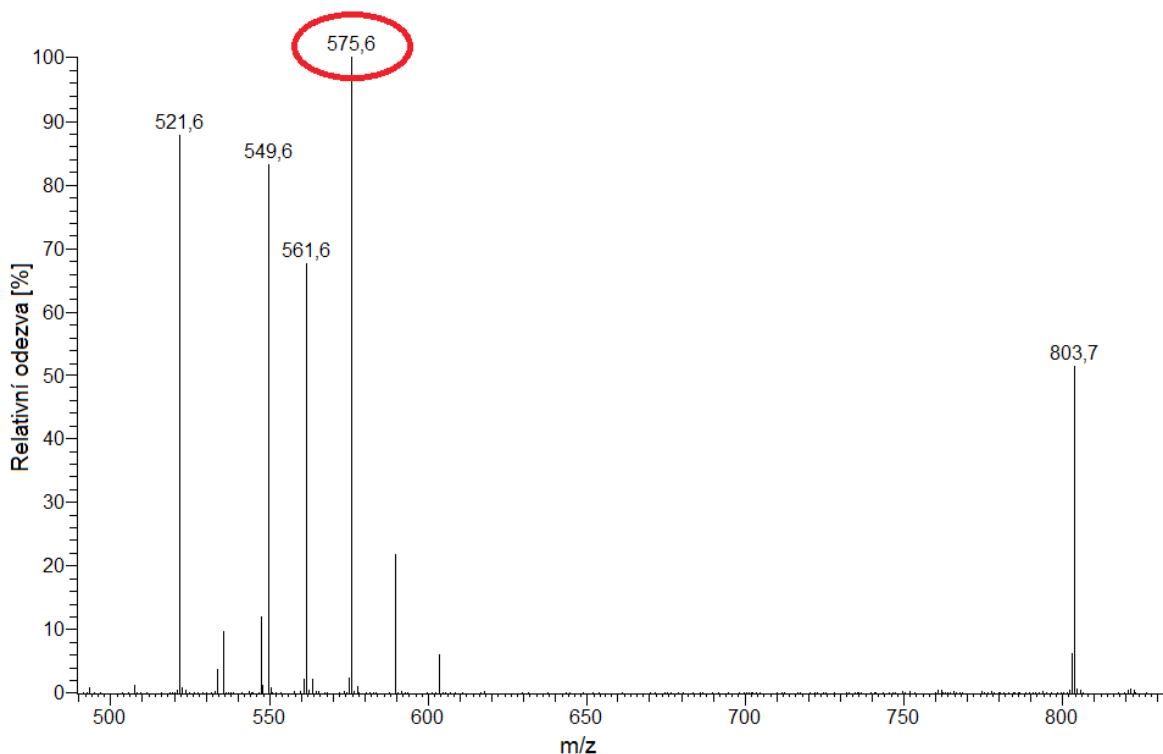


Obrázek 2a: Spektrum v píku chromatogramu rekonstruovaného pro m/z 820,5 (retenční čas 70,9 minuty). Hodnota m/z 820,5 odpovídá $[M+NH_4]^+$ a odpovídající chromatografický pík byl proto zahrnut do integrace. Měřeno na iontové pasti, separováno v gradientu acetonitril – ethylacetát, program Xcalibur (Qual Browser).



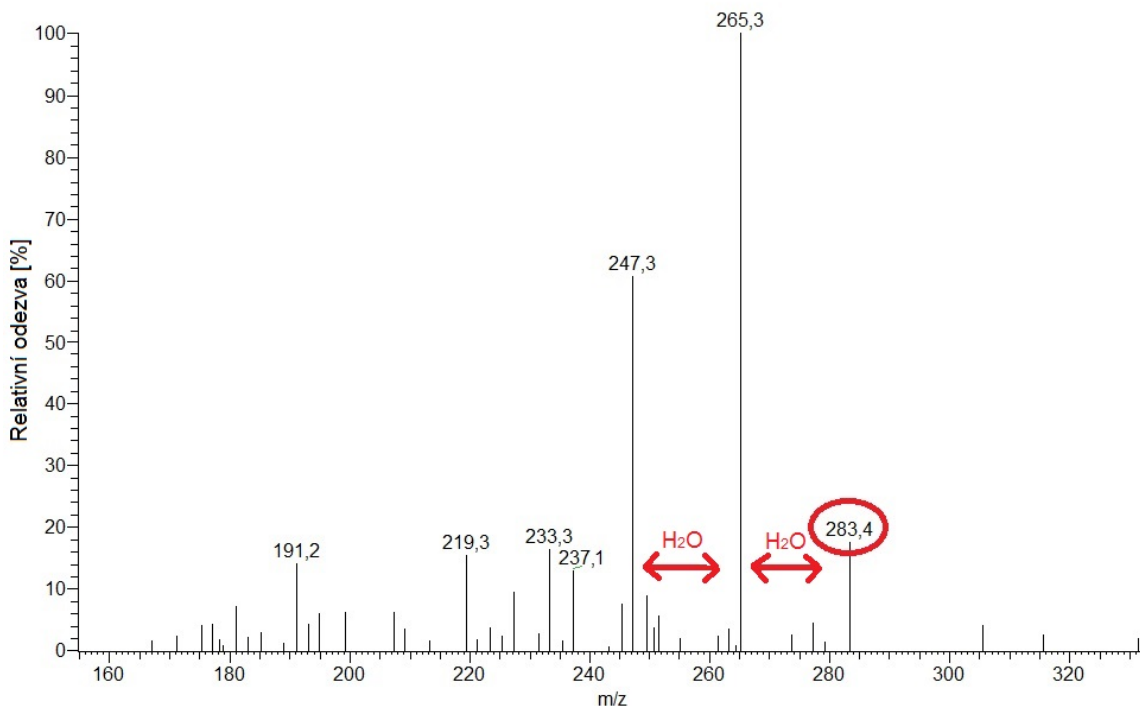
Obrázek 2b: Spektrum v píku chromatogramu rekonstruovaného pro m/z 820,5 (retenční čas 80,3 minuty). Ionť o m/z 820,5 je zde izotopem ionťu o m/z 819,0, který neodpovídá $[M+NH_4]^+$ a odpovídající chromatografický pík nebyl proto zahrnut do integrace, měřeno na ionťové pasti, separováno v gradientu acetonitril – ethylacetát, program Xcalibur (Qual Browser).

Druhým krokem vyhodnocování dat bylo nalezení neutrálních ztrát mastných kyselin v MS^2 spektrech (s ohledem na možný počet dvojných vazeb) dle tabulky A v Příloze A. Například m/z 575,6 v MS^2 (Obr. 3) spektru prekurzorového ionťu 820,5 (amonný adukt diesteru 1,2-diolu) odpovídá ztrátě 14:0 mastné kyseliny. Víme tedy, že tento jednu nenasycený diester diolu o celkovém počtu uhlíků 53 se skládá ze 14:0 mastné kyseliny a zatím neurčené mastné kyseliny a diolu se zatím nelokalizovanou jednou dvojnou vazbou. Nalezené mastné kyseliny byly zaznamenány zvlášť pro každý retenčně oddělený pík příslušné m/z . Zároveň byla ke každé takové kyselině zapsána i hmota viditelná v MS^2 spektru. Podle té pak byla prohledávána MS^3 spektra. Data byla vyhodnocena a zkompletována ze všech šesti měření.



Obrázek 3: MS² spektrum prekurzorového amonného aduktu diesteru 1,2-diolu o m/z 820,5 v retenčním čase 70,9 minuty. Vyznačený iont odpovídá neutrální ztrátě 14:0 mastné kyseliny. Měřeno na iontové pasti. Separováno v gradientu acetonitril – ethylacetát.

Třetím krokem vyhodnocování bylo nalezení signálů odpovídajících $[M+H]^+$ mastných kyselin a dopočítání délky diolou. Postupně byla otevřena MS³ data pro všechny MS² fragmenty odpovídající ztrátě relevantní mastné kyseliny. Z m/z hodnot byly vybrány ty, které odpovídaly $[M+H]^+$ mastné kyseliny s možným počtem dvojných vazeb (opět za pomoci tabulky A v příloze A). Z rozdílu prekurzorové m/z z MS² spektra a m/z z MS³ spektra byla vypočtena hodnota odpovídající neutrální ztrátě alkoholu. Ten byl určen pomocí tabulky B v Příloze B. Například m/z 283,4 v MS³ spektru 820,5 \rightarrow 575,6 (Obr. 4) odpovídá $[M+H]^+$ 18:1 mastné kyseliny. Nyní víme, že daný jednou nenasycený diester 1,2-diolu o celkovém počtu uhlíků 53 a jednou 14:0 mastnou kyselinou, obsahuje i 18:1 mastnou kyselinou. Diol v tomto diesteru 1,2-diolu tedy musí být nasycený a o délce 21 uhlíků ($53 - [14 + 18]$).



Obrázek 4: MS³ spektrum 820,5 → 575,6 v retenčním čase 70,9 minuty. Vyznačený iont odpovídá [M+H]⁺ 18:1 mastné kyseliny. Měřeno na iontové pasti. Separováno v gradientu acetonitril – ethylacetát.

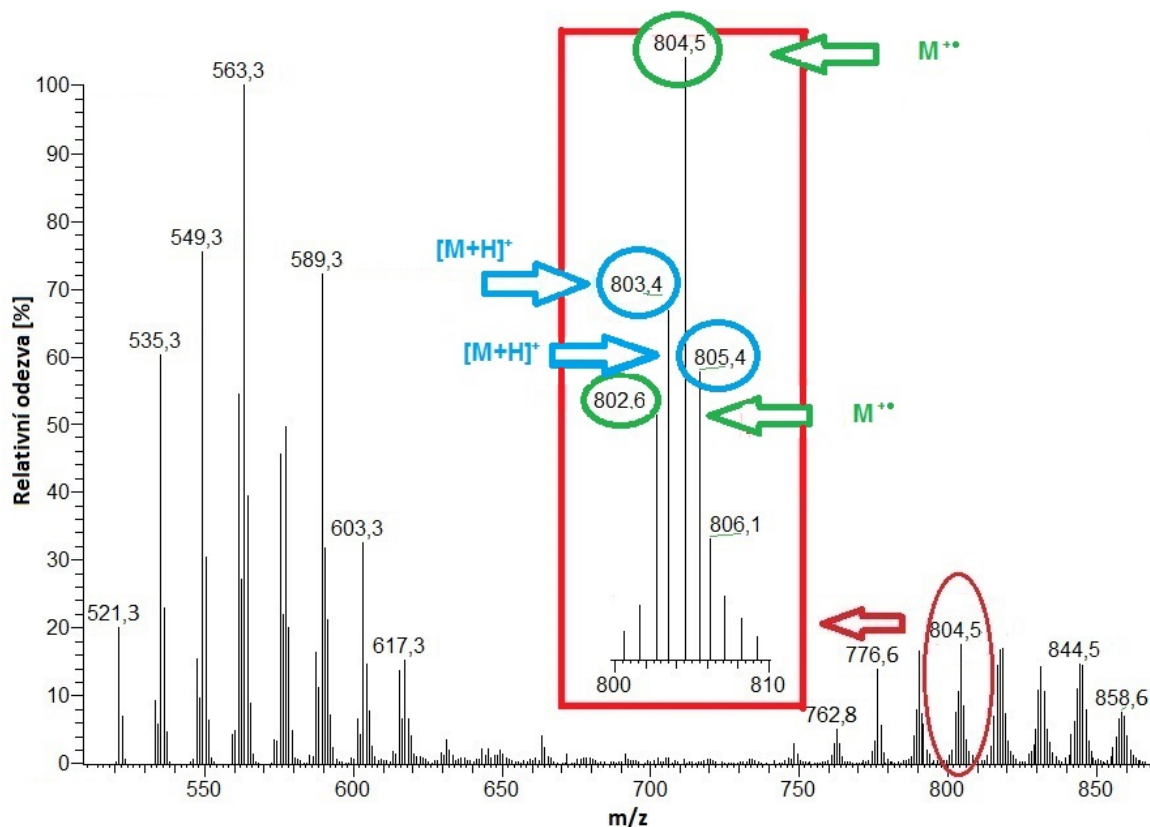
Tímto způsobem byla vyhodnocena data pro všechny píky ve všech retenčních časech všech m/z odpovídajících diesterům 1,2-diolů, pro které byla data alespoň v jednom ze šesti provedených měření. Ze skenu spektra m/z 400 – 1500 byl určen počet uhlíků a dvojných vazeb daného diesteru 1,2-diolu, z MS² spekter byla dopočtena délka a počet dvojných vazeb první odpadající mastné kyseliny a z MS³ spektra byla určena délka druhé mastné kyseliny a počet jejích dvojných vazeb. Délka alkoholu a počet jeho vazeb byly určeny z rozdílu celkového počtu uhlíků a dvojných vazeb daného diesteru 1,2-diolu a dvou nalezených mastných kyselin.

4 Výsledky a diskuze

Separační metodu bylo třeba optimalizovat tak, aby bylo co nejméně koelucí a tím byla interpretace co nejsnazší. Z tohoto důvodu bylo třeba, aby byly píky dostatečně rozdělené a zároveň měly dostatečnou šířku pro potřebný počet fragmentačních skenů. Převážná část optimalizace separace musela probíhat přímo na vzorku, neboť nebyly dostupné komerční standardy. Standardy, které byly syntetizovány na pracovišti měly hodnoty m/z okolo spodní hranice rozsahu hodnot m/z analytů, protože nebyly komerčně dostupné dioly s dostatečně dlouhými řetězci.

4. 1 Optimalizace separační metody na přístroji LCQ Fleet

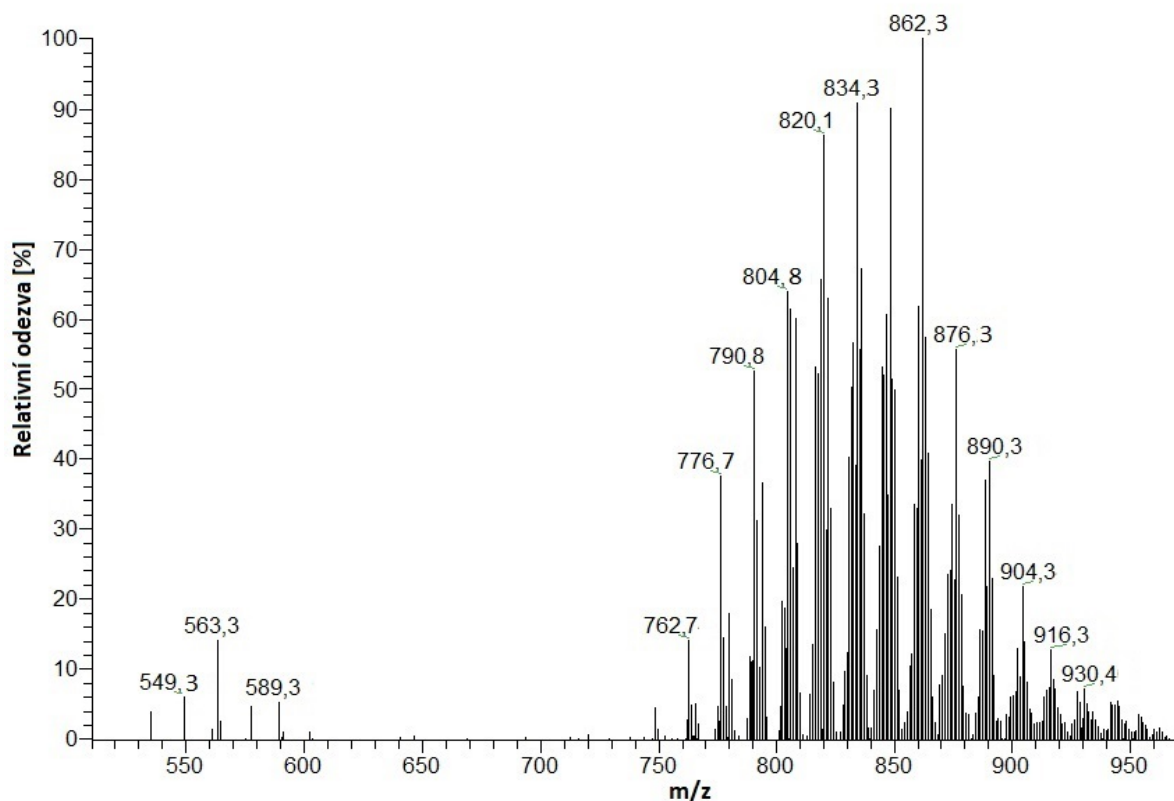
V počáteční fázi optimalizace byla zvolena C18 Nova-Pak kolona, která vykazuje dobré výsledky v separaci nepolárních lipidů a na níž již byla prováděna separace jiných lipidových frakcí vernixu⁴². Výběr stacionární fáze tedy nebyl předmětem optimalizace. První měření byla prováděna na koloně o délce 30 cm a na přístroji LCQ Fleet vybaveném zdrojem pro APCI a 3D iontovou pastí. MS metoda byla automaticky naladěna na standard pro přímý nástřik. Jako první mobilní fáze byly zkoušeny různé gradienty acetonitrilu s 2-propanolem, ethylacetátem a toluenem. Při měření bylo zjištěno, že diestery 1,2-diolů poměrně snadno fragmentují, čímž se snižuje jejich odezva. Dále bylo zjištěno, že tvoří pravděpodobně radikál kationty (objevovaly se sudé hodnoty m/z , očekávány byly liché hodnoty m/z $[M+H]^+$) a spektra tím byla značně složitá, což komplikovalo interpretaci dat (Obr. 5).



Obrázek 5: Ukázka spektra vzorku v chromatografickém píku v retenčním čase 52,04 minuty. Ionty o m/z 500 - 650 jsou fragmenty diesterů 1,2-diolů (m/z 750 - 900), ve výřezu ukázka složitosti spektra pro jeden spektrální pik a tvorby radikál kationtů, separace v gradientu acetonitril – 2-propanol, měřeno na iontové pasti, Xcalibur (Qual Browser).

4. 1. 1 Řešení fragmentací ve zdroji a výskytu radikál kationtů ve spektru

Nejprve jsme se problémy s fragmentacemi ve zdroji a výskytem radikál kationtů ve spektru pokusili odstranit změnou mobilní fáze A na methanol. Tato změna sice potlačila fragmentaci, ale ve spektru se stále vyskytovaly radikál kationty. Jejich tvorba byla potlačena (Obr. 6) až postkolonovým přidavkem 100 mmol/L roztoku mravenčanu amonného, se kterým tvoří diestery 1,2-diolů amonné adukty $[M+NH_4]^+$. MS metoda byla automatických laděním vyladěna na standard s přidavkem amonných iontů pro přímý nástřik.



Obrázek 6: Spektrum po přidavku amonných iontů do mobilní fáze, tvorba amonných aduktů (m/z 750 – 950) a potlačení fragmentace (m/z 500 - 600), separace v gradientu acetonitril – 2-propanol, měřeno na iontové pasti, Xcalibur (Qual Browser).

4. 1. 2 Porovnání různých mobilních fází

Separační schopnosti zkoušených mobilních fází byly porovnány na stejné měřicí metodě (Tab. 2).

Tabulka 2: Gradient měřicí metody pro porovnání separačních vlastností jednotlivých mobilních fází (acetonitril + 2-propanol, acetonitril + toluen, acetonitril + ethylacetát, methanol + 2-propanol).

Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μl/min]
0	100	0	750
80	0	100	200

^a Acetonitril nebo methanol

^b 2-propanol, toluen nebo ethylacetát

Acetonitril v kombinaci s toluenem a ethylacetátem se projevil 5x až 10x nižšími

odezvami a asi o 10 minut kratším retenčním časem analytů, než kombinace methanolu a acetonitrilu s 2-propanolem. Gradienty mobilní fáze s 2-propanolem vykazovaly vizuálně lepší separaci (příloha C) a silnější potlačení spontánní fragmentace. Gradient acetonitril-toluen byl pro další měření vyloučen z důvodu nejnižších odezev a vizuálně nejhorší separace ze zkoušených mobilních fází.

S ohledem na složitost spekter byla separační kolona prodloužena a další měření probíhala na přístroji s vyšším rozlišením MS spekter.

4. 2 Optimalizace separační metody na přístroji LTQ Orbitrap

Za původní kolonu byla ještě připojena další kolona o délce 15 cm. MS metoda byla opět vyladěna na standard s přidavkem amonných iontů pro přímý nástřik. Vzorek byl kontaminován látkami, které se uvolnily z materiálu septa při předchozím nástřiku. Pro každý další nástřik vzorku bylo proto použito víčko bez septema.

Gradient byl upraven (Tab. 3) s ohledem na delší separační prostředí. Všechny zkoumané kombinace mobilních fází byly měřeny ve třech opakování s vysokým rozlišením na orbitální pasti (Příloha D).

Tabulka 3: Gradient pro porovnání separačních schopností mobilních fází acetonitril-ethylacetát, acetonitril – 2-propanol, methanol – 2-propanol na delším separačním prostředí.

Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μl/min]
0	100	0	750
20	50	50	750
40	0	100	250
120	0	100	200

^a acetonitril nebo methanol

^b 2-propanol nebo ethylacetát

Vizuálně lepší rozlišení píků a 5x vyšší odezvy byly pozorovány u mobilních fází s 2-propanolem (příloha B). Bylo spočteno rozlišení pro 10 vybraných m/z (tab 4). A to jednak rozlišení sousedních píků o stejné m/z (Vzorec 1a, každá m/z byla rozdistributedna do minimálně dvou píků), jednak sousedních píků o rozdílné m/z (Vzorec 1b).

$$R_{1/2} = \frac{2 \times (t_{r2} - t_{r1})}{1,7 \times (w_1 + w_2)} \quad \text{Vzorec 1a}$$

$$R_{a/b} = \frac{2 \times (t_{r1,b} - t_{r1,a})}{1,7 \times (w_{1,a} + w_{1,b})} \quad \text{Vzorec 1b}$$

Kde $R_{1/2}$ je rozlišení sousedních píků stejné hodnoty m/z , t_{r1} je retenční čas prvního píku, t_{r2} je retenční čas druhého píku, w_1 je šířka prvního píku v polovině výšky, w_2 je šířka druhého píku v polovině výšky, $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků různých hodnot m/z , $t_{r1,a}$ je retenční čas prvního píku retenčně dřívější hodnoty m/z , $t_{r1,b}$ je retenční čas prvního píku retenčně pozdější hodnoty m/z , $w_{1,a}$ je šířka prvního píku retenčně dřívější hodnoty m/z v polovině výšky a $w_{1,b}$ je šířka prvního píku retenčně pozdější hodnoty m/z v polovině výšky.

Tabulka 4: Rozlišení jednotlivých píků pro gradient a mobilní fáze uvedené v Tab 3.

Kde t_{r1} je retenční čas prvního píku o dané hodnotě m/z , t_{r2} je retenční čas druhého píku o dané hodnotě m/z , w_1 je šířka v polovině výšky prvního píku dané hodnoty m/z , w_2 je šířka v polovině výšky druhého píku o dané hodnotě m/z , $R_{1/2}$ je rozlišení sousedních píků stejné hodnoty m/z , $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků o různé hodnotě m/z , retenční rozsah analytů je čas mezi prvním píkem nejnižší zkoumané m/z a druhým píkem nejvyšší zkoumané m/z , žlutě vyznačená pole ukazují změnu elučního pořadí.

Acetonitril + ethylacetát						
Retenční rozsah analytů 3,64 minuty						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	48,24	48,68	0,24	0,24	1,087	-
794,4	48,92	49,37	0,24	0,26	1,059	1,680
834,4	49,21	49,64	0,24	0,36	0,850	0,716
808,4	49,54	49,97	0,24	0,21	1,118	0,815
848,4	49,86	50,16	0,33	0,36	0,511	0,659
822,4	50,21	50,57	0,21	0,19	1,046	0,752
862,4	50,37	50,72	0,21	0,26	0,865	0,439
876,4	50,92	51,34	0,26	0,19	1,092	1,359
890,4	51,40	51,88	0,38	0,14	1,078	0,878
904,3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-

Tabulka pokračuje na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

Acetonitril + isopropanol						
Retenční rozsah analytů 10,49 minuty						
<i>m/z</i>	<i>t_{r1}</i> [min]	<i>t_{r2}</i> [min]	<i>w₁</i> [min]	<i>w₂</i> [min]	<i>R_{1/2}</i>	<i>R_{a/b}</i>
780,3	53,43	54,22	0,38	0,36	1,259	-
794,4	54,65	55,41	0,33	0,48	1,104	2,009
834,4	55,79	56,71	0,38	0,60	1,109	1,878
808,4	55,87	56,80	0,48	0,38	1,276	0,110
848,4	56,98	58,06	0,48	0,52	1,271	1,371
822,4	57,22	58,15	0,71	0,36	1,021	0,237
862,4	58,40	59,27	0,57	0,48	0,977	1,080
876,4	59,78	60,72	0,60	0,60	0,929	1,392
890,4	61,18	62,27	0,60	0,57	1,099	1,384
904,3	62,70	63,92	0,74	0,83	0,913	1,341
Methanol + isopropanol						
Retenční rozsah analytů 11,55 minuty						
<i>m/z</i>	<i>t_{r1}</i> [min]	<i>t_{r2}</i> [min]	<i>w₁</i> [min]	<i>w₂</i> [min]	<i>R_{1/2}</i>	<i>R_{a/b}</i>
780,3	51,30	52,27	0,40	0,36	1,498	-
794,4	52,69	53,58	0,38	0,45	1,256	2,081
808,4	54,04	55,03	0,48	0,43	1,287	1,853
834,4	54,37	55,38	0,50	0,52	1,161	0,398
822,4	55,41	56,40	0,48	0,48	1,223	1,253
848,4	55,70	56,65	0,52	0,48	1,118	0,341
862,4	57,12	58,10	0,60	0,50	1,053	1,493
876,4	58,55	59,70	0,55	0,62	1,160	1,472
890,4	60,08	61,12	0,71	0,67	0,886	1,426
904,3	61,64	62,85	0,71	0,64	1,049	1,285

^a *pík nelze vyhodnotit*

Při této příležitosti bylo zjištěno rozdílné eluční pořadí analytů v gradientovém programu obsahujícím methanol a acetonitril v oblasti *m/z* 808,4 – 848,4. V gradientu acetonitril-ethylacetát a acetonitril – 2-propanol je eluční pořadí analytů: *m/z* 834,4 - 808,4 – 848,4 – 822,4, kdežto v gradientu methanol – 2-propanol je eluční pořadí analytů: *m/z* 808,4 – 834,4 – 822,4 – 848,4. Nejlepší výsledky na základě rozlišení vykazovala kombinace methanolu s 2-propanolem.

Při další optimalizaci gradientu separační metody byl velkou komplikací vysoký tlak na koloně u gradientů s 2-propanolem. Ten povoloval jen nízký průtok mobilní fáze

(200 $\mu\text{l}/\text{min}$) od zastoupení 2-propanolu v mobilní fázi $> 60 \%$. Z tohoto důvodu byl pro další měření vyzkoušen aceton, který průtok neomezoval. Při měření směsi standardů 2 v čistém acetonu bylo zjištěno, že diestery 1,2-diolů tvoří v prostředí acetonu amonné adukty méně ochotně a opět se objevil problém s vysokou fragmentací ve zdroji. Rovněž docházelo k tvorbě dimerů standardů a aduktů diesterů 1,2-diolů s acetonem $[\text{M}+58]^+$.

Při dalším měření byl opět použit ethylacetát, i když vykazoval poněkud nižší odezvy analytů a horší separační účinky v porovnání s 2-propanolem. Jeho výhodou však bylo, že umožňoval vyšší průtoky mobilní fáze.

4. 2. 1 Porovnání různých gradientů mobilní fáze acetonitril – ethylacetát na vzorku

Byla vyzkoušena nová metoda pro autosampler, kde bylo vynecháno následné vyplachování nástřikové smyčky po nadávkování vzorku na kolonu. Touto změnou došlo k částečnému potlačení chvostování píků. Poté byl změřen vzorek (Příloha E), a to ve čtyřech různých gradientech (Tab. 5). Pro každé měření byla opět spočtena rozlišení píků. (Tab. 6)

Tabulka 5: Vyzkoušené gradienty pro mobilní fázi acetonitril – ethylacetát.

Měření	Čas trvání gradientu z 0 % do 100 % ethylacetátu [min]
1	40
2	50
3	60
4	70

Tabulka 6: Rozlišení pro různé gradienty mobilní fáze acetonitril – ethylacetát.

Kde t_{r1} je retenční čas prvního píku o dané hodnotě m/z , t_{r2} je retenční čas druhého píku o dané hodnotě m/z , w_1 je šířka v polovině výšky prvního píku dané hodnoty m/z , w_2 je šířka v polovině výšky druhého píku o dané hodnotě m/z , $R_{1/2}$ je rozlišení sousedních píků stejné hodnoty m/z , $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků o různé hodnotě m/z .

Gradient 40 minut						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	37,21	37,42	0,12	0,12	1,038	-
794,4	37,64	37,89	0,14	0,12	1,123	1,932
834,4	37,82	38,04	0,17	0,19	0,725	0,684
808,4	38,05	38,29	0,12	0,14	1,078	0,947
848,4	38,20	38,44	0,14	0,19	0,847	0,674
822,4	38,44	38,67	0,14	0,12	1,033	0,988
862,4	38,60	38,81	0,21	0,17	0,649	0,527
876,4	38,91	39,17	0,19	0,19	0,803	0,901
890,4	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
904,3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
Gradient 50 minut						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	43,93	44,25	0,12	0,12	1,581	-
794,4	44,48	44,79	0,12	0,14	1,393	2,718
834,4	44,74	45,05	0,19	0,17	1,021	0,988
808,4	45,01	45,36	0,12	0,12	1,729	1,026
848,4	45,29	45,55	0,24	0,24	0,642	0,922
822,4	45,53	45,82	0,14	0,14	1,194	0,741
862,4	45,71	46,03	0,17	0,21	0,988	0,684
876,4	46,20	46,50	0,21	0,21	0,824	1,513
890,4	46,65	46,90	0,24	0,19	0,686	1,170
904,3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
Gradient 60 minut						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	50,36	50,74	0,17	0,17	1,341	-
794,4	51,05	51,45	0,17	0,17	1,412	2,435
834,4	51,41	51,77	0,24	0,29	0,809	1,046
808,4	51,69	52,09	0,14	0,17	1,520	0,865
848,4	52,02	52,40	0,24	0,26	0,894	1,019
822,4	52,33	52,71	0,17	0,17	1,341	0,901
862,4	52,62	53,03	0,24	0,21	1,066	0,843

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

Gradient 60 minut						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
876,4	53,17	53,57	0,24	0,24	0,988	1,359
890,4	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
904,3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
Gradient 70 minut						
m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	56,71	57,14	0,19	0,17	1,416	-
794,4	57,52	57,96	0,17	0,17	1,553	2,668
834,4	57,94	58,37	0,26	0,29	0,924	1,153
808,4	58,32	58,74	0,19	0,19	1,297	0,988
848,4	58,70	59,12	0,29	0,29	0,865	0,939
822,4	59,08	59,48	0,24	0,17	1,163	0,853
862,4	59,42	59,84	0,29	0,29	0,865	0,764
876,4	60,10	60,55	0,29	0,26	0,967	1,400
890,4	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
904,3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-

^a pík nelze vyhodnotit

Rozlišení pro gradienty 50, 60 a 70 minut se výrazně nelišily, rozlišení pro gradient 40 minut byla v průměru nižší. Průměrné $R_{1/2}$ pro gradient 50 minut bylo 1,172, pro gradient 60 minut 1,171 a pro gradient 70 minut 1,131. Průměrné $R_{a/b}$ pro gradient 50 minut bylo 1,228, pro gradient 60 minut 1,210 a pro gradient 70 minut 1,252. Na základě těchto průměrných rozlišení by se gradienty 50, 60 a 70 minut zdály jako přibližně stejně účinné, ale poslední dva vybrané analyty (m/z 890,4 a 904,3) u nich nebylo možno vyhodnotit. U gradientu 50 minut byl první z těchto analytů (m/z 890,4) vyhodnotitelný ale jeho rozlišení nebylo zahrnuto v průměrném rozlišení. Z důvodu, že bylo možno vyhodnotit i zadní analyt se gradient 50 minut (0,5 % ethylacetátu/min) jevil jako nejlepší. Paralelně s tímto měřením probíhala i měření na dosyntetizovaných standardech v mobilních fázích acetonitril – ethylacetát a methynol – ethylacetát s nenulovým podílem ethylacetátu v čase t_0 .

4. 2. 2 Výběr optimální mobilní fáze a optimálního gradientu na směsi standardů

Jehla autosampleru byla nově promývána ve směsi acetonitril:chloroform 1:1 místo čistého acetonitrilu, čímž se potlačilo chvostování piků, které bylo na standardech, na rozdíl od složitějšího vzorku, dobře patrné.

Směs standardů č. 1 byla změřena ve třech různých gradientech (Tab. 7) v mobilních fázích methanol – ethylacetát (Příloha F) a acetonitril – ethylacetát (Příloha G). Podíl ethylacetátu čase t_0 byl 50 %.

Tabulka 7: Gradienty zkoušené na směsi standardů 1 v mobilních fázích methanol-ethylacetát a acetonitril-ethylacetát.

Označení gradientu	Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μ l/min]
Gradient A	0	50	50	700
	50	0	100	700
	140	0	100	700
Označení gradientu	Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μ l/min]
Gradient B	0	50	50	700
	75	0	100	700
	140	0	100	700
Označení gradientu	Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μ l/min]
Gradient C	0	50	50	700
	100	0	100	700
	140	0	100	700

^a acetonitril nebo methanol

^b ethylacetát

Podle spočtených rozlišení (Tab. 8) byl vybrán jako optimální gradient C (0,5 % ethylacetátu/min), což odpovídalo i měření vzorku v gradientu acetonitril – ethylacetát (Tab. 6).

Tabulka 8: Vypočtená rozlišení pro směs standardů 1 ve dvou různých mobilních fázích (acetonitril + ethylacetát, methanol + ethylacetát) a třech různých gradientech (gradient A – 1 % ethylacetátu/min, gradient B – 0,75 %/min, gradient C – 0,5 %/min).

Kde t_r je retenční čas dané hodnoty m/z , w je šířka daného píku v polovině výšky, $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků.

Acetonitril + ethylacetát, gradient A				Methanol + ethylacetát, gradient A			
[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$	[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$
703,7	18,43	0,25	-	703,7	11,66	0,14	-
651,7	19,31	0,25	2,071	651,7	11,96	0,11	1,412
707,7	23,65	0,30	9,283	707,7	14,56	0,20	9,867
787,8	23,82	0,35	0,308	787,8	14,93	0,21	1,062
Acetonitril + ethylacetát, gradient B				Methanol + ethylacetát, gradient B			
[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$	[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$
703,7	20,48	0,30	-	703,7	12,07	0,15	-
651,7	21,58	0,30	2,157	651,7	12,36	0,18	1,034
707,7	27,51	0,25	12,684	707,7	15,38	0,26	8,075
787,8	27,86	0,25		787,8	15,89	0,28	1,111
Acetonitril + ethylacetát, gradient C				Methanol + ethylacetát, gradient C			
[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$	[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$
703,7	21,77	0,30	-	703,7	12,28	0,16	-
651,7	23,05	0,25	2,738	651,7	12,59	0,21	0,986
707,7	30,22	0,20	18,745	707,7	15,84	0,28	7,803
787,8	30,75	0,30	1,247	787,8	16,39	0,29	1,135

Dále byl pro gradient mobilních fází acetonitril – ethylacetát a methanol – ethylacetát vyzkoušen nižší podíl ethylacetátu v čase t_0 (Tab. 9), použitý gradient byl 0,5 % ethylacetátu/min. Měření proběhlo opět na standardech ze směsi standardů č. 1.

Tabulka 9: Gradient s nižším podílem ethylacetátu v čase t_0 .

Čas [min]	Mobilní fáze A ^a [%]	Mobilní fáze B ^b [%]	Průtok mobilní fáze [μl/min]
0	70	30	700
140	0	100	700

^a Acetonitril

^b Ethylacetát

Spočtená rozlišení (Tab. 10) byla porovnána nejen pro obě mobilní fáze, ale i s minulým měřením, kde byl podíl ethylacetátu v čase t_0 50 % (Tab. 9). Měření v gradientu methanolu

mělo sice asi 10x vyšší odezvy, než v gradientu acetonitrilu, ale na základě rozlišení standardů (rekonstruovaný chromatogram – viz Příloha H) byla zvolena mobilní fáze acetonitril – ethylacetát. MS metoda byla opět naladěna na standard s přidavkem amonných iontů v mobilní fázi o složení 80 % ethylacetát + 20 % acetonitril.

Tabulka 10: Rozlišení pro gradient (0,5 %/min) s nižším podílem ethylacetátu (30 %) v čase t_0 .

Kde t_r je retenční čas dané hodnoty m/z , w je šířka daného píku v polovině výšky, $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků.

Acetonitril + ethylacetát				Methanol + ethylacetát			
[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$	[M+H] ⁺	t_r [min]	w [min]	$R_{a/b}$
703,7	47,95	0,37	-	703,7	25,32	0,37 ^a	-
651,7	49,85	0,38	2,980	651,7	25,41		- ^a
707,7	62,15	0,43	17,865	707,7	33,67	0,40	12,620
787,8	63,64	0,32	2,337	787,8	36,70	0,42	4,347

^akoeluce píků

Jako optimální mobilní fáze byla zvolena kombinace acetonitril – ethylacetát, gradient 0,5 % ethylacetátu/min a počátečním podílem ethylacetátu v mobilní fázi 30 %. Vzorek byl na tuto metodu změřen ve vysokém rozlišení na orbitální pasti. Bylo spočteno rozlišení pro vybrané m/z (Tab. 11) a porovnáno s předchozími gradienty acetonitril – ethylacetát zkoušenými na vzorku (Tab. 6).

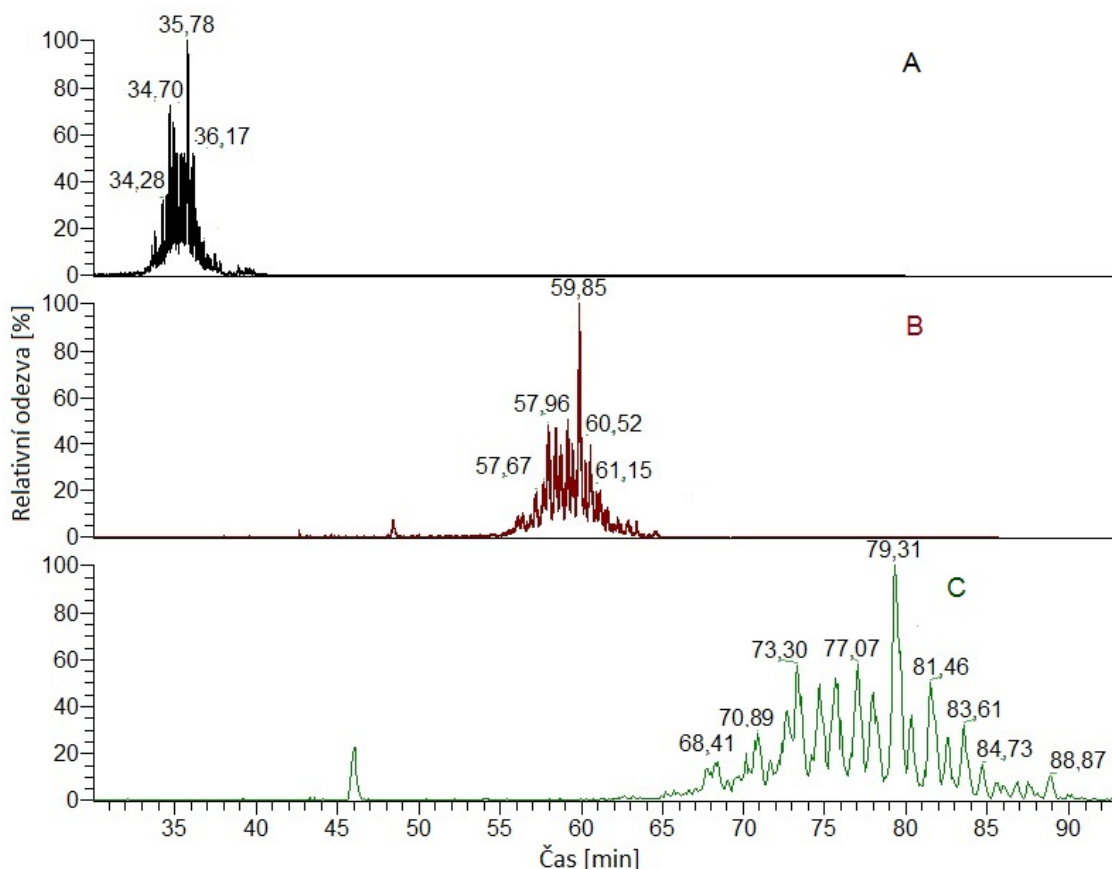
Tabulka 11: Rozlišení vybraných analytů v optimalizované separační metodě. Mobilní fáze acetonitril – ethylacetát, gradient 0,5 % ethylacetátu/min, počáteční podíl ethylacetátu v mobilní fázi 30 %.

Kde t_{r1} je retenční čas prvního píku o dané hodnotě m/z , t_{r2} je retenční čas druhého píku o dané hodnotě m/z , w_1 je šířka v polovině výšky prvního píku dané hodnoty m/z , w_2 je šířka v polovině výšky druhého píku o dané hodnotě m/z , $R_{1/2}$ je rozlišení sousedních píků stejné hodnoty m/z , $R_{a/b}$ je rozlišení sousedních píků o různé hodnotě m/z .

m/z	t_{r1} [min]	t_{r2} [min]	w_1 [min]	w_2 [min]	$R_{1/2}$	$R_{a/b}$
780,3	69,09	70,38	0,60	0,60	1,265	-
794,4	71,67	72,95	0,57	0,57	1,327	2,600
834,4	73,38	74,67	0,72	0,92	0,925	1,562
808,4	74,15	75,53	0,60	0,56	1,400	0,686
848,4	75,78	77,07	0,72	0,76	1,025	1,453
822,4	76,64	77,93	0,64	0,56	1,265	0,744
862,4	78,1	79,48	0,80	0,69	1,093	1,193
876,4	80,34	81,63	0,73	0,67	1,089	1,725
890,4	82,49	83,61	0,90	0,71	0,817	1,551
904,3	84,73	85,51	0,78	0,73	0,608	1,564

Průměrné $R_{1/2}$ je 1,173 a průměrné $R_{a/b}$ je 1,423 (rozlišení pro m/z 890,4 a 904,3 nebyla zahrnuta, aby bylo možné srovnat výsledky s předchozími měřeními). U gradientů 50, 60 a 70 minut se průměrná $R_{1/2}$ pohybovala v rozmezí 1,131 – 1,172 a průměrná $R_{a/b}$ v rozmezí 1,210 – 1,252. Navíc při měření v tomto gradientu jsou vyhodnotitelné i zadní analyty. Gradient 0,5 % ethylacetátu za minutu z počátečního podílu ethylacetátu v mobilní fázi 30 % vykazoval nejlepší hodnoty $R_{1/2}$ i $R_{a/b}$ ze všech testovaných, a proto byl vyhodnocen jako nejvhodnější pro analýzu diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku.

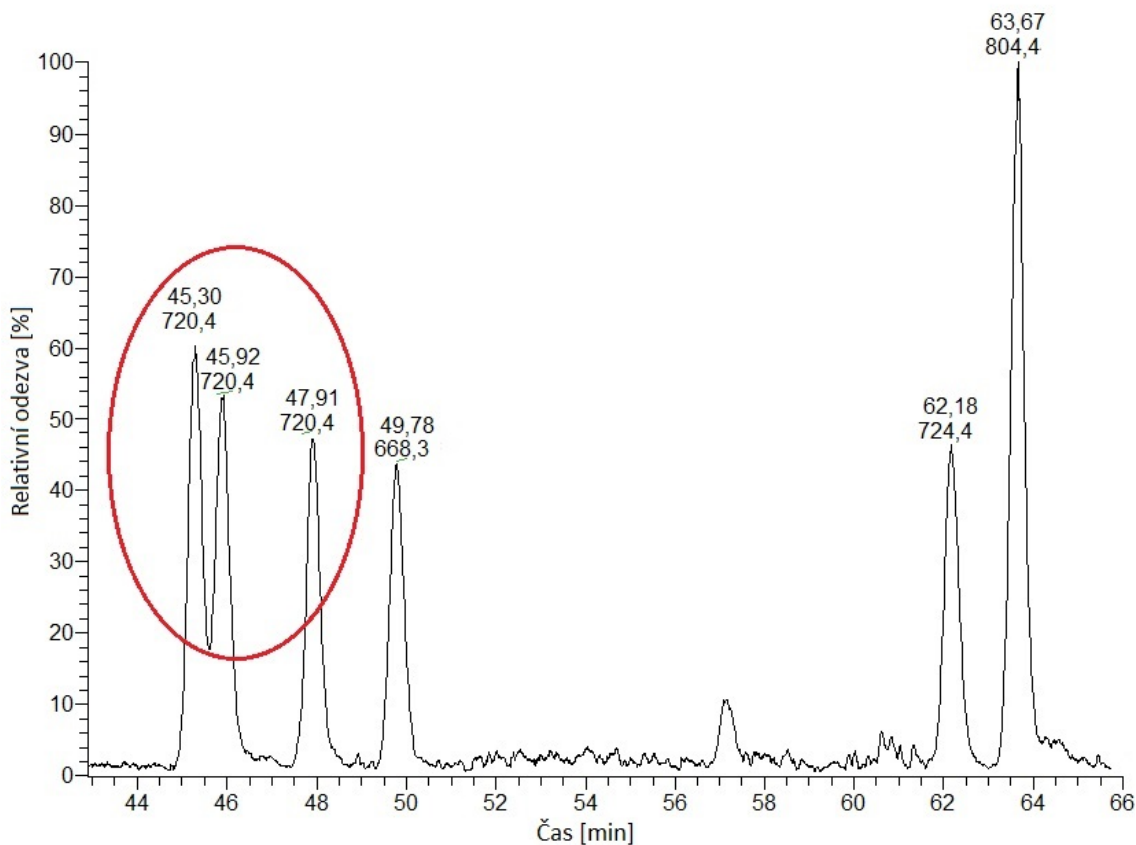
Separace optimalizovanou metodou bylo porovnána se separací ve stejné mobilní fázi na začátku a v průběhu optimalizace (Obr. 7).



Obrázek 7: Porovnání separace vzorku na začátku (A), v průběhu (B) a na konci optimalizace (C), měřeno na iontové pasti (A a B) a orbitální pasti (C, rozlišení 100 000), mobilní fáze acetonitril – ethylacetát, záznam vyhlazen, zobrazen rozsah hodnot m/z 700-1 000, Xcalibur (Qual Browser).

4. 2. 3 Ověření separace na směsi standardů č. 2

Po dosyntetizování standardů, které se liší jen polohou dvojně vazby byla namíchána směs standardů č. 2 a změřena výslednou metodou (gradient acetonitril – ethylacetát, 0,5 % ethylacetátu/min, počáteční podíl ethylacetátu v mobilní fázi 30 %), aby bylo ověřeno, jestli se analyty dělí i na základě polohy dvojně vazby, což se potvrdilo (Obr. 8). Úspěšně se podařilo separovat standardy s polohami dvojně vazby na obou 18:1 mastných kyselinách n-7t, n-9 a n-12 (eluční pořadí). První dva píky mohou být hůře rozdělené z důvodu rozdílného retenčního chování *cis* a *trans* izomerů na C18 Nova-Pak separační koloně⁶⁷.

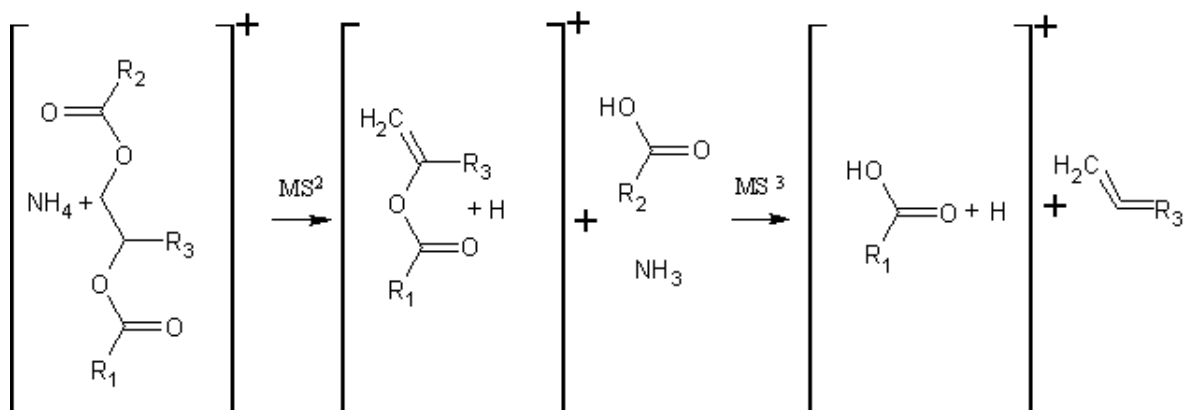


Obrázek 8: Separace směsi standardů 2, označené píky odpovídají standardům, které se liší pouze polohou dvojně vazby, pík v retenčním čase 45,30 minuty odpovídá standardu 10:0//18:1(n-7t)_18:1(n-7t), 45,92 minuty 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9), 47,91 minuty 10:0//18:1(n-12)_18:1(n-12), 49,78 minuty 10:0//16:0_16:0, 62,18 minuty 10:0//18:0_18:0 a pík v retenčním čase 63,67 odpovídá standardu 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9). Separováno optimalizovanou metodou v gradientu acetonitril – ethylacetát, měřeno na iontové pasti, píky vyhlazeny, Xcalibur (Qual browser).

4. 3 Optimalizace MS metody

Spektra byla měřena v pozitivním módu. Diestery 1,2-diolů byly pozorovány jako $[M+NH_4]^+$.

Bylo třeba nastavit fragmentační skeny tak, aby se fragmentovalo co nejvíce koeluujících analytů. Při fragmentaci v MS^2 byla pozorována neutrální ztráta jedné mastné kyseliny. V MS^3 byla pozorována neutrální ztráta alkoholového zbytku (Obr. 9).



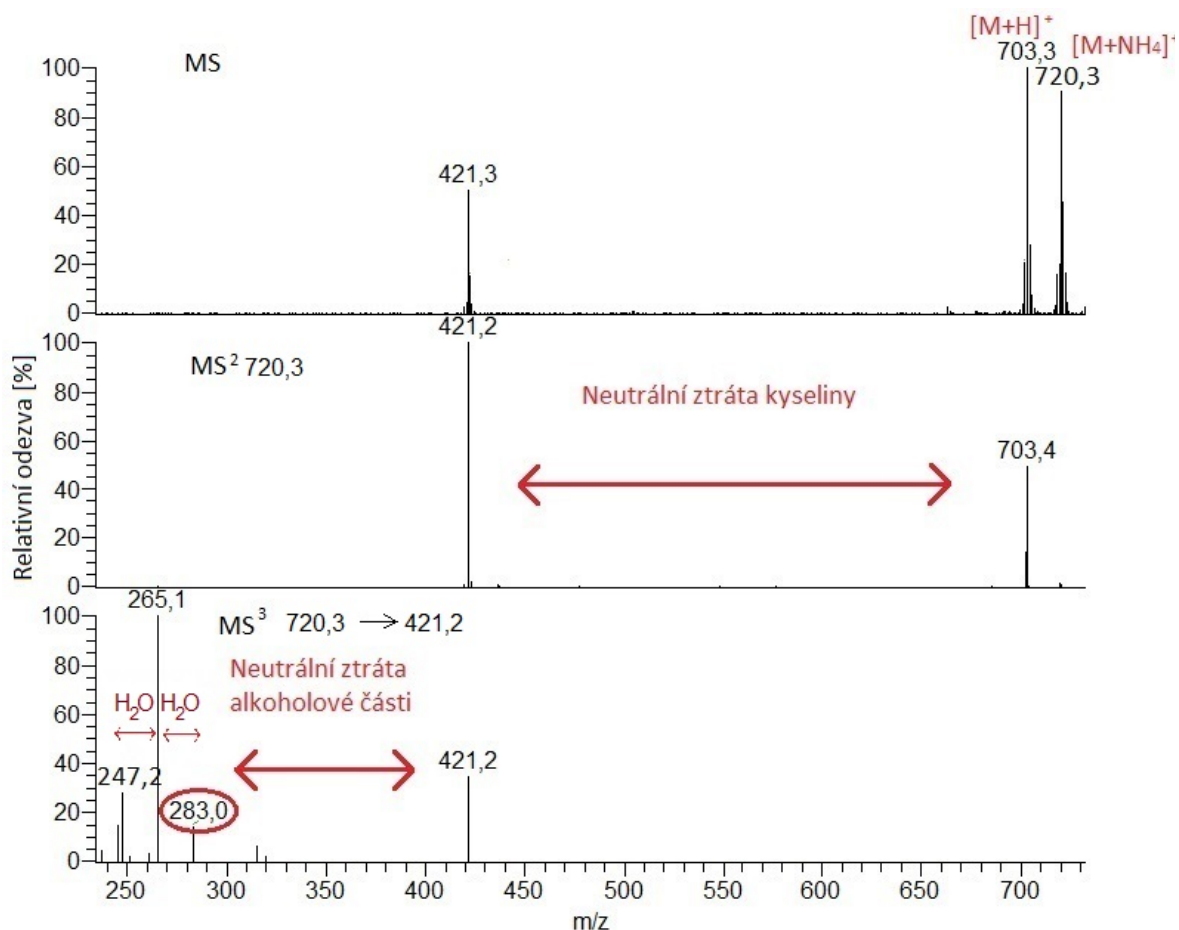
Obrázek 9: Fragmentační děj probíhající na diesterech 1,2-diolů, pouze ilustrační znázornění pro odštěpení mastné kyseliny nejprve z polohy 1.

Vzhledem k extrémní komplexitě vzorku bylo třeba fragmentovat více koelujících analytů v jednom chromatografickém píku a to až do MS^3 . Z důvodu nízké rychlosti skenování nebylo možné měřit data ve vysokém rozlišení na orbitální pasti, neboť by se nestihl dostatečný počet skenů. Při prvních pokusech byla první fragmentace prováděna ve zdroji, aby nebylo potřeba izolovat vybrané ionty v kolizní cele po dobu více fragmentací, ale tato metoda se neosvědčila, neboť bez skenu celého MS byla interpretace naměřených dat příliš komplikovaná.

Dále byla zkoušena dynamická exkluze, při které byl nejvyšší iont fragmentován pouze po určitou dobu, poté byl na stejně dlouhou dobu fragmentován druhý nejintenzivnější iont a pak byl opět fragmentován nejintenzivnější iont. Vzhledem k různorodosti v počtu hodnot m/z v každém píku, byla tato metoda nevhodná, neboť nebylo možné nastavit vhodný časový úsek, po který má být iont fragmentován a „zapomenut“.

Aby nedocházelo k zbytečné fragmentaci iontů, které neodpovídají $[M+NH_4]^+$ diesterů 1,2-diolů, byly všechny teoreticky možné hodnoty m/z pro diestery 1,2-diolů o počtu uhlíků 49 – 65 a počtu dvojných vazeb 0-4 (mezní počty uhlíků byly vypočítány ve spektru vzorku) zapsány do seznamu prekurzorových iontů.

Na směsi standardů 1 byla odzkoušena vhodná normalizovaná kolizní energie. Nakonec bylo zvoleno 27 % pro MS^2 a 33 % pro MS^3 . Bylo zjištěno, že nenasycené mastné kyseliny v MS^3 ztrácí velmi ochotně vodu (Obr. 10).



Obrázek 10: Spektrum dvakrát nenasyčeného standardu 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9). V MS³ spektru převládá intenzitou iont odpovídající mastné kyselině se ztrátou vody nad samotnou mastnou kyselinou, separováno optimalizovanou metodou v gradientu acetonitril – ethylacetát, normalizovaná kolizní energie pro MS² 27 % a pro MS³ 33 %, optimalizovaná separační metoda, měřeno na iontové pasti, Xcalibur (Qual browser).

Při měření vzorku byly fragmentační energie upraveny i pro vyšší hodnoty m/z . (Tab. 12)

Tabulka 12: Normalizovaná kolizní energie v MS² pro vzorek podle hodnoty m/z .

m/z	Normalizovaná kolizní energie [%] pro MS ²	Normalizovaná kolizní energie [%] pro MS ³
700 - 800	28	32
801 - 900	29	32
901 - 1000	30	32

Aby se získalo co nejvíce dat při koeluci více analytů v jednom píku, byla nakonec

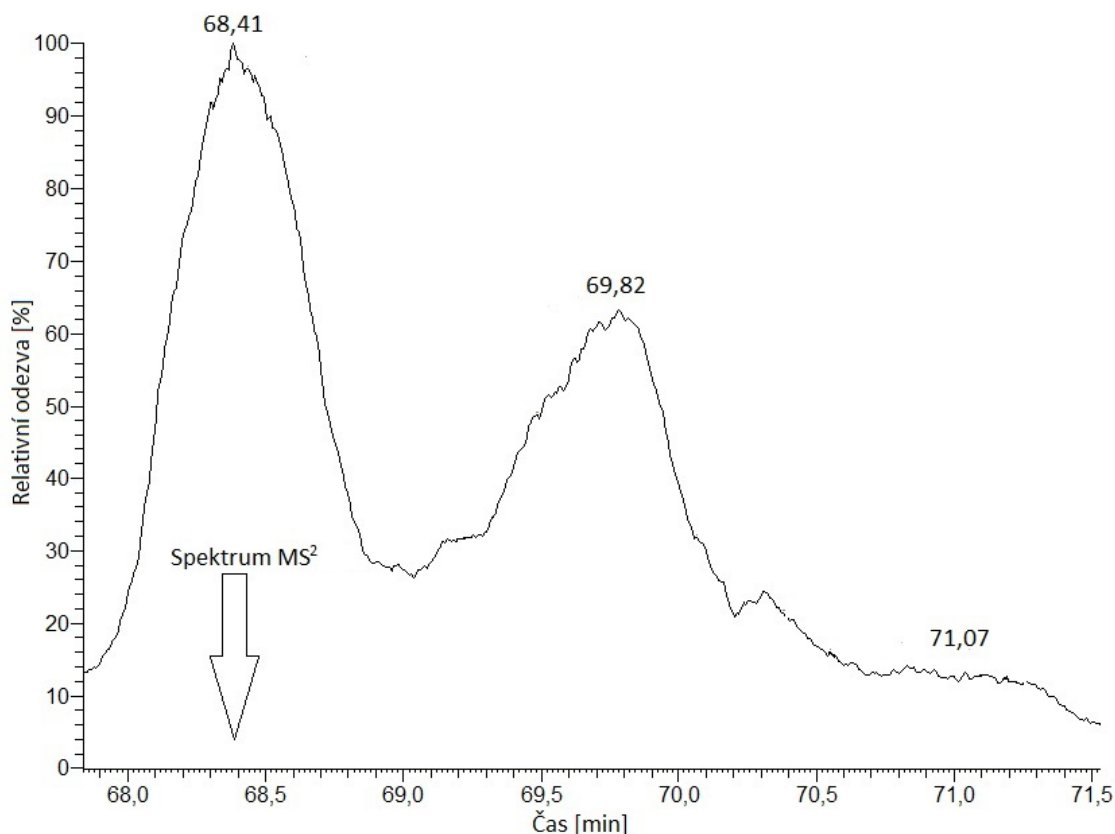
zvolena metoda o osmi různých skenovacích událostech (Tab. 13). Měření bylo provedeno celkem šestkrát a lišilo se vždy v MS² fragmentaci, kde byl postupně fragmentován 1. (1. měření) – 6. (6. měření) nejintenzivnější iont ze seznamu prekurzorových iontů.

Tabulka 13: Přehled skenovacích událostí.

skenovací událost	spektrum	fragmentovaný iont
1	MS 400 – 1500 <i>m/z</i>	-
2	MS ² ze seznamu prekurzorových iontů	1. nejintenzivnější (platí pro 1. měření) ^a
3	MS ³ ze skenovací události 2	1. nejintenzivnější
4	MS ³ ze skenovací události 2	2. nejintenzivnější
5	MS ³ ze skenovací události 2	3. nejintenzivnější
6	MS ³ ze skenovací události 2	4. nejintenzivnější
7	MS ³ ze skenovací události 2	5. nejintenzivnější
8	MS ³ ze skenovací události 2	6. nejintenzivnější

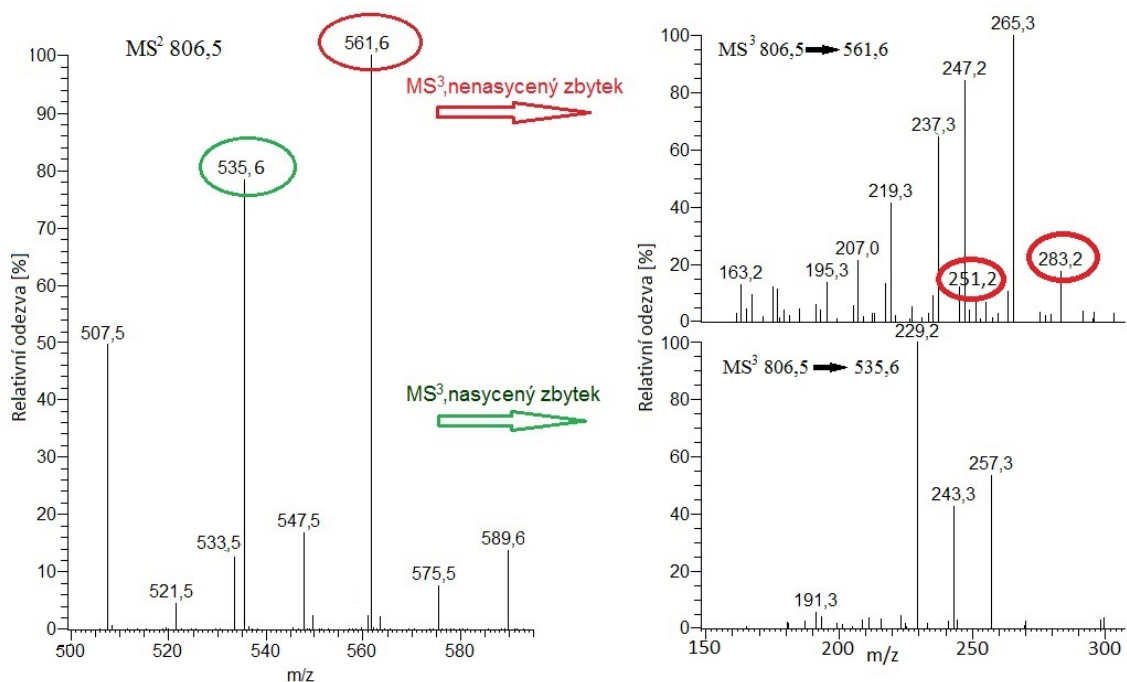
^a při druhém měření byl fragmentován 2. nejintenzivnější iont, při třetím měření 3. nejintenzivnější.... až při šestém měření byl fragmentován 6. nejintenzivnější iont ze seznamu prekurzorových iontů

Jako příklad byla pro detailnější vysvětlení vybrána hodnota *m/z* 806,5 ([M+NH₄]⁺), která odpovídá amonnému aduktu jednou nenasyceného diesteru 1,2-diolu s celkovým počtem uhlíků 52. Tato hodnota *m/z* eluovala celkem ve třech významných pících (Obr. 11).



Obrázek 11: Rekonstruovaný chromatogram pro vybraný iont m/z 806,5 ($[M+NH_4]^+$ jednu nenasyceného diesteru 1,2-diolu s celkovým počtem uhlíků 52), měřeno na iontové pasti, separováno optimalizovaným gradientem acetonitril - ethylacetát, spektrum vyhlazeno, Xcalibur (Qual Browser).

Pro ukázkou MS^2 spektra (Obr. 12) prekurzorového iontu o m/z 806,5 (52 uhlíků, jedna dvojná vazba) byl vybrán chromatografický pík s maximem v retenčním čase 68,41 minuty. Pro ukázkou MS^3 spekter bylo vybráno MS^3 spektrum $806,5 \rightarrow 561,6$ (neutrální ztráta mastné kyseliny 14:0) a $806,5 \rightarrow 535,6$ (neutrální ztráta mastné kyseliny 16:1) pro porovnání MS^3 spektra pro nasycený a nenasycený zbytek diesteru 1,2-diolu.



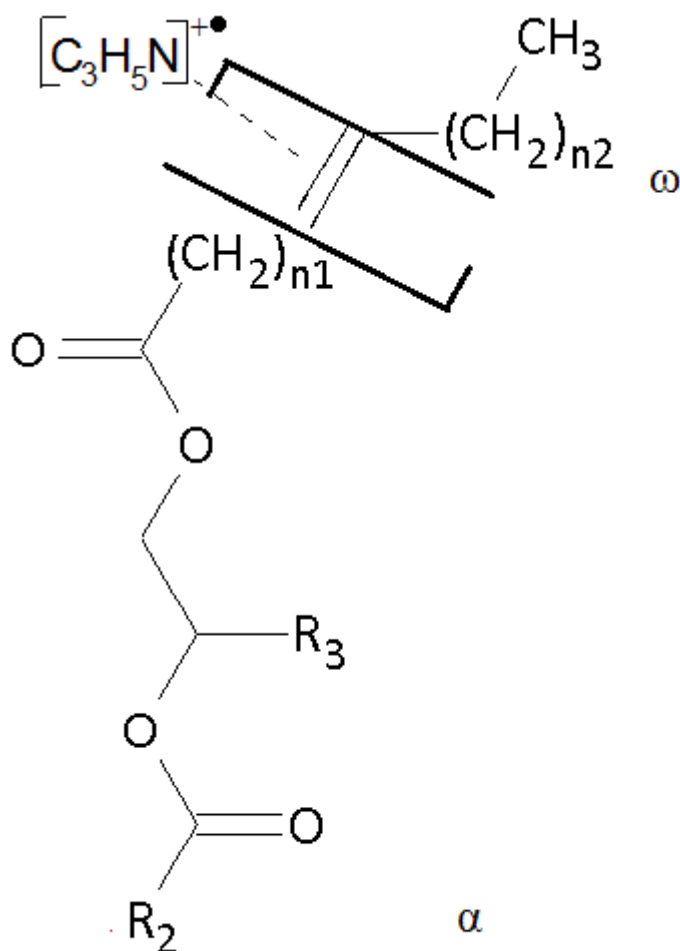
Obrázek 12: Ukázka MS² spektra prekurzorového iontu 806,5 ([M+NH₄)⁺ jednou nenasyceného diesteru 1,2-diolu s celkovým počtem uhlíků 52) v chromatografickém píku odpovídajícím retenčnímu času 68,41 minuty. MS³ spektra nasycené a nenasycené kyseliny. U nenasycených kyselin převládají ionty odpovídající ztrátě jedné a dvou molekul vody nad ionty odpovídajícími [M+H]⁺ dané nenasycené mastné kyseliny, měřeno na iontové pasti, separováno v optimalizovaném gradientu acetobitril - ethylacetát, Xcalibur (Qual Browser).

Po vyhodnocení spekter ze všech šesti měření bylo v tomto chromatografickém píku v retenčním čase 68,41 minuty identifikováno celkem 42 různých diesterů 1,2-diolů.

Data byla vyhodnocena postupem popsáním viz kap. 3. 2. 2. 6 a zanesena do výsledné tabulky (Příloha I). V tabulce byla rovněž ke každé hodnotě *m/z* (odpovídající amonnému aduktu diesteru 1,2-diolu), v každém retenčním čase uvedena plocha daného píku v %, a počet uhlíků:počet dvojných vazeb. Po identifikaci poloh dvojných vazeb u nenasycených diesterů 1,2-diolů, byly i tyto údaje do tabulky doplněny. V tabulce byly tučně vyznačeny plochy píků >1 %, nejintenzivnější analyt a případně převládající poloha dvojných vazby (viz kap. 4. 4).

4. 4 Určování poloh dvojných vazeb

Pro určování poloh dvojných vazeb byla ponechána stejná separační metoda i ladění detektoru. Změněna byla pouze MS metoda. Z literatury^{44, 45} bylo známo, že na určení poloh dvojných vazeb je jako mobilní fáze vhodný acetonitril, se kterým tvoří nenasycené diestery 1,2-diolů adukt $[M+C_3H_5N]^+$, který se v MS^2 kroku štěpí před a za dvojnou vazbou (Obr. 13)



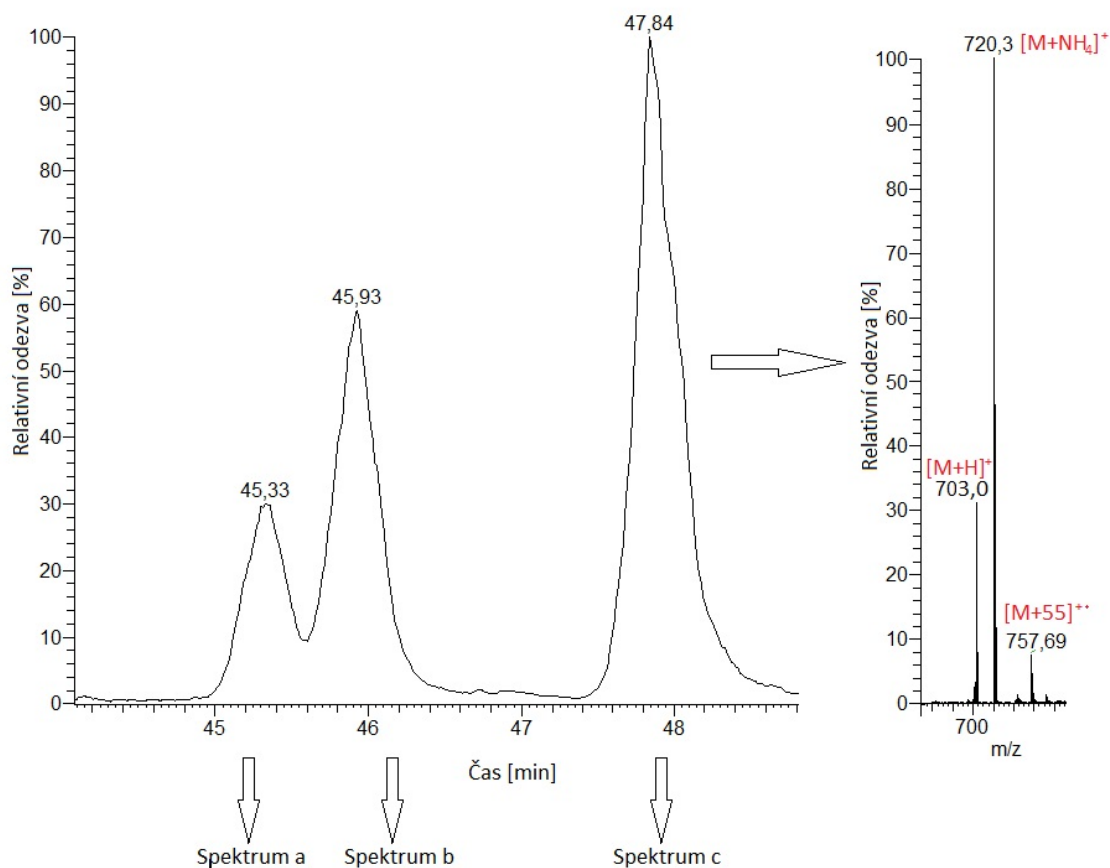
Obrázek 13: Vazba $[M+C_3H_5N]^+$ na dvojnou vazbu, v naznačených místech dochází k fragmentaci na část α a část ω .

Fragmentační energie a způsob zadání prekurzorových iontů do MS metody byly odzkoušeny na směsi standardů č. 3. Bylo použito nastavení, při kterém se fragmentoval iont doprovázející prekurzorový iont a lišící se od něj o 37 Da (výpočet vysvětlen níže).

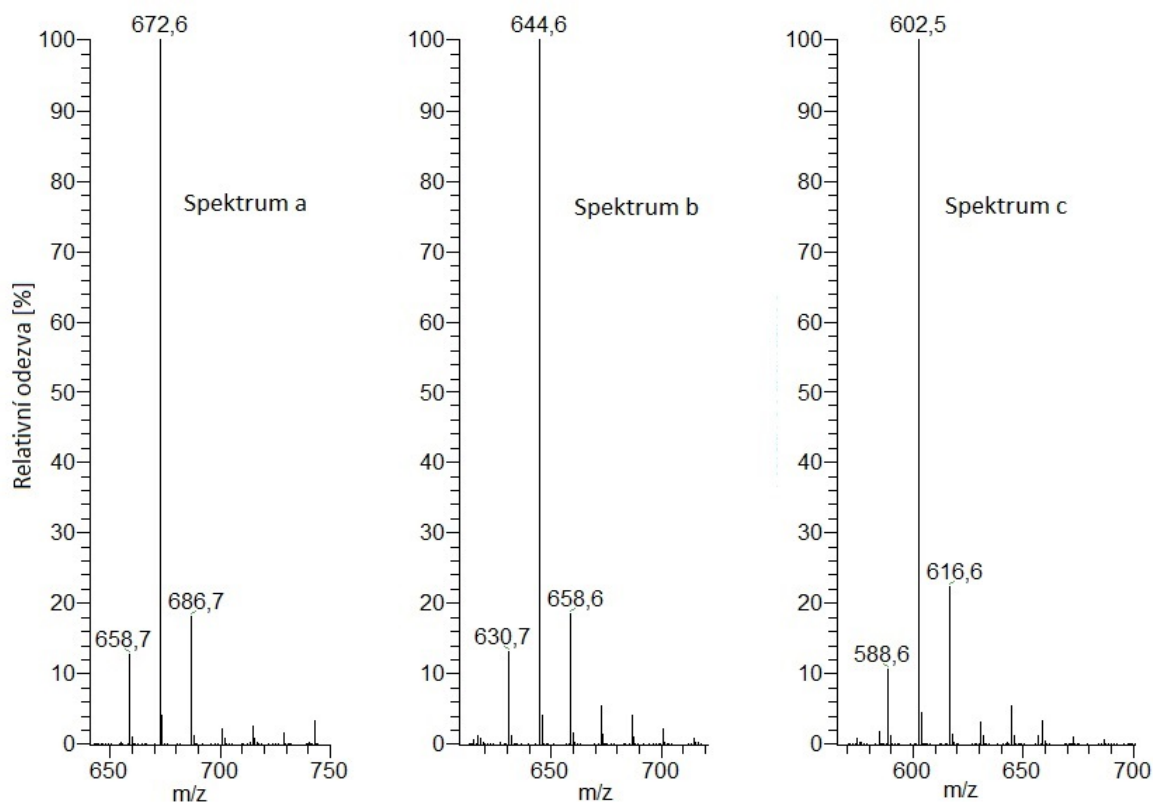
Adukt s částicí $[M+C_3H_5N]^+$ vhodné ke stanovení polohy dvojné vazby..... $[M+55]^+$
 Amonný adukt $[M+18]^+$
 rozdíl.....37 Da

Byla použita normalizovaná kolizní energie 29 %. V MS^2 spektru byl pozorován pík odpovídající části α , část ω má příliš nízkou hodnotu m/z (Obr. 13) a není proto detekována iontovou pastí. Z rozdílu m/z prekurzorového iontu a fragmentačního iontu bylo zjištěno, o kolik uhlíků byl řetězec po fragmentaci zkrácen.

V MS^2 spektrech směsi standardů č. 3, se vždy okolo hlavního iontu vyskytovaly i dva ionty satelitní lišící se od něj o ± 14 Da. Jejich intenzita byla do 25 % intenzity hlavního iontu. (Obr. 14a a 14b).



Obrázek 14a: Rekonstruovaný chromatogram pro směs standardů č. 3 a MS spektrum stejné pro všechny tři píky (zobrazeno pro chromatografický pík 47,84 minuty), separováno optimalizovaným gradientem acetonitril – ethylacetát, měřeno iontové pastí, Xcalibur (Qual Browser).



Obrázek 14b: Ukázka MS² spekter standardů lišících se polohou dvojné vazby, viditelné satelitní ionty, standard 10:0//18:1(n-7t)_18:1(n-7t) spektrum a, 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9) spektrum b a 10:0//18:1(n-12)_18:1(n-12) ve spektru c, separováno optimalizovaným gradientem acetonitril – ethylacetát, měřeno na iontové pasti, Xcalibur (Qual Browser).

K separaci vzorku byla použita optimalizovaná metoda z předchozího měření (gradient acetonitril – ethylacetát, 0,5 % ethylacetátu/min, počáteční podíl ethylacetátu 30 %). MS metoda obsahovala dvě skenovací události na iontové pasti. V první události se opět měřilo celé MS spektrum v rozsahu 400 – 1500 m/z. Ve druhé události se měřilo spektrum MS² (CID) iontů doprovázejících amonné adukty odpovídající nenasyceným diesterům 1,2-diolů nalezeným v předchozím měření, lišící se od nich o + 37 Da (Příloha I).

Pokud fragment odpovídající dané poloze dvojné vazby výrazně převyšoval ostatní, je v tabulce výsledků vyznačen tučně. Bohužel není možné přesně určit k jaké kyselině (alkoholu) poloha dvojné vazby náleží, neboť vzorek je příliš komplexní.

4. 5 Diestery 1,2-diolů nalezené v novorozeneckém mázku

Celkem bylo identifikováno 2250 různých diesterů 1,2-diolů lišících se délkou jednotlivých řetězců a retenčním chováním. Z tohoto počtu bylo 31,4 % identifikovaných diesterů 1,2-diolů nasycených, 42,9 % mononenasycených, 22,8 % dvakrát nenasycených a 3,0 % třikrát nenasycených. V tomto počtu není zahrnuto rozdílné větvení (poloha a délka) ani rozdílné polohy dvojných vazeb a jejich geometrie. Nasycené diestery 1,2-diolů o stejné hmotnosti eluovaly v několika retenčních časech, je pravděpodobné, že se analyty separují nejen podle polohy dvojných vazeb, ale i podle větvení. Tato směs je ale tak složitá, že pravděpodobně není možné pouhou jednodimenziální chromatografií (a v současné době známými technikami) dosáhnout dokonalého rozdělení jednotlivých diesterů 1,2-diolů, a není tedy tímto postupem možné detailní zkoumání rozvětvení řetězců pro každý jednotlivý, retenčně rozlišitelný pík. Prakticky každá hodnota m/z v každém retenčním čase, pro který byla naměřena data se skládala z více diesterů 1,2-diolů, lišících se délkami kyselin a alkoholového zbytku.

U minoritně zastoupených diesterů 1,2-diolů nebylo možné změřit jejich MS^3 spektra. Plochy těchto píků byly rovněž započítány do celkové plochy, ze které byla počítána procentuální zastoupení jednotlivých píků, ale tyto píky ve výsledné tabulce identifikovány nejsou, neboť pro ně nemáme MS^3 data. Třikrát nenasycené diestery 1,2-diolů byly nalezeny pouze v oblasti nejintenzivnější distribuce diesterů 1,2-diolů, lze ale předpokládat, že v krajních částech distribuce pouze nemají dostatečné zastoupení a nebyly tedy detekovány pro svůj nízký signál. Dále lze předpokládat, že složení diesterů 1,2-diolů může být do určité míry individuální pro každého novorozence, může záležet na pohlaví dítěte, fyzické kondici matky (strava, věk a zdravotní stav) a etnické příslušnosti.

Mastné kyseliny identifikované v diesterech 1,2-diolů nalezených ve vzorku byly v rozsahu počtu uhlíků 8 – 32 a o počtu dvojných vazeb 0 – 3. Celkem bylo nalezeno 62 různých mastných kyselin lišících se počtem uhlíků a dvojných vazeb, 24 bylo nasycených (38,7 %), 20 mononenasycených (32,2 %), a 18 (29,0 %) di- a trinenasycených. Do tohoto počtu nejsou zahrnuty rozdílné polohy a geometrie dvojných vazeb a větvení (poloha i délka větvení). Při předchozích studiích, zaměřených na určování poloh dvojných vazeb a větvení řetězců, byly nalezeny mastné kyseliny s počtem uhlíků 12 – 34, zkoumány byly pouze nasycené a mononenasycené mastné kyseliny⁵³.

Nejčastěji se vyskytující mastnou kyselinou v identifikovaných diesterech 1,2-diolů byla

kyselina 16:0 (shoda s předchozí studií²³), za ní následovaly 14:0, 15:0, 16:1 a 18:1 mastné kyseliny. Všechny těchto pět kyselin bylo identifikováno ve více než třech stech různých diesterech 1,2-diolů. Oproti tomu 13 dalších mastných kyselin bylo nalezeno vždy jen v jednom diesteru 1,2-diolu.

Dioly nalezené ve vzorku byly v rozsahu počtu uhlíků 8 – 35 a o počtu dvojných vazeb 0-3. Celkem bylo identifikováno 69 různých diolů lišících se počtem uhlíků a dvojných vazeb. Ve vzorku převažovaly nasycené 1,2-dioly, ale oproti předchozím studiím⁶¹ byly nalezeny i mono- a di- a tri- nenasycené. Do tohoto počtu nejsou zahrnuty rozdílné polohy a geometrie dvojných vazeb a větvení (poloha i délka větvení). V předchozí studii byly nalezeny dioly o počtu uhlíků 14 – 26^{cit. 46}.

Nejčastěji se vyskytujícím diolem v identifikovaných diesterech 1,2-diolů byl 22:0 (shoda s literaturou^{23, 46}), za ním následovaly 20:0, 23:0, 21:0 a 24:0 dioly. Deset různých diolů se vyskytovalo ve více než sto různých diesterech 1,2-diolů, dvanáct diolů se vyskytlo jen v jednom diesteru 1,2-diolu.

Co se týče poloh dvojných vazeb, ve vzorku výrazně převažovala poloha n-7. Tento údaj souhlasí s literaturou, podle které jsou nejčastěji se vyskytujícími nenasycenými mastnými kyselinami v diesterech 1,2-diolů novorozeneckého mázku: C16 Δ 9, C18 Δ 11, C20 Δ 13 a C22 Δ 15^{cit. 53}, které všechny odpovídají poloze dvojných vazeb v poloze n-7.

5 Závěr

Podařilo se ucelit dosud známé informace o složení frakce diesterů 1,2-diolů v novorozeneckém mázku. Doposud byly mastné kyseliny a dioly pocházející z diesterů 1,2-diolů zkoumány samostatně po hydrolýze esterových vazeb. Studie byly zaměřeny na určení větvení řetězců (nevětvené, *iso* a *anteiso* konformace) a poloh dvojných vazeb ve formě Δx . V naší práci byly diestery 1,2-diolů zkoumány jako celek a byly představeny kombinace diolů s mastnými kyselinami nalezené ve vzorku diesterů 1,2-diolů z novorozeneckého mázku.

Povedlo se optimalizovat separační i MS metodu. Jako optimální mobilní fáze pro HPLC separaci diesterů 1,2-diolů na koloně C18 (Nova-Pak) byla zvolena kombinace acetonitrilu a ethylacetátu s gradientem 0,5 % ethylacetátu za minutu s počátečním obsahem ethylacetátu 30 %. Postkolonově byly přidávány amonné ionty v podobě roztoku mravenčanu amonného (50 mmol/L). Fragmentační metoda obsahovala celkem osm skenovacích událostí, z toho jedna byla pro celé spektrum m/z 400 – 1500, druhá událost bylo MS² spektrum vybraných prekurzorových iontů odpovídajících amonným aduktům diesterů 1,2-diolů a třetí až osmá skenovací událost byla MS³ spektra fragmentů ze druhé skenovací události. Celkem bylo identifikováno 2250 různých diesterů 1,2-diolů bez ohledu na polohu dvojných vazeb, jejich geometrii a větvení.

Podařilo se určit převládající polohu dvojných vazeb vyskytující se ve vzorku jako n-7.

6 Seznam použité literatury

1. Singh G., Archana G.: Unraveling the mystery of the vernix caseosa. *Indian Journal of Dermatology* **53**:2, 54 – 60 (2008)
2. Hoath S. B., Narendran V., Visscher M. O.: The biology and role of vernix. *Newborn and Infant Nursing Reviews* **1**:1, 53 – 58 (2001)
3. Hoath S. B., Pickens W. L., Visscher M. O.: The biology of vernix caseosa. *International Journal of Cosmetic Science* **28**:5, 319 – 333 (2006)
4. Saunders C.: The vernix caseosa and subnormal temperature in premature infants. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire* **55**:4, 442 – 444 (1948)
5. Visscher M. O., Narendran V., Pickens W. L., LaRuffa A. A., Meinzen-Derr J., Allen K., Hoath S. B.: Vernix caseosa in neonatal adaptation. *Journal of Perinatology* **25**:7, 440 – 446 (2005)
6. Yoshio H., Tollin M., Gudmundsson G. H., Lagercrantz H., Jörnvall H., Marchini G., Agerberth B.: Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic Fluid: Implications for newborn innate defense. *Pediatric Research* **53**:2, 211 – 216 (2003)
7. Baker S. M., Balo N. N., Abdel Aziz F.T.: Is vernix caseosa a protective material to the newborn? A biochemical approach. *Indian Journal of Pediatrics* **62**:2, 237 – 239 (1995)
8. Moore C., Dempsey D., Deitermann D., Lewis D., Leikin J.: Fetal cocaine exposure: analysis of vernix caseosa. *Journal of analytical toxicology* **20**:6, 509 – 511 (1996)
9. Holm T, Rutishauser D, Kai-Larsen Y, Lyutvinskiy Y, Stenius F, Zubarev R. A., Agerberth B., Alm J., Scheynius A.: Protein biomarkers in vernix with potential to predict the development of atopic eczema in early childhood. *Allergy* **69**:1 104 – 112 (2014)
10. Hoeger P. H., Schreiner V., Klaassen I. A., Enzmann C. C., Friedrichs K., Bleck O.: Epidermal barrier lipids in human vernix caseosa: corresponding ceramide pattern in vernix and fetal skin. *The British journal of dermatology* **146**:2, 194 – 201 (2002)
11. Tollin M., Bergsson G., Kai-Larsen Y., Lengqvist J., Sjövall J., Griffiths W., Skúladóttir G. V., Haraldsson A., Jörnvall H., Gudmundsson G. H., Agerberth B.: Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cellular and molecular life sciences* **62**:19-20, 2390 – 2399 (2005)
12. Rissmann R., Groenink H. W., Weerheim A. M., Hoath S. B., Ponc M., Bouwstra J. A.: New Insights into Ultrastructure, Lipid Composition and Organization of Vernix

- Caseosa. *The Journal of investigative dermatology* **126**:8, 1823 – 1833 (2006)
13. Downing D. T., Greene R.: Double bond positions in the unsaturated fatty acids of vernix caseosa. *The journal of investigative dermatology* **50**:5, 380 – 386 (1968)
 14. Tollin M., Jägerbrink T., Haraldsson A., Agerberth B., Jörnvall H.: Proteome analysis of vernix caseosa. *Pediatric research* **60**:4, 430 – 434 (2006)
 15. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**:1, 497-509 (1957)
 16. Thewlis J.: Lanolin for cosmetic applications. *Agro FOOD Industry Hi Tech* **8**:3, 14 – 20 (1997)
 17. Jover E., Domínguez C., Erra P., Bayona J. M.: Comparative characterization of a wool-wax extract by two complementary chromatographic techniques. *Journal of cosmetic science* **57**:1, 23-35 (2006)
 18. Touchstone J. C.: Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of chromatography B* **671**:1-2, 169 – 195 (1995)
 19. Stewart M. E., Quinn M. A., Downing D. T.: Variability in the fatty acid composition of wax esters from vernix caseosa and its possible relation to sebaceous Gland Activity. *The Journal of investigative dermatology* **78**:4, 291 – 295 (1982)
 20. Carroll K. K.: Separation of lipid classes by chromatography on florisil. *Journal of lipid research* **2**:2, 135 – 141 (1961)
 21. Aitzetmüller K., Jürgen K.: Liquid chromatographic analysis of sebum lipids and other lipids of medical interest. *Journal of chromatography* **145**:2, 195 – 202 (1978)
 22. Zheng L., T'Kind R., Decuyper S., von Freyend S. J., Coombs G. H., Watson D. G.: Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* **24**:14, 2074 – 2082 (2010)
 23. Kärkkäinen J., Nikkari T., Ruponen S., Haahti E.: Lipids of vernix caseosa. *The Journal of investigative dermatology* **44**:5, 333 – 338 (1965)
 24. Ran-Ressler R. R., Lawrence P., Brenna J. T.: Structural characterization of saturated branched chain fatty acid methyl esters by collisional dissociation of molecular ions generated by electron ionization. *Journal of lipid research* **53**:1, 195 – 203 (2012)
 25. Weitkamp A. W., Smiljanic A. M., Rothman S.: The free fatty acids of human hair fat.

Journal of the American chemical society **69**:8, 1936 – 1939 (1947)

26. Weitkamp A. W., The Acidic Constituents of Degras. A New Method of Structure Elucidation. *Journal of the American chemical society*, **67**:3, 447–454 (1945)

27. Nicolaides N., The structures of the branched fatty acids in the wax esters of vernix caseosa. *Lipids* **6**:12, 901 – 905 (1971)

28. Nicolaides N., Apon J. M. B., Wong D. H.: Further studies of the Saturated Methyl Branched Fatty Acids of Vernix Caseosa Lipid. *Lipids* **11**:11, 781 – 790 (1976)

29. Hauff S., Vetter W.: Exploring the fatty acids of vernix caseosa in form of their methyl esters by off-line coupling of non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1217**:52, 8270 – 8278 (2010)

30. Fuchs B., Süß R., Schiller J.: An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Progress in lipid research* **49**:4, 450 – 475 (2010)

31. Shroff R., Svatoš A.: Proton sponge: a novel and versatile MALDI matrix for the analysis of metabolites using mass spectrometry. *Analytical chemistry* **81**:19, 7954 – 7959 (2009)

32. Miyake Y., Yokomizo K., Matsuzaki N.: Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American oil chemists' society* **75**:9, 1091 – 1094 (1998)

33. Schiller J., Süß R., Petkovic M., Arnold K.: Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of food lipids* **9**:3, 185 – 200 (2002)

34. Christie W. W.: Mass spectra of fatty alcohols (including monoacyl/ylkyl-glycerols). Part 2. Dostupné z URL: <<http://lipidlibrary.aocs.org>> [cit. 29. 8. 2013]

35. Wood R.: Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Long-Chain Fatty Alcohols. *Journal of chromatographic science* **6**:2, 94 – 96 (1968)

36. Horn D. H. S., Hougen W. F.: Wool wax. Part IV. The constitution of the aliphatic diols. *Journal of the chemical society* , 3533 – 3538 (1953)

37. Bandi P. C., Schmid H. H.: Configurational analysis of long chain alkanediols. *Chemistry and physics of lipids* **17**:2-3, 267 – 274 (1976)

38. Snyder F. , Stephens N.: A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids. *Biochimica et biophysica acta* **34**, 244 – 245 (1959)

39. Baumann W. J., Seufert J., Hayes H. W., Holman R. T.: Mass spectrometric analysis of long-chain esters of diols. *Journal of lipid research* **10**:6, 703 – 709 (1969)
40. Sinninghe Damsté J. S., Dekker M., van Dongen B. E., Schouten S., Piersma T.: Structural identification of the diester preen-gland waxes of the red knot (*Calidris canutus*). *Journal of natural products* **63**:3, 381 – 384 (2000)
41. Vrkoslav V., Urbanová K., Háková M., Cvačka J.: Analysis of wax esters by silver-ion high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **1302**, 105 – 110 (2013)
42. Vrkoslav V., Urbanová K., Cvačka J.: Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **1217**:25, 4184 – 4194 (2010)
43. von Rudloff E.: Periodate-permanganate oxidations. IV. Determination of the position of double bonds in unsaturated fatty acids and esters. *Journal of the American Oil Chemists Society* **33**:3, 126 – 128 (1956)
44. Vrkoslav V., Cvačka J.: Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **1259**, 244 – 250 (2012)
45. Vrkoslav V., Háková M., Pecková K., Urbanová K., Cvačka J.: Localization of double bonds in wax esters by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts. *Analytical chemistry* **83**:8, 2978 – 2986 (2011)
46. Nikkari T.: The occurrence of diester waxes in human vernix caseosa and in hair lipids of common laboratory animals. *Comparative biochemistry and physiology* **29**:2, 795 – 803 (1969)
47. Wertz P. W., Stover P. M., Abraham W., Downing D. T.: Lipids of chicken epidermis. *Journal of lipid research* **27**:4, 427 – 435 (1986)
48. Sawaya W. N., Kolattukudy P. E.: Structure and biosynthesis of diesters of alkane-2,3-diols of the uropygial glands of ring-necked pheasants. *Biochemistry* **11**:23, 4398 – 4406 (1972)
49. Kunst L., Samuels A. L.: Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research* **42**:1, 51 – 80 (2003)
50. Biester E. M., Hellenbrand J., Gruber J., Hamberg M., Frentzen M.: Identification of

- avian wax synthases. *BMC biochemistry* **13**:4, (2012)
51. Turkish A. R., Henneberry A.L., Cromley D., Padamsee M., Oelkers P., Bazzi H., Christiano A. M., Billheimer J. T., Sturley S. L.: Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases: members of the diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene superfamily. *The Journal of biological chemistry* **280**:15, 14755 – 14764 (2005)
52. Kalscheuer R., Uthoff S., Luftmann H., Steinbüchel A.: In vitro and in vivo biosynthesis of wax diesters by an unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *European journal of lipid science and technology* **105**:10, 578 – 584 (2003)
53. Ansari M. N. A., Fu H. C., Nicolaides N.: Fatty Acids of the Alkane Diol Diesters of Vernix Caseosa. *Lipids* **5**:2, 279 – 282 (1970)
54. Johnson W. Jr., Bergfeld W. F., Belsito D. V., Hill R. A., Klaassen C. D., Liebler D., Marks J. G. Jr., Shank R. C., Slaga T. J., Snyder P. W., Andersen F.A.: Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics. *International journal of toxicology* **31**:5 Suppl, 147S – 168S (2012)
55. US Pat. 7582681 B2. Schmaus G., Lange S., Joppe H.: *Synergistic mixtures of 1,2-alkane diols*. 1. 8. 2009
56. US Pat. 7754774. Kobazashi A., Okamoto H., Okada F.: *Antiseptic bactericides and cosmetics, drugs and foods containing the antiseptic bactericides*. 13. 7. 2010
57. US Pat. 8623916. Redoules D., Daunes-Marion S., Aries M. F.: *Polyunsaturated fatty acid and diol ester as an anti-acne agent*. 7. 1. 2014
58. US Pat. 5008126. Klemann L. P., Finley J. W., Scimone A.: *Long chain diol diesters as low calorie fat mimetics*. 16. 4. 1991
59. Nicolaides N.: The monoene and other Wax alcohols of human skin surface lipid and their relation to the fatty acids of this lipid. *Lipids* **2**:3, 266 – 275 (1967)
60. Woodford F. P., van Gent C. M.: Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters: the “carbon-number” as a parameter for comparison of columns. *The Journal of lipid research* **1**:2, 188 – 190 (1960)
61. Nicolaides N., Fu H. C.: The Structure of Alkane Diols of Diesters in Vernix Caseosa Lipids. *Lipids* **4**:2, 170 – 175 (1969)
62. Nicolaides N., Fu H. C.: A rapid micro technique for differentiating between iso,

- anteiso and other mono methyl branched fatty chains. *Lipids* **4**:1, 83 – 86 (1969)
63. Nishimaki-Mogami T., Minegishi K., Takahashi A., Kawasaki Y., Kurokawa Y., Uchiyama M.: Characterization of skin-surface lipids from the monkey (*Macaca fascicularis*). *Lipids* **23**:9, 869 – 877 (1988)
64. Schmid P. C., Schmid H. H.: Lipase hydrolysis of mammalian long-chain 1,2-alkanediol diesters. Nonrandom distribution of fatty acids. *The Journal of lipid research* **19**:7, 894 – 898 (1978)
65. The nomenclature of lipids (Recommendations 1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochemical Journal* **171**:1, 21 – 35 (1978)
66. Liebisch G., Vizcaino J.A., Köfeler H., Trötz Müller M., Griffiths W. J., Schmitz G., Spener F., Wakelam M. J.: Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of lipid research* **54**:6, 1523 – 1530 (2013)
67. Lísa M., Netušilová K., Franěk L., Dvořáková H., Vrkoslav V., Holčápek M.: Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection. *Journal of chromatography. A* **1218**:42, 7499 – 7510 (2011)

Přílohy

Příloha A

Tabulka A: Hodnoty m/z mastných kyselin s ohledem na počet uhlíků a dvojných vazeb.

Počet uhlíků	Počet dvojných vazeb				
	0	1	2	3	4
8	144,1	142,1	140,1	138,1	136,1
9	158,1	156,1	154,1	152,1	150,1
10	172,1	170,1	168,1	166,1	164,1
11	186,2	184,1	182,1	180,1	178,1
12	200,2	198,2	196,1	194,1	192,1
13	214,2	212,2	210,2	208,1	206,1
14	228,2	226,2	224,2	222,2	220,1
15	242,2	240,2	238,2	236,2	234,2
16	256,2	254,2	252,2	250,2	248,2
17	270,2	268,2	266,2	264,2	262,2
18	284,3	282,3	280,3	278,2	276,2
19	298,3	296,3	294,3	292,2	290,2
20	312,3	310,3	308,3	306,3	304,2
21	326,3	324,3	322,3	320,3	318,3
22	340,3	338,3	336,3	334,3	332,3
23	354,3	352,3	350,3	348,3	346,3
24	368,4	366,3	364,3	362,3	360,3
25	382,4	380,4	378,3	376,3	374,3
26	396,4	394,4	392,4	390,3	388,3
27	410,4	408,4	406,4	404,4	402,3
28	424,4	422,4	420,4	418,4	416,4
29	438,4	436,4	434,4	432,4	430,4
30	452,5	450,4	448,4	446,4	444,4

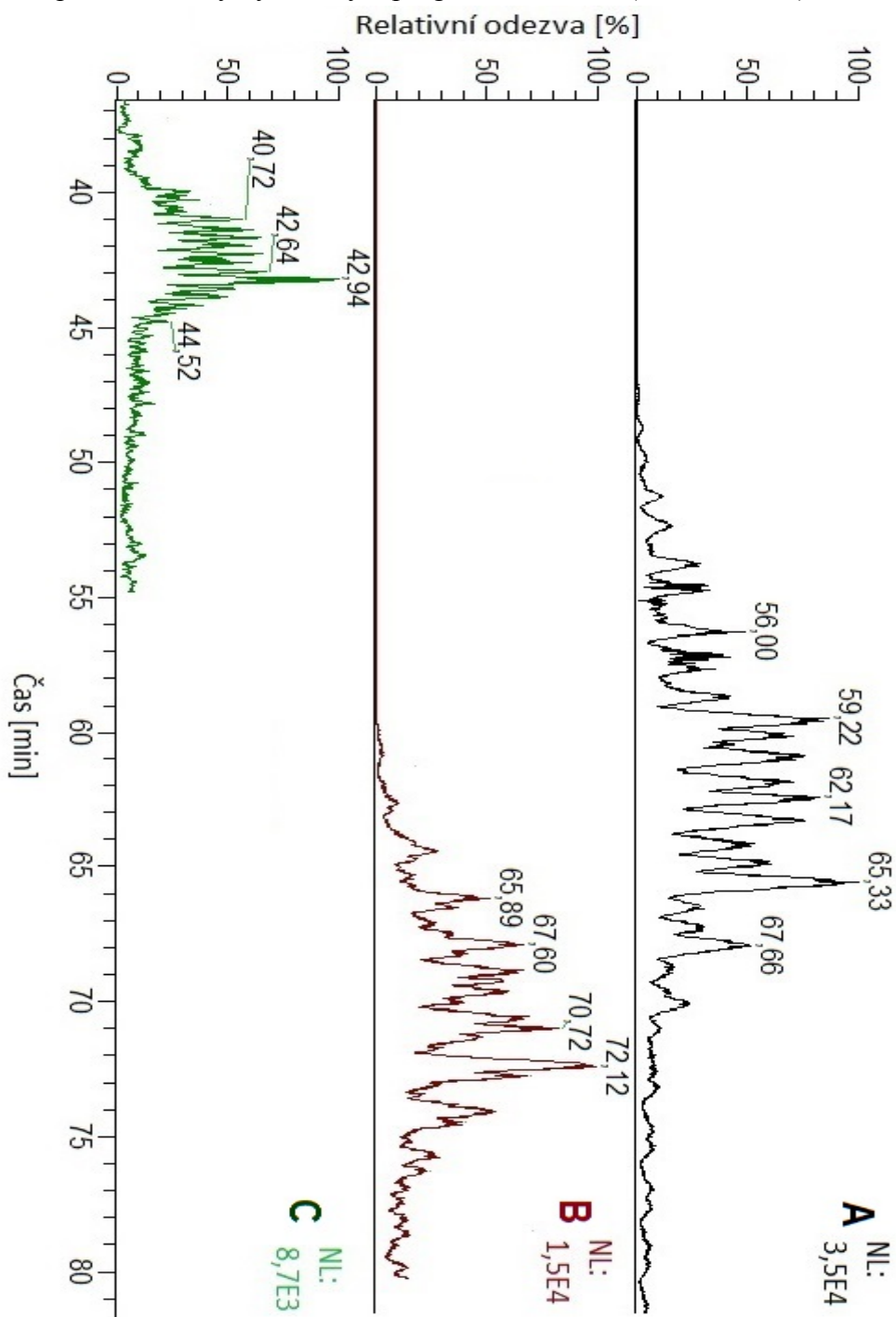
Příloha B

Tabulka B: Hodnoty m/z neutrálních ztrát alkoholů jako dienů podle počtu uhlíků a dvojných vazeb.

Počet uhlíků	Počet dvojných vazeb				
	0	1	2	3	4
8	110,1	108,1	106,1	104,1	102
9	124,1	122,1	120,1	118,1	116,1
10	138,1	136,1	134,1	132,1	130,1
11	152,2	150,1	148,1	146,1	144,1
12	166,2	164,2	162,1	160,1	158,1
13	180,2	178,2	176,2	174,1	172,1
14	194,2	192,2	190,2	188,2	186,1
15	208,2	206,2	204,2	202,2	200,2
16	222,2	220,2	218,2	216,2	214,2
17	236,3	234,2	232,2	230,2	228,2
18	250,3	248,3	246,2	244,2	242,2
19	264,3	262,3	260,3	258,2	256,2
20	278,3	276,3	274,3	272,3	270,2
21	292,3	290,3	288,3	286,3	284,3
22	306,3	304,3	302,3	300,3	298,3
23	320,3	318,3	316,3	314,3	312,3
24	334,4	332,3	330,3	328,3	326,3
25	348,4	346,4	344,3	342,3	340,3
26	362,4	360,4	358,4	356,3	354,3
27	376,4	374,4	372,4	370,4	368,3
28	390,4	388,4	386,4	384,4	382,4
29	404,4	402,4	400,4	398,4	396,4
30	418,5	416,4	414,4	412,4	410,4
31	432,5	430,5	428,4	426,4	424,4
32	446,5	444,5	442,5	440,4	438,4
33	460,5	458,5	456,5	454,5	452,4
34	474,5	472,5	470,5	468,5	466,5
35	488,5	486,5	484,5	482,5	480,5
36	502,5	500,5	498,5	496,5	494,5
37	516,6	514,5	512,5	510,5	508,5
38	530,6	528,6	526,5	524,5	522,5
39	544,6	542,6	540,6	538,5	536,5
40	558,6	556,6	554,6	552,6	550,5

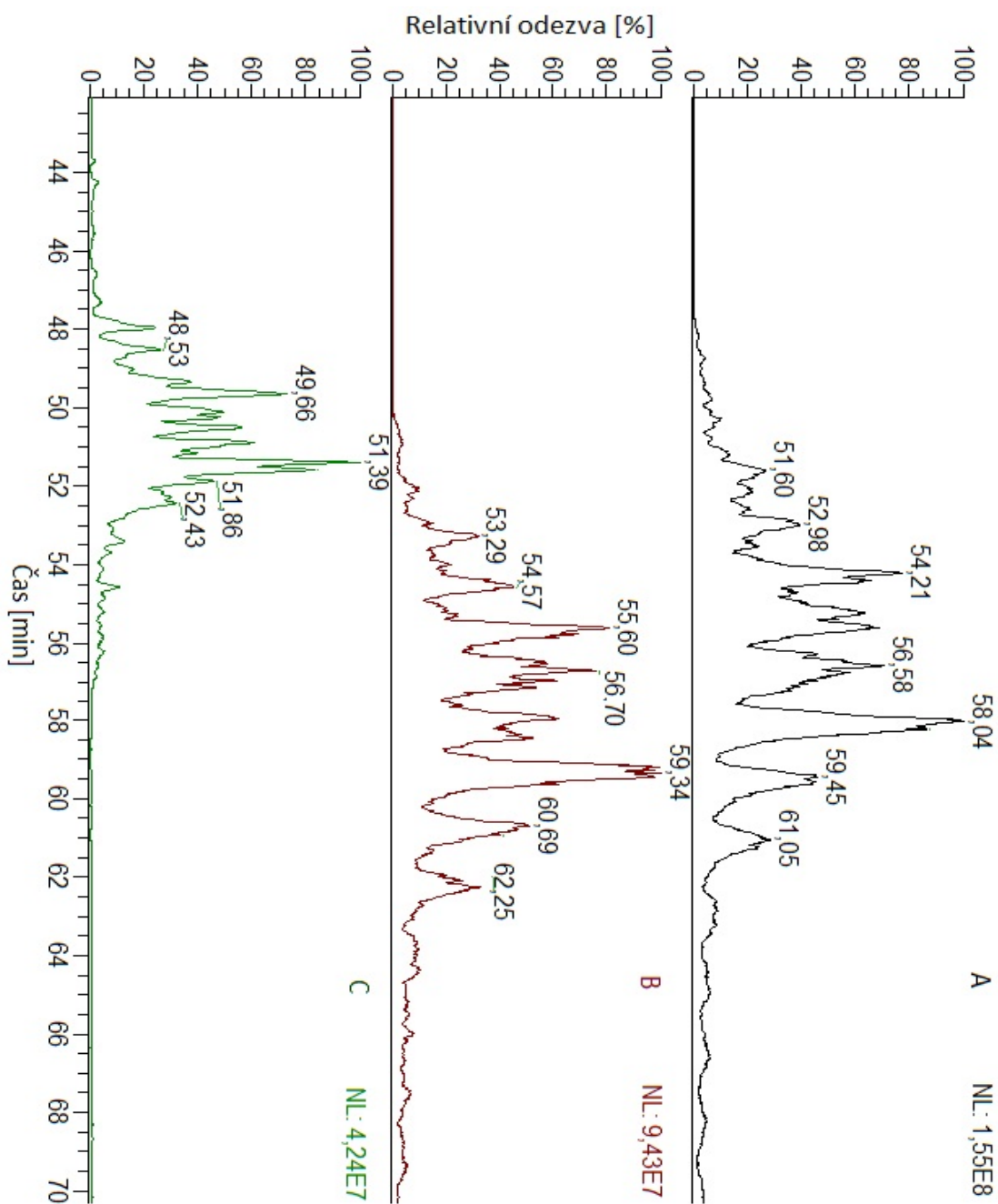
Příloha C

Porovnání chromatogramů diesterů 1,2-diolů z novorozeneckého mázku separovaných ve třech mobilních fázích: A – methanol + 2-propanol, B – acetonitril + 2-propanol, C – acetonitril + toluen, gradient: 1,25 % více organické fáze (2-propanol, toluen)/min, v t_0 obsah více organické fáze 0 %, průtok mobilní fáze klesal lineárně ze 750 $\mu\text{l}/\text{min}$ (t_0) na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (t_{80}), přidavek amonných iontů rychlostí 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (100 mmol/L), měřeno na iontové pasti, záznamy vyhlazeny v programu Xcalibur (Qual browser).



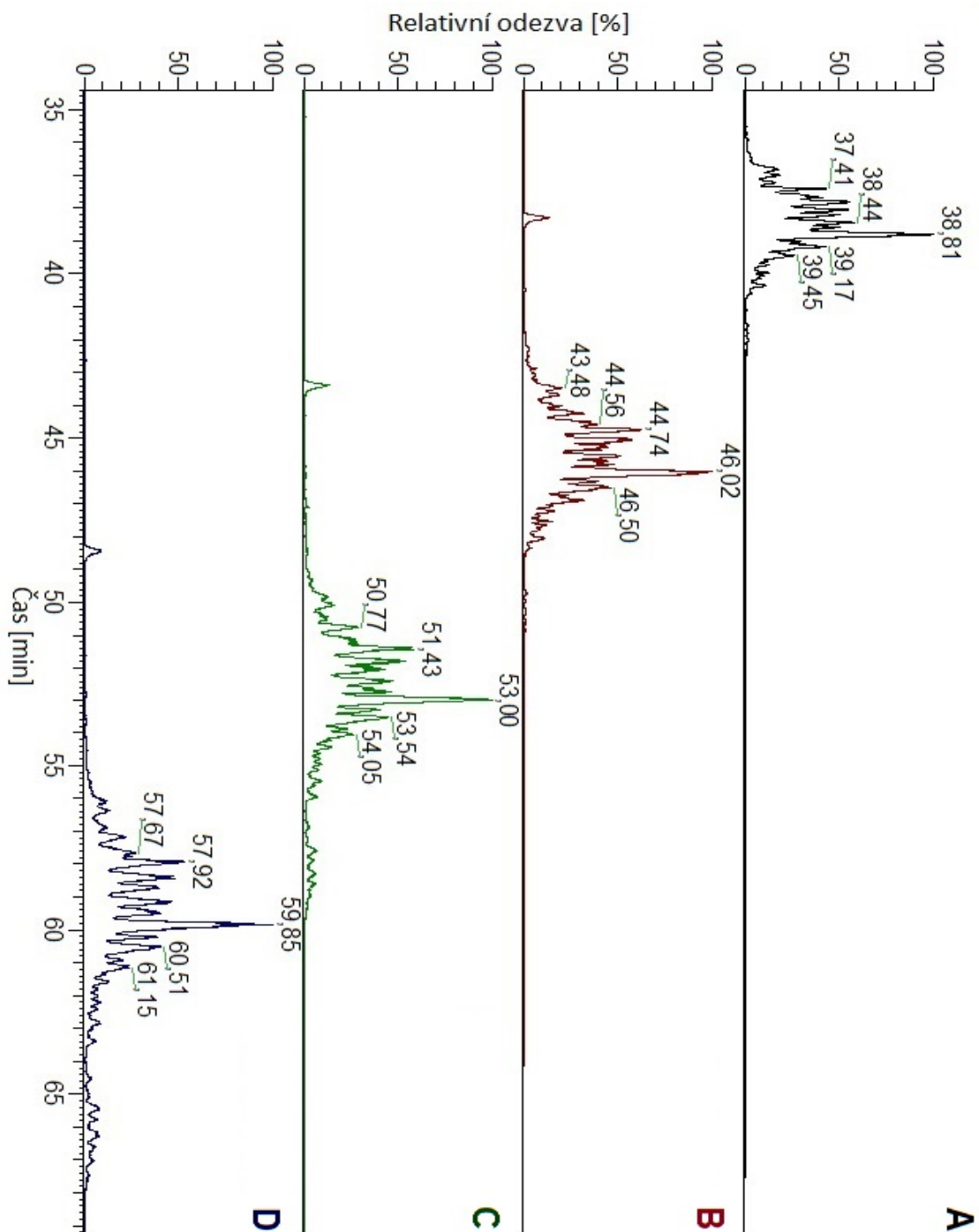
Příloha D

Porovnání chromatogramů diesterů 1,2-diolů z novorozeneckého mázku separovaných ve třech mobilních fázích: A – methanol + 2-propanol, B – acetonitril + 2-propanol, C – acetonitril + ethylacetát, na prodlouženém separačním prostředí. Gradient: 2,5 % více organické fáze (2-propanol, ethylacetát)/min, v čase t_0 0 % více organické fáze, průtok klesal ze 750 $\mu\text{l}/\text{min}$ (t_0) na 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ (t_{40}) a dále na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (t_{120}), přidavek amonných iontů rychlostí 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (100 mmol/L), měřeno na orbitální pasti, rozlišení 100 000, záznam vyhlazen, Xcalibur (Qual Browser).



Příloha E

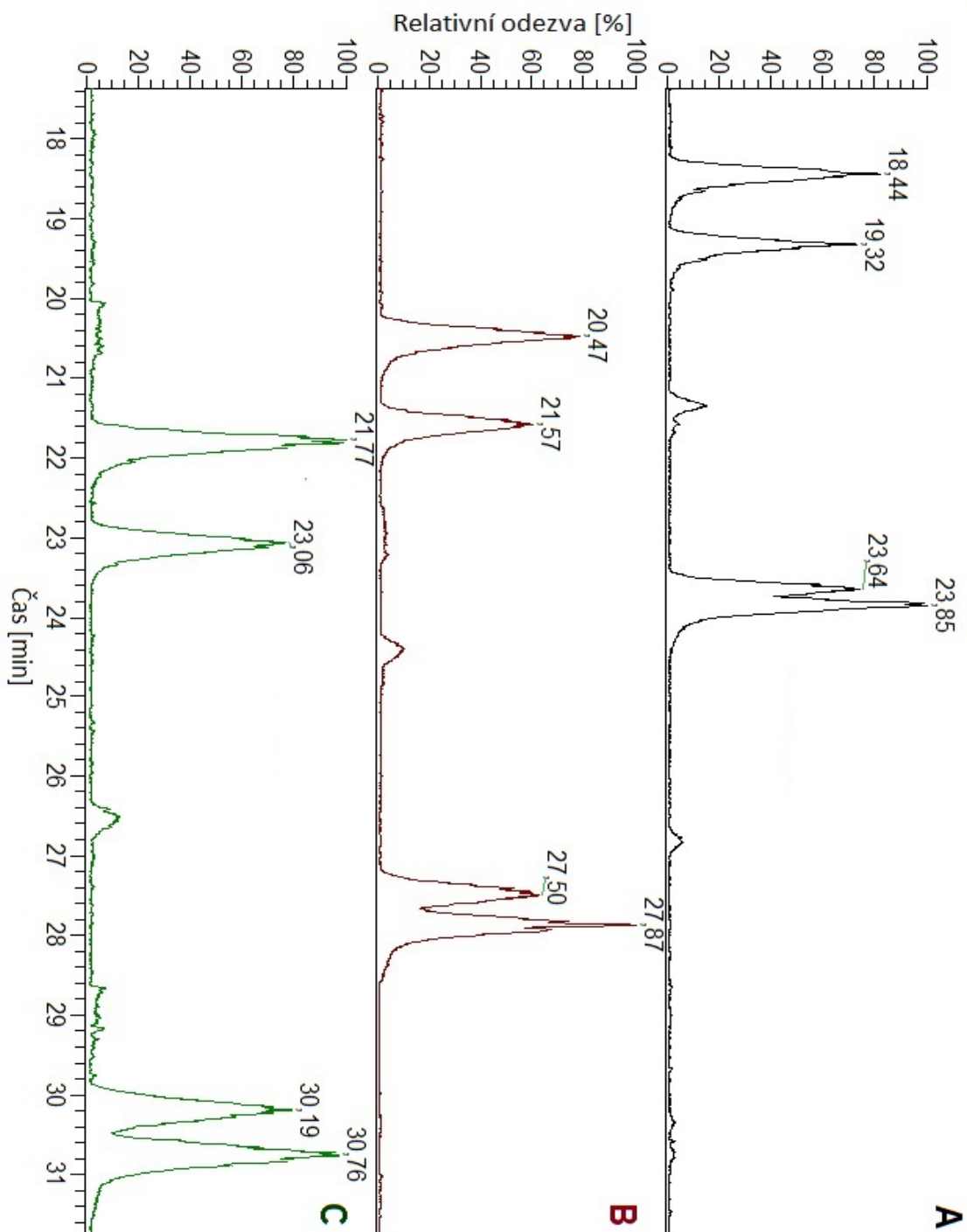
Porovnání čtyř různých gradientů při separaci vzorku v mobilní fázi acetonitril + ethylacetát, A – z 0 % ethylacetátu (t_0) do 100 % ethylacetátu za 40 minut, B – za 50 minut, C – za 60 minut a D – za 70 minut, průtok mobilní fáze 700 $\mu\text{l}/\text{min}$, přidavek amonných iontů rychlostí 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (100 mmol/L), měřeno na iontové pasti, záznam vyhlazen, Xcalibur (Qual Browser).



Příloha F

Porovnání tří různých gradientů: A – gradient 1 % ethylacetátu/min, B – gradient 0,75 %/min a C – gradient 0,5 %/min, směsi standardů 1 - retenční pořadí:

10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9); 10:0//16:0_16:0; 10:0//18:0_18:0; 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9),
mobilní fáze acetonitril + ethylacetát, přídavek amonných iontů rychlostí 9 $\mu\text{l}/\text{min}$ (50
mmol/L), měřeno na iontové pasti, záznam vyhlazen, Xcalibur (Qual Browser).



Příloha G

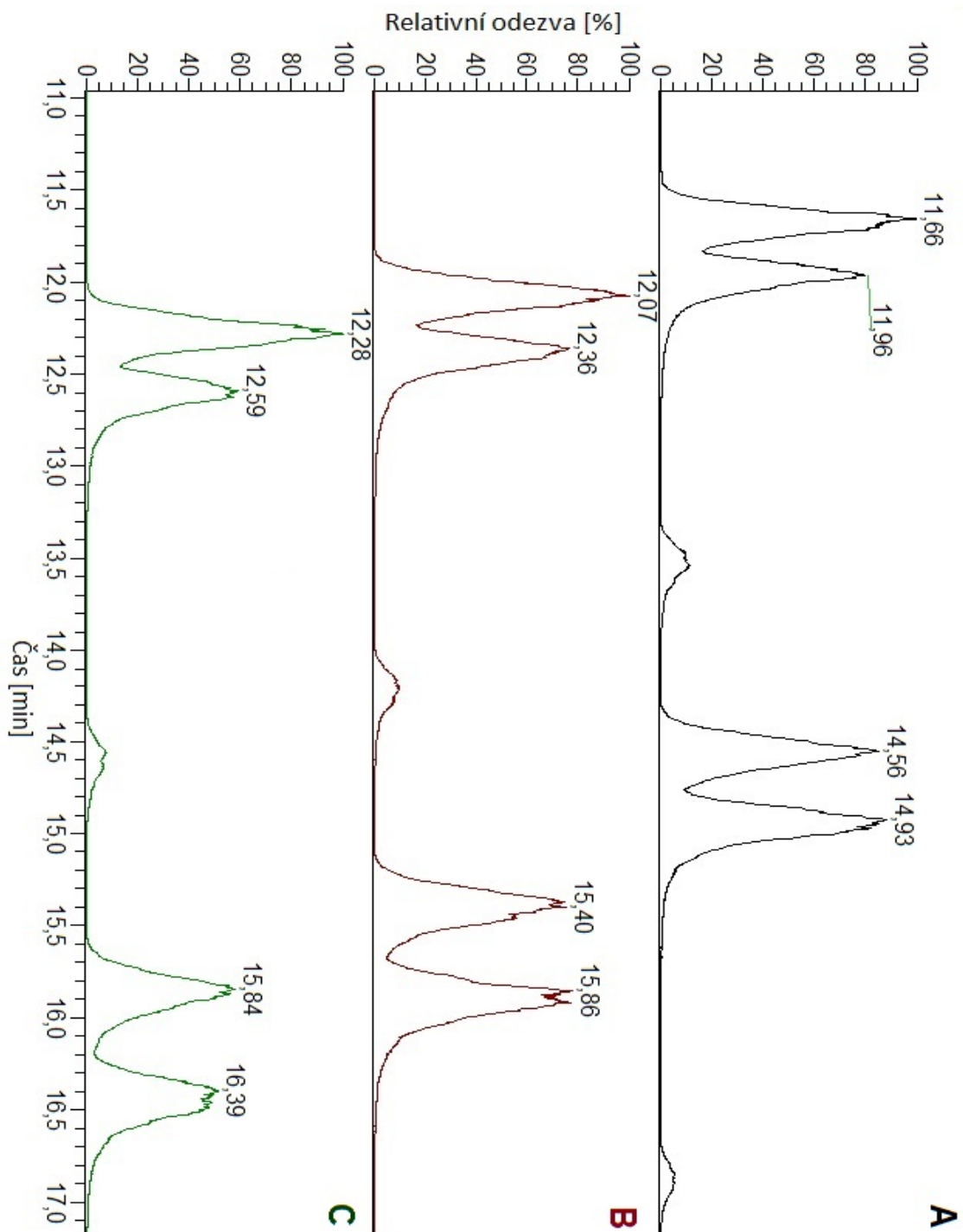
Porovnání tří různých gradientů: A – gradient 1 % ethylacetátu/min, B – gradient

0,75 %/min a C – gradient 0,5 %/min, směsi standardů 1 - retenční pořadí:

10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9); 10:0//16:0_16:0; 10:0//18:0_18:0; 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9),

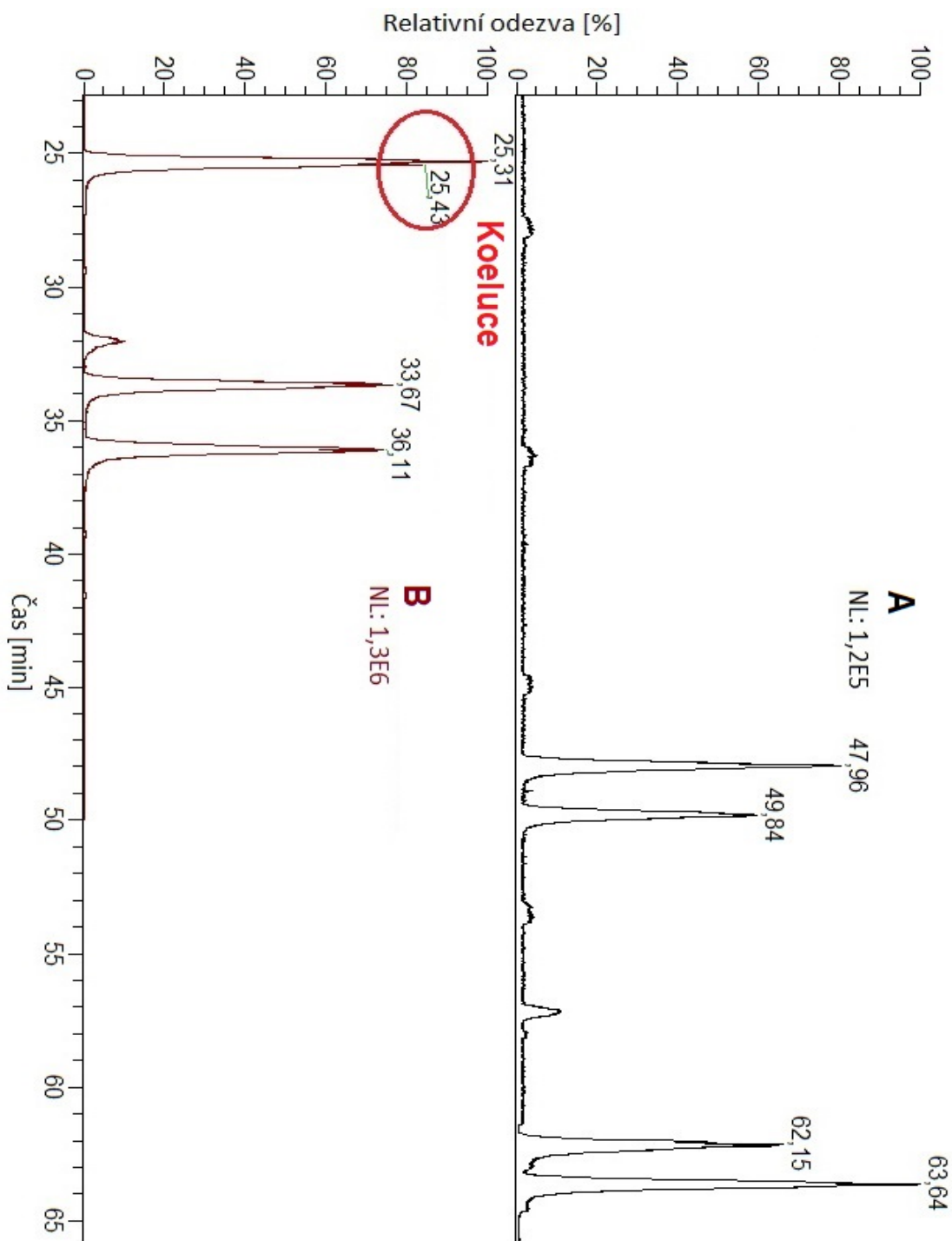
mobilní fáze methanol + ethylacetát, přídavek amonných iontů rychlostí 9 $\mu\text{l}/\text{min}$

(50 mmol/L), měřeno na iontové pasti, záznam vyhlazen, Xcalibur (Qual Browser).



Příloha H

Porovnání stejného gradientu (0,5 % ethylacetátu/min) ze stejného podílu ethylacetátu v čase t_0 (30 %), A - mobilní fáze acetonitril + ethylacetát a B - methanol + ethylacetát, směs standardů 1 - retenční pořadí: 10:0//18:1(n-9)_18:1(n-9); 10:0//16:0_16:0; 10:0//18:0_18:0; 16:0//18:1(n-9)_18:1(n-9), přídavek amonných iontů rychlostí 9 $\mu\text{l}/\text{min}$ (50 mmol/L), měřeno na iontové pasti, záznam vyhlazen, Xcalibur (Qual Browser).



Příloha I

Výsledná tabulka s uvedenými retenčními časy, m/z (amonné adukty diesterů 1,2-diolů, $[M+NH_4]^+$), plochami daných píků, poměrem počtu uhlíků:počtu dvojných vazeb (CN:DB), seznamem nalezených diesterů 1,2-diolů v daném píku a nalezenými pozicemi dvojných vazeb, tučně vyznačeny plochy píků $>1\%$, výrazně převládající diester 1,2-diolu v daném píku a převládající dvojná vazba

t_r [min]	m/z [$M+NH_4$] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojných vazby
62.59	804.4	0.22	52:2	20:0//16:1_16:1 20:0//18:2_14:0 22:0//16:1_14:1 24:1//16:1_12:0 25:0//16:1_11:1 26:0//16:1_10:1	20:1//16:1_16:0	n-7; n-5; n-4; n-6; n-9; n-10	
63.15	778.4	0.18	50:1	16:0//14:1_20:0 19:0//14:0_17:1 22:0//14:1_14:0 24:0//14:0_12:1 27:0//14:0_9:1	16:0//16:1_18:0 17:0//14:0_19:1 19:0//16:1_15:0 23:0//16:1_11:0 24:0//16:1_10:0 25:0//14:0_11:0	20:0//16:1_14:0 n-7; n-5	
63.54	804.4	0.10	52:2	20:1//14:1_18:0 24:0//16:1_12:1	22:0//16:1_14:1 26:0//16:1_10:1	22:1//16:1_14:0 n-7; n-5; n-6; n-9	
64.53	778.4	0.06	50:1	15:0//16:1_19:0 21:0//16:1_13:0	16:0//16:1_18:0 22:0//16:1_12:0	20:0//16:1_14:0 n-7; n-5	
64.57	818.4	0.10	53:2	13:0//15:0_25:2 19:1//16:1_18:0 22:1//14:0_17:1 24:1//16:1_13:0	17:0//16:1_20:1 21:2//14:0_18:0 22:1//16:1_15:0 23:1//16:1_14:0 25:1//16:1_12:0	19:1//14:0_20:1 n-7; n-5; n-6; n-4; n-9; n-10	
64.57	844.5	0.12	55:3	27:0//18:2_10:1	27:1//16:1_12:1	- ^a	
65.13	792.4	0.05	51:1	15:0//16:1_20:0 17:0//18:1_16:0 21:0//16:1_14:0 23:1//14:0_14:0	17:0//14:0_20:1 20:0//16:1_15:0 22:0//16:1_13:0	17:0//16:1_18:0 20:0//18:1_13:0 22:1//14:0_15:0 - ^a	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
65.22	818.4	0.30	53:2	17:0//16:1_20:1 17:0//18:2_18:0 19:0//18:2_16:0	n-7; n-5; n-6; n-9; n-4; n-10
				20:0//18:2_15:0 21:0//16:1_16:1 21:0//18:2_14:0	
				22:0//16:1_15:1 22:0//18:2_13:0 22:1//16:1_15:0	
				23:1//16:1_14:0 24:0//18:2_11:0 24:1//16:1_13:0	
				25:0//16:1_12:1 26:2//15:0_12:0 27:0//16:1_10:1 27:1//16:1_10:0	
65.85	792.4	0.24	51:1	15:0//16:1_20:0 16:0//13:0_22:1 17:0//14:1_20:0	n-7; n-5; n-9; n-6
				17:0//16:1_18:0 18:0//16:1_17:0 19:0//16:1_16:0	
				19:0//18:1_14:0 20:0//16:1_15:0 20:0//18:1_13:0	
				21:0//14:1_16:0 21:0//16:1_14:0 21:0//18:1_12:0	
				22:0//14:1_15:0 22:0//16:1_13:0 22:1//13:0_16:0	
				23:0//14:1_14:0 23:0//16:1_12:0 24:1//14:0_13:0	
				25:0//14:1_12:0 25:0//18:1_8:0 27:0//15:0_9:1	
66.41	792.4	0.11	51:1	15:0//16:1_20:0 17:0//14:0_20:1 17:0//16:1_18:0	- ^a
				19:0//16:1_16:0 19:0//18:1_14:0 20:0//14:1_17:0	
				20:0//16:1_15:0 21:0//14:1_16:0 21:0//16:1_14:0	
				21:1//14:0_16:0 22:0//16:1_13:0 22:1//14:0_15:0	
				23:0//14:1_14:0 24:0//16:1_11:0	
66.43	766.4	0.20	49:0	17:0//14:0_18:0 20:0//12:0_17:0 20:0//13:0_16:0	Nasycené diestry 1,2-diolů
				20:0//14:0_15:0 21:0//12:0_16:0 21:0//14:0_14:0	
				21:0//15:0_13:0 22:0//14:0_13:0 22:0//15:0_12:0	
				23:0//14:0_12:0 23:0//15:0_11:0	
66.45	818.4	0.11	53:2	15:0//16:1_22:1 17:0//16:1_20:1 19:1//16:1_18:0	- ^a
				20:0//16:1_17:1 20:0//18:2_15:0 21:0//18:2_14:0	
				22:0//18:2_13:0 22:1//16:1_15:0 23:0//16:1_14:1	
66.45	858.6	0.35	56:3	14:0//18:1_24:2 17:0//16:1_23:2 19:0//16:1_21:2	- ^a
				22:1//18:2_16:0 24:1//16:1_16:1 26:1//16:1_14:1	
				26:1//18:1_12:1 27:1//18:2_11:0 28:1//16:1_12:1	
66.99	832.5	0.35	54:2	16:0//18:1_20:1 17:0//16:1_21:1 22:0//18:1_14:1	n-7; n-5; n-6; n-4; n-9; n-10
				22:1//14:0_18:1 22:1//16:1_16:0 23:1//16:1_15:0	
				24:1//16:1_14:0 24:1//18:1_12:0 27:1//14:0_13:1	
				28:1//14:0_12:1 29:1//14:0_11:1	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
67.11	792.4	0.15	51:1	15:0//14:0_22:1 15:0//16:1_20:0 17:0//14:1_20:0	- ^a
				17:0//16:1_18:0 19:0//16:1_16:0 20:0//16:1_15:0	
				21:0//14:1_16:0 21:0//16:1_14:0 22:0//16:1_13:0	
				23:0//16:1_12:0 24:0//16:1_11:0 26:0//16:1_9:0	
67.24	858.6	0.30	56:3	22:0//18:2_16:1 22:1//18:2_16:0 22:2//18:1_16:0	- ^a
				24:1//18:2_14:0 25:0//18:2_13:1 25:2//16:1_15:0	
				27:0//18:2_11:1 27:2//16:1_13:0 28:0//18:2_10:1	
				30:2//16:1_10:0	
67.70	858.6	0.11	56:3	14:0//16:0_26:3 21:3//16:0_19:0 22:0//16:1_18:2	- ^a
				22:2//16:0_18:1 26:3//14:0_16:0 27:2//13:1_16:0	
				29:1//11:2_16:0	
67.72	832.5	1.35	54:2	8:2//14:0_32:0 12:0//16:1_26:1 13:0//16:1_25:1	n-7; n-5; n-9; n-6; n-4; n-10; n-11
				15:0//14:0_25:2 16:0//16:1_22:1 17:0//16:1_21:1	
				17:0//18:1_19:1 17:0//18:2_19:0 19:1//18:1_17:0	
				20:0//16:1_18:1 20:0//18:2_16:0 21:0//18:1_15:1	
				21:0//18:2_15:0 21:1//16:1_17:0 22:0//14:0_18:2	
				22:0//16:1_16:1 22:0//18:1_14:1 22:1//16:1_16:0	
				22:1//18:1_14:0 22:2//16:0_16:0 23:0//18:1_13:1	
				23:0//18:2_13:0 23:1//14:0_17:1 23:1//16:1_15:0	
				24:0//16:1_14:1 24:0//18:2_12:0 24:1//14:1_16:0	
				24:1//16:1_14:0 24:1//18:1_12:0 25:0//16:1_13:1	
				25:1//16:0_13:1 26:0//16:1_12:1 26:0//18:1_10:1	
				27:0//16:1_11:1 28:0//16:1_10:1 28:2//16:0_10:0	
				29:0//14:1_11:1 29:1//14:0_11:1 29:2//14:0_11:0	
30:2//14:0_10:0					
67.75	766.4	0.17	49:0	15:0//15:0_19:0 17:0//14:0_18:0 18:0//16:0_15:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				20:0//14:0_15:0 20:0//16:0_13:0 21:0//14:0_14:0	
				21:0//15:0_13:0 21:0//16:0_12:0 22:0//14:0_13:0	
				22:0//16:0_11:0 23:0//16:0_10:0	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby		
68.41	806.5	1.38	52:1	8:0//16:1_28:0	13:0//16:1_23:0	15:0//15:0_22:1	
				16:0//14:0_22:1	16:0//16:1_20:0	17:0//15:0_20:1	
				17:0//16:1_19:0	18:0//16:0_18:1	18:0//16:1_18:0	
				18:1//12:0_22:0	19:0//18:1_15:0	20:0//14:0_18:1	
				20:0//16:1_16:0	21:0//14:1_17:0	21:0//16:1_15:0	
				21:0//18:1_13:0	21:1//14:0_17:0	21:1//16:0_15:0	
				22:0//14:0_16:1	22:0//14:1_16:0	22:0//18:1_12:0	n-7; n-5;
				22:1//14:0_16:0	22:1//15:0_15:0	23:0//14:1_15:0	n-9
				23:0//16:1_13:0	23:0//18:1_11:0	24:0//14:0_14:1	
				24:0//16:1_12:0	24:0//18:1_10:0	24:1//14:0_14:0	
				24:1//15:0_13:0	25:0//14:0_13:1	25:0//16:1_11:0	
				25:0//18:1_9:0	25:1//14:0_13:0	26:0//12:0_14:1	
				26:0//14:0_12:1	27:0//13:0_12:1	27:0//14:0_11:1	
				27:0//15:0_10:1	28:0//14:0_10:1	29:0//13:0_10:1	
				68.59	832.5	0.55	54:2
17:0//18:2_19:0	20:0//16:1_18:1	20:0//18:2_16:0					
20:1//16:1_18:0	21:0//18:2_15:0	22:0//16:1_16:1	n-7; n-6;				
22:0//18:2_14:0	22:1//16:1_16:0	22:2//16:0_16:0	n-5; n-9;				
23:2//16:0_15:0	24:0//18:2_12:0	24:1//16:1_14:0	n-10;				
25:2//14:0_15:0	26:0//16:1_12:1	27:0//18:2_9:0	n-4; n-11				
27:2//16:0_11:0	28:0//16:1_10:1	28:2//16:0_10:0					
29:2//14:0_11:0	30:2//14:0_10:0						
68.95	872.6	0.16	57:3	22:1//16:1_19:1	22:2//16:1_19:0	23:0//16:1_18:2	_a
				29:2//16:1_12:0	30:2//16:1_11:0	31:2//16:1_10:0	
69.15	780.5	0.56	50:0	16:0//15:0_19:0	17:0//15:0_18:0	19:0//16:0_15:0	
				20:0//14:0_16:0	20:0//15:0_15:0	21:0//14:0_15:0	nasyčené
				21:0//16:0_13:0	22:0//13:0_15:0	22:0//14:0_14:0	diestery
				22:0//16:0_12:0	23:0//13:0_14:0	23:0//16:0_11:0	1,2-diolů
				26:0//14:0_10:0			

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
69.65	846.5	0.37	55:2	15:0//18:1_22:1	17:0//16:1_22:1	17:0//18:1_20:1	- ^a
				17:2//15:0_23:0	19:0//15:0_21:2	19:1//16:1_20:0	
				19:1//18:1_18:0	21:0//16:1_18:1	21:1//16:1_18:0	
				22:1//16:1_17:0	22:1//18:1_15:0	23:1//14:0_18:1	
				23:1//16:1_16:0	23:1//18:1_14:0	24:0//16:1_15:1	
				24:1//15:0_16:1	25:1//14:0_16:1	27:0//17:1_11:1	
				29:0//16:1_10:1	29:2//15:0_11:0	30:2//14:0_11:0	
69.71	872.6	0.20	57:3	29:0//10:1_18:2			- ^a
69.82	806.5	1.13	52:1	9:0//16:1_27:0	14:0//18:1_20:0	15:0//16:1_21:0	n-7; n-5; n-9; n-10
				16:0//14:0_22:1	16:0//16:0_20:1	16:0//16:1_20:0	
				16:0//18:1_18:0	17:0//14:0_21:1	17:0//14:1_21:0	
				17:0//16:1_19:0	18:0//14:0_20:1	18:0//16:1_18:0	
				18:0//18:1_16:0	19:0//16:1_17:0	19:0//18:1_15:0	
				19:1//14:0_19:0	20:0//14:0_18:1	20:0//16:1_16:0	
				21:0//16:1_15:0	22:0//14:0_16:1	22:0//16:0_14:1	
				22:0//18:1_12:0	22:1//12:0_18:0	22:1//14:0_16:0	
				23:0//16:0_13:1	23:0//16:1_13:0	24:0//16:1_12:0	
				24:1//14:0_14:0	26:0//14:0_12:1	26:0//16:1_10:0	
				27:0//14:0_11:1	27:0//16:1_9:0	28:0//12:0_12:1	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby		
70.28	846.5	1.43	55:2	17:0//16:1_22:1	17:0//18:1_20:1	17:0//18:2_20:0	
				18:0//16:1_21:1	18:0//18:2_19:0	19:0//16:1_20:1	
				19:0//18:1_18:1	21:0//18:1_16:1	21:0//18:2_16:0	
				21:1//16:1_18:0	21:1//18:1_16:0	22:0//15:0_18:2	
				22:0//18:1_15:1	22:0//18:2_15:0	22:1//16:1_17:0	
				22:1//17:1_16:0	22:1//18:1_15:0	23:0//16:0_16:2	n-7; n-5;
				23:0//16:1_16:1	23:0//18:1_14:1	23:0//18:2_14:0	n-6; n-9;
				23:1//16:1_16:0	23:1//18:1_14:0	24:0//16:1_15:1	n-10; n-4;
				24:1//16:1_15:0	24:2//15:0_16:0	25:0//16:1_14:1	n-8
				25:1//16:1_14:0	25:2//14:0_16:0	26:0//16:1_13:1	
				26:0//18:1_11:1	27:0//16:1_12:1	28:0//16:1_11:1	
				28:0//17:1_10:1	28:0//18:1_9:1	29:0//16:1_10:1	
				29:1//14:0_12:1	29:1//15:0_11:1	29:1//16:0_10:1	
				29:2//14:0_12:0	30:2//14:0_11:0		
				70.42	780.5	0.58	50:0
18:0//14:0_18:0	19:0//16:0_15:0	20:0//12:0_18:0					
20:0//14:0_16:0	20:0//15:0_15:0	21:0//14:0_15:0	nasyčené				
21:0//16:0_13:0	22:0//12:0_16:0	22:0//14:0_14:0	diestery				
22:0//15:0_13:0	23:0//14:0_13:0	23:0//15:0_12:0	1,2-diolů				
23:0//16:0_11:0	24:0//12:0_14:0						
25:0//14:0_11:0	25:0//15:0_10:0						

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby		
70.96	820.5	2.24	53:1	13:0//16:1_24:0	15:0//16:0_22:1	15:0//16:1_22:0	n-7; n-5; n-9
				15:0//18:1_20:0	17:0//14:0_22:1	17:0//15:0_21:1	
				17:0//16:0_20:1	17:0//16:1_20:0	17:0//18:1_18:0	
				17:1//16:0_20:0	19:0//14:0_20:1	19:0//16:1_18:0	
				19:0//18:1_16:0	19:1//15:0_19:0	19:1//16:0_18:0	
				20:0//13:0_20:1	20:0//16:1_17:0	20:0//18:1_15:0	
				20:1//15:0_18:0	21:0//14:0_18:1	21:0//16:1_16:0	
				21:0//17:1_15:0	21:1//14:0_18:0	22:0//14:0_17:1	
				22:0//14:1_17:0	22:0//16:1_15:0	22:0//18:1_13:0	
				22:1//14:0_17:0	22:1//15:0_16:0	23:1//14:0_16:0	
				23:0//14:0_16:1	23:0//18:1_12:0	23:1//15:0_15:0	
				23:1//16:0_14:0	24:0//15:0_14:1	24:0//16:1_13:0	
				24:0//18:1_11:0	24:1//14:0_15:0	24:1//16:0_13:0	
				25:0//14:0_14:1	25:0//15:0_13:1	25:0//16:0_12:1	
				25:0//16:1_12:0	25:0//18:1_10:0	25:1//14:0_14:0	
				25:1//16:0_12:0	26:0//14:0_13:1	26:0//15:0_12:1	
				26:0//18:1_9:0	26:1//14:0_13:0	27:0//14:0_12:1	
				27:0//15:0_11:1	27:0//16:0_10:1	27:0//16:1_10:0	
				28:0//13:0_12:1	28:0//14:0_11:1	28:0//15:0_10:1	
				29:0//14:0_10:1			
71.07	806.5	0.15	52:1	18:0//14:0_20:1	20:0//14:0_18:1	20:0//16:1_16:0	- ^a
				21:0//16:1_15:0	23:0//16:0_13:1	24:0//16:1_12:0	
				24:1//14:0_14:0	26:0//14:0_12:1		
71.07	846.5	0.54	55:2	17:0//16:0_22:2	17:0//16:1_22:1	17:0//18:2_20:0	- ^a
				20:0//18:2_17:0	21:0//18:2_16:0	21:1//16:1_18:0	
				22:0//18:1_15:1	22:0//18:2_15:0	22:1//16:1_17:0	
				23:0//18:2_14:0	23:1//16:1_16:0	23:2//15:0_17:0	
				24:1//16:1_15:0	24:2//16:0_15:0	26:1//14:0_15:1	
26:2//14:0_15:0	27:0//16:1_12:1	27:0//18:2_10:0					

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
71.33	886.6	0.63	58:3	18:0//18:1_22:2	18:2//18:1_22:0	19:0//18:1_21:2
				20:0//16:0_22:3	22:1//18:2_18:0	22:2//18:1_18:0
				24:0//18:1_16:2	24:1//16:1_18:1	24:1//18:2_16:0
				24:2//16:1_18:0	24:2//18:1_16:0	24:3//16:0_18:0
				25:0//18:2_15:1	25:1//18:1_15:1	25:3//16:0_17:0
				26:1//18:2_14:0	29:1//16:1_13:1	29:1//18:1_11:1
				29:2//18:1_11:0	30:2//18:1_10:0	31:1//16:1_11:1
				31:2//16:1_11:0	31:3//16:0_11:0	32:3//16:0_10:0
71.70	794.4	1.03	51:0	15:0//15:0_21:0	17:0//14:0_20:0	17:0//16:0_18:0
				18:0//16:0_17:0	19:0//15:0_17:0	19:0//16:0_16:0
				20:0//13:0_18:0	20:0//14:0_17:0	20:0//15:0_16:0
				21:0//14:0_16:0	21:0//15:0_15:0	22:0//14:0_15:0
				22:0//16:0_13:0	23:0//14:0_14:0	23:0//15:0_13:0
				23:0//16:0_12:0	24:0//15:0_12:0	25:0//14:0_12:0
				25:0//15:0_11:0	25:0//16:0_10:0	
71.80	780.5	0.21	50:0	16:0//16:0_18:0	17:0//14:0_19:0	20:0//14:0_16:0
				21:0//14:0_15:0	21:0//16:0_13:0	22:0//14:0_14:0
				22:0//16:0_12:0		
71.88	886.6	0.43	58:3	16:0//16:0_26:3	18:0//16:0_24:3	22:0//16:0_20:3
				24:1//18:2_16:0	25:3//16:0_17:0	26:0//18:2_14:1
				27:3//16:0_15:0	28:3//16:0_14:0	
71.98	860.6	0.71	56:2	14:2//16:0_26:0	17:0//20:1_19:1	18:1//18:1_20:0
				20:0//18:1_18:1	21:1//18:1_17:0	22:0//18:1_16:1
				22:1//18:1_16:0	23:0//18:1_15:1	23:1//18:1_15:0
				24:1//16:1_16:0	24:1//18:1_14:0	24:2//14:0_18:0
				25:0//18:1_13:1	27:0//18:1_11:1	28:1//14:0_14:1
28:2//16:0_12:0						

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
				15:0//16:0_22:1	15:0//16:1_22:0	16:0//16:0_21:1	
				17:0//14:0_22:1	17:0//16:0_20:1	17:0//16:1_20:0	
				18:0//17:1_18:0	19:0//14:0_20:1	19:0//18:1_16:0	
				20:0//16:1_17:0	20:0//17:1_16:0	20:0//18:1_15:0	
				21:0//14:0_18:1	21:0//15:0_17:1	21:0//16:1_16:0	
				22:0//14:1_17:0	22:0//16:0_15:1	22:0//16:1_15:0	
				22:0//17:1_14:0	22:0//18:1_13:0	22:1//14:0_17:0	
72.24	820.5	1.36	53:1	22:1//15:0_16:0	23:0//14:0_16:1	23:0//14:1_15:0	n-7; n-5; n-9
				23:0//15:0_15:1	23:0//18:1_12:0	23:1//14:0_15:0	
				23:1//16:0_14:0	24:0//18:1_11:0	24:1//14:0_15:0	
				25:0//14:0_14:1	25:0//18:1_10:0	26:0//15:0_12:1	
				26:0//16:1_11:0	26:0//18:1_9:0	26:1//16:0_11:0	
				27:0//16:1_10:0	27:1//14:0_12:0	28:0//14:0_11:1	
				28:0//15:0_10:1	28:0//16:0_9:1	28:0//16:1_9:0	
				29:0//14:0_10:1			

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
72.69	860.6	2.49	56:2	16:2//16:0_24:0	n-7; n-9; n-4; n-10; n-6; n-11
				17:0//18:1_21:1	
				18:0//18:2_20:0	
				19:0//16:1_21:1	
				20:0//16:1_20:1	
				20:0//18:1_18:1	
				20:0//20:1_16:1	
				20:0//20:2_16:0	
				21:0//18:1_17:1	
				22:0//16:1_18:1	
				22:0//18:2_16:0	
				22:0//20:2_14:0	
				22:1//16:1_18:0	
				22:1//18:1_16:0	
				22:2//14:0_20:0	
				22:2//16:0_18:0	
				23:0//18:2_15:0	
23:1//18:1_15:0					
24:0//16:1_16:1					
24:0//18:1_14:1					
24:0//18:2_14:0					
24:1//16:1_16:0					
24:1//18:1_14:0					
24:2//16:0_16:0					
25:0//14:0_17:2					
25:0//16:0_15:2					
25:0//16:1_15:1					
25:0//18:1_13:1					
25:2//14:0_17:0					
25:2//16:0_15:0					
26:0//18:1_12:1					
26:1//14:0_16:1					
26:1//18:1_12:0					
27:0//16:1_13:1					
27:0//18:1_11:1					
27:1//16:0_13:1					
27:2//14:0_15:0					
27:2//16:0_13:0					
28:0//10:1_18:1					
28:0//16:1_12:1					
28:1//14:0_14:1					
28:1//16:0_12:1					
28:1//18:1_10:0					
28:2//16:0_12:0					
29:0//14:0_13:2					
29:0//17:1_10:1					
29:1//14:0_13:1					
29:2//16:0_11:0					
30:1//14:0_12:1					
30:1//16:0_10:1					
30:2//16:0_10:0					
31:2//14:0_11:0					
72.94	820.5	0.24	53:1	17:0//14:0_22:1	- ^a
				17:0//16:1_20:0	
				17:1//16:0_20:0	
				19:1//14:0_20:0	
				20:0//16:1_17:0	
				21:0//16:1_16:0	
21:1//16:0_16:0					
22:0//16:1_15:0					
22:1//16:0_15:0					
23:0//16:0_14:1					
23:0//16:1_14:0					
23:1//14:0_16:0					
26:0//15:0_12:1					
26:0//16:1_11:0					
27:0//16:0_10:1					
28:0//16:1_9:0					
72.97	834.5	0.20	54:1	19:0//18:1_17:0	- ^a
				20:0//18:1_16:0	
				21:0//18:1_15:0	
				21:1//15:0_18:0	
				22:0//18:1_14:0	
22:1//15:0_17:0					
22:1//16:0_16:0					
23:0//18:1_13:0					
23:1//16:0_15:0					
24:0//15:0_15:1					
24:1//14:0_16:0					
24:1//15:0_15:0					
26:1//14:0_14:0					

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
73.09	794.4	1.16	51:0	15:0//16:0_20:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				16:0//16:0_19:0	
				17:0//14:0_20:0	
				17:0//15:0_19:0	
				18:0//15:0_18:0	
				19:0//16:0_16:0	
				20:0//13:0_18:0	
				20:0//14:0_17:0	
20:0//16:0_15:0					
21:0//12:0_18:0	21:0//15:0_15:0	21:0//16:0_14:0			
22:0//15:0_14:0	22:0//16:0_13:0	23:0//14:0_14:0			
23:0//15:0_13:0	23:0//16:0_12:0	24:0//14:0_13:0			
24:0//15:0_12:0	25:0//14:0_12:0	25:0//15:0_11:0			
29:0//12:0_10:0					
73.24	860.6	1.62	56:2	14:2//16:0_26:0	- ^a
				18:0//16:0//22:0	
				19:0//16:0_21:2	
				20:0//18:2_18:0	
				20:0//20:2_16:0	
				21:1//16:0_19:1	
				22:0//16:1_18:1	
				22:0//18:2_16:0	
22:0//20:2_14:0					
22:1//18:1_16:0	22:2//16:0_18:0	23:1//18:1_15:0			
24:0//16:1_16:1	24:0//18:2_14:0	24:1//16:1_16:0			
24:1//18:1_14:0	24:2//16:0_16:0	25:0//16:1_15:1			
26:1//18:1_12:0	28:0//16:1_12:1	28:1//16:0_12:1			
28:2//16:0_12:0	30:1//16:0_10:1				
73.42	834.5	4.62	54:1	15:0//14:0_25:1	n-7; n-9; n-5
				15:0//16:1_23:0	
				16:0//16:1_22:0	
				16:0//18:1_20:0	
				17:0//18:1_19:0	
				18:0//16:1_20:0	
				19:0//14:0_21:1	
				19:0//15:0_20:1	
				19:0//16:1_19:0	
				19:0//18:1_17:0	
				19:1//15:0_20:0	
				19:1//16:0_19:0	
				20:0//14:0_20:1	
				20:0//16:1_18:0	
				20:0//18:1_16:0	
20:0//20:1_14:0					
21:0//14:0_19:1					
21:0//16:1_17:0					
21:0//18:1_15:0					
22:0//14:0_18:1	22:0//15:0_17:1				
22:0//16:0_16:1	22:0//20:1_12:0	22:1//14:0_18:0			
22:1//16:0_16:0	23:0//16:1_15:0	23:0//18:1_13:0			
23:1//16:0_15:0	24:0//14:0_16:1	24:1//14:0_16:0			
25:0//16:1_13:0	25:0//18:1_11:0	25:1//15:0_14:0			
26:0//14:0_14:1	26:0//16:1_12:0	26:0//18:1_10:0			
27:0//14:0_13:1	27:0//15:0_12:1	27:0//16:0_11:1			
27:0//16:1_11:0	28:0//14:0_12:1	28:0//15:0_11:1			
28:0//16:1_10:0	29:0//14:0_11:1	30:0//14:0_10:1			
30:1//14:0_10:0					

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
74.02	860.6	0.64	56:2	20:0//18:2_18:0 20:0//20:2_16:0 21:0//20:2_15:0	n-7; n-6; n-9; n-10; n-5; n-11
				22:0//16:1_18:1 22:0//18:2_16:0 22:0//20:2_14:0	
				22:1//16:1_18:0 22:1//18:1_16:0 23:0//18:2_15:0	
				24:0//16:1_16:1 24:0//18:2_14:0 24:1//16:1_16:0	
				24:1//18:1_14:0 24:2//16:0_16:0 25:0//18:2_13:0	
				25:1//16:0_15:1 25:2//16:0_15:0 26:0//18:1_12:1	
				26:0//18:2_12:0 26:1//18:1_12:0 27:0//16:1_13:1	
				27:0//18:2_11:0 27:1//16:0_13:1 27:2//14:0_15:0	
				27:2//16:0_13:0 28:0//16:1_12:1 28:0//18:2_10:0	
				28:1//18:1_10:0 28:2//16:0_12:0 29:0//16:1_11:1	
				29:0//18:2_9:0 29:1//16:0_11:1 29:2//16:0_11:0	
				30:1//16:0_10:1 30:2//16:0_10:0	
				74.26	
20:0//16:0_16:0 21:0//14:0_17:0 21:0//15:0_16:0					
22:0//14:0_16:0 22:0//15:0_15:0 22:0//17:0_13:0					
23:0//14:0_15:0 23:0//16:0_13:0 23:0//17:0_12:0					
24:0//14:0_14:0 24:0//15:0_13:0 24:0//16:0_12:0					
25:0//14:0_13:0 25:0//15:0_12:0 26:0//15:0_11:0					
26:0//16:0_10:0 27:0//15:0_10:0 28:0//15:0_9:0					
74.31	794.4	0.24	51:0	17:0//14:0_20:0 18:0//14:0_19:0 20:0//16:0_15:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				21:0//14:0_16:0 21:0//15:0_15:0 22:0//14:0_15:0	
				22:0//16:0_13:0 23:0//14:0_14:0 23:0//16:0_12:0	
				27:0//14:0_10:0	
74.31	874.6	0.34	57:2	22:1//16:1_19:0 22:1//18:1_17:0 23:1//18:1_16:0	- ^a
				24:1//16:1_17:0 24:1//17:1_16:0 24:1//18:1_15:0	
				24:1//18:1_15:0 28:0//18:1_11:1	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby		
74.86	834.5	2.72	54:1	16:0//18:1_20:0	17:0//15:0_22:1	17:0//16:0_21:1	
				17:0//16:1_21:0	17:0//17:1_20:0	17:0//18:1_19:0	
				18:0//16:1_20:0	18:0//18:1_18:0	19:0//14:0_21:1	
				19:0//16:1_19:0	19:0//18:1_17:0	19:1//16:0_19:0	
				20:0//14:0_20:1	20:0//16:0_18:1	20:0//16:1_18:0	
				20:0//17:1_17:0	20:1//16:0_18:0	21:0//14:0_19:1	
				21:0//16:0_17:1	21:0//16:1_17:0	21:0//18:1_15:0	
				22:0//16:0_16:1	22:0//17:1_15:0	22:0//18:1_14:0	
				22:0//20:1_12:0	22:1//14:0_18:0	22:1//16:0_16:0	
				23:0//14:0_17:1	23:0//16:0_15:1	23:0//16:1_15:0	n-7; n-9;
				23:0//18:1_13:0	23:1//16:0_15:0	24:0//14:0_16:1	n-5
				24:0//15:0_15:1	24:0//16:0_14:1	24:0//18:1_12:0	
				24:1//15:0_15:0	24:1//16:0_14:0	25:0//14:0_15:1	
				25:0//15:0_14:1	25:0//16:0_13:1	25:0//16:1_13:0	
				25:0//18:1_11:0	26:0//14:0_14:1	26:0//15:0_13:1	
				26:0//16:0_12:1	26:0//16:1_12:0	26:1//14:0_14:0	
				27:0//14:0_13:1	27:0//16:0_11:1	27:0//18:1_9:0	
				27:1//15:0_12:0	28:0//14:0_12:1	28:0//16:0_10:1	
				28:0//16:1_10:0	28:1//14:0_12:0	29:0//14:0_11:1	
				30:0//14:0_10:1			
75.14	874.6	1.58	57:2	17:0//18:1_22:1	18:0//17:1_22:1	19:0//16:1_22:1	
				21:0//16:1_20:1	21:1//16:1_20:0	22:0//18:2_17:0	
				22:1//18:1_17:0	23:0//16:1_18:1	23:1//18:1_16:0	n-7; n-9;
				24:0//18:2_15:0	24:1//16:1_17:0	24:1//18:1_15:0	n-5; n-10;
				25:1//20:1_12:0	27:0//16:1_14:1	27:0//17:1_13:1	n-4;
				27:0//18:1_12:1	27:2//16:0_14:0	28:0//16:1_13:1	n-8; n-6
				28:0//18:1_11:1	29:0//18:1_10:1	29:1//16:1_12:0	
				30:0//16:1_11:1	30:2//16:0_11:0	31:2//15:0_11:0	
				31:2//16:0_10:0			

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
75.60	808.5	2.01	52:0	16:0//16:0_20:0	17:0//16:0_19:0	20:0//14:0_18:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//15:0_17:0	20:0//16:0_16:0	21:0//14:0_17:0	
				21:0//16:0_15:0	22:0//13:0_17:0	22:0//15:0_15:0	
				22:0//16:0_14:0	23:0//14:0_15:0	23:0//16:0_13:0	
				24:0//16:0_12:0	25:0//14:0_13:0	25:0//15:0_12:0	
				25:0//16:0_11:0	26:0//16:0_10:0	27:0//14:0_11:0	
				27:0//16:0_9:0	28:0//14:0_10:0	28:0//15:0_9:0	
75.79	848.5	4.36	55:1	17:0//16:0_22:1	17:0//18:1_20:0	18:0//15:0_22:1	n-7; n-9; n-5
				18:0//16:1_21:0	18:0//18:1_19:0	19:0//14:0_22:1	
				19:0//15:0_21:1	19:0//16:0_20:1	19:0//16:1_20:0	
				19:0//17:0_19:1	20:0//15:0_20:1	20:0//18:1_17:0	
				21:0//16:1_18:0	21:0//18:1_16:0	21:0//20:1_14:0	
				22:0//14:0_19:1	22:0//16:0_17:1	22:0//16:1_17:0	
				22:0//18:1_15:0	22:0//20:1_13:0	22:1//15:0_18:0	
				22:1//16:0_17:0	23:0//16:1_16:0	23:0//18:1_14:0	
				23:1//14:0_18:0	23:1//16:0_16:0	24:0//14:0_17:1	
				24:0//15:0_16:1	24:0//18:1_13:0	24:1//14:0_17:0	
				24:1//15:0_16:0	25:0//15:0_15:1	25:0//16:0_14:1	
				25:1//14:0_16:0	25:1//15:0_15:0	26:0//14:0_15:1	
				26:0//15:0_14:1	26:0//16:0_13:1	26:0//17:0_12:1	
				26:0//18:1_11:0	26:1//14:0_15:0	27:0//13:0_15:1	
				27:0//14:0_14:1	27:0//15:0_13:1	27:0//16:0_12:1	
				27:0//16:1_12:0	27:0//18:1_10:0	27:1//15:0_13:0	
				28:0//14:0_13:1	28:0//15:0_12:1	28:0//16:0_11:1	
				28:1//15:0_12:0	29:0//14:0_12:1	29:0//15:0_11:1	
				29:0//16:1_10:0	29:1//15:0_11:0	30:0//14:0_11:1	
				30:0//15:0_10:1	31:0//13:0_11:1	31:0//14:0_10:1	
31:1//14:0_10:0							

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
75.87	834.5	0.60	54:1	13:0//16:0_25:1	15:0//18:1_21:0	16:0//18:1_20:0	- ^a
				17:0//16:1_21:0	17:0//18:1_19:0	17:1//16:0_21:0	
				18:0//16:1_20:0	19:0//16:1_19:0	20:0//16:0_18:1	
				20:0//16:1_18:0	21:0//16:1_17:0	21:0//18:1_15:0	
				22:0//16:0_16:1	22:0//18:1_14:0	22:1//14:0_18:0	
				22:1//16:0_16:0	23:0//16:0_15:1	23:0//16:1_15:0	
				23:1//16:0_15:0	24:0//16:1_14:0	24:1//16:0_14:0	
				25:0//18:1_11:0	26:0//16:0_12:1	26:1//16:0_12:0	
				27:0//16:0_11:1	28:0//16:0_10:1	30:0//14:0_10:1	
76.43	874.6	0.42	57:2	16:0//18:1_23:1	19:0//16:1_22:1	21:0//18:2_18:0	- ^a
				22:0//16:0_19:2	22:0//20:2_15:0	23:0//16:1_18:1	
				23:0//18:2_16:0	23:1//18:1_16:0	24:0//18:2_15:0	
				24:1//18:1_15:0	26:0//18:2_13:0	27:0//16:1_14:1	
				27:1//16:0_14:1	28:1//16:0_13:1	28:2//16:0_13:0	
				29:1//16:0_12:1	30:1//16:0_11:1	30:1//16:1_11:0	
				31:2//16:0_10:0			
76.66	888.6	0.37	58:2	18:2//16:0_24:0	22:1//18:1_18:0	24:1//18:1_16:0	- ^a
76.69	822.5	1.21	53:0	17:0//15:0_21:0	17:0//16:0_20:0	18:0//16:0_19:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//13:0_20:0	20:0//14:0_19:0	20:0//15:0_18:0	
				20:0//16:0_17:0	21:0//14:0_18:0	21:0//15:0_17:0	
				21:0//16:0_16:0	22:0//14:0_17:0	22:0//16:0_15:0	
				23:0//15:0_15:0	23:0//16:0_14:0	23:0//17:0_13:0	
				24:0//15:0_14:0	24:0//17:0_12:0	25:0//14:0_14:0	
				25:0//15:0_13:0	25:0//16:0_12:0	25:0//17:0_11:0	
				26:0//14:0_13:0	26:0//15:0_12:0	26:0//16:0_11:0	
27:0//14:0_12:0	27:0//15:0_11:0						
76.89	808.5	0.82	52:0	14:0//16:0_22:0	17:0//16:0_19:0	20:0//15:0_17:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//16:0_16:0	21:0//14:0_17:0	21:0//16:0_15:0	
				22:0//15:0_15:0	22:0//16:0_14:0	23:0//14:0_15:0	
				23:0//16:0_13:0	24:0//16:0_12:0	25:0//14:0_13:0	
				26:0//16:0_10:0	27:0//16:0_9:0		

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
77.11	848.5	4.33	55:1	16:0//16:1_23:0	n-7; n-9; n-5	
				16:0//18:1_21:0		
				17:0//18:1_20:0		18:0//16:1_21:0
				19:0//14:0_22:1		
				19:0//16:1_20:0		19:1//16:0_20:0
				20:0//18:1_17:0		
				21:0//16:0_18:1		21:0//16:1_18:0
				21:0//20:1_14:0		
				21:1//15:0_19:0		21:1//16:0_18:0
				22:0//14:0_19:1		
				22:0//16:0_17:1		22:0//16:1_17:0
				22:0//18:1_15:0		
				22:1//15:0_18:0		22:1//16:0_17:0
				23:0//16:0_16:1		
				23:0//17:1_15:0		23:0//18:1_14:0
				23:1//14:0_18:0		
				23:1//16:0_16:0		24:0//16:0_15:1
				24:0//16:1_15:0		
				24:0//18:1_13:0		24:1//14:0_17:0
				24:1//16:0_15:0		
25:0//14:0_16:1	25:0//16:0_14:1					
25:0//17:1_13:0						
25:0//18:1_12:0	26:0//15:0_14:1					
26:0//16:0_13:1						
26:0//18:1_11:0	26:1//14:0_15:0					
26:1//16:0_13:0						
27:0//14:0_14:1	27:0//15:0_13:1					
27:0//16:0_12:1						
27:0//17:1_11:0	27:0//18:1_10:0					
27:1//16:0_12:0						
28:0//14:0_13:1	28:0//15:0_12:1					
28:0//16:0_11:1						
28:1//15:0_12:0	29:0//14:0_12:1					
29:0//16:0_10:1						
29:1//16:0_10:0	30:0//14:0_11:1					
77.34	888.6	0.95	58:2	19:0//18:1_21:1	- ^a	
				19:0//18:2_21:0		
				20:0//18:2_20:0		
				22:0//16:1_20:1		22:0//18:1_18:1
				22:1//16:0_20:1		
23:0//18:2_17:0	24:0//20:2_14:0					
24:1//18:1_16:0						
26:0//18:1_14:1	27:0//18:1_13:1					
28:0//18:1_12:1						
28:0//20:1_10:1						

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
77.89	888.6	1.79	58:2	16:0//18:2_24:0	16:0//20:1_22:1	18:0//18:1_22:1	n-7; n-5; n-9; n-6; n-10
				18:2//14:0_26:0	19:0//18:1_21:1	19:0//18:2_21:0	
				19:0//20:2_19:0	20:0//18:1_20:1	20:0//18:2_20:0	
				21:0//14:0_23:2	21:2//16:0_11:0	22:0//16:1_20:1	
				22:0//18:1_18:1	22:0//18:2_18:0	22:0//20:2_16:0	
				22:1//16:0_20:1	22:1//16:1_20:0	22:1//18:1_18:0	
				22:2//16:0_20:0	23:0//18:2_17:0	23:1//18:1_17:0	
				24:0//16:0_18:2	24:0//18:1_16:1	24:0//20:2_14:0	
				24:1//16:1_18:0	24:1//18:1_16:0	24:1//20:1_14:0	
				24:2//14:0_20:0	25:0//18:1_15:1	25:0//20:1_13:1	
				25:1//16:0_17:1	25:2//16:0_17:0	26:0//16:0_16:2	
				26:0//18:1_14:1	26:0//20:1_12:1	26:1//18:1_14:0	
				26:2//16:0_16:0	27:0//14:0_17:2	27:0//18:1_13:1	
				27:0//20:1_11:1	27:1//16:0_15:1	28:0//16:1_14:1	
				28:0//18:1_12:1	28:0//20:1_10:1	28:1//16:0_14:1	
				28:1//18:1_12:0	28:2//16:0_14:0	29:0//16:1_13:1	
				29:0//18:1_11:1	29:1//16:0_13:1	29:1//18:1_11:0	
				29:2//16:0_13:0	30:0//16:0_12:2	30:0//16:1_12:1	
				30:0//18:1_10:1	30:1//14:0_14:1	30:1//16:0_12:1	
				30:2//14:0_14:0	30:2//16:0_12:0	31:0//16:1_11:1	
32:2//16:0_10:0							
77.96	822.5	2.44	53:0	16:0//16:0_21:0	17:0//16:0_20:0	18:0//15:0_20:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				19:0//14:0_20:0	20:0//14:0_19:0	20:0//15:0_18:0	
				20:0//16:0_17:0	21:0//14:0_18:0	21:0//15:0_17:0	
				21:0//16:0_16:0	22:0//13:0_18:0	22:0//14:0_17:0	
				22:0//16:0_15:0	23:0//15:0_15:0	23:0//16:0_14:0	
				23:0//17:0_13:0	24:0//15:0_14:0	24:0//16:0_13:0	
				24:0//17:0_12:0	25:0//15:0_13:0	25:0//17:0_11:0	
				26:0//14:0_13:0	26:0//15:0_12:0	26:0//16:0_11:0	
				27:0//14:0_12:0	27:0//15:0_11:0	27:0//16:0_10:0	
28:0//15:0_10:0	28:0//16:0_9:0						

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
78.03	848.5	0.24	55:1	16:0//18:1_21:0	17:0//18:1_20:0	19:0//16:1_20:0
				19:1//16:0_20:0	20:0//16:0_19:1	20:0//16:1_19:0
				21:0//16:0_18:1	22:0//16:1_17:0	22:0//18:1_15:0
				23:0//16:1_16:0	23:0//18:1_14:0	25:0//18:1_12:0
				26:0//16:0_13:1	27:0//15:0_13:1	27:0//16:0_12:1
				28:0//18:1_9:0		
78.09	862.6	3.43	56:1	17:0//17:0_22:1	17:0//18:1_21:0	18:0//16:0_22:1
				18:0//18:1_20:0	19:0//16:1_21:0	19:0//18:1_19:0
				20:0//14:0_22:1	20:0//16:1_20:0	20:0//18:1_18:0
				20:0//20:1_16:0	21:0//14:0_21:1	21:0//16:1_19:0
				21:0//18:1_17:0	21:0//20:1_15:0	22:0//14:0_20:1
				22:0//16:0_18:1	22:0//16:1_18:0	22:1//14:0_20:0
				22:1//16:0_18:0	23:0//14:0_19:1	23:0//16:0_17:1
				23:0//16:1_17:0	23:0//18:1_15:0	23:0//20:1_13:0
				23:1//15:0_18:0	24:0//16:1_16:0	24:0//18:1_14:0
				24:1//14:0_18:0	24:1//15:0_17:0	24:1//16:0_16:0
				25:0//14:0_17:1	25:0//16:0_15:1	25:0//16:1_15:0
				25:0//18:1_13:0	26:0//14:0_16:1	26:0//15:0_15:1
				26:0//16:0_14:1	26:0//18:1_12:0	27:0//14:0_15:1
				27:0//15:0_14:1	27:0//16:0_13:1	27:0//16:1_13:0
				27:0//18:1_11:0	28:0//14:0_14:1	28:0//16:0_12:1
				28:0//17:0_11:1	29:0//14:0_13:1	29:0//15:0_12:1
29:0//16:0_11:1	30:0//14:0_12:1	31:0//14:0_11:1				
79.07	836.5	0.93	54:0	17:0//15:0_22:0	17:0//17:0_20:0	19:0//15:0_20:0
				19:0//16:0_19:0	20:0//14:0_20:0	20:0//16:0_18:0
				20:0//17:0_17:0	21:0//14:0_19:0	21:0//15:0_18:0
				21:0//16:0_17:0	22:0//14:0_18:0	22:0//15:0_17:0
				22:0//16:0_16:0	23:0//14:0_17:0	23:0//16:0_15:0
				24:0//15:0_15:0	24:0//16:0_14:0	24:0//17:0_13:0
				25:0//15:0_14:0	26:0//15:0_13:0	26:0//17:0_11:0
				28:0//14:0_12:0	28:0//16:0_10:0	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
79.29	822.5	0.91	53:0	17:0//14:0_22:0	17:0//15:0_21:0	17:0//16:0_20:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				18:0//14:0_21:0	18:0//15:0_20:0	19:0//16:0_18:0	
				20:0//15:0_18:0	20:0//16:0_17:0	21:0//14:0_18:0	
				21:0//16:0_16:0	22:0//14:0_17:0	22:0//16:0_15:0	
				23:0//15:0_15:0	23:0//16:0_14:0	24:0//15:0_14:0	
				24:0//16:0_13:0	25:0//14:0_14:0	25:0//16:0_12:0	
				26:0//14:0_13:0	26:0//15:0_12:0	27:0//14:0_12:0	
79.38	862.6	7.36	56:1	16:1//16:0_24:0	19:0//16:0_21:1	19:0//16:1_21:0	n-7; n-9; n-5
				19:1//16:0_21:0	20:0//16:1_20:0	20:0//18:1_18:0	
				20:0//20:1_16:0	21:0//15:0_20:1	21:0//16:1_19:0	
				21:0//18:1_17:0	22:0//14:0_20:1	22:0//16:0_18:1	
				22:0//16:1_18:0	22:1//15:0_19:0	22:1//16:0_18:0	
				23:0//16:0_17:1	23:0//16:1_17:0	23:0//18:1_15:0	
				23:0//20:1_13:0	24:0//16:0_16:1	24:0//18:1_14:0	
				24:1//14:0_18:0	24:1//16:0_16:0	25:0//16:0_15:1	
				26:0//16:0_14:1	26:0//18:1_12:0	26:0//20:1_10:0	
				26:1//16:0_14:0	27:0//16:0_13:1	27:0//18:1_11:0	
				28:0//14:0_14:1	28:0//16:0_12:1	28:0//18:1_10:0	
				29:0//14:0_13:1	29:0//15:0_12:1	29:0//16:0_11:1	
29:1//14:0_13:0	30:0//16:0_10:1	31:0//14:0_11:1					
79.48	902.7	1.06	59:2	19:0//18:1_22:1	19:0//20:1_20:1	20:0//18:1_21:1	- ^a
				20:1//18:1_21:0	21:0//16:1_22:1	21:0//18:1_20:1	
				22:1//16:1_21:0	22:1//18:1_19:0	23:0//18:1_18:1	
				23:0//20:1_16:1	23:0//21:2_15:0	23:1//16:1_20:0	
				24:1//18:1_17:0	24:1//20:1_15:0	25:0//16:1_18:1	
				25:1//18:1_16:0	26:1//16:1_17:0	26:1//18:1_15:0	
				27:0//16:1_16:1	27:0//20:1_12:1	28:0//16:1_15:1	
				28:0//18:1_13:1	28:0//20:1_11:1	28:1//16:1_15:0	
				29:0//16:1_14:1	29:0//18:1_12:1	30:0//16:1_13:1	
				32:2//16:0_11:0	33:0//15:0_11:2	33:2//15:0_11:0	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
80.32	876.6	2.12	57:1	17:0//18:1_22:0	n-7; n-9; n-5
				19:0//16:0_22:1	
				19:0//18:1_20:0	
				20:0//15:1_22:0	
				20:0//16:1_21:0	
				20:0//17:1_20:0	
				21:0//16:1_20:0	
				21:0//18:1_18:0	
				21:0//20:1_16:0	
				22:0//14:0_21:1	
				22:0//15:0_20:1	
				22:0//16:0_19:1	
				22:0//16:1_19:0	
				22:0//18:1_17:0	
22:1//15:0_20:0					
22:1//16:0_19:0					
22:1//17:0_18:0					
23:0//16:0_18:1					
23:0//17:0_17:1					
23:0//20:1_14:0					
24:0//16:0_17:1					
24:0//17:0_16:1					
24:0//18:1_15:0					
24:0//20:1_13:0					
24:1//15:0_18:0					
24:1//16:0_17:0					
25:0//16:1_16:0					
25:0//18:1_14:0					
26:0//14:0_17:1					
26:0//15:0_16:1					
28:0//16:0_13:1					
28:1//16:0_13:0					
29:0//14:0_14:1					
29:0//16:0_12:1					
29:0//17:0_11:1					
29:0//18:1_10:0					
31:0//14:0_12:1					
32:0//14:0_11:1					
80.33	836.5	2.25	54:0	12:0//16:0_26:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				17:0//16:0_21:0	
				17:0//17:0_20:0	
				18:0//15:0_21:0	
				18:0//16:0_20:0	
				18:0//17:0_19:0	
				19:0//15:0_20:0	
				20:0//14:0_20:0	
				20:0//16:0_18:0	
				21:0//14:0_19:0	
21:0//15:0_18:0					
21:0//16:0_17:0					
22:0//14:0_18:0					
22:0//15:0_17:0					
22:0//16:0_16:0					
23:0//14:0_17:0					
23:0//16:0_15:0					
24:0//15:0_15:0					
24:0//16:0_14:0					
25:0//15:0_14:0					
25:0//16:0_13:0					
26:0//14:0_14:0					
26:0//18:0_10:0					
27:0//15:0_12:0					
27:0//16:0_11:0					
28:0//14:0_12:0					
28:0//15:0_11:0					
28:0//16:0_10:0					
29:0//14:0_11:0					
80.54	862.6	0.37	56:1	17:0//18:1_21:0	-a
				18:0//18:1_20:0	
				19:0//16:0_21:1	
				20:1//16:0_20:0	
				21:0//16:0_19:1	
				22:0//16:0_18:1	
				22:0//16:1_18:0	
				22:1//16:0_18:0	
23:0//16:1_17:0					
23:0//18:1_15:0					
23:1//16:0_17:0					
24:0//16:0_16:1					
24:0//18:1_14:0					
24:1//16:0_16:0					
25:0//16:0_15:1					
25:0//18:1_13:0					
26:0//16:0_14:1					
26:0//18:1_12:0					
26:1//16:0_14:0					
27:0//18:1_11:0					
28:0//16:0_12:1					
29:0//16:0_11:1					
30:1//16:0_10:0					

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby
81.28	916.5	0.11	60:2	22:0//20:1_18:1 22:0//22:1_16:1 22:1//16:1_22:0	-a
				23:0//16:1_21:1 23:1//16:1_21:0 24:0//18:1_18:1	
				24:0//20:1_16:1 24:1//16:1_20:0 24:1//18:1_18:0	
				24:1//20:1_16:0 25:0//18:1_17:1 26:1//18:1_16:0	
				27:0//18:1_15:1 27:1//20:1_13:0 28:0//20:1_12:1	
				30:0//16:1_14:1	
81.32	850.6	0.68	55:0	19:0//16:0_20:0 20:0//14:0_21:0 20:0//15:0_20:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				20:0//16:0_19:0 20:0//17:0_18:0 21:0//14:0_20:0	
				21:0//15:0_19:0 21:0//16:0_18:0 22:0//14:0_19:0	
				22:0//15:0_18:0 22:0//16:0_17:0 22:0//20:0_13:0	
				23:0//14:0_18:0 23:0//15:0_17:0 23:0//16:0_16:0	
				24:0//16:0_15:0 24:0//17:0_14:0 25:0//15:0_15:0	
81.54	876.6	3.99	57:1	26:0//14:0_15:0 27:0//14:0_14:0 27:0//15:0_13:0	n-7; n-9; n-5
				27:0//16:0_12:0 27:0//17:0_11:0 28:0//15:0_12:0	
				17:0//16:1_24:0 17:0//20:1_20:0 19:0//16:0_22:1	
				19:0//18:1_20:0 20:0//16:0_21:1 21:0//18:1_18:0	
				21:0//20:1_16:0 22:0//15:0_20:1 22:0//16:0_19:1	
				22:0//16:1_19:0 22:0//18:1_17:0 23:0//16:0_18:1	
				23:0//16:1_18:0 23:0//20:1_14:0 24:0//14:0_19:1	
				24:0//16:1_17:0 24:0//18:1_15:0 25:0//16:1_16:0	
				25:0//18:1_14:0 25:1//16:0_16:0 26:0//16:0_15:1	
				26:0//18:1_13:0 27:0//16:0_14:1 27:0//18:1_12:0	
81.60	836.5	1.43	54:0	28:0//14:0_15:1 28:0//16:0_13:1 28:0//18:1_11:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				29:0//16:0_12:1 29:0//18:1_10:0 29:1//16:0_12:0	
				30:0//16:0_11:1 31:0//16:0_10:1	
				19:0//15:0_20:0 20:0//16:0_18:0 21:0//15:0_18:0	
				21:0//16:0_17:0 22:0//14:0_18:0 22:0//15:0_17:0	
				22:0//16:0_16:0 23:0//16:0_15:0 24:0//15:0_15:0	
24:0//16:0_14:0 25:0//16:0_13:0 25:0//18:0_11:0					
26:0//14:0_14:0 26:0//15:0_13:0 26:0//16:0_12:0					
27:0//16:0_11:0 28:0//16:0_10:0					

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
82.58	890.6	1.48	58:1	19:0//18:1_21:0	20:0//16:0_22:1	20:0//16:1_22:0	n-7; n-9; n-5
				20:0//18:1_20:0	20:0//20:1_18:0	21:0//16:0_21:1	
				21:0//16:1_21:0	21:0//18:1_19:0	21:0//20:1_17:0	
				22:0//16:0_20:1	22:0//16:1_20:0	22:0//18:1_18:0	
				22:1//15:0_21:0	22:1//16:0_20:0	22:1//17:0_19:0	
				23:0//16:1_19:0	23:0//18:1_17:0	23:0//20:1_15:0	
				24:0//16:0_18:1	24:0//16:1_18:0	24:0//20:1_14:0	
				24:1//16:0_18:0	24:1//17:0_17:0	24:1//20:0_14:0	
				25:0//16:0_17:1	25:0//16:1_17:0	25:0//18:1_15:0	
				26:0//18:1_14:0	26:0//20:0_12:1	26:1//16:0_16:0	
				27:0//16:1_15:0	28:0//16:1_14:0	29:0//14:0_15:1	
				29:0//16:0_13:1	30:0//14:0_14:1	30:0//16:0_12:1	
				30:0//16:1_12:0	30:1//16:0_12:0	32:0//14:0_12:1	
				82.59	850.6	1.43	
20:0//15:0_20:0	20:0//16:0_19:0	21:0//14:0_20:0					
21:0//15:0_19:0	21:0//16:0_18:0	22:0//14:0_19:0					
22:0//15:0_18:0	22:0//16:0_17:0	23:0//14:0_18:0					
23:0//16:0_16:0	23:0//17:0_15:0	24:0//16:0_15:0					
24:0//17:0_14:0	25:0//16:0_14:0	26:0//15:0_14:0					
26:0//16:0_13:0	26:0//17:0_12:0	27:0//16:0_12:0					
27:0//17:0_11:0	27:0//18:0_10:0	28:0//15:0_12:0					
28:0//16:0_11:0	29:0//16:0_10:0	30:0//14:0_11:0					
82.71	876.6	0.15	57:1	17:0//16:0_24:1	19:0//16:0_22:1	19:0//18:1_20:0	- ^a
				22:0//18:1_17:0	23:0//16:0_18:1	23:1//16:0_18:0	
				24:0//16:0_17:1	24:1//16:0_17:0	26:0//16:0_15:1	
				27:0//16:0_14:1	28:0//16:0_13:1	30:0//16:0_11:1	
82.89	836.5	0.11	54:0	22:0//16:0_16:0			nasycené diestery 1,2-diolů
83.39	930.7	0.17	61:2	19:0//18:1_24:1	24:1//18:1_19:0		- ^a

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
83.55	864.6	0.30	56:0	17:0//16:0_23:0	20:0//16:0_20:0	21:0//16:0_19:0
				22:0//14:0_20:0	22:0//16:0_18:0	23:0//16:0_17:0
				23:0//18:0_15:0	24:0//16:0_16:0	24:0//18:0_14:0
				25:0//16:0_15:0	25:0//18:0_13:0	26:0//16:0_14:0
				27:0//16:0_13:0	27:0//18:0_11:0	28:0//16:0_12:0
				28:0//18:0_10:0	29:0//16:0_11:0	30:0//16:0_10:0
83.57	890.6	1.46	58:1	14:0//16:0_28:1	16:0//16:0_26:1	16:0//18:1_24:0
				19:0//18:1_21:0	20:0//18:1_20:0	20:0//20:1_18:0
				21:0//20:1_17:0	22:0//16:0_20:1	22:0//16:1_20:0
				22:0//18:1_18:0	22:1//15:0_21:0	22:1//16:0_20:0
				23:0//18:1_17:0	23:0//20:1_15:0	24:0//16:0_18:1
				24:0//16:1_18:0	24:0//20:1_14:0	24:1//14:0_20:0
				24:1//16:0_18:0	25:0//16:0_17:1	25:0//18:1_15:0
				26:0//16:0_16:1	26:0//20:1_12:0	26:1//16:0_16:0
				27:0//16:0_15:1	27:0//20:1_11:0	28:0//16:0_14:1
				28:0//18:1_12:0	28:0//20:1_10:0	28:1//16:0_14:0
				29:0//16:0_13:1	30:0//16:0_12:1	31:0//15:0_12:1
				31:0//16:0_11:1	32:1//16:0_10:0	
83.77	850.6	0.56	55:0	16:0//16:0_23:0	20:0//14:0_21:0	20:0//18:0_17:0
				21:0//16:0_18:0	22:0//15:0_18:0	22:0//16:0_17:0
				23:0//14:0_18:0	23:0//15:0_17:0	23:0//16:0_16:0
				24:0//16:0_15:0	25:0//16:0_14:0	25:0//17:0_13:0
				27:0//16:0_12:0	28:0//16:0_11:0	29:0//16:0_10:0

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
84.66	904.7	0.77	59:1	16:0//18:1_25:0	17:0//21:0_21:1	18:0//18:1_23:0
				19:0//18:1_22:0	20:0//16:1_23:0	20:0//18:1_21:0
				20:0//20:1_19:0	21:0//16:1_22:0	21:0//18:1_20:0
				21:0//20:1_18:0	22:0//16:1_21:0	22:0//18:1_19:0
				22:0//20:1_17:0	22:1//16:0_21:0	22:1//17:0_20:0
				23:0//16:0_20:1	23:0//16:1_20:0	23:0//18:1_18:0
				23:0//21:0_15:1	24:0//18:1_17:0	24:0//20:1_15:0
				24:0//21:0_14:1	24:1//15:0_20:0	24:1//16:0_19:0
				25:0//18:1_16:0	27:1//16:0_16:0	28:1//16:0_15:0
				30:0//16:0_13:1	30:0//16:1_13:0	30:0//18:1_11:0
84.79	864.6	0.86	56:0	16:0//16:0_24:0	18:0//16:0_22:0	19:0//16:0_21:0
				20:0//14:0_22:0	20:0//15:0_21:0	20:0//16:0_20:0
				20:0//18:0_18:0	21:0//14:0_21:0	21:0//16:0_19:0
				21:0//20:0_15:0	22:0//14:0_20:0	22:0//15:0_19:0
				22:0//16:0_18:0	23:0//14:0_19:0	23:0//15:0_18:0
				23:0//16:0_17:0	23:0//18:0_15:0	24:0//15:0_17:0
				24:0//16:0_16:0	24:0//18:0_14:0	25:0//14:0_17:0
				25:0//16:0_15:0	26:0//16:0_14:0	28:0//14:0_14:0
84.81	890.6	0.28	58:1	21:0//20:1_17:0	22:0//18:1_18:0	22:1//16:0_20:0
				24:0//16:0_18:1	24:1//16:0_18:0	27:0//16:0_15:1
				28:0//16:0_14:1	29:0//16:0_13:1	
85.29	944.7	0.38	62:2	22:1//18:1_22:0	24:1//16:1_22:0	24:1//18:1_20:0
85.55	904.7	0.67	59:1	20:0//18:1_21:0	21:0//16:0_22:1	22:0//16:0_21:1
				22:1//16:0_21:0	23:0//18:1_18:0	23:0//20:1_16:0
				23:1//16:0_20:0	24:0//20:1_15:0	25:0//18:1_16:0
				28:0//16:0_15:1	28:0//20:1_11:0	30:0//16:0_13:1

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
85.68	878.6	0.49	57:0	19:0//16:0_22:0	20:0//14:0_23:0	20:0//15:0_22:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//16:0_21:0	20:0//20:0_17:0	21:0//14:0_22:0	
				21:0//15:0_21:0	21:0//16:0_20:0	22:0//14:0_21:0	
				22:0//15:0_20:0	22:0//16:0_19:0	23:0//14:0_20:0	
				23:0//15:0_19:0	23:0//16:0_18:0	24:0//14:0_19:0	
				24:0//15:0_18:0	24:0//16:0_17:0	24:0//21:0_12:0	
				25:0//14:0_18:0	25:0//15:0_17:0	26:0//14:0_17:0	
				27:0//16:0_14:0	27:0//20:0_10:0	28:0//15:0_14:0	
85.99	864.6	0.54	56:0	17:0//16:0_23:0	20:0//16:0_20:0	21:0//16:0_19:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				22:0//14:0_20:0	22:0//16:0_18:0	23:0//16:0_17:0	
				23:0//18:0_15:0	24:0//16:0_16:0	24:0//18:0_14:0	
				25:0//16:0_15:0	25:0//18:0_13:0	26:0//16:0_14:0	
				27:0//16:0_13:0	27:0//18:0_11:0	28:0//16:0_12:0	
				28:0//18:0_10:0	29:0//16:0_11:0	30:0//16:0_10:0	
86.31	918.7	0.21	60:1	22:1//22:0_16:0	24:1//20:0_16:0	25:0//17:0_18:1	- ^a
86.71	918.7	0.45	60:1	20:0//16:1_24:0	20:0//18:1_22:0	21:0//16:1_23:0	n-7; n-9; n-5; n-10; n-4
				21:0//18:1_21:0	22:0//16:1_22:0	22:0//18:1_20:0	
				22:1//22:0_16:0	23:0//16:1_21:0	23:0//22:0_15:1	
				24:0//16:1_20:0	24:0//18:1_18:0	24:1//20:0_16:0	
				25:0//16:1_19:0	25:0//18:1_17:0	26:0//16:1_18:0	
				26:0//20:0_14:1	27:0//20:1_13:0	28:0//16:0_16:1	
				30:0//16:0_14:1	31:1//16:0_13:0		
86.86	878.6	0.56	57:0	19:0//16:0_22:0	20:0//14:0_23:0	20:0//15:0_22:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//16:0_21:0	21:0//14:0_22:0	21:0//16:0_20:0	
				22:0//14:0_21:0	22:0//16:0_19:0	22:0//20:0_15:0	
				23:0//14:0_20:0	23:0//15:0_19:0	23:0//16:0_18:0	
				24:0//16:0_17:0	24:0//18:0_15:0	24:0//21:0_12:0	
				25:0//16:0_16:0	27:0//16:0_14:0	28:0//15:0_14:0	
				28:0//16:0_13:0	29:0//14:0_14:0	31:0//15:0_11:0	

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-diestery diolů			Pozice dvojně vazby
87.44	918.7	0.42	60:1	22:0//22:1_16:0	22:1//22:0_16:0	23:0//22:1_15:0	n-7 ; n-9; n-5; n-10
				24:0//22:1_14:0	24:0//20:1_16:0	24:1//20:0_16:0	
				24:1//20:0_16:0	25:0//22:1_13:0	27:0//20:1_13:0	
				28:0//16:0_16:1	30:0//16:0_14:1	31:1//16:0_13:0	
87.62	892.7	0.50	58:0	20:0//14:0_24:0	20:0//15:0_23:0	20:0//16:0_22:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				21:0//14:0_23:0	21:0//15:0_22:0	21:0//16:0_21:0	
				22:0//14:0_22:0	22:0//15:0_21:0	22:0//16:0_20:0	
				23:0//14:0_21:0	23:0//15:0_20:0	24:0//14:0_20:0	
				25:0//15:0_18:0	25:0//16:0_17:0	27:0//14:0_17:0	
88.15	878.6	0.22	57:0	20:0//16:0_21:0	21:0//16:0_20:0	22:0//15:0_20:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				22:0//16:0_19:0	23:0//16:0_18:0	24:0//16:0_17:0	
				24:0//18:0_15:0	25:0//15:0_17:0	25:0//16:0_16:0	
				26:0//18:0_13:0	28:0//16:0_13:0	30:0//16:0_11:0	
				31:0//16:0_10:0			
88.70	932.6	0.32	61:1	20:0//16:1_25:0	20:0//18:1_23:0	21:0//16:1_24:0	n-7; n-5; n-9; n-4; n-10
				21:0//18:1_22:0	22:0//16:1_23:0	22:0//18:1_21:0	
				23:0//16:1_22:0	26:0//16:1_19:0	27:0//18:1_16:0	
				27:1//16:0_18:0	29:0//16:1_16:0	29:0//18:1_14:0	
				29:0//21:0_11:1	30:0//18:1_13:0	32:0//16:1_13:0	
88.99	892.7	0.65	58:0	16:0//16:0_26:0	16:0//20:0_22:0	18:0//16:0_24:0	nasycené diestery 1,2-diolů
				20:0//14:0_24:0	20:0//16:0_22:0	20:0//20:0_18:0	
				21:0//16:0_21:0	21:0//22:0_15:0	22:0//14:0_22:0	
				22:0//15:0_21:0	22:0//16:0_20:0	23:0//14:0_21:0	
				23:0//16:0_19:0	23:0//20:0_15:0	24:0//14:0_20:0	
				24:0//16:0_18:0	25:0//16:0_17:0	25:0//20:0_13:0	
				26:0//15:0_17:0	26:0//16:0_16:0	27:0//16:0_15:0	
				27:0//20:0_11:0	28:0//20:0_10:0	29:0//14:0_15:0	
29:0//16:0_13:0	32:0//14:0_12:0						
89.27	932.6	0.16	61:1	20:0//16:1_25:0	24:1//16:0_21:0	27:1//16:0_18:0	n-7 ; n-5

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojný vazby			
89.55	906.7	0.43	59:0	20:0//14:0_25:0	20:0//15:0_24:0	20:0//22:0_17:0		
				21:0//14:0_24:0	21:0//15:0_23:0	21:0//16:0_22:0		
				22:0//14:0_23:0	22:0//15:0_22:0	22:0//16:0_21:0		
				23:0//14:0_22:0	23:0//15:0_21:0	23:0//16:0_20:0		
				24:0//14:0_21:0	24:0//15:0_20:0	26:0//16:0_17:0		
				27:0//16:0_16:0	30:0//15:0_14:0	31:0//14:0_14:0	nasyčené diestery 1,2-diolů	
89.97	946.7	0.13	62:1	20:0//18:1_24:0	22:1//14:0_26:0	23:1//14:0_25:0		n-7; n-5; n-9
				24:1//14:0_24:0	30:1//14:0_18:0			
90.17	892.7	0.18	58:0	20:0//16:0_22:0	22:0//16:0_20:0	24:0//16:0_18:0		nasyčené diestery 1,2-diolů
				25:0//16:0_17:0	26:0//16:0_16:0	29:0//16:0_13:0		
				31:0//16:0_11:0				
90.60	946.7	0.41	62:1	19:0//18:1_25:0	20:0//16:1_26:0	20:0//18:1_24:0	n-7; n-9; n-5; n-8	
				21:0//18:1_23:0	22:0//16:1_24:0	22:0//18:1_22:0		
				22:1//14:0_26:0	22:1//16:0_24:0	23:0//16:1_23:0		
				23:0//18:1_21:0	23:1//14:0_25:0	23:1//16:0_23:0		
				24:0//16:1_22:0	24:0//18:1_20:0	24:0//24:1_14:0		
				24:1//14:0_24:0	24:1//16:0_22:0	26:0//18:1_18:0		
				27:0//18:1_17:0	28:0//16:1_18:0	28:1//16:0_18:0		
				29:0//16:0_17:1	29:0//18:1_15:0	30:1//14:0_18:0		
	31:0//16:0_15:1	31:0//16:1_15:0						
90.78	906.7	0.55	59:0	17:0//21:0_21:0	19:0//16:0_24:0	20:0//14:0_25:0	nasyčené diestery 1,2-diolů	
				20:0//15:0_24:0	20:0//16:0_23:0	21:0//14:0_24:0		
				21:0//15:0_23:0	21:0//16:0_22:0	22:0//14:0_23:0		
				22:0//15:0_22:0	22:0//16:0_21:0	23:0//14:0_22:0		
				23:0//16:0_20:0	24:0//16:0_19:0	24:0//21:0_14:0		
	25:0//16:0_18:0	26:0//16:0_17:0	29:0//15:0_15:0					
91.15	946.7	0.19	62:1	22:1//16:0_24:0	23:1//16:0_23:0	24:1//16:0_22:0	n-7; n-5; n-9; n-6	
				31:0//15:1_16:0				

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů			Pozice dvojně vazby
91.40	920.7	0.46	60:0	20:0//14:0_26:0	20:0//15:0_25:0	20:0//22:0_18:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				20:0//24:0_16:0	21:0//14:0_25:0	22:0//14:0_24:0	
				22:0//15:0_23:0	22:0//16:0_22:0	23:0//14:0_23:0	
				23:0//16:0_21:0	24:0//14:0_22:0	24:0//15:0_21:0	
				24:0//16:0_20:0	27:0//16:0_17:0	28:0//16:0_16:0	
				29:0//14:0_17:0			
91.80	906.7	0.04	59:0	20:0//16:0_23:0	22:0//16:0_21:0		nasyčené diestery 1,2-diolů
92.83	920.7	0.39	60:0	20:0//14:0_26:0	20:0//16:0_24:0	21:0//14:0_25:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				21:0//16:0_23:0	22:0//14:0_24:0	22:0//15:0_23:0	
				22:0//16:0_22:0	23:0//14:0_23:0	23:0//15:0_22:0	
				23:0//16:0_21:0	24:0//16:0_20:0	24:0//22:0_14:0	
				26:0//16:0_18:0	27:0//16:0_17:0	27:0//22:0_11:0	
				29:0//16:0_15:0	30:0//14:0_16:0	32:0//16:0_12:0	
93.26	934.6	0.41	61:0	20:0//14:0_27:0	20:0//15:0_26:0	20:0//16:0_25:0	nasyčené diestery 1,2-diolů
				21:0//14:0_26:0	21:0//16:0_24:0	22:0//14:0_25:0	
				22:0//15:0_24:0	22:0//16:0_23:0	23:0//14:0_24:0	
				23:0//16:0_22:0	24:0//14:0_23:0	24:0//16:0_21:0	
				26:0//16:0_19:0	27:0//14:0_20:0	27:0//15:0_19:0	
				28:0//14:0_19:0	32:0//14:0_15:0		
93.86	920.7	0.09	60:0	22:0//16:0_22:0			nasyčené diestery 1,2-diolů

Pokračování tabulky na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

t_r [min]	m/z [M+NH ₄] ⁺	Plocha píku [%]	CN:DB	Identifikované 1,2-distery diolů	Pozice dvojně vazby	
94.37	934.6	0.52	61:0	16:0//25:0_20:0	20:0//16:0_25:0	20:0//24:0_17:0
				21:0//14:0_26:0	21:0//16:0_24:0	22:0//14:0_25:0
				22:0//16:0_23:0	22:0//24:0_15:0	23:0//14:0_24:0
				23:0//16:0_22:0	24:0//14:0_23:0	24:0//16:0_21:0
				27:0//16:0_18:0	28:0//16:0_17:0	30:0//16:0_15:0
94.96	948.7	0.37	62:0	32:0//15:0_14:0	32:0//16:0_13:0	33:0//16:0_12:0
				20:0//14:0_28:0	21:0//15:0_26:0	21:0//16:0_25:0
				22:0//14:0_26:0	22:0//15:0_25:0	22:0//16:0_24:0
				23:0//14:0_25:0	23:0//15:0_24:0	24:0//14:0_24:0
				24:0//15:0_23:0	24:0//16:0_22:0	31:0//15:0_16:0
96.10	948.7	0.50	62:0	34:0//14:0_14:0	20:0//16:0_26:0	21:0//16:0_25:0
				22:0//15:0_25:0	22:0//16:0_24:0	23:0//16:0_23:0
				23:0//24:0_15:0	24:0//16:0_22:0	24:0//24:0_14:0
				26:0//16:0_20:0	26:0//24:0_12:0	27:0//24:0_11:0
				28:0//16:0_18:0	29:0//16:0_17:0	30:0//16:0_16:0
96.67	962.7	0.25	63:0	32:0//15:0_15:0	32:0//16:0_14:0	21:0//14:0_28:0
				21:0//14:0_28:0	21:0//16:0_26:0	21:0//17:0_25:0
				22:0//14:0_27:0	22:0//15:0_26:0	22:0//16:0_25:0
				23:0//14:0_26:0	23:0//15:0_25:0	24:0//15:0_24:0
				29:0//14:0_20:0	30:0//14:0_19:0	
97.80	962.7	0.40	63:0	20:0//16:0_27:0	20:0//18:0_25:0	21:0//16:0_26:0
				22:0//16:0_25:0	23:0//16:0_24:0	24:0//14:0_25:0
				24:0//15:0_24:0	24:0//16:0_23:0	27:0//16:0_20:0
				28:0//16:0_19:0		
99.30	976.7	0.30	64:0	21:0//16:0_27:0	22:0//16:0_26:0	23:0//16:0_25:0
				24:0//16:0_24:0	26:0//16:0_22:0	28:0//16:0_20:0
				29:0//16:0_19:0	30:0//16:0_18:0	33:0//15:0_16:0

^a Polohu dvojně vazby nebylo možno vyhodnotit