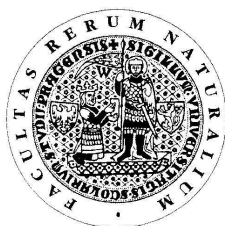


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Petra Lacinová

# **Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin v krevní plazmě**

Determination of non-esterified fatty acids in plasma

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Konzultant: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Praha 2014

## 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 vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. srpna 2014.

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Evě Tvrzické, CSc. za poskytnutí cenných informací a rad při zpracování této diplomové práce, za vedení při měření analytických dat použitých a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za pomoc při zpracování této diplomové práce.

## Obsah

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>5</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
2.1 TRANSPORT NEESTERIFIKOVANÝCH MASTNÝCH KYSELIN .....	11
2.2 ROZDĚLENÍ A NÁZVOSLOVÍ MASTNÝCH KYSELIN .....	13
2.3 SYNTÉZA A METABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN .....	16
2.4 FUNKCE MASTNÝCH KYSELIN V ORGANISMU.....	17
2.4 STANOVENÍ NEESTERIFIKOVANÝCH MASTNÝCH KYSELIN .....	20
2.4.1 <i>Izolace</i> .....	21
2.4.2 <i>Stanovení celkových neesterifikovaných mastných kyselin</i> .....	23
2.4.3 <i>Derivatizace</i> .....	23
2.4.4 <i>Plynová chromatografie – identifikace a kvantifikace</i> .....	24
<b>3 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>28</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>29</b>
4.1 REAGENCIE A LABORATORNÍ VYBAVENÍ .....	29
4.1 IZOLACE .....	29
4.1.1 <i>Extrakční metoda</i> .....	30
4.1.2 <i>Izolace tenkovrstvou kapalinovou chromatografií</i> .....	31
4.2 STANOVENÍ PROFILU MASTNÝCH KYSELIN PLYNOVOU CHROMATOGRafiÍ	32
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>35</b>
5.1 ÚPRAVA LABORATORNÍHO PROCESU .....	35
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>53</b>

## Abstrakt

Stanovení celkové koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (nonesterified fatty acids, NEFA) v plazmě patří mezi rutinní biochemické vyšetřovací metody. Pro detailnější metabolické studie je třeba i stanovení jejich profilu, tj. identifikace a kvantifikace jednotlivých složek. Stanovení profilu NEFA se běžně provádí kapilární plynovou chromatografií, není však ujednocen způsob jejich izolace od ostatních plazmatických lipidů. To lze provést buď extrakcí, nebo preparativní tenkovrstevnou chromatografií. Cílem předkládané práce bylo srovnat obě separační techniky.

Vzorky směsné krevní plazmy od dobrovolných dárců byly analyzovány kapilární plynovou chromatografií po předchozí separaci tenkovrstevnou chromatografií a alternativně extrakcí kapalina-kapalina. Srovnání výsledků t-testem bylo provedeno jak pro absolutní koncentrace jednotlivých mastných kyselin, stanovené metodou vnitřního standardu (kyselina margarová), tak pro relativní zastoupení (Rel%).

Reprodukovatelnost výsledků byla výrazně lepší u extrakční metody než u metody TLC – hodnoty relativní směrodatné odchylky jednotlivých skupin FA podle nenasycenosti byly 4,3-11,3% vs. 8,6-33,8% pro relativní zastoupení (Rel%) a 16,5-25,5% vs. 15,4-47,4% pro absolutní koncentrace. U jednotlivých FA, které měly zastoupení větší než 0,1 Rel%, dosahovaly hodnoty RSD 4,5-47,8% vs. 9,5-52,5% pro relativní zastoupení (Rel%) a 14,0-42,0% vs. 14,3-48,2% pro absolutní koncentrace. Zastoupení jednotlivých FA i jejich skupin podle nenasycenosti, vyjádřených jako Rel% nebo jako absolutní koncentrace v  $\mu\text{mol/l}$ , se u obou metod lišilo, ve většině případů statisticky významně. Charakter změn byl shodný pro relativní i absolutní koncentrace. Pro studium biologických souborů je třeba používat pouze jednu z metod pro zachování kontinuity výsledků.

Klíčová slova: neesterifikované mastné kyseliny, chromatografie, extrakce

## Abstract

The determination of non-esterified fatty acids (NEFA) in plasma is possible by many routine biochemical methods. For more detailed metabolic studies it is required to analyse the fatty acid (FA) profile. The NEFA profile determination is usually performed by the capillary gas chromatography (GC), but the sample preparation is not uniform. NEFA may be isolated by the extraction process or by the preparative thin-layer chromatography (TLC). The aim of this study was to compare these two separation procedures.

The samples of pooled plasma from volunteer donors were analyzed by capillary GC after previous separation procedure by the TLC and the liquid-liquid extraction. The results were compared by the t-test for both the absolute concentration of individual FA provided by the internal standard (margaric acid) method and the relative abundance (Rel%).

The reproducibility of the results was significantly better for the liquid-liquid extraction method than the TLC. The relative standard deviations (RSD) of the FA groups (unsaturated, monosaturated and polysaturated) were from 4.3 to 11.3 % vs. 8.6 to 33.8 % for the relative abundance and from 16.5 to 25.5% vs. 15.4 to 47.4% for the absolute concentration. For each FA, which were represented by more than 0.1 Rel %, RSD ranged from 4.5 to 47.8% vs. 9.5 to 52.5% for the relative abundance (Rel%) and from 14.0 to 42.0% vs. 14.3 to 48.2% for the absolute concentration. The concentrations (Rel% or absolute) of the individual FA and the groups, which were isolated by both methods, were significantly different in most cases. The character of changes was same for both relative and absolute concentrations. Finding of the study is that, for the biological files analysis, it is necessary to use one of the above described methods for maintaining continuity of results.

Keywords: non-esterified fatty acids, chromatography, extraction

## Seznam zkratek

FA	mastné kyseliny
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny
RSD	relativní výběrová směrodatná odchylka
SD	výběrová směrodatná odchylka
TAG	triacylglyceroly
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
FFA	volné mastné kyseliny
TLC	tenkovrstevná chromatografie
GC	plynová chromatografie
FID	plamenoionizační detektor
ECL	ekvivalent délky řetězce
MS	hmotnostní spektrometrie
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
VLDL	lipoproteinové částice o velmi nízké hustotě
LDL	lipoproteinové částice nízké hustotě
HDL	lipoproteinové částice vysoké hustotě
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
SFA	nasycené mastné kyseliny
CN	uhlíkové číslo
ATP	adenosin trifosfát
ACP	protein přenášející acyl
AI	aterogéní index
TI	trombogéní index
SPE	extrakce na pevné fázi
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CoA	koenzym A
UV	ultrafialové
AS	autosampler
L <sub>1,2</sub>	interval spolehlivosti
EXT	extrakce
MET	metoda
MED	medián
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
MCFA	mastné kyseliny se středním řetězcem
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem

## 1 Úvod

Mastné kyseliny (fatty acids, FA) jsou důležitou složkou všech organismů včetně živočichů, rostlin, hub a bakterií. Poprvé je isoloval francouzský chemik M. E. Chevreul v roce 1818. V lidském těle se vyskytují ve formách neesterifikovaných (nonesterified fatty acids, NEFA), tj. volných (free fatty acids, FFA), nebo častěji v podobě esterů. Estery FA se dělí podle bazické složky na fosfolipidy, mono-, di-, tri-acylglyceroly a estery cholesterolu.

V lidském organismu se vyskytují FA s délkou řetězce s 2-36 atomy uhlíku. Mohou být nasycené nebo nenasycené s 1 až 6 dvojnými vazbami (mononenasycené až vícenenasycené FA). Z hlediska prostorového uspořádání se odlišují cis a trans isomery nenasycených FA. Většina nenasycených FA má dvojnou vazbu v poloze cis. Trans FA se vyskytují například ve ztužených tucích nebo mléčných produktech (1-3).

Mastné kyseliny jsou základní složkou tuků, kde tvoří estery s glycerolem, tzv. triacylglyceroly (TAG). Triacylglyceroly mohou být ukládány jako zásobní zdroj energie v tukové tkáni nebo se štěpí pomocí lipoproteinové lipázy v kapilárách a intracelulární hormon-senzitivní lipázou v tukové tkáni na NEFA a glycerol. Po rozštěpení tuků pomocí lipoproteinové lipázy jsou NEFA reesterifikovány v tukových buňkách a vznikají TAG. Po rozštěpení tuků hormon-senzitivní lipázou mohou být NEFA uvolněny do oběhu a využity jako zdroj energie (4).

Většinu FA si lidský organismus v případě nedostatečného příjmu potravou dovede syntetizovat z acetyl-CoA. Zdrojem acetyl-CoA je  $\beta$ -oxidace FA a glykolýza, a tím je metabolismus FA navázán na metabolismus sacharidů. Syntéza a následná úprava molekuly FA, tj. prodlužování řetězce a zavádění dvojných vazby, probíhá v cytosolu, v matici mitochondrií a v endoplazmatickém retikulu. Odbourávání FA, neboli  $\beta$ -oxidace, probíhá v matici mitochondrií (5).



Některé FA si organismus v případě nedostatku nedovede sám vytvořit a pak se jedná o tzv. esenciální FA. Esenciálními FA jsou především polyneenasycené FA (polyunsaturated fatty acid, PUFA), jejichž první dvojná vazba se vyskytuje na 3. nebo 6. atomu uhlíku od methylového konce. Esenciální mastné kyseliny mají v organismu řadu biologických funkcí, a proto musí být nezbytnou součástí každého jídelníčku. Hlavními zdroji esenciálních FA pro organismus jsou např. slunečnicový olej, mořské ryby, jádra sladkých mandlí, lněné semínko a další olejnatá semínka (1).

Profil FA v organismu má úzkou souvislost s celou řadou patologických stavů. Dnes je již dobře známo, že nadbytek satureovaných FA a trans-nenasycených FA přispívá k celé řadě onemocnění, které jsou souhrnně označovány jako metabolický syndrom. Některé FA mají atherogenní a trombogenní potenciál. Naopak cis-nenasycené mastné kyseliny mají pozitivní vliv na fyziologické funkce organismu, např. významně snižují riziko aterosklerózy a jejích komplikací. Můžeme se s nimi setkat i ve formě potravinových doplňků využívaných hlavně v prevenci kardiovaskulárních a metabolických onemocnění.

Při řešení řady studií z oboru biologie a moderní medicíny je nutné stanovit profil FA v biologických vzorcích, jako jsou např. sérum nebo tkáň. Často se profil FA stanovuje i v potravinách. Vedle stanovení jednotlivých lipidových tříd je často třeba analyzovat i profil NEFA. V současné době stanovení NEFA a ostatních lipidových tříd prochází velkým vývojem. Výzkumní pracovníci hledají nové postupy splňující nejen požadavky přesnosti, správnosti a reprodukovatelnosti výsledků, ale navíc tyto techniky musí být časově a finančně nenáročné a musí umožňovat stanovit co nejširší profil FA (1).

Cílem mé diplomové práce bylo porovnat dva různé způsoby izolace NEFA z krevní plazmy. Jedná se o metody tenkovrstevné chromatografie (thin layer chromatography, TLC) a rozdělovací extrakci (liquid-liquid extraction, LLE). Po izolaci NEFA ze vzorku byly jednotlivé FA stanoveny pomocí plynové chromatografie (gas chromatography, GC) s plamenoionizačním detektorem

(flame ionization detector, FID). U jednotlivých NEFA byla hodnocena přesnost a reprodukovatelnost výsledků vzhledem ke způsobu izolace.

## 2 Teoretická část

V teoretické části práce jsem se zaměřila na podrobný popis transportu, struktury, názvosloví a metabolismu NEFA vyskytujících se v lidském organismu. Dále je uvedeno jejich rozdělení do skupin a je rozebrán jejich vliv na organismus. Následující část práce se zabývá způsoby stanovení FA. Jednotlivé způsoby izolace FA jsou navzájem porovnány a jsou uvedeny jejich výhody a nevýhody.

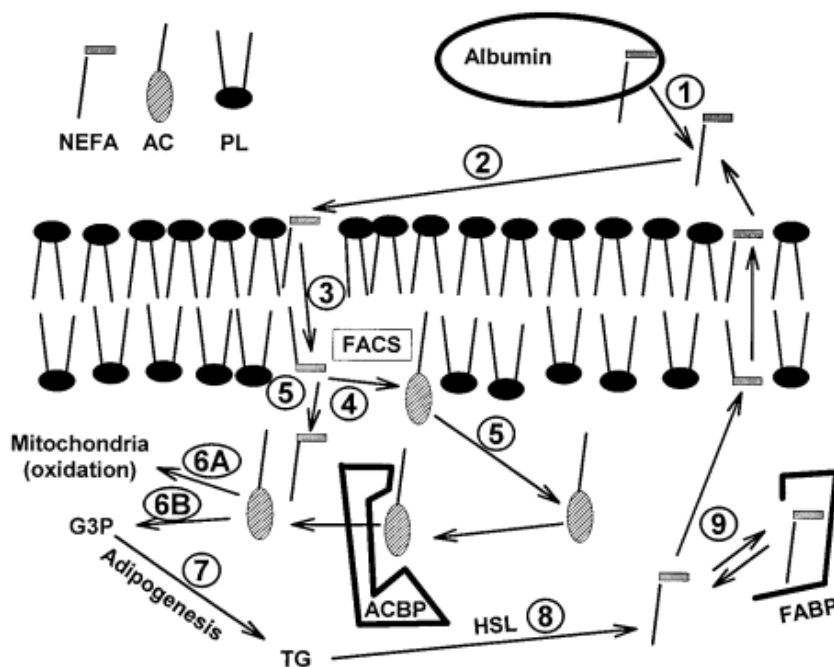
Mastné kyseliny jsou monokarboxylové kyseliny. Detailní znalost mechanismů, kterými jsou NEFA v lidském organismu distribuovány, skladovány nebo dále využity, je velmi důležitá pro pochopení nejen fyziologických, ale i patologických stavů, jako je např. Alzheimerova choroba, obezita, diabetes 2. typu, dyslipidemie a ateroskleróza (6-8).

Mastné kyseliny přicházejí do organismu buď z exogenních zdrojů, nebo jsou v organismu syntetizovány. Endogenně jsou NEFA syntetizovány hlavně v játrech, která sekretují lipoproteinové částice o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein, VLDL), jejichž hlavní složkou jsou TAG. Exogenně se do organismu dostávají NEFA převážně v podobě TAG z potravy. Ve střevě jsou TAG štěpeny pomocí lipáz na monoacylglyceroly a NEFA, které jsou dále vstřebávány do enterocytů, kde jsou opět syntetizovány na TAG, ty společně s bílkoviny a cholesterolem tvoří částice chylomikrony, kterými jsou přenášeny do periferní krve. V periférii se VLDL a chylomikrony váží na endotel kapilár. Za přísun NEFA do tkání jsou zodpovědné dva enzymy, o kterých se psalo již výše, lipoproteinová lipáza v kapilárách a intracelulární hormon-senzitivní lipáza v tukové tkáni. V plazmě se NEFA vyskytují navázané na albumin (9).

### 2.1 Transport neesterifikovaných mastných kyselin

Na obrázku 1 je zobrazen transport NEFA v lidském organismu. Prvním krokem je uvolnění NEFA z vazby na albumin. Rovnováha mezi navázanou a

nenavázanou formou udržuje stabilní koncentraci NEFA v plazmě. Druhým krokem je transport z plazmy na povrch buňky. Tyto kroky nejsou přímo regulovány (4).



Obr. 1. Schéma transportu NEFA (4)

Třetím krokem je translokace NEFA z buněčné membrány. Za fyziologického pH jsou NEFA přítomny buď jako aniont ( $A^-$ ) nebo v protonizované formě HA. Obě formy jsou ve vzájemné rovnováze. Mnoho hypotéz předpokládá, že protonizovaná forma NEFA je schopna přecházet přes membránu difuzí. Membrána je na obou stranách polární, uvnitř je však nepolární. Proto mnoho iontů vyžaduje speciální proteinové přenašeče. Lipofilní charakter NEFA usnadňuje jejich transport přes membránu; proto k transportu NEFA je využíván systém, který nevyžaduje žádný proteinový přenašeč. Dalším, 4. krokem, je navázání NEFA na acyl-CoA za účasti acyl CoA syntázy. Transport volných NEFA přes membránu je možný v obou směrech membrány. Po navázání acyl-CoA jsou NEFA zablokovány v buňce a

nemohou se již transportovat vně buňky. V kroku 5 dochází k desorpci NEFA z povrchu membrány. Tento krok je limitován malou rozpustností NEFA ve vodě. Jejich rozpustnost klesá s délkou řetězce. V kroku 6.A dochází k transportu NEFA do mitochondrií a k jejich oxidaci. Tento krok je ireverzibilní a probíhá především v játrech a ve svalech. Krok 6B znázorňuje transport acyl CoA do endoplazmatického retikula. Zde dochází k tvorbě TAG. V tukové tkáni jsou TAG ukládány a skladovány v adipocytech. V játrech jsou TAG naopak formovány do lipoproteinů.

Koncentrace NEFA v plazmě je velmi nízká, pohybuje se od 0,5 do 1,0 mmol/l, někteří autoři hovoří i o koncentraci nižší, tj. od 0,4 do 0,8 mmol/l (10).

NEFA mohou být dále oxidovány, reesterifikovány, elongovány nebo desaturovány. Během klidového stavu jsou oxidovány v játrech a myokardu. Při fyzické zátěži jsou oxidovány také v kosterním svalu (10).

Chemické složení, struktura a konformace FA ovlivňuje jejich vlastnosti. Koncentrace FA v různých formách jsou ve vzájemné rovnováze, tzn. že nedostatek nebo nadbytek určitého typu NEFA se odrazí i v jejich esterifikované formě. V další kapitole se proto bude hovořit obecně o vlastnostech FA.

## 2.2 Rozdělení a názvosloví mastných kyselin

Mastné kyseliny lze dělit podle různých kritérií. Jak již bylo uvedeno, v těle se vyskytují buď v podobě esteru vázané např. na glycerol, fosfoglycerol, alkohol, sterol, sfingosin nebo jako volné FA. Většina FA, vyskytujících se u vyšších živočichů, má sudý počet atomů uhlíků od 2 do 24. Sudý počet atomů uhlíku je dán syntézou z dvouuhlíkových jednotek. Dominantní jsou především kyseliny palmitová, stearová, olejová a linolová.

Mastné kyseliny můžeme dělit podle délky řetězce a podle počtu dvojných vazeb. Nasycené FA dělíme podle délky řetězce na krátké (short chain FA,

SCFA), středně dlouhé (middle chain FA, MCFA), dlouhé (long chain FA, LCFA) a velmi dlouhé (very long chain FA, VLCFA). Nenasycené FA dělíme podle počtu dvojných vazeb na mononenasyčené (MUFA) a PUFA. Počet dvojných vazeb u PUFA se pohybuje od 2 do 6. Dvojná vazba je častěji v poloze cis, která způsobuje ohyb o 60 stupňů. Méně častá je konformace v poloze trans (1).

Obecný vzorec FA má tvar CN:p n-x, kde CN (carbon number) představuje počet atomů uhlíku, p - počet dvojných vazeb, x – polohu první dvojně vazby od metylové skupiny (n). Polynenasycené mastné kyseliny jsou podle polohy první dvojně vazby od metylové skupiny děleny na FA řady n-3, n-6, n-7 a n-9. V tabulce 1 jsou příklady mastných kyselin pro jednotlivé skupiny.

Fyzikální a chemické vlastnosti FA jsou velmi ovlivněny délkou řetězce, přítomností a počtem dvojných vazeb. Bod tání FA roste s délkou řetězce u nasycených FA; jeho hodnota klesá u nenasycených s počtem dvojných vazeb. Vliv má také konformace dvojně vazby. Konformace cis způsobuje ohyb o 60 stupňů, což vede k neúčinnému zaplnění prostoru a snižování van der Waalsových interakcí, tedy i k snížení bodu tání. Rozpustnost FA ve vodě klesá s rostoucí délkou řetězce. Při nízkých koncentracích jsou FA v roztoku v podobě monomerů, při vyšší koncentraci tvoří micely. Do středu micely jsou FA orientovány hydrofobní částí, naopak vně micely jsou karboxylové konce. Rozdíly ve fyzikálně chemických vlastnostech jednotlivých FA umožňují jejich separaci pomocí chromatografických metod (5).

**Tab. 1: Rozdělení mastných kyselin**

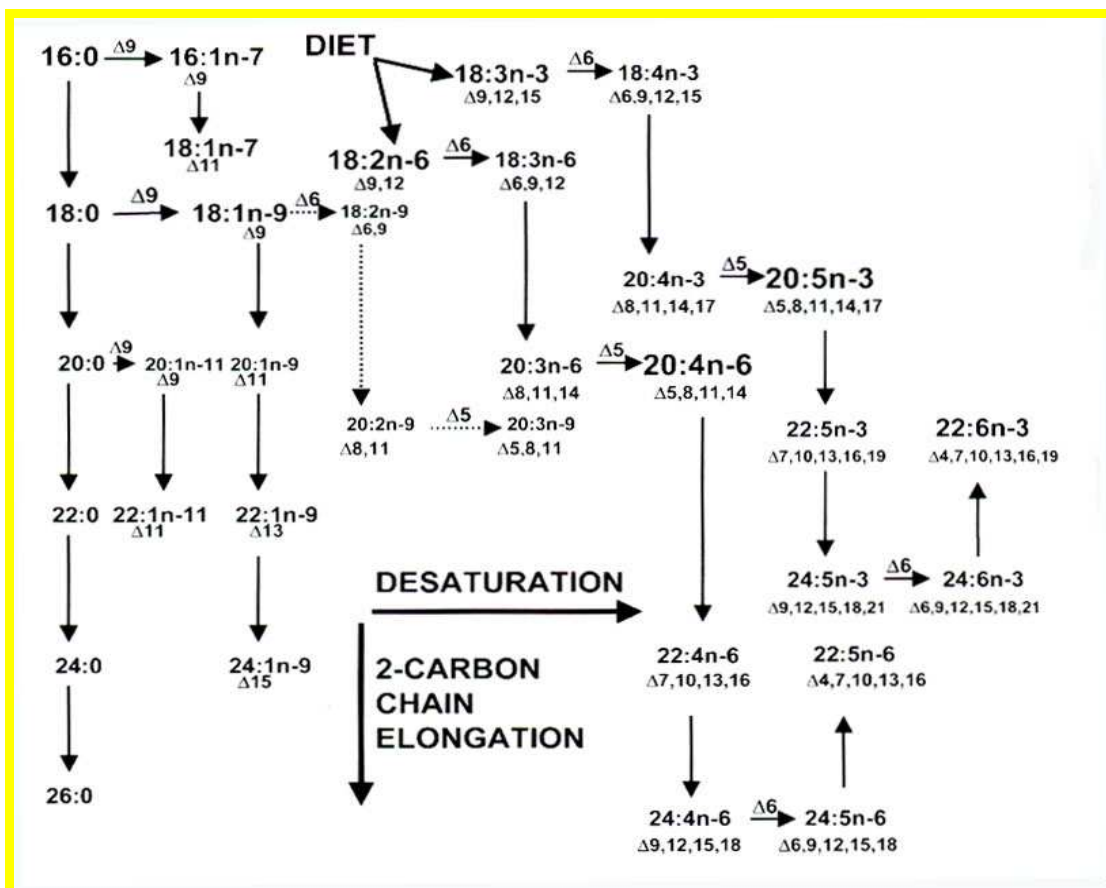
Skupina		Název	CN: p
SFA	SCFA	octová	2:0
		propionová	3:0
		máselná	4:0
	MCFA	kapronová	6:0
		kaprylová	8:0
	LCFA	laurová	12:0
		myristová	14:0
		palmitová	16:0
		stearová	18:0
	VLCFA	arachová	20:0
		behenová	22:0
		lignocerová	24:0
		cerotová	26:0
		montanová	30:0
cis-MUFA		olejová	18:1n-9c
		palmitolejová	16:1n-7c
trans-MUFA		elaidová	18:1n-9t
		trans-vakcenová	18:1n-7t
PUFA	PUFA n-3	$\alpha$ -linolenová	18:3n-3
		eikosapentaenová	20:5n-3
		dokosahexaenová	22:6n-3
	PUFA n-6	linolová	18:2n-6
		$\gamma$ -linolenová	18:3n-6
		dihomo- $\gamma$ -linolenová	20:3n-6
		arachidonová	20:4n-6

### 2.3 Syntéza a metabolismus mastných kyselin

Syntéza FA probíhá z acetyl-CoA do palmitátu v cytosolu. Další prodlužování řetězce (elongace) probíhá v matrici mitochondrií. K desaturaci, nebo-li zavádění dvojně vazby, dochází v endoplazmatickém retikulu. Prvním krokem při biosyntéze FA de novo je přeměna acetyl-CoA na malonyl-CoA. Tuto reakci katalyzuje enzym acetyl-CoA-karboxylasa. Pro správnou funkci enzymu je zapotřebí přítomnost vitamínu biotinu a ATP. Zdrojem oxidu uhličitého je hydrogenuhličitan, acetyl-CoA je dodáván z  $\beta$ -oxidace FA a glykolýzy sacharidů. Syntéza probíhá na multienzymovém komplexu, jehož jádrem je protein ACP (Acyl Carrier Protein). Součástí proteinu je aminokyselina cystein, která obsahuje dvě sulfhydrylové skupiny (SH). Tento protein je schopen se vázat thioesterovou vazbou na acetát a malonát za účasti acetyltransferázy a malonyltransferázy. Dalším krokem syntézy FA je kondenzace acetylu-ACP a malonylu-ACP za katalytického působení enzymu  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthazy a vzniku acetoacetyl-ACP. Po tomto kroku následuje redukce za účasti enzymu  $\beta$ -ketoacylreduktázy na  $\beta$ -hydroxybutyl-S-ACP. Tento produkt je dehydratován enzymem  $\beta$ -hydroxyacyldehydratázou a dále redukován  $\alpha,\beta$ -enoylreduktázou. Nakonec je přenesen z centrální SH-skupiny na periferní SH-skupinu. Celý cyklus se opakuje připojováním dalších malonyl-CoA až do vzniku palmitátu. Posledním krokem syntézy je uvolnění FA z multienzymového komplexu (5).

Organismus je schopen zavést dvojnou vazbu nejbližší do polohy  $\Delta 9$ . Za katalýzy enzymem  $\Delta 9$  desaturázou tak vzniká z kyseliny stearové kyselina olejová a z kyseliny palmitové kyselina palmitolejová. Desaturace je zobrazena na obrázku 2 vodorovnými čarami (viz. obrázek 2). Elongace je naznačena svislými čarami směrem ze shora dolů. Naopak  $\beta$ -oxidace je znázorněna svislými čarami směrem nahoru. Další dvojně vazby vznikají většinou v pentadienovém uspořádání.





Obr. 2: Schématické znázornění desaturace a elongace mastných kyselin

Polynenasycené FA řady n-6 a n-3 jsou v organismu syntetizovány z mateřských FA. Tyto FA jsou označovány jako esenciální. Pro řadu n-3 se jedná o kyselinu  $\alpha$ -linolenovou a pro řadu n-6 o kyselinu linolovou.

Syntéza PUFA řady n-9, n-6 a n-3 je sled oxidačních desaturací a elongací, kterých se účastní stejné enzymy. Tyto enzymy se liší pouze afinitou k určité řadě; afinita je v poměru PUFA n-3: n-6: n-9 10:3:1(1).

## 2.4 Funkce mastných kyselin v organismu

FA plní v organismu mnoho důležitých funkcí. Nasycené FA s krátkým řetězcem, tzn. s 2 až 4 atomy uhlíku (kyseliny octová, propionová, máselná) stimuluje průtok krve střevem, tvorbu hlenu a omezují růst bakterií ve střevě.

Dále slouží jako zdroj energie pro enterocyty a kolonocyty. Mastné kyseliny se středním řetězcem, tzn. 6 až 10 atomy uhlíku (kyseliny kapronová, kaprylová, kaprinová) zvyšují klidový energetický výdej. Z tohoto důvodu se tyto FA používají hlavně při léčbě obezity.

Nasyčené FA s dlouhým řetězcem, s 12 až 18 atomy uhlíku, mají významný aterogenní i trombogenní potenciál (11). Aterogenní potenciál má především kyselina laurová, myristová a palmitová. Trombogenní potenciál má kyselina myristová, palmitová a stearová. Pro výpočet aterogenního a trombogenního indexu slouží následující vzorce:

$$AI = \frac{4 \cdot c(4:0) + c(16:0)}{c(PUFAn-6) + c(PUFAn-3) + c(MFA)}$$

$$TI = \frac{c(14:0) + c(16:0) + c(18:0)}{0,5 \cdot c(MFA) + 0,5 \cdot c(PUFAn-6) + 3 \cdot c(PUFAn-3) + \frac{c(PUFAn-3)}{c(PUFAn-6)}}$$

kde AI je aterogenní index, TI trombogenní index a c je koncentrace pro FA uvedené v závorce. Tyto kyseliny představují 80-90 % nasycených FA přijímaných potravou. Nejznámějším potravinovým zdrojem těchto FA je např. čokoláda, máslo nebo sádlo.

Nasyčené FA s velmi dlouhým řetězcem, tzn. s 20 až 30 uhlíky (např. kyselina arachová), se vyskytují v měřitelné koncentraci u osob s vrozenými poruchami metabolismu (11).

Cis-mononenasycené FA, mezi něž patří například kyselina olejová, snižují koncentraci LDL částic a zvyšují koncentraci HDL (high density lipoprotein). Dále zvyšují odolnost těchto lipoproteinových částic vůči lipoperoxidaci. Částice LDL přenášejí cholesterol do cév, kde dochází k jeho usazování a vzniku aterogenních plátů. Částice HDL naopak přenášejí cholesterol z periferie.

Zvyšování poměru mezi HDL a LDL má příznivý vliv na ischemickou chorobu srdeční. Cis-mononenasyčené FA mají také vliv na snížení agregability trombocytů. Zdrojem těchto FA je hlavně olivový olej, jádra sladkých mandlí a lískových oříšků (1).

Trans-nenasycené FA v lidské plazmě pocházejí převážně z exogenních zdrojů. Jsou to například kyseliny elaidová a vakcenová. Vyskytují se především v másle a margarínech. Tyto FA způsobují významný růst LDL částic a snižují tvorbu HDL, proto mají vysoký aterogenní potenciál. Autoři uvádějí, že trans-nenasycené FA způsobují rozvoj ischemické choroby srdeční více než nenasycené FA (11).

Jak již bylo uvedeno výše, v organismu se syntetizují nenasycené FA zavedením dvojné vazby do kyseliny stearové nebo palmitové v poloze  $\Delta 9$ . Tímto způsobem vznikají kyseliny olejová a palmitolejová. Kyselina olejová může být dále desaturována v poloze  $\Delta 6$  na kyselinu cis-6,9-oktadekadienovou, potom elongována na kyselinu cis-8,11-eikosadienovou a ta desaturována v poloze  $\Delta 5$  na kyselinu cis-5,8,11-eikosatrienovou, která má triviální název kyselina Meadova (12) podle svého objevitele, viz obrázek 2. Tato FA se tvoří především při dlouhodobém nedostatku esenciálních PUFA. PUFA řady n-6 se vyskytují ve slunečnicovém oleji, máku setém, černém rybízu a v oleji z hroznových jadérek. PUFA řady n-3 se vyskytují v lněném semínku, černém rybízu a v sójových bobech. PUFA mají antiaterogenní a antitrombogenní účinek, působí na regulaci krevního tlaku a metabolismus minerálů. Mají vliv na fluiditu membrán, na hladinu krevních lipidů a lipoproteinů, účastní se modulace eikosanoidů, zvyšují inzulínovou senzitivitu, mění rozložení tuku v těle a velikost adipocytů. V experimentálních studiích byl prokázán antioxidační a antikancerogenní účinek konjugovaných FA. Mezi FA s konjugovaným systémem dvojných vazeb patří konjugovaná kyselina linolová. Fyziologická hladina PUFA v lidském organismu je velmi důležitá a světová populace se obecně velmi často potýká s jejich nedostatečným příjmem potravou, a proto se velmi často můžeme setkat s potravinovými doplňky, které

je obsahují. Tyto přípravky se většinou prezentují jako vhodná prevence kardiovaskulárních onemocnění a metabolických onemocnění (13).

Nenasycené FA s 18 až 20 atomy uhlíku jsou prekurzory eikosanoidů, tj. prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů. Eikosanoidy ovlivňují buňky, kterými jsou syntetizovány a také přilehlé buňky. Jedná se o kyselinu arachidonovou, eicosapentaenovou a kyselinu dihomo- $\gamma$ linolenovou (14).

Mastné kyseliny se vyskytují v těle i v celé řadě esterů. V podobě TAG, tuků, jsou nejvydatnějším zdrojem energie. Bohatými zdroji energie jsou VLCFA, LCFA a MCFA. Zároveň slouží jako tepelná a mechanická izolace. Hydrofobní charakter tuků usnadňuje transport a vstřebávání některých lipofilních látek (vitamin A, D, E a K). Mastné kyseliny jsou dále součástí fosfolipidů, které tvoří buněčné membrány. Jejich složení ovlivňuje sílu a propustnost membrány. Fluidita membrány stoupá s rostoucím počtem dvojných vazeb v konformaci cis. Naopak přítomnost FA s nasyceným řetězcem nebo s dvojnou vazbou v poloze trans fluiditu snižuje (15).

FA se dále účastní chemické struktury druhých poslů a ovlivňují jejich funkci. Účastní se acylace proteinů, která usnadní jejich ukotvení do buněčných membrán a změní jejich aktivitu. Dále se účastní genové transkripce a jsou substrátem lipoperoxidace (11).

Zvýšená koncentrace NEFA může negativně ovlivnit strukturální stabilitu cytoplazmatických membrán, což může vést k vzniku arytmií. Také může ovlivnit funkci membrány trombocytů a vést k protrombogennímu efektu z alternativní aktivace koagulační kaskády.

## **2.4 Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin**

Pro stanovení NEFA bylo vyvinuto a publikováno mnoho metod. Prvním krokem stanovení NEFA je jejich izolace od dalších lipidových tříd vzorku. K tomuto účelu se používají následující techniky: preparativní TLC nebo HPLC, extrakční metody – LLE nebo extrakce na pevné fázi (solid phase

extraction, SPE) (16). V případě, že pro prováděnou biologickou studii je izolace na jednotlivé lipidové třídy nedostatečná, lze NEFA vzorek dále dělit pomocí chromatografických metod na nasycené, nenasycené, případně i na různé isomery NEFA. V získaných vzorcích lze stanovit jejich celkovou koncentraci. V moderním výzkumu se však častěji pro jejich hodnocení využívá molární zastoupení (profil 20-26 FA). Pro stanovení celkových plazmatických NEFA se nejčastěji používají spektrofotometrické a titrační metody, které byly popsány Dolem a spol. již v roce 1956 (17,18). Tento základní postup od této doby prošel rozsáhlým vývojem.

Jednotlivé NEFA při chromatografickém stanovení lze identifikovat pomocí retenčního času a koeficientu ekvivalentní délka řetězce (equivalent chain length, ECL), který je při použití dané kolony pro NEFA charakteristický. V mnoha případech nestačí stanovit celkové množství NEFA ve vzorku, ale je potřeba stanovit koncentrace jednotlivých NEFA nebo jejich relativní zastoupení.

#### **2.4.1 Izolace**

##### *Preparativní tenkovstevná chromatografie*

Nejstarší a nejčastěji publikovanou metodou izolace je TLC (19, 20). Její výhodou je rozdělení vzorku na více lipidových tříd. V literatuře se uvádí, že při použití izolace vzorku na silikagelu s mobilní fází heptan:diethyl ether:kyselina mravenčí (80:20:2) se vzorek rozdělí na estery cholesterolu, TAG, NEFA, cholesterol, 1,3 diacylglyceroly, 1,2 diacylglyceroly, monoacylglyceroly a fosfolipidy (21). Touto metodou lze získat všechny lipidové třídy. Lipidovou třídu lze z desky izolovat a dále dělit na jednotlivé složky za jiných podmínek. V literatuře je uvedena izolace methylesterů FA na silikagelu impregnovaném 10% AgNO<sub>3</sub> (v/v) při použití mobilní fáze hexan a diethylether v poměru 9:1 na nasycené, trans-mononenasycené, cis-mononenasycené a dinenasycené FA. Při úpravě poměru složek mobilní fáze na 2:3 dochází naopak k izolaci vícenenasycených FA. Výhodou tohoto

postupu je izolace cis a trans isomerů, které je obtížnější dosáhnout metodou GC-FID z celkových FA (22).

### Extrakce

Mezi další způsoby izolace patří extrakce (23). Tato metoda není časově náročná. Nevýhodou rozdělovací extrakce je možnost získání pouze 2 frakcí a to esterifikovaných FA a NEFA. Při extrakcích dochází k postupným ztrátám vzorku, a proto je nízká výtěžnost.

Nejčastěji se v současné době používá izolace NEFA ze vzorku pomocí SPE kolonek (24, 25). Tato metoda patří mezi časově a experimentálně náročnější. Je vhodná v případě analýzy více lipidových tříd z jednoho vzorku. V literatuře se nejčastěji uvádí izolace lipidů plasmy na 4 frakce, tj. fosfatidylcholin, triacylglycerol, NEFA a estery cholesterolu (24). Díky různým sériím extrakcí můžeme ze vzorku získat všechny lipidové třídy podobně jako u metody TLC. Výhodné je, že zde nedochází ke ztrátám polynenasycených FA kvůli jejich oxidaci po vystavení vzdušnému kyslíku jako v metodě TLC. Burdge a spolupracovníci (24) porovnali metodu TLC a SPE kolonky. Pro metodu TLC uvádějí variační koeficienty pro kyselinu palmitovou 14 %, stearovou 16,5 %, olejovou 6,7 %, a linolovou 11,8 %. Pro izolaci pomocí SPE kolonek je variační koeficient pro kyselinu palmitovou 2,5 %, stearovou 7,8 %, olejovou 4,0 % a linolovou 6,4 %. Z toho vyplývá, že metoda používající SPE kolonky je výrazně přesnější.

### Preparativní kapalinová chromatografie

K separaci vzorku lze také použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) kombinovanou s UV detektorem nebo detektorem rozptylu světla. Použití mobilní fáze se pak odvíjí od typu detektoru. Pro separaci FA lze použít i iontově výměnou chromatografii s navázanými ionty stříbra na stacionární fázi. V tomto případě dochází k dělení vzorku FA podle počtu, geometrie a polohy dvojnásobné vazby. V literatuře (22) je popsána metoda s kolonou o délce 25

cm; jako mobilní fáze byl použit gradient 2 složek – dichlormethan - dichlorethan (1:1) a 4 složek dichlormethan – dichlorethan – acetonitril – methanol (47:47:3:3). V této metodě došlo k separaci vzorku na nasycené FA, trans-mononenasycené, cis-mononenasycené, dieny, trieny s tetraeny a pentaeny s hexaeny.

#### 2.4.2 Stanovení celkových neesterifikovaných mastných kyselin

Celkové NEFA lze stanovit pomocí spektrofotometrických metod (26, 27). Principem stanovení je sled enzymatických reakcí. První reakce se účastní NEFA, adenosin-5-fosfát (ATP) a CoA jako výchozí látky. Reakce je katalyzovaná enzymem acyl-CoA syntetázou. Produkty této reakce jsou acyl-CoA, adenosin-5-monofosfát a pyrofosfát. Acyl-CoA reaguje s kyslíkem za přítomnosti acyl-CoA oxidázy za vzniku enoyl-CoA a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku dále reaguje s 2,4,6-tribrom-3-hydroxy-benzenem a 4-aminoantipyrinem za účasti peroxidázy. Výsledkem je červeně zbarvený produkt, který lze stanovit spektrofotometricky při 546 nm. Z Lambert-Beerova zákona je pak vypočtena koncentrace NEFA při hodnotě absorpčního koeficientu pro tuto vlnovou délku  $19,3 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Tato metoda je experimentálně velmi nenáročná.

#### 2.4.3 Derivatizace

Dalším krokem stanovení profilu FA je derivatizace (28). Vzorek je možné derivatizovat buď na methylester nebo ethylester. Ethylestery mají delší eluční čas, ale menší toxicitu činidel. Neesterifikované FA lze také analyzovat bez derivatizace, ale zhorší se jejich separační vlastnosti. V literatuře je publikováno několik metod sloužících k methylaci NEFA. Reakce probíhá za kyselých katalýz pomocí acetyl chloridu, fluoridu boritého, methylchloromravenčanu nebo kyseliny sírové (29, 30).

#### 2.4.4 Plynová chromatografie – identifikace a kvantifikace

Plynová chromatografie je technika používaná pro identifikaci i stanovení FA ve všech izolovaných lipidových třídách včetně NEFA. V dnešní době jsou dostupné vysoce kvalitní kapilární kolony, které umožňují analyzovat i velmi komplexní směsi. Volba kolony je proto pro separaci FA ve vzorku NEFA důležitá.

Na nepolární koloně se dělí FA podle bodu varu. Na této koloně je dělení nedokonalé. Přednostně elují z kolony nenasycené FA a posléze nasycené. Na středně polární koloně dochází k dělení podle počtu uhlíku a počtu dvojných vazeb. Rostoucí délka řetězce a zvyšující se počet dvojných vazeb prodlužuje retenční čas. Délka kolony je okolo 30 m. Časy analýz se pohybují od 50 do 80 minut. Tento čas je zhruba poloviční než v případě vysoce polární kolony. Další výhodou této stacionární fáze je nižší pořizovací cena a delší životnost kolony. Bohužel tímto postupem nelze izolovat trans a cis isomery FA, jejichž stanovení je důležité v řadě studií. Na vysoce polární koloně jsou FA děleny především podle jejich polarity. Délka řetězce i v tomto případě prodlužuje retenční čas, trans izomery jsou eluovány před odpovídajícími cis-formami. Délka kolony je 60 až 100 m a doba analýzy 90 až 150 min. Čas analýzy je ovlivněn u obou kolon přítomností cholesterolu ve vzorku, který má vysokou retenci (31).

K ověření dostatečné účinnosti izolace sledujeme na koloně tzv. kritický pár. Pro středně polární kolonu se jedná o FA 18:1n-9 a 18:1n-7 a pro polární kolonu 20:0 a 18:3n-3. Jako mobilní fázi lze použít helium nebo vodík. Vodík má nižší pořizovací náklady a poskytuje lepší separaci, ale je zde nebezpečí vzniku třaskavé směsi se vzduchem.

Nejčastějším používaným detektorem je FID; je to neselektivní detektor a s výjimkou velmi malých organických sloučenin je schopen detekovat téměř všechny sloučeniny obsahující uhlík. S rostoucím počtem uhlíků roste odezva detektoru. Odezvu nedává většina anorganických plynů a par. Principem detektoru je ionizace vzorku v kyslíko-vodíkovém plameni. Vzorek je přiveden



do detektoru v plynné fázi v proudu nosného plynu. Zde je ionizován a vzniklé ionty zvyšují vodivost mezi elektrodami. Výhodou detektoru je široký dynamický lineární rozsah (32).

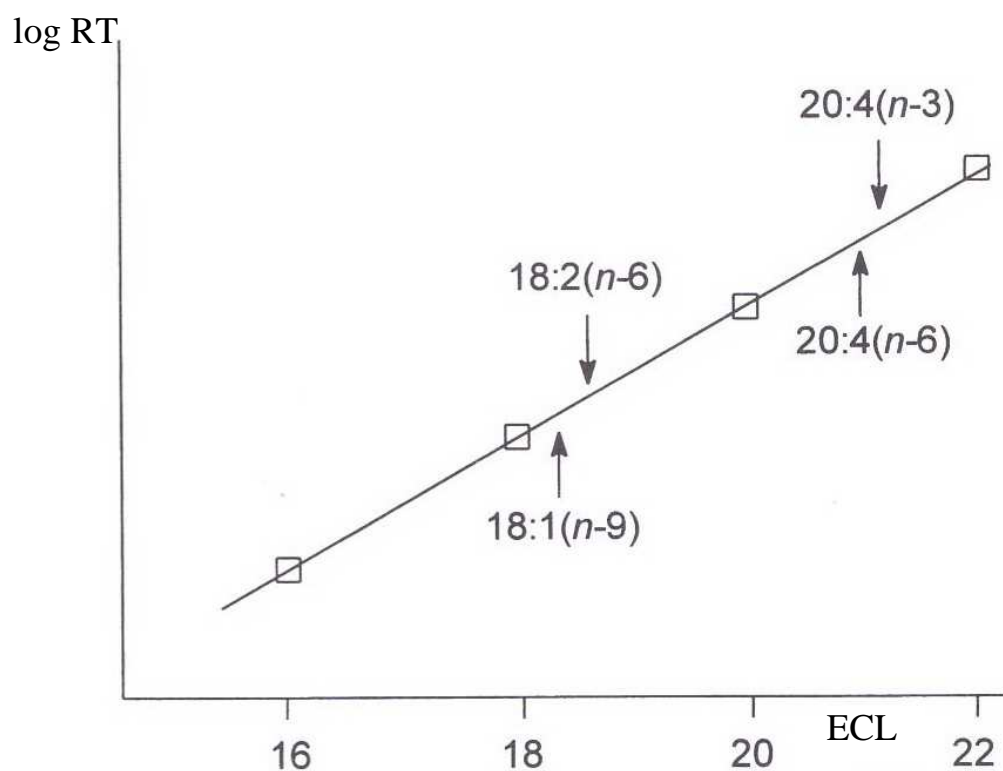
Další alternativou je použití hmotnostně spektrometrického (mass spectrometric, MS) detektoru (33). Tento detektor přinese časovou úsporu, protože není nutné čekat na uvolnění cholesterolu z kolony. Nehrozí, že by cholesterol interferoval v další analýze. Nevýhodou MS detektoru jsou velké pořizovací náklady (34).

#### Kvalitativní a kvantitativní analýza

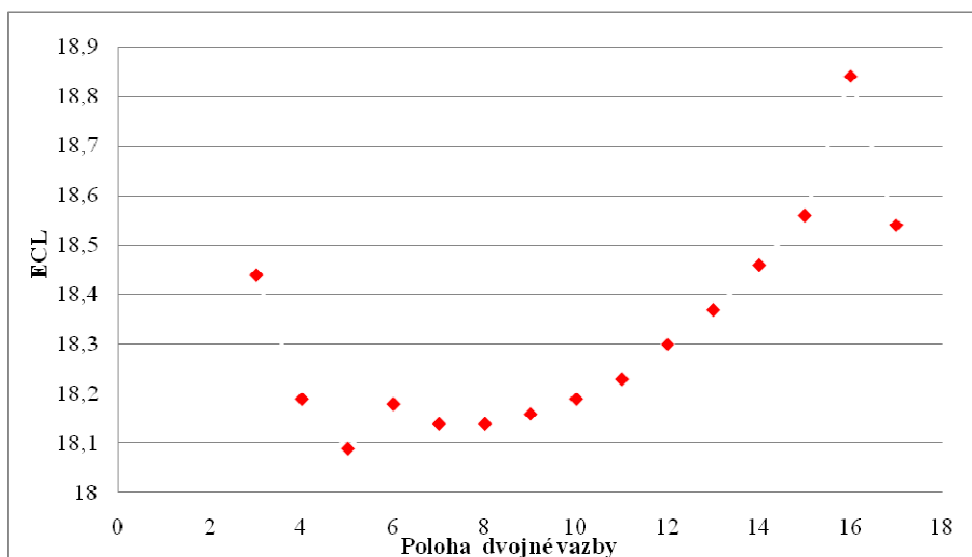
K těmto účelům se nejčastěji používá detekce MS a FID. Kvantitativní a kvalitativní analýza NEFA pomocí hmotnostního spektrometru přesahuje rámec této práce. Dále se proto zabývám stanovením za použití FID. Pro identifikaci FA se využívá veličina ECL. Pro saturevané FA je ECL dán počtem uhlíkových atomů FA. Pro nenasycené FA se ECL musí odečíst z grafu, který je sestaven ze závislosti log retenčního času (RT) standardů saturevaných FA na jejich ECL, jak ukazuje obrázek 3. Z ekvivalentů můžeme odečíst, zda za daných podmínek docházelo k separaci. Koeficient je charakteristický pro každou FA na dané koloně (35). Na ECL má vliv také poloha dvojně vazby. Na obrázku 4 je tato závislost znázorněna pro synteticky připravené izomery FA 18:1. Data jsou převzata z literatury (36). FA byly separovány na koloně Carbowax. Abychom mohli FA považovat za oddělené, je nutné, aby rozdíl ECL byl více než 0,2. Pro výpočet ECL se používá následující vzorec:

$$ECL = (RT_x - RT_n) / (RT_{n+i} - RT_n) + n$$

kde index x patří sledované FA, indexy n a n+i standardům, které jsou elulovány před a po sledované FA.



**Obr. 3: Ekvivalentní délka řetězce pro nenasycené mastné kyseliny**



**Obr. 4: Závislost polohy dvojně vazby kyseliny 18:1 na ekvivalentní délce řetězce**

Koncentrace FA je úměrná ploše příslušného píku v chromatogramu. Pro stanovení absolutní koncentrace lze použít kalibrační přímkou – závislost ploch píků jednotlivých složek na koncentraci dané látky, ze které lze pak odečíst koncentraci vzorku. Více používanou metodou je přidání vnitřního standardu do vzorku. Do vzorku se přidá arteficiální FA, která není ve vzorku běžně přítomná, o známé koncentraci. Pro některé analýzy je podstatné relativní zastoupení FA nebo dokonce relativní zastoupení nasycených a nenasycených FA. Jednotlivé mastné kyseliny nevyvolají stejnou odezvu detektoru pro stejnou koncentraci, proto je nutné použít korekčního faktoru (relative response factor, RRF). Jako vnitřní standard pro stanovení FA se nejčastěji používá kyselina margarová (17:0) (37) a nonadekanová (19:0) (38). Pro stanovení PUFA byla použita i kyselina dokosatrienová (22:3n-3) (39), trikosanová (23:0) a nervonová (24:1n-9) (40). Platnost teoretických hodnot RRF potvrdili Bannon a spolupracovníci (41) na základě analýzy FA před a po hydrogenaci, a dále Eder a spolupracovníci (37) srovnáním různých injekčních technik. Složení FA je většinou vyjadřováno pomocí relativního zastoupení určené podle podílu plochy píku z celkového součtu všech hodnocených píků. Méně prací používá absolutního stanovení koncentrace FA vztažené k objemu plasmy nebo hmotnosti izolovaného lipidu (42).

### 3 Cíl práce

Cílem práce bude optimalizace dvou různých způsobů izolace NEFA z krevní plazmy a tyto metody porovnat. Jedná se o metody TLC a rozdělovací extrakci. Po izolaci NEFA tyto jednotlivé FA stanovit pomocí GC-FID. Koncentrace NEFA vyjádřit jako relativní zastoupení jednotlivých FA a jako absolutní koncentrace s použitím metody vnitřního standardu. U jednotlivých NEFA vyhodnotit přesnost a reprodukovatelnost výsledků vzhledem ke způsobu izolace. Statistické zpracování výsledků povézt t-testem. Pomocí regresních závislostí určit korelační koeficienty stanovovaných mastných kyselin. Sledovat vliv počtu dvojných vazeb na případné ztráty v průběhu izolace.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Reagencie a laboratorní vybavení

Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV, Millipore, Praha, ČR

Multifunkční centrifuga Megafuge 16/16R, Thermo Scientific, USA

Analytické váhy Sartorius Analytic AC 120 S, SRN

Plynový chromatograf (Trace GC) s autosamplerem (Thermo Finnigan AS 2000)

Kapilární kolona CP-select FAME 100 m x 0,25 mm ID Varian

Vakuová komora (cole parmer, SRN)

Isooktan (Sigma, pro HPLC, USA), acetonitril (Sigma, pro HPLC, USA),

kyselina šťavelová (Sigma p.a., USA), methanol (Sigma, pro HPLC, USA),

hydroxid draselný (Sigma, p.a., Francie), dimethylaminopyrimidin (Sigma,

ReagentPlus, USA), dichlormethan (Sigma, p.a. USA), methylchloroformiát

(Sigma, ReagentPlus, Maďarsko), kyselina chlorovodíková 35% (Penta, p.a.,

Česká Republika), hexan (Sigma, p.a. USA), heptan (Sigma, p.a. USA), 99%

kyselina octová (Penta, p.a., Česká Republika), kyselina sírová (Penta, p.a.,

Česká Republika), diethylether (Sigma, p.a. USA), standard FA C 17:0

deska 20x20 cm s naneseným silikagelem, chromatografická vana, UV lampa

Folchovo činidlo bylo připraveno z methanolu a dichlormethanu (1:2) (19)

### 4.1 Izolace

Pro stanovení NEFA bylo celkem použito 9 vzorků směsného séra, každý z

nich byl rozdělen na 6 alikvotů po 1 ml. V prvních 3 alikvotech byly NEFA

izolovány extrakční metodou, v dalších 3 alikvotech byly izolovány metodou

TLC.

#### 4.1.1 Extrakční metoda

##### Reagenční roztoky

Srážecí roztok: 0,5 % roztok kyseliny šťavelové v methanolu + acetonitril (2:1 v/v).

Reextrakční roztok: acetonitril + 1 % vodný roztok KOH (9:1 v/v).

Katalyzátor: 1 g dimethylaminopyridinu v 0,75 ml methanolu, 0,75 ml dichlormethanu a 8,5 ml isooktanu.

Esterifikační činidlo: isooktan a methylchloroformiát (9:1 v/v).

Třepací roztok: 0,8 ml koncentrované HCl + 10 ml vody.

Vnitřní standard: zásobní roztok: 10 mg FA C 17:0 v 1 ml isooktanu.

pracovní roztok: 100  $\mu$ l zásobního roztoku + 9,9 ml isooktanu  
(výsledná koncentrace 156  $\mu$ mol/l).

##### Pracovní postup

Do zkumavky bylo odpipetováno 250  $\mu$ l standardu FA C17:0 o koncentraci 1,56  $\mu$ mol/l a 1 ml séra. K vzorku byly přidány 4 ml isooktanu a 3 ml srážecího roztoku. Vzorek byl 15 s mixován laboratorním mixerem, poté centrifugován 4 min při 1500 otáček/min. Supernatant byl odebrán do další zkumavky a byly k němu přidány 3 ml reextrakčního roztoku. Vzorek byl míchán 15 s na wortexu. Supernatant byl odstraněn. Dále byl vzorek promyt 2-krát 2 ml isooktanu. Supernatant byl opět odstraněn. Ke vzorku byly přidány 2 ml katalyzátoru a 1 ml esterifikačního činidla. Vzorek byl mixován 15 s až do vyčerení. Po jedné minutě stání byl vzorek 3x promyt 2 ml třepacího roztoku. Do odpadu se vylévá vřdy spodní vrstva. Po posledním promytí se supernatant nechal vysušit pod proudem N<sub>2</sub>. Vzorek byl buď použit k další analýze, nebo uskladněn při -20° C.

#### 4.1.2 Izolace tenkovrstvou kapalinovou chromatografií

##### Reagenční roztoky

Pro extrakci celkového lipidu jsme jako extrakční směs použili Folchovo činidlo dichlormethan-methanol 2:1 (19). Jednotlivé lipidové třídy byly izolovány pomocí TLC s mobilní fází heptan-diethylether-kyselina octová 80:20:1.

##### Pracovní postup

Do zkumavky byl odpipetován 1 ml vzorku plazmy a 250  $\mu$ l standardu FA C17:0 o koncentraci 156  $\mu$ mol/l. Dále bylo přidáno 15 ml Folchova činidla. Vzorek byl 20 minut třepán na třepačce a poté zfiltrován do další chromatografické nádoby. Zkumavka byla vypláchnuta 1 ml Folchova činidla. Poté byl filtrační papír propláchnutý 2-krát 1 ml Folchova činidla. K filtrátu bylo přidáno 5 ml vody. Vzorek byl protřepán a centrifugován 5 min při 1500 otáčkách za min. Spodní vrstva byla přenesena do zkumavky a vysušena. Vzorek byl skladován při  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalšího zpracování.

Deska s naneseným silikagelem byla aktivována v sušárně při teplotě  $110^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut. Byla připravena mobilní fáze o složení 80 ml heptanu 20 ml diethyletheru a 1 ml kyseliny octové a nalita do chromatografické vany. Vana byla uzavřena a hodinu ekvilibrována, aby se ustavila rovnováha mezi kapalinou a parami mobilní fáze. Vzorek byl rozpuštěn v 200  $\mu$ l roztoku připraveného z hexanu a methanolu (1:2). Po zchladnutí desky přibližně na  $50^{\circ}\text{C}$  byl vzorek nanesen na desku. Deska byla vložena do chromatografické vany. Po dosažení mobilní fáze cca 2 cm pod horním okrajem byla deska vyjmuta a vložena do vakuové komory. Po vysušení byla frakce NEFA identifikována pod UV lampou, ohraničena jehlou a špachtlí seškrábnuta do zkumavky. Do zkumavky byl odpipetován 1 ml methanolu a 0,1 ml koncentrované kyseliny sírové. Vzorek byl ponechán hodinu ve tmě. Po inkubaci byly přidány 2 ml hexanu a vzorek byl 3-krát promyt vodou.

Vrchní vrstva byla odebrána a vysušena. Vzorek byl do chromatografické analýzy skladován při -20° C. Takto skladovaný vzorek je stabilní po dobu nejméně 6 měsíců.

#### 4.2 Stanovení profilu mastných kyselin plynovou chromatografií

Vzorky NEFA připravené oběma způsoby izolace byly dále analyzovány pomocí GC-FID. Kolona byla vyhřívána na teplotu 80° C, injektor na 250° C a detektor na 270° C. Teplotní gradient byl programován následovně: počáteční teplota 80° C po dobu 1 min, vzestup teploty 4° C/min na 120° C, potom rychlostí 2° C/ min do 270° C; tato teplota byla udržována na koloně po dobu 25 min. Celkový čas analýzy činil 111 min. Poté byla kolona zchlazena zpět na 80° C. Vzorky byly rozpuštěny v 50 µl heptanu a umístěny do automatického dávkovače. Chromatogramy byly vyhodnoceny programem Clarity od firmy DataApex. Bylo vyhodnoceno 20 NEFA (viz tabulka 2). Statistické zpracování výsledků bylo provedeno t-testem.

Relativní zastoupení jednotlivých FA v Rel% bylo vypočteno na základě ploch píků, absolutní koncentrace byly vyhodnoceny metodou vnitřního standardu podle vzorce:

$$c_i = c_{IS} \times A_i/A_{IS} \times RRF_{17:0}^{-1}$$

kde index *i* se vztahuje k parametrům dané FA, index *IS* k parametrům vnitřního standardu, *c* je koncentrace (v µmol/l), *A* je plocha píku,  $RRF_{17:0}$  korekční faktor FA 17:0 (viz tabulka 3) (31).



**Tab. 2: Seznam hodnocených mastných kyselin**

Vzorec	Systematický název	Triviální název	Zkratka
14:0	Tetradekanová	myristová	
16:0	Hexadekanová	palmitová	PA
16:1n-9	cis-7-hexadecenová		
16:1n-7	cis-9-hexadecenová	palmitolejová	POA
17:0	Heptadekanová	margarová	
18:0	Oktadekanová	stearová	SA
18:1t	trans-oktadecenová (směs polohových izomerů)		
18:1n-9	cis-9-oktadecenová	Olejová	OA
18:1n-7	cis,cis-11-oktadecenová	vakcenová	
18:2n-6	cis,cis-9,12-oktadekadienová	linolová	LA
18:3n-6	cis-6,9,12-oktadekatrienová	$\gamma$ -linolenová	GLA
18:3n-3	cis-9,12,15-oktadekatrienová	$\alpha$ -linolenová	ALA
20:0	eikosanová	arachidonová	
20:1n-9	cis-11-eikosenová	gondoová	
20:2n-6	cis,cis-11,14-eikosadienová		
20:3n-6	cis-8,11,14-eikosatrienová	dihomo- $\gamma$ -linolenová	DHGLA
20:4n-6	cis-5,8,11,14-eikosatetraenová	arachidonová	AA
22:5n-6	cis-4,7,10,13,16-docosapentaenová		DPA-6
22:5n-3	cis-7,10,13,16,19- dokosapentaenová		DPA-3
22:6n-3	cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	klupadonová	DHA

**Tab. 3: Hodnoty korekčních faktorů**

CN	C=C	MW <sub>FA</sub>	MW <sub>FAME</sub>	% C <sup>a</sup>	RRF <sub>17:0</sub> <sup>b</sup>
8	0	144.212	158.239	60.72	1.182
10	0	172.266	186.293	64.47	1.113
12	0	200.320	214.346	67.24	1.067
14	0	228.373	242.400	69.37	1.035
14	1	226.357	240.384	69.95	1.026
16	0	256.427	270.454	71.06	1.010
16	1	254.411	268.438	71.59	1.003
17	0	270.454	284.480	71.78	1.000
18	0	284.480	298.507	72.43	0.991
18	1	282.465	296.491	72.92	0.984
18	2	280.449	294.476	73.42	0.978
18	3	278.433	292.460	73.92	0.971
18	4	276.417	290.444	74.44	0.964
19	0	298.507	312.534	73.02	0.983
20	0	312.534	326.561	73.56	0.976
20	1	310.518	324.545	74.02	0.970
20	2	308.502	322.529	74.48	0.964
20	3	306.487	320.513	74.95	0.958
20	4	304.471	318.498	75.42	0.952
20	5	302.455	316.482	75.90	0.946
21	0	326.561	340.588	74.06	0.969
22	0	340.588	354.614	74.52	0.963
22	1	338.572	352.599	74.94	0.958
22	2	336.556	350.583	75.37	0.952
22	3	334.540	348.567	75.81	0.947
22	4	332.524	346.551	76.25	0.941
22	5	330.509	344.535	76.70	0.936
22	6	328.493	342.520	77.15	0.930
24	0	368.641	382.668	75.33	0.953
24	1	366.625	380.652	75.73	0.948

CN - počet atomů uhlíku, C=C - počet dvojných vazeb, MW- molekulová hmotnost, FAME – methylester FA, RRF- korekční faktor

a – váhové procento aktivních uhlíkových atomů (FAME)

b –  $RRF_{17:0} = \%C_{17:0} / \%C_i$

## 5 Výsledky a diskuze

Metody izolace NEFA jsme převzali z literatury (19, 23). Jedná se o metodu TLC a metodu extrakce kapalina-kapalina. Techniky byly optimalizovány, aby známé chyby byly minimalizovány a byly použitelné v dostupných podmínkách laboratoře. Z literatury známým nedostatkem metody TLC byly ztráty PUFA vlivem oxidace. Při extrakční metodě jsme používali vysoce polární kolonu na rozdíl od Huška a spol. (23), který používal středně polární. Optimální podmínky izolace NEFA extrakcí kapalina-kapalina jsme ověřili metodou TLC.

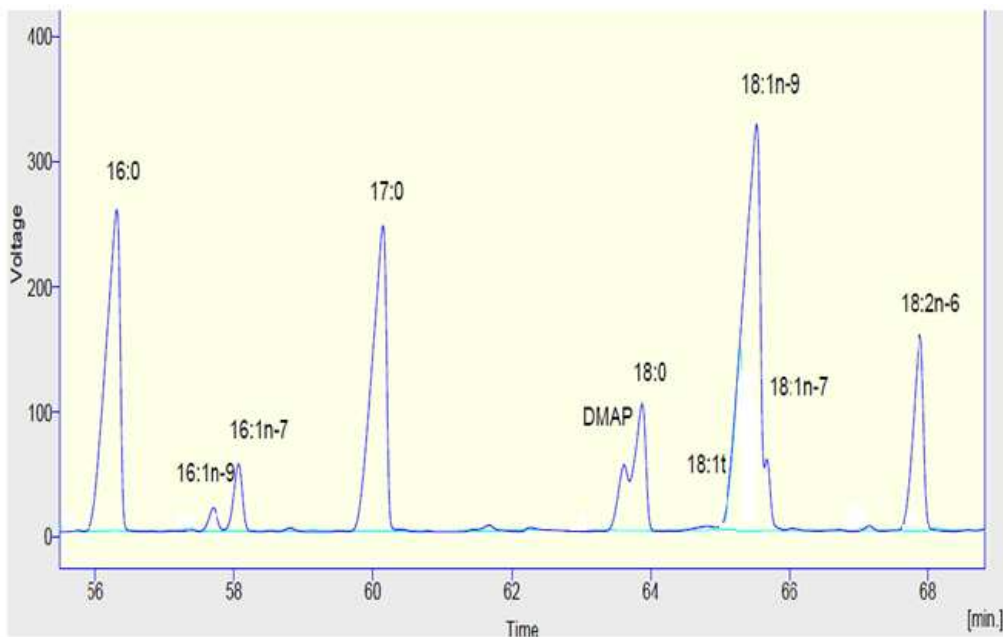
V další části práce srovnáváme obě metody izolace NEFA. Získané hodnoty statisticky vyhodnocujeme t-testem.

### 5.1 Úprava laboratorního procesu

Izolace NEFA metodou TLC po předchozí extrakci celkového lipidu dle Folche (19) je dlouho známá a osvědčená metoda; je také známé riziko rozkladu NEFA na tenké vrstvě, kde je malé množství vzorku rozprostřené na poměrně velké ploše. Toto riziko jsme se snažili zmenšit sušením desek ve vakuu. Po izolaci NEFA od ostatních lipidových tříd bylo nutné volné FA esterifikovat na methyl estery. Rovněž i esterifikace NEFA methanolem za přítomnosti kyseliny sírové, která váže reakcí vzniklou vodu, je osvědčená a finančně nenáročná. V této metodě jsme neudělali prakticky žádné změny.

Extrakční metoda (23) je ve srovnání s metodou TLC jen o něco méně časově náročná, v laboratorním procesu jsme však museli udělat úpravy. V katalyzačním roztoku je přítomen dimethylaminopyridin, který je na vysoce polární koloně eluován v těsné blízkosti kyseliny stearové a ruší její stanovení. Při jednom promytí reakční směsi třepacím roztokem zůstává jeho část ve vzorku, proto jsme počet protřepávání zvýšili na tři. Na obrázku 5 je uveden chromatogram vzorku stanovovaných NEFA s přidavkem dimethylaminopyridinu.

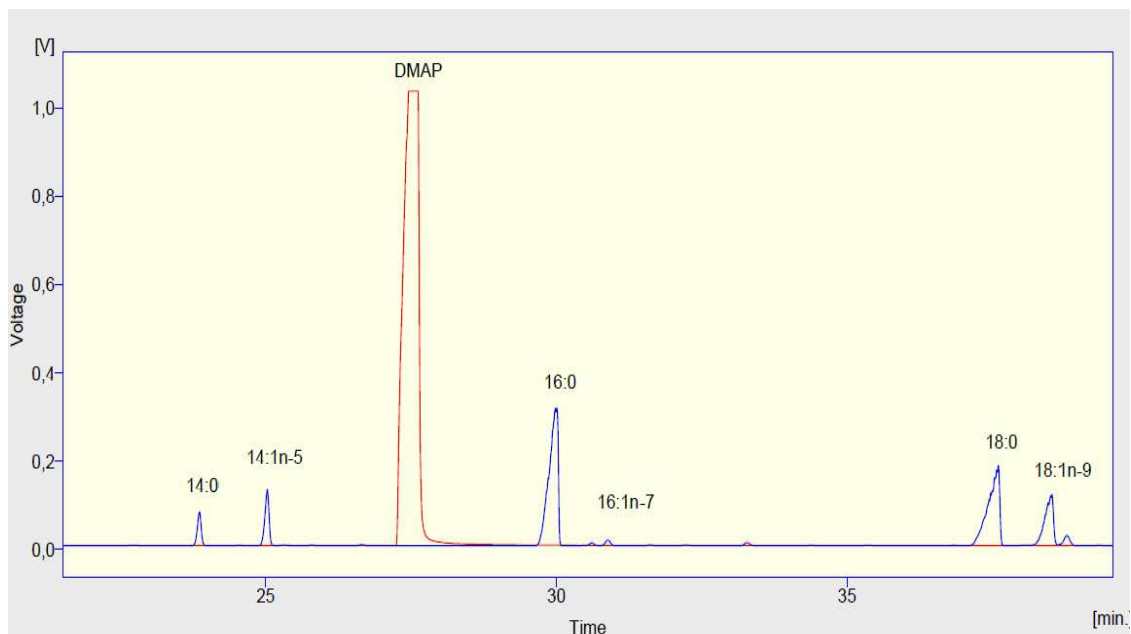
V publikované metodě, kterou jsme převzali (23), tohoto kroku nebylo třeba, protože autoři použili středně polární kolonu, na které je dimethylaminopyridin eluován po kyselině laurové (myristovou) a stanovení není rušeno. Záznam analýzy ukazuje obrázek 6.



**Obr. 5: Výřez chromatogramu mastných kyselin s přídavkem dimethylaminopyridinu na vysoce polární koloně**

DMAP-dimethylaminopyrimidin

*Separáčn*í podmínky: nástřik 1  $\mu$ l z 50  $\mu$ l vzorku s přídavkem dimethylaminopyrimidin, teplota: kolona 80° C, injektor 250° C, detektor 270° C. Teplotní gradient: 80° C 1 min, 4° C/min na 120° C, 2° C/ min do 270° po dobu 25 min, vyhodnocení chromatogramu programem Clarity od firmy DataApex.



**Obr. 6: Výřez chromatogramu mastných kyselin a dimethylaminopyridinu na středně polární koloně**

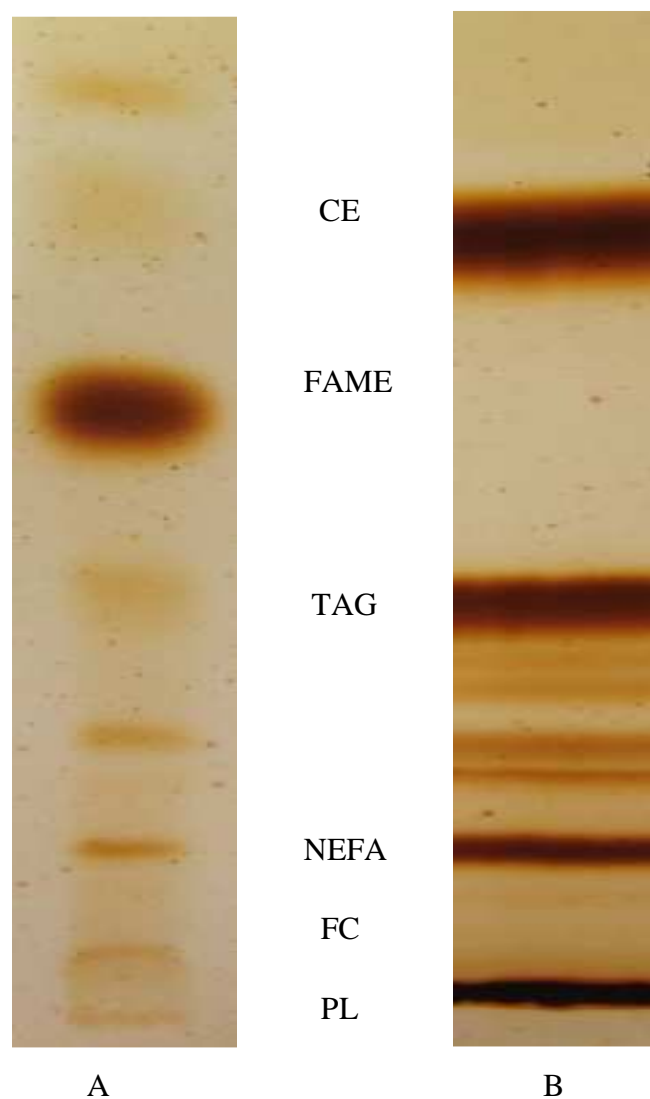
DMAP-dimethylaminopyrimidin

*Separační podmínky:* nástřik 1  $\mu$ l z 50  $\mu$ l vzorku spřídavkem dimethylaminopyrimidin, teplota: kolona 80° C, injektor 250° C, detektor 270° C. Teplotní gradient: 80° C 1 min, 4° C/min na 120° C, 2° C/ min do 270° po dobu 25 min, vyhodnocení chromatogramu programem Clarity od firmy DataApex.

Při extrakční metodě dochází v jednotlivých krocích k ustavení rovnováhy jednotlivých složek vzorku mezi dvě fáze, dané rozdělovacím koeficientem. Nedosahuje se úplné izolace NEFA od ostatních lipidových tříd. Při této metodě je esterifikace prováděná methylchloroformiátem. Efektivitu izolace jsem otestovala analýzou výsledných methylesterů FA, získaných extrakční metodou. Methyl estery jsme izolovali pomocí metody TLC. Analýza byla pouze kvalitativní, k vizualizaci frakcí jsme použili jodových par. Porovnání záznamu analýzy methylesterů a celkového lipidu plasmy ukazuje obrázek 7. Ze záznamu je patrné, že frakce methylesterů FA získaná extrakční metodou

obsahuje v menší míře i všechny ostatní frakce celkového lipidu – estery cholesterolu, triacylglyceroly i fosfolipidy. Tyto složky sice neruší stanovení mastných kyselin, ale nejsou také eluovány z kolony. Částečně podlehnou tepelné destrukci v injektoru, který se tímto znečišťuje, částečně se ukládají ve formě depozit na počátku kolony a postupem času tak zhoršují její dělicí vlastnosti; toto znečištění se projeví chvostováním píků především nenasycených složek. Kolonu je třeba po každých cca 200 analýzách zkrátit o asi o 1 m; zkracováním se postupně zhoršuje dělicí schopnost a zkracuje i její životnost. Na obrázku 7 můžeme také vidět zbytek frakce NEFA, které nebyly methylovány.

Statistické srovnání výsledků dosažených oběma metodami pro všechny vzorky (celkem 27 měření) je přehledně uvedeno v tabulce 4. Tabulka ukazuje jak relativní zastoupení (Rel%), tak absolutní koncentrace. Relativní zastoupení je poměr plochy píku pro FA k celkovému součtu ploch všech píků FA mimo vnitřního standardu. Při výpočtu absolutní koncentrace metodou vnitřního standardu je z důvodu nestejně odezvy detektoru pro jednotlivé FA nutná jejich korekce. Korekční faktory jsou uvedené v tabulce 3. Absolutní koncentrace nejsou zatíženy chybou způsobenou vzájemnou kompenzací změn, jak bylo pozorováno u relativního zastoupení. Většina biologických i medicinských studií však stále využívá výjádření výsledků jako relativní zastoupení FA v jednotlivých lipidových třídách, které přehledně ukazuje jejich podíl z celkového obsahu.



**Obr. 7: Analýza methylesterů připravených extrakční metodou (A) a celkového lipidu plazmy (B)**

PL – fosfolipidy, FC – volný cholesterol, TAG – triacylglyceroly, FAME – methylestery FA, CE – estery cholesterolu

Z výsledků je patrné, že prakticky u všech FA jsou významné rozdíly v koncentracích naměřených oběma metodami, a to jak u relativního zastoupení, tak u absolutních koncentrací. Pro SFA jsou vyšší hodnoty

koncentrací získané metodou TLC, pro MUFA a PUFA naopak hodnoty získané extrakční metodou.

**Tab. 4: Srovnání metod pro jednotlivé skupiny mastných kyselin**

ΣFA	M	MED (%) ± L <sub>1,2</sub>	t-test	MED (μmol/l) ± L <sub>1,2</sub>	t-test
ΣSFA	EXT	37,892 ± 1,753	<0,001	242,510 ± 28,783	<0,001
	TLC	47,088 ± 2,603		329,513 ± 37,719	
ΣMUFA	EXT	45,757 ± 1,406	<0,001	303,501 ± 52,319	0,316
	TLC	39,600 ± 1,966		286,922 ± 48,671	
ΣPUFA n-6	EXT	14,220 ± 0,679	<0,001	95,705 ± 17,580	0,053
	TLC	11,092 ± 1,010		82,311 ± 18,259	
ΣPUFA n-3	EXT	1,688 ± 0,138	<0,001	11,388 ± 1,658	<0,001
	TLC	0,966 ± 0,189		7,437 ± 2,521	

ΣFA – sumarizovaná skupina FA; SFA - součet koncentrací nasycených FA; MUFA - součet koncentrací mononenasycených FA; PUFA n-6 - součet koncentrací polynenasycených FA řady n-6; PUFA n-3 - součet koncentrací polynenasycených FA řady n-3; M – metoda; EXT – extrakce; TLC – tenkovrstevná chromatografie; MED – medián; L<sub>1,2</sub> - interval spolehlivosti;

Rozdíly v koncentracích měřených po izolaci na tenké vrstvě jsou způsobeny ztrátami PUFA, kterým se nepodařilo zabránit ani uchováváním desek ve vakuu. V profilu FA vyjádřených Rel% je vyšší zastoupení SFA, které je kompenzované nižším zastoupením MUFA a PUFA. Pokud by docházelo pouze ke ztrátám PUFA metodou TLC, v absolutních koncentracích by měly být hodnoty SFA srovnatelné u obou metod, výsledky však ukazují rozdíly stejného charakteru. Molární zastoupení MUFA a obou tříd PUFA bylo statisticky významně vyšší při extrakční metodě; stejný trend můžeme pozorovat i pro změny absolutních koncentrací MUFA a PUFA n-6, avšak rozdíly statistické významnosti nedosáhly.

Statistické vyhodnocení obou metod pro individuální FA je přehledně uvedeno v tabulce 5 (celkem 27 měření).



Rozdíly v koncentracích stanovených oběma metodami jsou pro jednotlivé FA prakticky shodné jako u jejich skupin podle nasycenosti. Výjimky, tedy vyšší koncentrace získané metodou TLC pro nenasyčené FA, tvoří kyseliny myristolejová (14:1 n-5), cis-7-hexa-decenová (16:1 n-9) a kyselina adrenová (22:4 n-6).

**Tab 5: Srovnání metod pro jednotlivé mastné kyseliny**

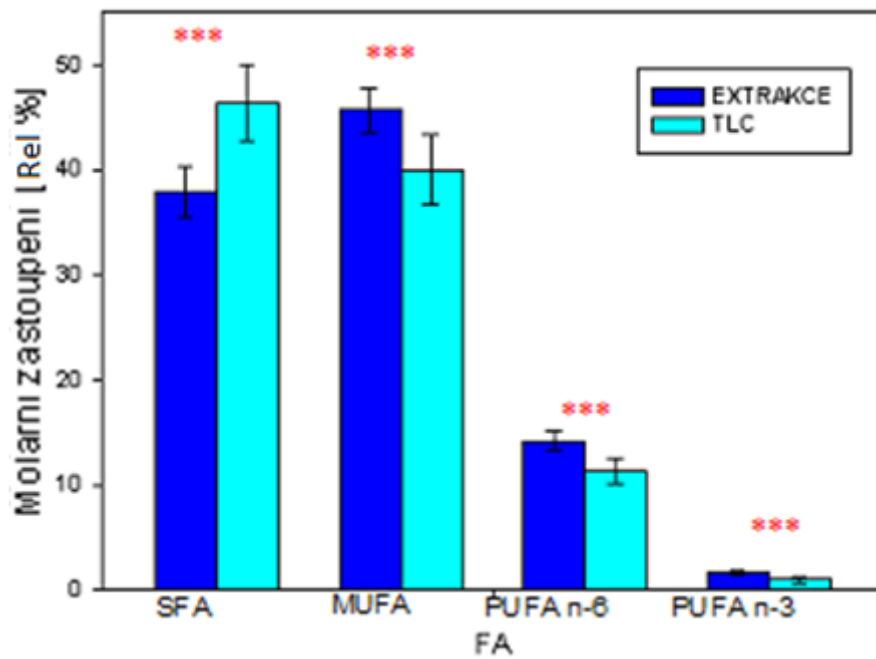
FA	MET	MED (%) $\pm L_{1,2}$	t-test	MED ( $\mu\text{mol/l}$ ) $\pm L_{1,2}$	t-test
14:0	EXT	0,990 $\pm$ 0,280	0,001	6,152 $\pm$ 1,859	<0,001
	TLC	1,526 $\pm$ 0,452		10,286 $\pm$ 3,093	
16:0	EXT	24,190 $\pm$ 0,996	<0,001	154,515 $\pm$ 20,563	<0,001
	TLC	30,510 $\pm$ 2,171		211,847 $\pm$ 21,755	
16:1n-9	EXT	0,644 $\pm$ 0,222	<0,001	3,960 $\pm$ 0,903	<0,001
	TLC	1,260 $\pm$ 0,373		8,608 $\pm$ 2,202	
16:1n-7	EXT	2,034 $\pm$ 0,207	0,002	13,439 $\pm$ 3,021	0,64
	TLC	1,773 $\pm$ 0,221		12,889 $\pm$ 3,160	
18:0	EXT	12,548 $\pm$ 0,951	<0,001	80,785 $\pm$ 8,136	<0,001
	TLC	14,689 $\pm$ 1,217		104,820 $\pm$ 16,083	
18:1 t	EXT	0,443 $\pm$ 0,077	<0,001	2,867 $\pm$ 0,530	<0,001
	TLC	1,254 $\pm$ 0,474		8,592 $\pm$ 2,620	
18:1n-9	EXT	40,181 $\pm$ 1,314	<0,001	266,766 $\pm$ 45,984	0,219
	TLC	34,240 $\pm$ 2,332		248,449 $\pm$ 42,920	
18:1n-7	EXT	2,347 $\pm$ 0,160	<0,001	15,633 $\pm$ 2,918	0,113
	TLC	1,912 $\pm$ 0,208		13,909 $\pm$ 2,743	
18:2n-6	EXT	11,979 $\pm$ 0,668	<0,001	80,493 $\pm$ 15,370	0,063
	TLC	9,382 $\pm$ 1,060		69,408 $\pm$ 15,556	
18:3n-6	EXT	0,106 $\pm$ 0,020	<0,001	0,736 $\pm$ 0,199	<0,001
	TLC	0,064 $\pm$ 0,019		0,472 $\pm$ 0,176	
20:0	EXT	0,128 $\pm$ 0,022	<0,001	0,834 $\pm$ 0,121	<0,001
	TLC	0,325 $\pm$ 0,065		2,314 $\pm$ 0,459	
18:3n-3	EXT	1,018 $\pm$ 0,095	<0,001	6,785 $\pm$ 1,142	<0,001
	TLC	0,594 $\pm$ 0,156		4,489 $\pm$ 1,559	

**Tab 5: Srovnání metod pro jednotlivé mastné kyseliny (pokračování)**

20:1n-9	EXT	0,498 ± 0,034	<0,001	3,353 ± 0,600	0,008
	TLC	0,379 ± 0,035		2,804 ± 0,568	
20:2n-6	EXT	0,309 ± 0,049	<0,001	2,035 ± 0,323	<0,001
	TLC	0,189 ± 0,038		1,417 ± 0,401	
20:3n-6	EXT	0,314 ± 0,046	<0,001	2,149 ± 0,510	<0,001
	TLC	0,190 ± 0,036		1,437 ± 0,398	
20:4n-6	EXT	1,258 ± 0,108	<0,001	8,551 ± 1,444	0,093
	TLC	1,034 ± 0,165		7,778 ± 1,880	
22:5n-6	EXT	0,131 ± 0,044	0,007	0,894 ± 0,284	0,703
	TLC	0,100 ± 0,024		0,774 ± 0,231	
22:5n-3	EXT	0,157 ± 0,037	<0,001	1,088 ± 0,303	0,006
	TLC	0,085 ± 0,026		0,671 ± 0,255	
22:6n-3	EXT	0,429 ± 0,063	<0,001	2,958 ± 0,488	<0,001
	TLC	0,236 ± 0,057		1,866 ± 0,646	

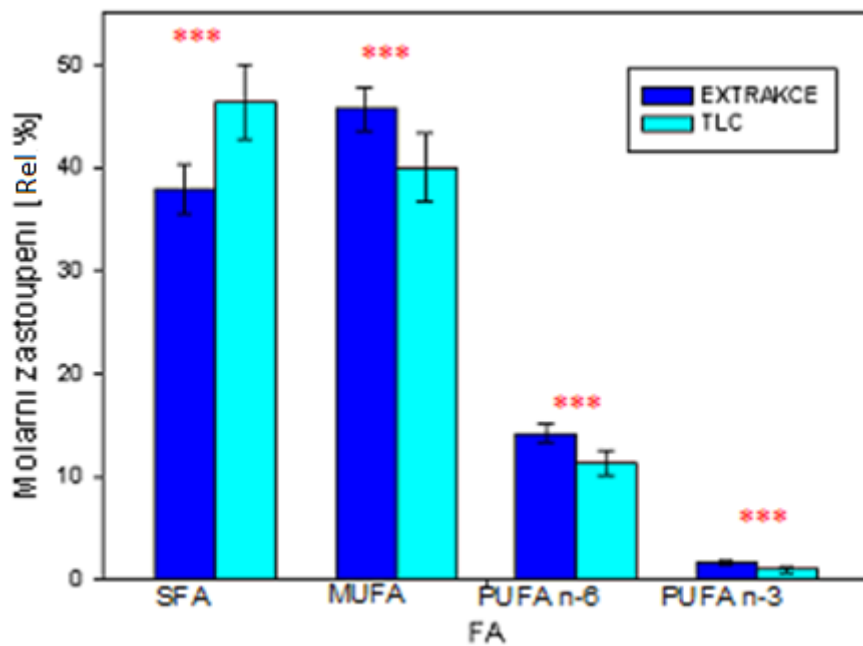
M – metoda; EXT – extrakce; TLC – tenkovrstevná chromatografie; MED – medián;  $L_{1,2}$  - interval spolehlivosti, t – trans

Srovnání koncentrací pro skupiny FA podle nasycenosti a pro majoritní FA (v Rel%) jsou uvedeny na obr. 8 a 9.



\*\*\*)  $P \leq 0,001$

**Obr. 8: Srovnání koncentrací skupin mastných kyselin**



\*\*\*)  $P \leq 0,001$

**Obr. 9: Srovnání koncentrací majoritních mastných kyselin**

Výsledky uvedené v tabulkách 4 a 5 jsou zpracovány z 9 vzorků měřených v tripletech, tj. každá hodnota představuje průměr z 27 měření. Na obrázku 8 a 9 jsou grafy nejdůležitějších poznatků z tabulek 4 a 5. Burdge a spolupracovníci (41) srovnávali metody TLC a SPE pro jednotlivé lipidové třídy (PL, TAG, CE, NEFA) a v případě NEFA se však zabývali pouze kyselinami palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou. Hodnoty RSD pro metodu TLC byly pro tyto kyseliny srovnatelné s našimi výsledky: kyselina palmitová 14% vs. 9,9%, kyselina stearová 16,5% vs. 11,5%, kyselina olejová 6,7% vs. 9,5% a kyselina linolová 11,8% vs 15,7%. Autoři dále zmiňují, že pro FA o obsahu 1% a nižším hodnota RSD dramaticky vzrůstá, ale konkrétní čísla však neuvádějí.

**Tab. 6: Statistické srovnání výsledků obou metod pro jednotlivé vzorky z absolutních koncentrací**

FA/P	Vzorek								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14:0	0,080	<b>0,025</b>	0,587	<b>0,048</b>	0,180	0,088	<b>0,0480</b>	0,1800	0,0880
16:0	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0020</b>	<b>0,0020</b>	<b>0,0040</b>
16:1n-9	0,100	<b>0,005</b>	0,407	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,0030</b>	<b>&lt;0,001</b>
16:1n-7	0,343	0,927	0,097	0,700	<b>0,007</b>	0,967	0,7000	<b>0,0070</b>	0,9670
18:0	0,085	<b>0,001</b>	<b>0,017</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,006</b>	<b>0,042</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,0060</b>	<b>0,0420</b>
18:1 t	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,036</b>	<b>0,005</b>	0,100	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>	0,1000	<b>0,0010</b>	<b>0,0140</b>
18:1n-9	<b>&lt;0,001</b>	0,400	0,100	0,073	0,646	<b>0,008</b>	0,0730	0,6460	<b>0,0080</b>
18:1n-7	0,706	0,262	0,078	<b>0,008</b>	0,700	0,059	<b>0,0080</b>	0,7000	0,0590
18:2n-6	0,852	0,252	0,100	0,215	0,585	<b>0,001</b>	0,2150	0,5850	<b>0,0010</b>
18:3n-6	<b>&lt;0,001</b>	0,106	<b>0,003</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,1000	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
20:0	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,1000	<b>&lt;0,001</b>
18:3n-3	<b>&lt;0,001</b>	0,102	<b>0,014</b>	0,700	0,133	<b>0,007</b>	0,7000	0,1330	<b>0,0070</b>
20:1n-9	0,844	<b>0,010</b>	0,200	0,100	0,100	0,136	0,1000	0,1000	0,1360
20:2n-6	0,400	0,400	0,122	0,100	0,700	0,124	0,1000	0,7000	0,1240
20:3n-6	0,149	0,400	<b>0,027</b>	<b>0,046</b>	0,700	0,447	<b>0,0460</b>	0,7000	0,4470
20:4n-6	0,767	0,364	0,100	<b>0,014</b>	0,739	0,700	<b>0,0140</b>	0,7390	0,7000
22:5n-6	0,145	0,215	0,429	0,100	0,272	0,297	0,1000	0,2720	0,2970
22:5n-3	0,427	0,578	0,117	<b>&lt;0,001</b>	0,700	0,297	<b>&lt;0,001</b>	0,7000	0,2970
22:6n-3	0,700	<b>0,027</b>	<b>0,010</b>	0,069	0,100	0,510	0,0690	0,1000	0,5100

\*) t-test, červená - vyšší koncentrace TLC, modrá- vyšší koncentrace extrakce

Srovnání metod pro jednotlivé vzorky, tj. vyhodnocení 3 stanovení extrakční metodou proti 3 stanovením metodou TLC, ukazuje tabulka 6. Srovnání se týká měření absolutních hodnot metodou vnitřního standardu. Tabulka 7 porovnává metody pomocí relativních koncentrací.

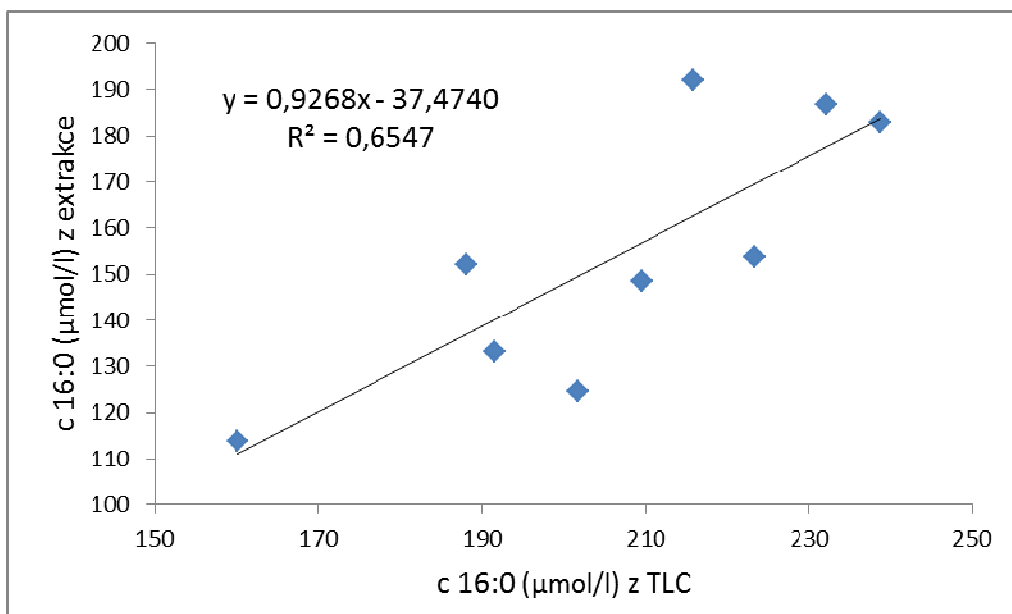
Výsledky jednotlivých vzorků odpovídají výsledkům zpracování celé skupiny, tzn. charakter změn (zvýšení-snížení) je shodný. Je zde však méně statisticky významných rozdílů především pro PUFA.

Pro metabolicky významné FA – kyselinu palmitovou, palmitolejovou, stearovou, olejovou a linolovou - jsme zpracovali regresní závislosti pro srovnání obou metod, které jsou uvedeny na obrázcích 10-17.

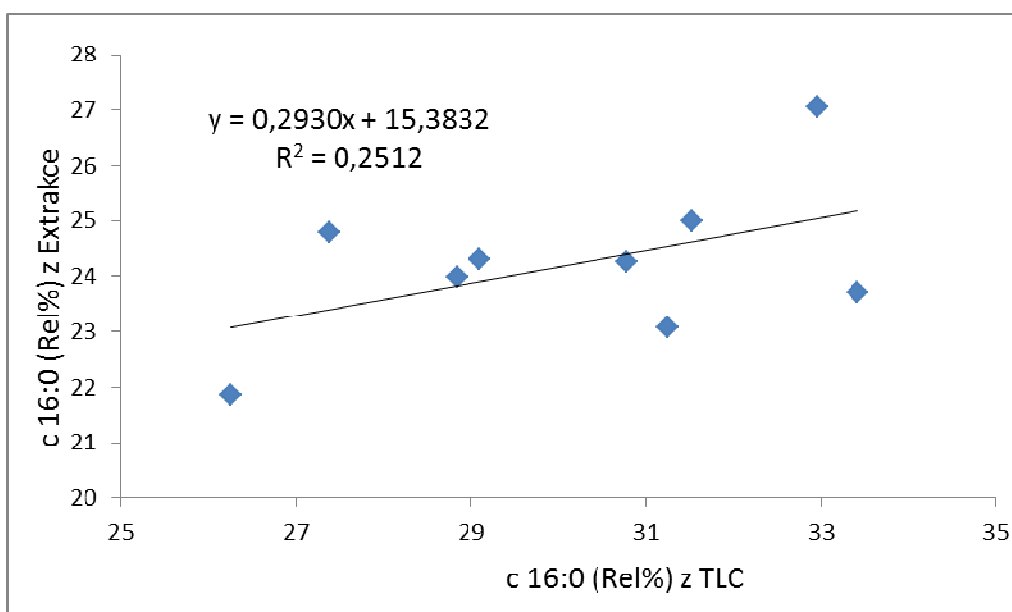
**Tab. 7: Statistické srovnání výsledků obou metod pro jednotlivé vzorky z relativního zastoupení**

FA/P	Vzorek								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14:00	0,169	<b>0,008</b>	0,799	<b>0,038</b>	0,212	0,096	0,896	0,305	<b>0,002</b>
16:00	<b>0,038</b>	<b>0,002</b>	0,076	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,047</b>	<b>0,004</b>	0,002	0,100	0,100
16:1n-9	0,105	<b>0,002</b>	0,256	<b>&lt;0,001</b>	0,100	0,002	0,356	<b>0,008</b>	<b>&lt;0,001</b>
16:1n-7	0,856	0,381	0,100	0,395	<b>&lt;0,001</b>	0,589	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>	0,232
18:00	<b>0,100</b>	0,687	0,064	<b>0,005</b>	<b>0,027</b>	<b>0,024</b>	<b>0,033</b>	<b>0,014</b>	<b>0,011</b>
18:1 t	<b>0,012</b>	0,065	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,017</b>	0,100	0,100	0,076
18:1n-9	<b>0,044</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,062	0,100	0,054	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	0,100	<b>0,002</b>
18:1n-7	0,099	<b>0,029</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>0,019</b>	<b>0,006</b>	<b>0,060</b>	<b>0,004</b>
18:2n-6	<b>0,013</b>	0,100	0,083	<b>0,007</b>	0,198	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>
18:3n-6	<b>&lt;0,001</b>	0,068	0,100	<b>0,049</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,100	0,100	0,604
20:00	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>	0,100	0,100	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>	0,100	0,003
18:3n-3	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,025</b>	0,100	0,700	0,054	<b>0,008</b>	0,100	<b>0,023</b>	<b>0,001</b>
20:1n-9	0,050	<b>&lt;0,001</b>	0,115	<b>&lt;0,001</b>	0,100	0,115	0,100	0,100	0,100
20:2n-6	0,100	0,100	0,100	<b>0,049</b>	0,700	0,200	<b>0,012</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>
20:3n-6	<b>0,037</b>	0,100	0,100	<b>0,021</b>	0,100	0,359	0,100	0,061	<b>&lt;0,001</b>
20:4n-6	0,700	0,056	0,100	<b>0,002</b>	0,914	1,000	0,100	0,100	<b>0,006</b>
22:5n-6	0,125	0,153	0,410	<b>0,049</b>	0,255	0,340	0,076	0,353	1,000
22:5n-3	0,100	0,100	0,100	<b>&lt;0,001</b>	0,700	0,340	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>&lt;0,001</b>
22:6n-3	0,100	<b>0,005</b>	0,100	<b>0,012</b>	0,100	0,100	0,100	<b>0,008</b>	<b>0,002</b>

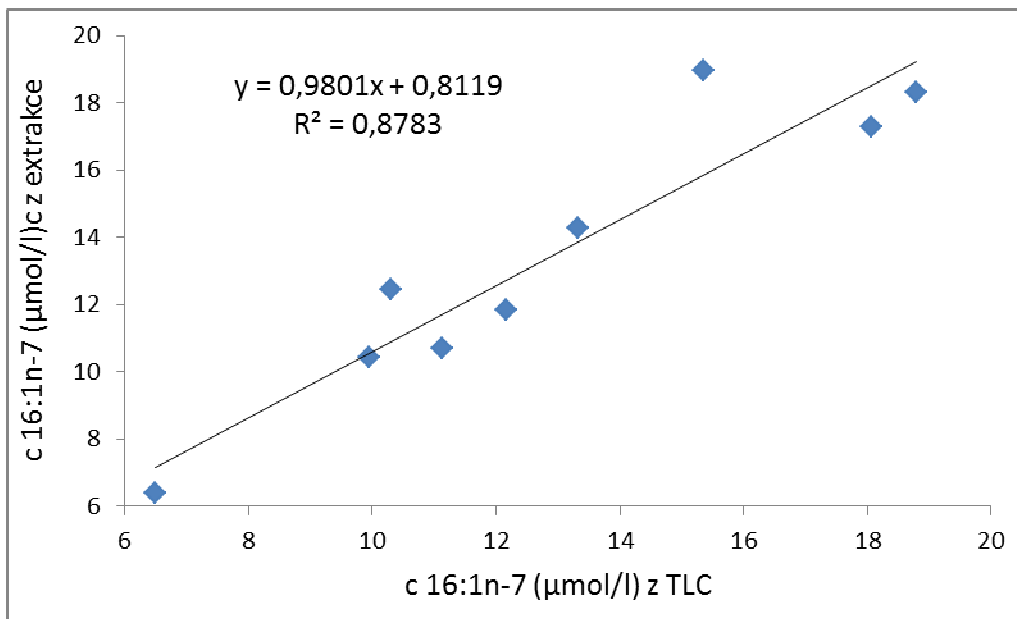
\*) t-test, červená - vyšší molární zastoupení TLC, modrá - vyšší molární zastoupení extrakce



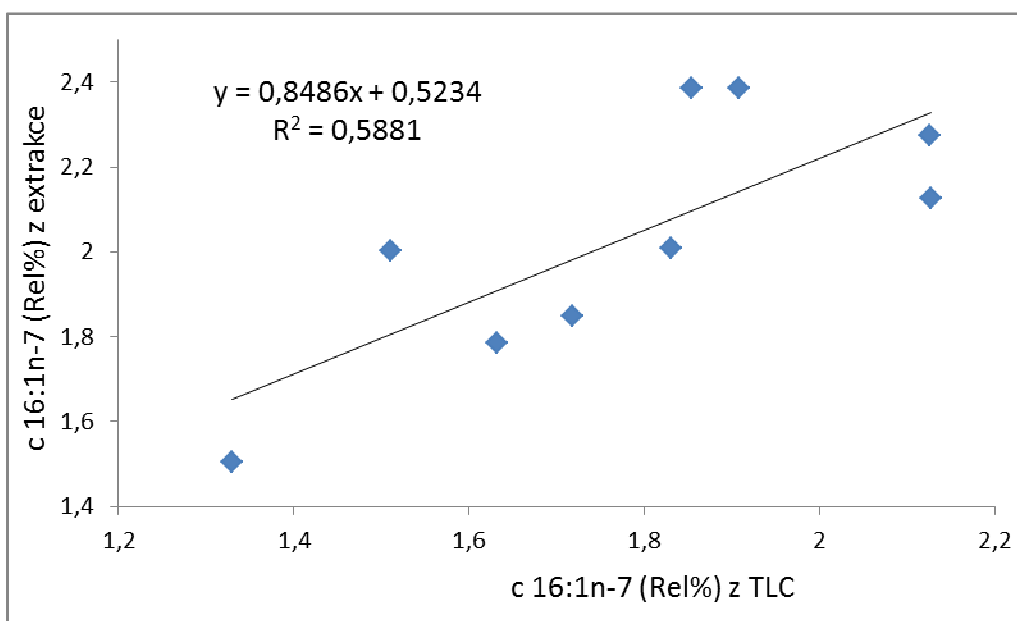
**Obr. 10: Porovnání metod izolace pomocí koncentrací kyseliny palmitové**



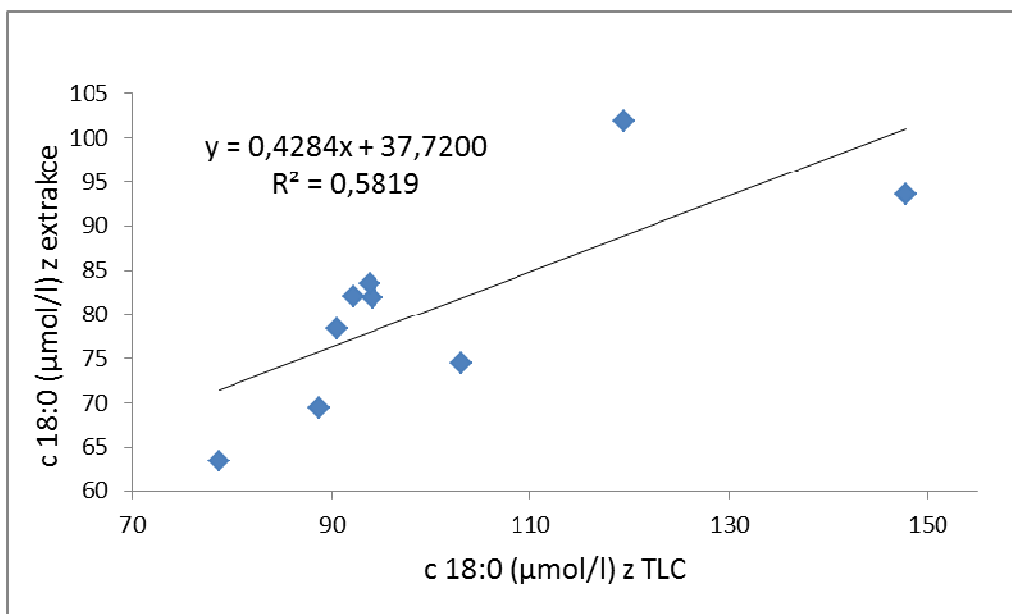
**Obr. 11: Porovnání metod izolace pomocí relativního zastoupení kyseliny palmitové**



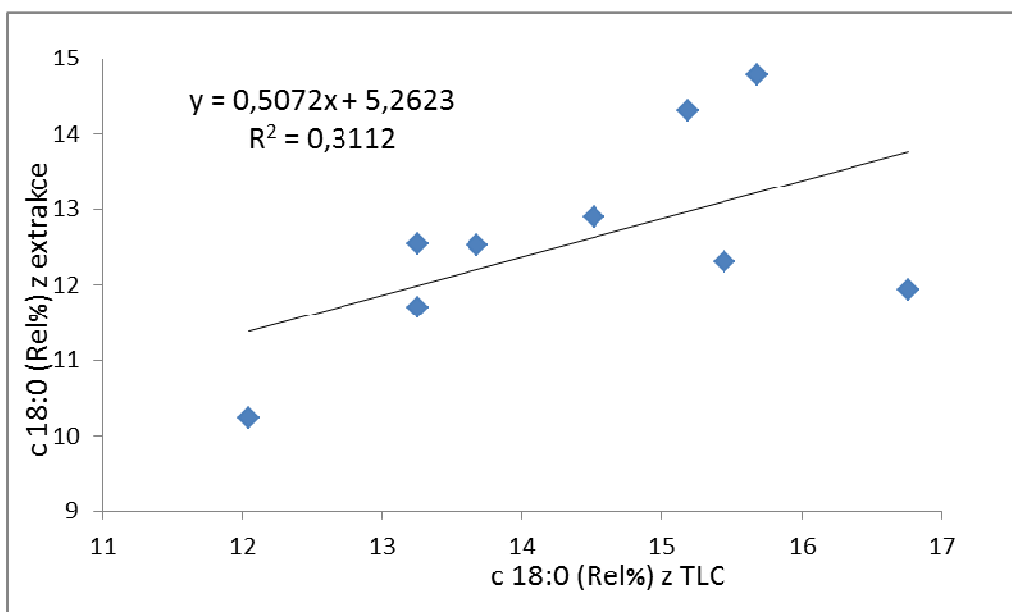
**Obr. 12: Porovnání metod izolace pomocí koncentrací kyseliny palmitolejové**



**Obr. 13: Porovnání metod izolace pomocí relativního zastoupení kyseliny palmitolejové**

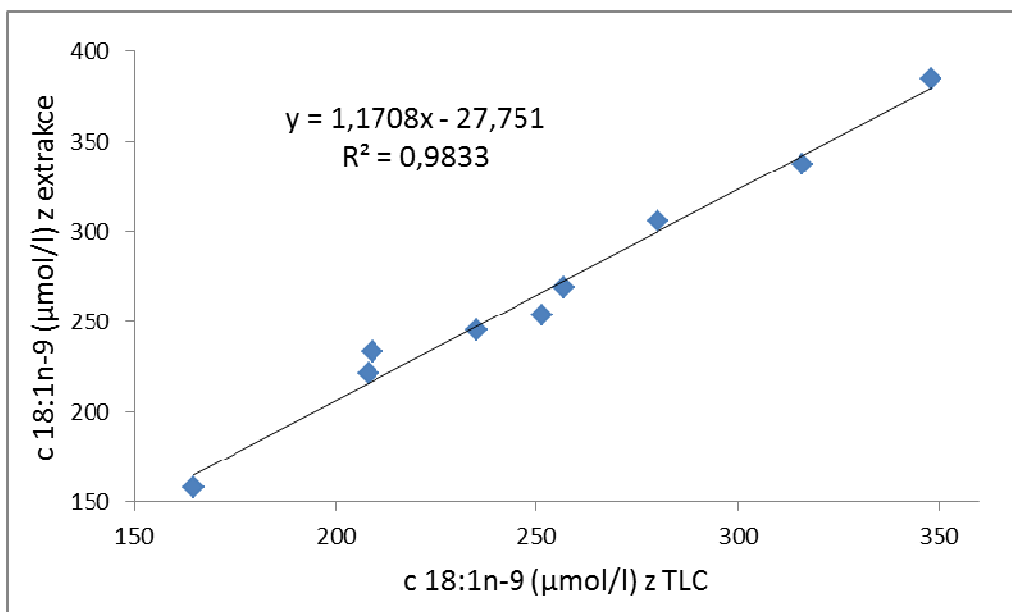


**Obr. 14: Porovnání metod izolace pomocí koncentrací kyseliny stearové**

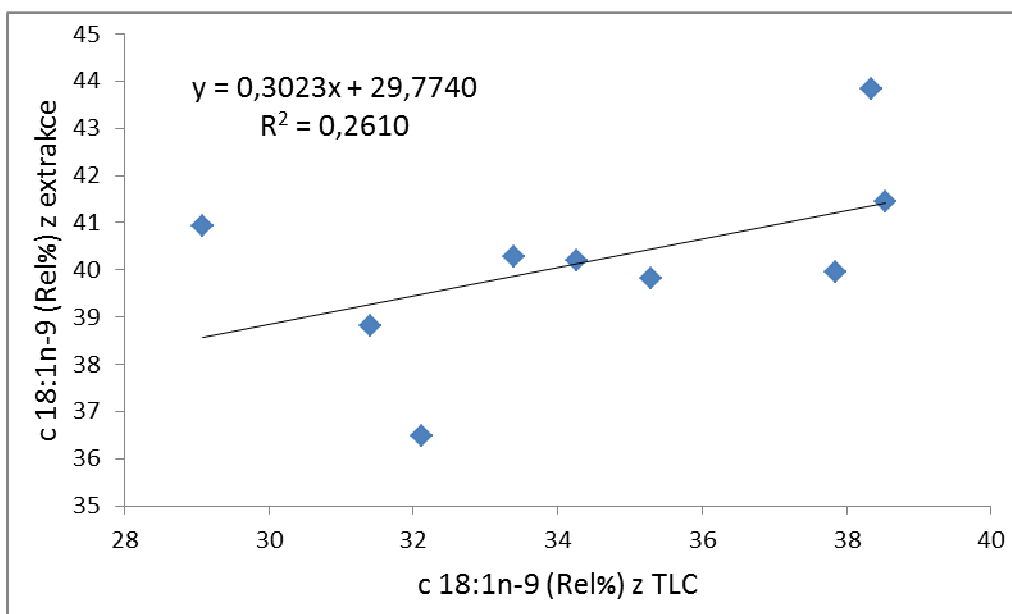


**Obr. 15: Porovnání metod izolace pomocí relativního zastoupení kyseliny stearové**





**Obr. 16: Porovnání metod izolace pomocí koncentrací kyseliny olejové**



**Obr. 17: Porovnání metod izolace pomocí relativního zastoupení kyseliny olejové**

Shrnutí všech regresních závislostí a jejich korelačních koeficientů ukazuje tabulka 8.

**Tab. 8: Parametry regresních závislostí a korelační koeficienty stanovovaných mastných kyselin**

FA	K		Q		R <sup>2</sup>	
	REL c	ABS c	REL c	ABS c	REL c	ABS c
14:0	-0,067	-0,096	1,085	6,974	0,010	0,019
16:0	0,293	0,927	15,383	-37,474	0,251	0,655
16:1n-9	0,240	0,022	0,365	3,916	0,129	0,002
16:1n-7	0,849	0,980	0,523	0,812	0,588	0,878
18:0	0,507	0,428	5,262	37,720	0,311	0,582
18:1 t	0,061	-0,166	0,366	4,129	0,053	0,212
18:1n-9	0,302	1,171	29,774	-27,751	0,261	<b>0,983</b>
18:1n-7	0,498	1,092	1,404	0,563	0,403	<b>0,922</b>
18:2n-6	0,569	1,080	6,560	5,519	0,445	<b>0,928</b>
18:3n-6	-0,103	0,412	0,115	0,558	0,008	0,122
20:0	0,034	0,030	0,112	0,743	0,116	0,008
18:3n-3	0,007	0,419	1,037	5,081	0,0001	0,244
20:1n-9	0,707	1,315	0,238	-0,2344	0,361	<b>0,954</b>
20:2n-	0,006	0,470	0,317	1,436	0,00002	0,259
20:3n-6	-0,004	0,714	0,300	1,000	0,00001	0,361
20:4n-6	0,335	0,812	0,903	2,383	0,099	0,521
22:5n-6	0,034	0,476	0,116	0,459	0,004	0,538
22:5n-3	-0,141	0,491	0,169	0,776	0,009	0,145
22:6n-3	0,124	0,459	0,405	2,152	0,011	0,344

rovnice  $y = kx + q$ , y – extrakce, x – TLC, R – korelační koeficient, REL- relativní ABS- absolutní

Z uvedené tabulky je patrné, že korelace obou metod není příliš dobrá, až na několik výjimek pro absolutní stanovení koncentrací u kyselin palmitolejové, olejové, vakcenové a cis-11 eikosenové. U kyselin palmitové a stearové, které jsou chemicky nejstabilnější, jsou výsledky podstatně horší.

Může to být způsobeno nereprodukovatelností jednotlivých izolačních kroků při zpracování vzorku extrakční metodou, případně i izolací na tenké vrstvě. Nasycené FA se mohou v daném systému pohybovat pomaleji a tak může dojít k nereprodukovatelným ztrátám. Ze zkušenosti pracoviště je známo, že monoacidické triacylglyceroly s nasycenou FA, používané jako vnitřní standard pro tuto lipidovou třídu, zůstávají při vyvíjení mobilní fáze heptan-diethylether-kyselina octová částečně na startu, kde pak ruší stanovení profilu FA ve fosfolipidech.

Možným dalším důvodem rozdílu v obou metodách je v postupu methylace NEFA U izolace prostřednictvím TLC jsme methylovali NEFA methanolem s  $H_2SO_4$ . Tento postup je dlouho používaný jeho výtěžnost je téměř 100%, ale tento postup je časově náročný. U izolace pomocí extrakce kapalina-kapalina je použit methylchloroformiát. Na obrázku 7 je vidět že methylace neproběhla se 100% účinností. Výsledný vzorek FA po methylaci stále obsahuje frakci neesterifikovaných FA. Hušek a spol. (23) uvádějí výtěžek methylace 95-106 % pro jednotlivé FA. Výhodou této methylace je časová a finanční úspora, ale nevýhodou je nestálost esterifikačního činidla.

U minoritních složek je stanovení vždy zatížené větší chybou a nízké hodnoty korelačních koeficientů byly očekávané. Při využití metody pro biochemický výzkum či diagnostiku je třeba používat zásadně jednu z metod pro zachování kontinuity výsledků.

## 6 Závěr

V diplomové práci byly srovnány dvě izolační metody pro stanovení NEFA plynovou chromatografií – extrakce v systému kapalina-kapalina a izolace preparativní tenkovrstevnou chromatografií. Složení NEFA ve formě methylesterů bylo stanoveno kapilární plynovou chromatografií.

Lze říci, že reprodukovatelnost výsledků byla výrazně lepší u extrakční metody. Zastoupení jednotlivých FA i jejich skupin podle nenasycenosti, vyjádřených jako Rel% nebo jako absolutní koncentrace v  $\mu\text{mol/l}$ , se u obou metod lišilo, ve většině případů statisticky významně. Charakter změn byl shodný pro relativní i absolutní koncentrace NEFA. Metodou TLC se dosahuje vyšší výtěžnosti izolace NEFA, ale dochází k ztrátám PUFA oxidací a navíc metoda je časově náročná.

U výsledků uvedených v absolutních koncentracích byla lepší vzájemná korelace. Výhodou vyjádření výsledků v relativním zastoupení je přehlednost zastoupení jednotlivých NEFA.

Parametry regresních přímek i hodnoty korelačních koeficientů ukazují na nepřilíh dobrou shodu obou metod, výjimku tvořily pouze kyseliny palmitolejová, olejová, vakcenová, linolová a cis-11 eikosenová v absolutních koncentracích. Při studiu biologických souborů je třeba používat pouze jednu z metod, nejsou vzájemně zastupitelné, aniž by byla porušena kontinuita výsledků.

V současné době jsou výše uvedené metody nahrazovány extrakcí na pevné fázi. K tomuto účelu se nejčastěji používají SPE kolonky. Předpokládá se, že tato extrakce bude optimalizována a zavedena pro izolaci jednotlivých lipidových tříd i na pracovišti IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN Praha.

## Literatura

1. Tvrzická E, et al., *Mastné kyseliny: 1. Výskyt a biologický význam*, Čas Lék Čes, 2009, 148:16-24.
2. Kremmyda LS, et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease*, Biomed Pap Med, 2011, 155: 195-218.
3. Tvrzická E, et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease-a review, Part 1: classification, dietary sources and biological functions*, Biomed Pap Med, 2011, 155: 117-130.
4. Pownall HJ, *Cellular transport of nonesterified fatty acids*, J Mol Neurosci, 2001, 16: 109-115.
5. Murray RK, *Biosynthesa mastných kyselin v knize Harperova biochemie*, H&H, Praha, 1998, 223-278.
6. Wang DC, et al., *Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2012, 33: 1057-1066.
7. Yi L, et al., *Simultaneously quantitative measurement of comprehensive profiles of esterified and non-esterified fatty acid in plasma of type 2 diabetic patients*. Chem Phys Lipids, 2007, 150: 204-216.
8. Boden G, *Obesity and free fatty acids*, Endocrinol Metab Clin North Am, 2008, 37: 635-646.
9. Svačina Š, *Metabolický syndrom a lipidy v knize Syndrom inzulínové resistance*, Triton, 2002, 53-56.
10. Zima T, *Poruchy metabolismu lipidů a lipoproteinů, v knize Laboratorní diagnostika*, Galén, 2013, 127-130.
11. Tvrzická E, *Mastné kyseliny:2. Fyziologický a klinický význam*, Čas Lek Čes, 2009, 148: 116-123
12. Mead JF, *The metabolism of the essential fatty acids*, Am J Clin Nutr, 1958, 6: 656-661.
13. Lawson RE, Moss AR, *The role of dairy products supplying conjugated linoleic acid to man's diet*, Nutr Res Rev, 2001, 14: 153-172.
14. Heaggström JZ, Wetterholm A, *Enzymes and receptors in the leukotriene cascade*, Cell Mol Life Sci, 2002; 59: 742-753.
15. Nelson DL, Cox MM, *Lipids v knize Principles of Biochemistry*, Freeman and company, New York, 2005, 334-363.
16. Privett OS, et al., *Quantitative analysis of lipid classes*, Am J Clin Nutr, 1971, 24: 1265-1275.
17. Dole VP, *Fractionation of plasma nonesterified fatty acid*, Proc Soc Exp Biol Med, 1956, 93: 532-533.

18. Dole VP, *A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose*, J Clin Invest, 1956, 35: 150-154.
19. Folch J, et al., *A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues*, J Biol Chem, 1957, 226: 497-509.
20. Aveladano MI, et al., *Separation and quantitation of free fatty acids and fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography*, J Lipid Res, 1983, 24: 83-93.
21. Cristie WW, *Isolation of fatty acids and identification by spectroscopic and related techniques*, v knize *Lipid analysis*, PJ Barnes & Associates, 2010, 181-188.
22. Cristie WW, *Analysis of simple lipid classes*, v knize *Lipid analysis*, PJ Barnes & Associates, 2010, 71-76.
23. Hušek P, et al., *Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum*, Anal Chim Acta, 2002, 465: 433-439.
24. Burdge GC, et al., *A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction*, Br J Nutr, 2000, 84: 781-787.
25. Kopf T, Schmitz G, *Analysis of non-esterified fatty acids in human samples by solid-phase-extraction and gas chromatography/mass spectrometry*, J Chromatogr B, 2013, 938: 22-26.
26. Shimizu S, et al., *Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method*, Anal Biochem, 1980, 107: 193-198.
27. Harris RJ, *Plasma nonesterified fatty acid and blood glucose levels in healthy and hypoxemic newborn infants*, J Pediatr, 1974, 84: 578-584.
28. Cristie WW, *Preparation of derivatives of fatty acids*, v knize *Lipid analysis*, PJ Barnes & Associates, 2010, 145-158.
29. Lepage G, Roy CC, *Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction*, J Lipid Res, 1988, 29: 227-235.
30. Pace-Asciak CR, *One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis*, J Lipid Res, 1989, 30: 451-454.
31. Tvrzická E, et al., *Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection. Quantitative aspects*, Anal. Chim. Acta, 2002, 465: 337-354.
32. Banel A, et al., *Determination of SCFAs in water using GC-FID. Selection of the separation systém*, Anal Chim Acta, 2012, 716: 24-27.
33. Sanchez-Avila N, et al., *Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography-mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum*, J Chromatogr A, 2009, 1216: 6864-6872.
34. Cristie WW, *Mass spectrometry of fatty acids*, v knize *Lipid analysis*, PJ Barnes & Associates, 2010, 202-211.

35. Miwa TK, et al., *Gas chromatographic characterization of fatty acids-identification constants for mono- and dicarboxylic methyl esters*, Anal Chem, 1960, 32: 1739-1742.
36. Cristie WW, *Position and geometric isomers of unsaturated fatty acids, v knize Lipid analyse*, PJ Barnes & Associates, 2010, s.169.
37. Eder K, *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters: Avoiding discrimination by programmed temperature vaporizing injection*, J Chromatogr, 1991, 588: 265-272.
38. Beaumelle BD., *Quantitative analysis of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals on a polar (free fatty acid phase) capillary column*, 1986, 356: 187-194.
39. Liebich HM, *Analysis of polyunsaturated fatty acids in blood serum after fish oil administration*, J Chromatogr B, 1991, 572: 1-9.
40. Shantha NC, *Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n—3 polyunsaturated fatty acid methyl esters*, J Chromatogr, 1990, 533: 1-10.
41. Bannon CD, *Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. V. Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector*, J Am Oil Chem Soc, 1986, 63: 105-110.
42. Sattler W, *Preparation of fatty acid methyl esters from lipoprotein and macrophage lipid subclasses on thin-layer plates*, Lipids, 1996, 12: 1303-1310.