

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Eva Havelková

**VYUŽITÍ MODERNÍCH SEPARAČNÍCH A SPEKTROMETRICKÝCH
METOD K IDENTIFIKACI LIPIDOMU Z BIOLOGICKÉHO VZORKU**

ACIDIMETRIC DETERMINATION OF ACETIC ACID IN FOOD PRODUCTS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultanti diplomové práce:

Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc., RNDr. Aleš Tomčala, PhD.

Praha 2013

Tato práce byla finančně podporována Technologickou agenturou České republiky
(projekt #TA01020969)

Prohlášení

Tato diplomová práce byla vypracována na pracovišti laboratoře přírodních produktů Ústavu organické chemie a biochemie v Praze v letech 2010 – 2013 pod vedením RNDr. Aleše Tomčaly, PhD.

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 14. května 2013.

.....

Eva Havelková

Abstrakt

Využití moderních separačních a spektrometrických metod k identifikaci lipidů z biologického vzorku

Lipidomika je jedna z oblastí metabolomiky, která se v poslední době, díky rozvoji chemicko-analytických metod hlavně pak spektrometrických, těší velké pozornosti. Tato práce se věnuje testování extrakčních technik lipidů, optimalizaci preseparace lipidů a jejich chromatografie pro hmotnostní spektrometrii. Byly získány fragmentační vzory zástupců čtyř nejvíce zastoupených tříd glycerolipidů (PC, PE, TG, DG) v navrhovaném systému a srovnány s dostupnou literaturou. Pro extrakci byla určena jako vhodnější Folchova metoda využívající směs chloroformu a methanolu. Preseparační technika SPE napomáhá k identifikaci lipidů. Optimalizace této metody proběhla ve smyslu zvýšení její výtěžnosti a to zejména ve frakci polárních lipidů. HPLC metoda je založena na mobilních fázích methanolu s amonným pufrem, vodě a isopropanolu. Separace byla testována na třech kolonách založených na různých typech sorbentů (Gemini, Synchronis a Kinetex) a byla hodnocena z hlediska opakovatelnosti, tvaru a šířky peaků jednotlivých analytů. Jako nejlepší byla vybrána varianta, která využívala vmíchání 20% vody do systému. Kolona Kinetex se osvědčila jako nejlepší. Robustnost navržené metody a kolony byla testována na vzorcích rybiho masa se zaměřením na detekci omega-3 nenasycených mastných kyselin. Hlavním výsledkem bylo zjištění, že maso mořských ryb obsahuje valnou většinu omega-3 nenasycených kyselin v molekulách fosfolipidů.

Abstract

Modern separation and spectrometric techniques for biological sample lipidom investigation

Due recent progress in field of mass spectrometry the lipidomics, part of metabolomics, is increasing its importance for broad fields of biological study. The aim of this study is to test the lipid extraction techniques and to optimize the preseparation and separation of lipids suitable for mass spectrometry detection. The fragmentation patterns of four, the most abundant lipid classes of glycerolipids (PC, PE, TG, DG), were acquired for the proposed system. These patterns were compared with literature. The most appropriate method for extraction was declared technique according Folch based on methanol and chloroform solution. The preseparation due SPE method is very useful tool for lipid determination. The optimized were focused to reach higher recovery especially in polar lipid fraction. Proposed HPLC system is based on methanol with ammonium buffer, water and isopropanol. The testing was done on three columns with different type of sorbents (Gemini, Synchronis and Kinetex). The separation was evaluated according mass spectrometer response, shape and wide of particular analytes peaks. Composition contains 20% of water was determinate as the best and also the best separation was achieved by Kinetex column. The proposed method was tested on set of fish meat samples which was focused on omega-3 unsaturated fatty acid determination. This study revealed that most of the omega-3 unsaturated fatty acids are present in phospholipids molecules rather than triacylglyceroles.

Klíčová slova

Předmětová hesla:

Optimalizace extrakce na tuhou fázi (SPE)

Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC)

Hmotnostní spektrometrie lipidů (MS)

Klíčová slova:

Glycerolipidy

SPE

UHPLC

MS

Key Words

Objectives Words:

Optimization of Solid Phase Extraction (SPE)

Optimization of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) & Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Mass Spectrometry (MS)

Key Words:

Glycerolipids

SPE

UHPLC

MS

Poděkování

Ráda bych vyjádřila své díky všem, kteří se na mé práci podíleli.

V první řadě rodičům, kteří mne podporovali po celou dobu mého studia na Univerzitě Karlově v Praze.

Dále paní doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a paní RNDr. Ireně Valterové, CSc., které z pozice vedoucího a garanta za katedru analytické chemie Univerzity Karlovy v Praze, resp. konzultanta této diplomové práce, mne přivedly k tématu této práce a jejímu následnému vypracování v laboratoři přírodních produktů Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

Samozřejmě nesmím opomenout ani trpělivé, odborné a lidské vedení při činnostech vedoucí k úspěšnému dokončení této diplomové práce, kterého se mi dostávalo po celou dobu od RNDr. Aleše Tomčaly, PhD. a ostatních spolupracovníků během mého působení v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

Děkuji též TA ČR za finanční podporu umožňující výzkum spojený s touto diplomovou prací.

Obsah

Prohlášení.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Klíčová slova	6
Key Words	7
Poděkování.....	8
Obsah	9
Seznam zkratk a symbolů	11
1 Úvod.....	13
1.1 Cíle práce	13
1.2 Studované látky.....	14
1.2.1 Biologický význam lipidů.....	16
1.2.2 Analytické metody pro stanovení glycerolipidů	17
2 Experimentální část.....	24
2.1 Reagencie.....	24
2.1.1 Studované látky – standardy glycerolipidů.....	24
2.1.2 Reagencie pro přípravu extrakčních roztoků	24
2.1.3 Reagencie pro přípravu separačních roztoků (SPE)	25
2.1.4 Reagencie pro přípravu mobilních fází HPLC/UHPLC	25
2.2 Od vzorku po informaci	26
2.3 HPLC/ESI/MS sestava.....	27
2.4 Pracovní postup.....	28
2.4.1 Extrakce – Folchova metoda.....	28
2.4.2 Extrakce – methyl (terc-butyl) ether (MTBE)	29
2.4.3 SPE.....	30
2.4.4 HPLC/ UHPLC	31
2.4.5 ESI/MS/MS.....	31
3 Externí standard	32
3.1 Složení externího standardu.....	32
3.2 Vlastnosti HPLC ESI MS systému	34
3.2.1 Opakovatelnost měření	34
3.2.2 Ionizace jednotlivých tříd lipidů	37
3.2.3 Chování jednotlivých lipidů na chromatografické koloně C18	38

3.2.4 Chování lipidických tříd v pozitivním a negativním ESI módu	42
3.2.5 MS ² experimenty	45
4 Extrakce – Folchova metoda versus MTBE	51
5 SPE.....	53
5.1 SPE dle originální receptury dle Kalužného.....	53
5.2 Optimalizace SPE metody pro separaci glycerolipidů na základě polarity	54
6 HPLC/UHPLC	56
6.1 Podmínky Chromatografie.....	58
6.2 Vliv vody a typu kolony na separaci různých tříd lipidů.....	62
6.2.1 Phosphatidylethanolaminy	62
6.2.2 Phosphatidylcholiny.....	67
6.2.3 Diacylglyceroly.....	72
6.2.4 Triacylglyceroly	76
6.2.5 Vyhodnocení nejvhodnější varianty a nejvhodnější kolony	80
7 Využití optimalizované metody UHPLC/ESI/MS v praxi	84
8 Závěr	86
Seznam použité literatury	87
Příloha A	90

Seznam zkratek a symbolů

A	Peak Area	Plocha píku
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
CID	Collision-Induced Decomposition	Kolizí indukovaná dekompozice
DG	Diglycerides	Diacylglyceroly
DHA	Docosahexaenoic Acid	Kyselina dokosahexaenová
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	Detektor rozptylu světla
EPA	Eicosapentaenoic Acid	Kyselina eikosapentaenová
ESI	Electrospray Ionization	Ionizace elektrosprejem
FA	Fatty Acids	Mastné kyseliny
FFA	Free Fatty Acids	Volné mastné kyseliny
FID	Flame Ionization Detector	Plamenově ionizační detektor
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	Gas Chromatography	Plynová chromatografie
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry	Plynová chromatografie /Hmotnostní spektrometrie
GL	Glycerolipids	Glycerolipidy
GPL	Glycerophospholipids	Glycerofosfolipidy
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry	Vysokoučinná kapalinová chromatografie/Hmotnostní spektrometrie
LC	Liquid Chromatography	Kapalinová chromatografie
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry	Kapalinová chromatografie /Hmotnostní spektrometrie
LysoPC	Lysophosphatidylcholines	Lysofosfatidylcholin
LysoPE	Lysophosphatidylethanolamines	Lysofosfatidyletanolaminy
MG	Monoglycerides	Monoacylglyceroly
MP	Mobile Phase	Mobilní fáze
MS	Mass Spectrometry	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	Tandemová hmotnostní spektrometrie

MSⁿ	Tandem Mass Spectrometry	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	Matricí podporovaná laserová desorpce ionizace
MTBE	Methyl (Terc-Butyl) Ether	Methyl (terc-butyl) ether
NL	Neutral lipids	Neutrální lipidy
PC	Phosphatidylcholines	Fosfatidylcholiny
PE	Phosphatidylethanolamines	Fosfatidylethanolaminy
PG	Phosphoglycerols	Fosfatidylglyceroly
PI	Phosphoinositols	Fosfatidylinositoly
PL	Phospholipids	Fosfolipidy
PS	Phosphatidylserines	Fosfatidylseriny
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids	Polynenasycené mastné kyseliny
RSD	Relativ Standard Deviation	Relativní směrodatná odchylka
RT	Retention Time	Retenční čas
SPE	Solid Phase Extraction	Extrakce na pevnou fázi
TG	Triglycerides	Triacylglyceroly
TIC	Total Ion Current	Celkový iontový proud
TOF	Time Of Flight	Doba letu
t_r	Retention Time	Retenční čas
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography	Ultra-účinná kapalinová chromatografie
vN	Variant Number	Číslo varianty
w	Peak Width	Šířka píku
Y	Yield	Výtěžnost
Δt_r	Retention Time Interval	Časová vzdálenost píků

1 Úvod

1.1 Cíle práce

Diplomová práce je dílčí studií, která je součástí rozsáhlého projektu zabývajícího se stanovením lipidomu v biologickém vzorku jakékoli povahy. Lipidom je označení souboru všech lipidů vyskytujících se v buňce a popisuje ho lipidomika. Ta je součástí chemicko analytických technik detekujících široké spektrum analytů nazývaných souhrnně metabolomika. Cílem je vytvořit rychlou, spolehlivou, robustní a opakovatelnou metodu, která se stane rutinním nástrojem pro determinaci lipidů všeho druhu. Je nutné vypracovat metodu, která rychle a efektivně odpoví na otázky pokládané fyziology, lékaři a vědci širokého spektra oborů. Tato práce se soustředí na detekci skupiny glycerolipidů (GL) a volných mastných kyselin (FFA). Právě GL, jak polární, tak nepolární, jsou neodmyslitelnou součástí buněk - jak funkční (buněčná membrána), transportní, tak i zásobní (tukové buňky).

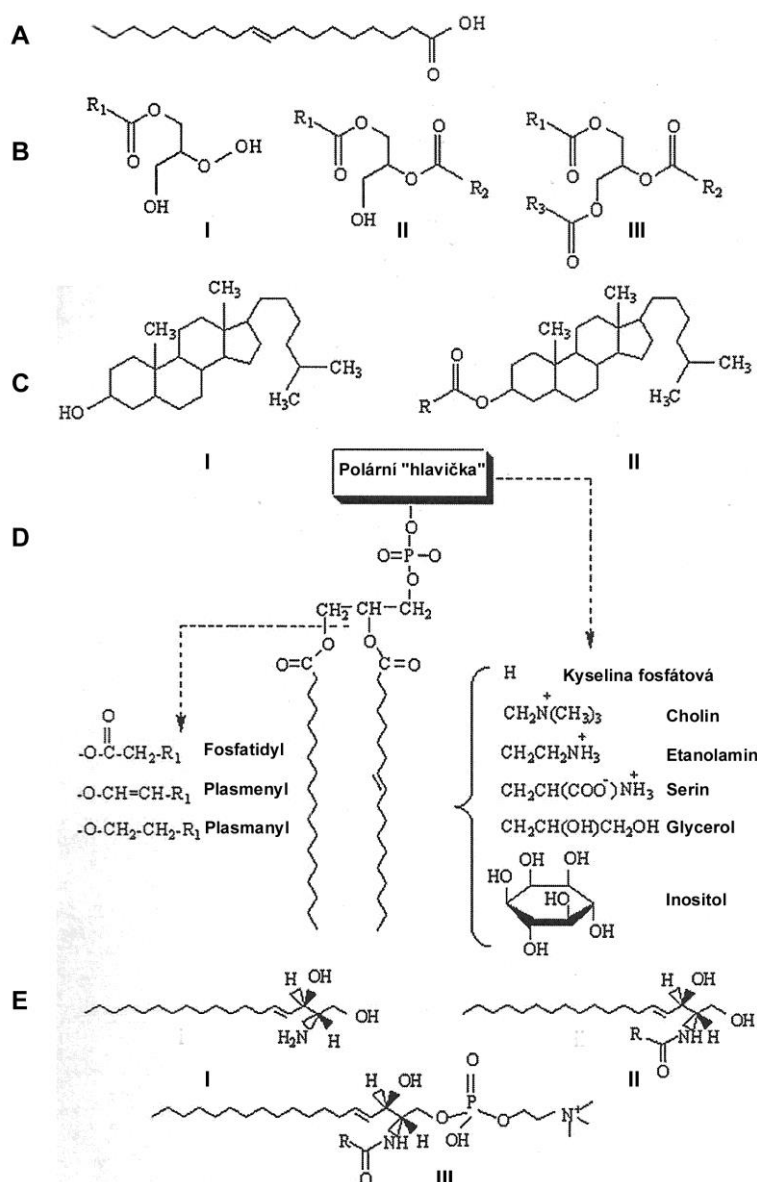
První část diplomové práce obsahuje shrnutí chemicko-analytických metod, které se běžně používají nebo jsou schopné GL stanovit a kvantifikovat (kapitola 1.2.2). Moderní sofistikovanou a robustností metodou je hmotnostní spektrometrie (MS) kombinovaná s vysokoúčinnou či ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC, UHPLC). Výsledky této analýzy jsou velmi markantně ovlivněny zásahy operátora spočívajícími v nastavení hmotnostního spektrometru, složení mobilní fáze, použité chromatografické koloně a čistotě samotného biologického vzorku.

Prvním krokem, jímž se tato práce zabývá, je extrakce totálních lipidů z biologického vzorku (kapitola 4), druhým krokem je přečištění a předseparace (kapitola 5) a posledním pak optimalizace metody HPLC/MS (kapitola 6).

Optimalizovaná metoda byla ověřena při determinaci GL v nutriční studii zabývající se lipidy v rybím mase.

1.2 Studované látky

Lipidy zahrnují nesčetné množství strukturálně a funkčně odlišných molekul například apolární sterol estery, neutrální lipidy (NL) jako triacylglyceroly (TG) a polární fosfolipidy (GPL). Nejčastěji dnes používaná klasifikace lipidů je sestavena na základě nomenklatury deklarované Fahym¹, její přehledné schéma lze vidět na obrázku 1².



Obrázek 1.: Základní struktury příkladů molekulárních tříd lipidů. A) Mastná kyselina (FA) – olejová; B) Glycerolipidy – I. Mono – II. Di - III. Tri – acylglyceroly; C) Steroly -I. Cholesterol II. Cholesterol ester; D) Glycerofosfolipidy (GPL); E) Sfingolipidy - I. Sfingosin II. Ceramid III. Sfingomyelin.²

Prezentované rozdělení lipidů na 8 nejdůležitějších tříd je provedeno na základě jejich chemické struktury a biochemické povahy s důrazem na hydrofóbní a hydrofilní elementy v molekule². Vzhledem k tomu, že jsou lipidy takto široká skupina látek a rozsah této práce by nedokázal postihnout všechny skupiny, byla vybrána skupina NL a GPL. Důvodem výběru těchto dvou skupin je skutečnost, že se často stávají cílem biologických studií.

Mastné kyseliny (FA) jsou základní stavební jednotkou všech lipidů. Jejich rozmanitost je ovlivněna především délkou alifatického řetězce mastné kyseliny a počtem dvojných vazeb. V přírodě se obvykle vyskytují mastné kyseliny, které mají sudý počet uhlíků, protože jejich biosyntéza se děje spojováním acetátových jednotek³. Obvykle dosahují délky od 14 do 24 uhlíků. Počet dvojných vazeb nepřesahuje 6^{2,4}. FA jsou samy o sobě prekurzory pro mnohé bioaktivní molekuly. Například kyselina arachidonová je prekurzorem eikosanoidů, které fungují jako signální molekuly specifických receptorů hrajících významnou roli v zánětlivých procesech.

Relativně jednoduchou třídou lipidů jsou neutrální GL. Obvykle zahrnují monoacylglyceroly (MG), diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG). Od sebe se liší počtem FA vázaných esterovou vazbou na hydroxy skupinu glycerolové kostry. Je také nutné zmínit, že jednotlivé FA mohou být navázány v různých pozicích, čímž dochází u MG k existenci 3 stereoisomerů (1-, 2-, 3- izomery), stejně tak u DG (*sn*-1,2-, *sn*-1,3-, *sn*-2,3-). Do této třídy lipidů, především TG, patří látky zásobní povahy, které jsou zdrojem energie, slouží jako prekurzory pro rozličné biologicky aktivní molekuly a dále slouží jako důležité mediátory v procesech metabolismu. Porucha jejich příjmu vede ke vzniku patologických změn chorob, jako je cukrovka, obezita, arteroskleróza a nemoci jater.²

Poslední a nejrozsáhlejší třídou lipidů jsou GPL. Zahrnuje rozličné množství molekulárních druhů, které mají společnou polární hlavičku, jejímž základem je zbytek kyseliny fosforečné navázaný fosfodiesterovou vazbou do polohy *sn*-3. Do polohy *sn*-1 a *sn*-2 jsou stejně jako u předchozí skupiny esterovou vazbou začleněny různé FA. Na základě složení polární části molekuly lze rozdělit GPL na fosfatidylcholiny (PC), fosfatidylethanolaminy (PE), fosfatidylseriny (PS), fosfatidylglyceroly (PG) a fosfatidylinositoly (PI). U některých skupin, jmenovitě u PE a PC, někdy dochází k navázání FA v poloze *sn*-1 pomocí etherové vazby, a to vinyl etherovou (plasmenyl-)

nebo alkyl etherovou (palsmanylo-). Do této skupiny bychom měli také počítat lyso-GPL, jež mají místo jedné FA navázanou hydroxylovou skupinu. Rozmanitost GPL je nepopíratelná a opět přesahuje možnosti této diplomové práce, proto byl výběr zúžen pouze na skupiny PC a PE, které jsou kvantitativně nejvíce zastoupeny v buněčných membránách eukaryot.^{2,5} Význam ostatních skupin pochopitelně nelze opomíjet, ale nejsou vzhledem k jejich pestrosti a rozsahu studovaného materiálu předmětem této práce.

1.2.1 Biologický význam lipidů

Lipidy jsou základními stavebními kameny membrán a mají v biologických systémech nespočetně důležitých funkcí. Díky membráně, kterou lipidy tvoří, dochází ke vzniku buněčných subsystémů relativně oddělených od okolního prostředí. Lipidy dále tvoří vhodné hydrofilní prostředí pro správnou funkčnost membránových proteinů a interakcí mezi nimi. Dále může být mnoho lipidických molekul zdrojem molekuly druhého posla, jež vzniká enzymatickou cestou. Velký význam lipidů je demonstrován také tím, že v případě poruchy metabolismu lipidů u lidí dochází ke vzniku závažných onemocnění, jako je cukrovka, obezita, arteroskleróza a Alzheimerova choroba.^{2,6} Studiem struktury lipidů z mozkové tkáně lze také odhalit biomarkery onemocnění BSE.⁷ Výše zmíněné skutečnosti společně s vývojem hmotnostní spektrometrie a chromatografických technik jsou hlavními důvody pro rozvoj lipidomiky obecně. Využití lipidomiky v medicíně nabývá stále většího významu. Nejčastějším přístupem je vytvoření kompletního lipidomického profilu u osob zdravých a u osob potenciálně nemocných nebo majících specifický genetický profil. Porovnáním těchto lipidických profilů lze získat potenciální lipidické biomarkery. Tyto studie však vyžadují velké množství času, proto je velmi žádoucí vyvinout účinnou, robustní a rychlou metodiku pro stanovení lipidů.² Bezesporu první místo mezi chemicko-analytickými metodikami zabírá hmotnostní spektrometrie kombinovaná s kapalinovou či plynovou chromatografií.⁸

1.2.2 Analytické metody pro stanovení glycerolipidů

Charakteristickou vlastností glycerolipidů je jejich velká rozmanitost a zároveň strukturní podobnost. Pro dokonalou identifikaci molekuly lipidu jsou nezbytné informace o tom, ke které třídě lipidů patří, kolik má vázaných mastných kyselin a v které poloze na glycerolové kostře se nachází, dále pak rozhoduje délka uhlíkového řetězce konkrétní mastné kyseliny, její nasycenost či nenasycenost a eventuální počet dvojných vazeb a jejich poloha v rámci uhlíkového řetězce. Takto komplexní informaci o GL je velmi složité získat i pomocí moderních metod instrumentální analytické chemie a obvykle je potřeba více komplementárních technik.

Prvním krokem k analýze lipidů je jejich extrakce z biologického materiálu.⁹⁻¹² Až na výjimky¹³ je dalším krokem při identifikaci lipidů jejich separace pomocí různých chromatografických metod, jako je separace na tenké vrstvě,¹⁴⁻²² extrakce na pevnou fázi,²³⁻²⁹ vysokoúčinná kapalinová chromatografie^{18, 19, 21, 22, 30-39} nebo po derivatizaci i plynová chromatografie.^{6,7} Posledním krokem je detekce. Běžně se setkáváme s použitím speciálních detektorů rozptylu světla^{16, 17, 30, 35, 36, 41, 42, 45}, dále pak UV detekce, která má však omezené využití.⁴⁶⁻⁴⁸ Tyto metody jsou však vytlačovány stále častěji používanou hmotnostní spektrometrií^{2, 4, 18, 22, 31, 32, 39, 49-61}. Metodou, kterou lze studovat podíl nenasycených mastných kyselin ve vzorku, je nedestruktivní magnetická rezonance.³⁸

1.2.2.1 Extrakce

K extrakci lipidů z biologického materiálu se nejčastěji používá metoda kapalina : kapalina⁶². Lipidy svou povahou patří mezi nepolární (TG) až mírně polární (GPL), proto k jejich extrakci používáme polární organická rozpouštědla, obvykle se jedná o jejich směs. Nejčastější metodou zvanou také zlatý standard je postup navržený Folchem v roce 1957⁹. Extrakční činidlo je v tomto případě chloroform s methanolem v poměru 2:1. Oblíbenou metodou je extrakce Bligha a Dryera, kdy směs tvoří kromě chloroformu a methanolu také voda.¹⁰ Hara a Radin v roce 1978 navrhli extrakční metodu s nízkou toxicitou používající směs hexanu a 2-propanolu¹¹, nicméně tato metoda se nijak neprosadila snad pro svoji nižší účinnost. S postupující modernizací

instrumentální analytické chemie a také se zvýšenými nároky na zpracování většího množství vzorku za kratší čas se objevila potřeba vyvinout extrakční postup, který by byl vhodný i pro automatické dávkovače. Extrakce pomocí chloroformu však těmto požadavkům nevyhovuje. Chloroformová frakce s lipidy totiž tvoří spodní vrstvu a při nástřiku do chromatografického systému by mohlo dojít ke kontaminaci či ucpání jehly sraženými bílkoviny v horní vodné vrstvě. Německá skupina v roce 2008 navrhla extrakci methyl (terc-butyl) etherem, která kritéria pro automatickou extrakci splňuje, jelikož etherová vrstva s lipidy se nachází ve vrchní části extrakční vialky¹².

1.2.2.2 Separace

Nedílnou součástí analýzy lipidů je jejich separace. Kromě detekce v systému LC/MS^{13, 58} je separace lipidů pro jejich stanovení nezbytná.

1.2.2.2.1 TLC

Tenkvrstvá chromatografie je jednou z nejstarších chromatografických technik, která se ještě dnes těší poměrně velké oblibě. Tato technika je také instrumentálně nejméně náročná¹⁴⁻²¹. Tenkvrstvá chromatografie se může dělit na rozdělovací, kdy stacionární fáze je kapalina zachycená v tenké vrstvě a mobilní fáze je kapalná. Druhým typem je adsorpční, kdy je stacionární fáze tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy, a mobilní fáze je kapalná.

Vzorek je nanášen ve formě kapky, obvykle pomocí kapiláry, pak se nechá mobilní fáze vzlítnat póry tenké vrstvy. Interakcí se stacionární fází dochází ke zpoždování látek ve vzorku, což způsobuje jejich dělení. Chromatogram se vyvíjí v uzavřené chromatografické komoře, která je dobře nasycena parami mobilní fáze. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne protilehlého konce od startu, vyjmeme chromatogram z komory, čímž ukončíme vyvíjení. Chromatogram se usuší a k identifikaci skvrn použijeme vhodnou detekční metodu. Příkladem může být nanesení vhodného činidla jako např. kyselina sírová, manganistan draselný nebo jód formou postřiku. Dále pak je možno využít fluorescenci luminoforů v UV záření nebo zhasnutí fluorescence tenkvrstvé desky s obsahem fluorescenčního indikátoru. Jednotlivé analyty můžeme stanovit přímo na chromatogramu pomocí fotodensitometru nebo se extrahují z chromatogramu a poté se stanoví vhodnou metodou.⁶³

K výhodám TLC patří zejména jednoduchost, přesnost, robustnost a velmi účinná dělicí schopnost. Tu lze ještě zvýšit například několikanásobným vyvíjením s různými rozpouštědly. V oblasti lipidomiky se TLC v poslední době využívá hlavně na rychlou separaci lipidických tříd^{36, 41, 64}.

TLC lipidů je obvykle prováděno na sorbentech na bázi silikagelu, které mohou být speciálně impregnovány kyselinou boritou či dusičnanem stříbrným. Kyselina boritá se využívá, protože tvoří komplex s vicinální alkoholovou skupinou a blokuje tak přechod zbytku FA do jiné polohy na glycerolové kostře, nedochází tak k izomeraci mono a diglycerolů. Dusičnan stříbrný je vhodný pro dělení stejných molekulárních druhů lišících se v počtu a poloze dvojných vazeb v acylových zbytcích FA. Dvojně vazby tvoří π komplexy se stříbrným iontem v silikagelu a tím dochází ke zvýšení jejich retence⁶⁵.

1.2.2.2.2 Extrakce na pevnou fázi SPE

Tato separační metoda je oproti TLC poměrně nová, první SPE kolonky se objevily v roce 1979, ale k největšímu rozmachu došlo až koncem 90. let minulého století. Díky vývoji nových sorbentů došlo ke zpřesnění, větší specifitě, zvýšení výtěžnosti a zlepšení opakovatelnosti metody. Principiálně můžeme dělit SPE na „online“ a „offline“. „Online“ SPE je prováděno automaticky a vzorek je hned po provedení SPE zaveden do detekčního systému. Tato technika se osvědčila především ve spojení SPE/LC, a to díky kapaliné povaze obou metod. Mnohem složitější problém představuje spojení SPE/GC. Kapalný vzorek rozdělený metodou SPE je zaveden do přístroje GC, který využívá plynnou mobilní fázi. „Offline“ SPE není automatizované a mezi SPE a samotnou analýzou vzorku může být prodleva. Výhodou tohoto systému je nezanedbatelné snížení spotřeby vzorku a možnost následné analýzy systémem GC⁶⁶.

Principiálně rozlišujeme několik druhů sorbentů⁶⁶:

- 1) *Chemicky vázané silikagely reverzní fáze*, což jsou C_{18} nebo C_8 , které mají různé modifikace např. cyklohexylem, fenylem, selektivním elektronem donorové nebo akceptorové silikagely, kyanopropylové a aminopropylové silikagely. Poslední jmenované jsou fáze polární, které způsobují interakce jak polární, tak nepolární.
- 2) *Iontopárové a iontovýměnné sorbenty*. Používají se pro analyty ve formě iontu nebo pro ionizovatelné analyty. Nevýhodou silikagelů je jejich úzká škála pH, při které mohou být použity (3-9). Kation-výměnný sorbent se skládá ze slabé karboxylové kyseliny a silné aromatické nebo nearomatické skupiny kyseliny sulfonové. Slabý

aniont-výměnný sorbent je z primárních či sekundárních aminoskupin, kdežto silný z kvarterních aminů.

3) *Uhlíkové sorbenty*, jejichž základem je grafitizovaný uhlík získaný jeho zahříváním na vysoké teploty (2700-3000°C). Každý sorbent pak má na povrchu specifickou funkční skupinu, která podléhá kyslíkové chemisorbci. Tyto sorbenty jsou vhodné pro studia pesticidů, kdy jsou schopny oddělit kyselé, bazické a neutrální pesticidy.

4) *Imunoafinitní extrakční sorbenty* fungují na principu interakce mezi látkou a protilátkou, což umožňuje selektivní extrakci na bázi molekulárního rozpoznání. Protilátky jsou kovalentně navázány na sorbent, čímž zajišťují vysokou specifiku. Proto se také používají především u matric, které ve vzorku mají pouze stopové množství analytu.

5) *Molekulárně imprintované polymery* poskytují podobnou specifiku jako imunoafinitní sorbenty. Oproti nim však mají řadu výhod, jako například rychlejší a jednodušší přípravu, použití přesně definovaných metod a také stabilitu při vysokých teplotách a extrémních hodnotách pH. Jejich syntéza začíná seskupením monomerů kolem templátové molekuly, načež dojde k polymeraci monomerů a vzniku rigidního materiálu. Následuje vymytí templátových molekul, po nichž v polymeru zůstanou specifické „dutiny“ – imprinty. Tyto „dutiny“ slouží jako vazebná místa pro cílový analyt, který je navázán podobně jako u imunoafinitních sorbentů na základě souhrnu vodíkových, hydrofobních a elektrických interakcí.

Valná většina prací zabývajících se separací lipidů na pevné fázi je založena na prvním typu SPE kolonek se základní molekulou C18 s amylopropylovou skupinou. První zmínka o využití techniky SPE pro separaci lipidických tříd je z roku 1985 od týmu vedeným Kalužným²³. Tato studie se zabývá rozdělením totálního extraktu dvojitým způsobem. Jednodušší metodika využívá pouze jednu SPE kolonku a dělí celkový extrakt lipidů na tři frakce - neutrální lipidy, volné mastné kyseliny a fosfolipidy. Při použití dvou SPE kolonek lze dosáhnout frakcionace vzorku na cholesteryl estery, triglyceridy, diglyceridy, monoglyceridy, cholesterol, volné mastné kyseliny a fosfolipidy. Revize této metodiky je publikována Kimem v roce 1990. Metodika navržená Kalužným je základem pro další studie zabývajících se pouze technikou²⁴ samotnou nebo její aplikací. Aplikací záběr SPE metody je velmi široký počínaje

stanovením mastných kyselin v různých lipidických frakcích mikrobiálních kultur^{67, 25} přes determinaci lipidů ve svazech mořských živočichů²⁷ až po nutriční a medicínské studie^{64, 68}.

1.2.2.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC/UHPLC

Kapalinová chromatografie v širším pojetí zahrnuje všechny chromatografické metody s kapalnou mobilní fází. Vznik vysokoúčinné kapalinové chromatografie tak, jak ji známe dnes, byl podmíněn využitím teoretických a praktických poznatků z plynové chromatografie, které byly aplikovány na sloupcovou kapalinovou chromatografii. Velké rozlišovací schopnosti bylo dosaženo použitím speciálních náplní kolony a vhodnou kombinací systému fází, která zaručuje vyšší selektivitu. Zkrácení doby analýzy se dosáhlo větším průtokem mobilní fáze za použití přetlakových systémů⁶³.

Podobně jako SPE kolonky jsou stejně tak i chromatografické kolony určené pro HPLC nebo UPHPLC vyráběny v široké škále sorbentů s rozličnými funkčními skupinami. V literatuře se obvykle setkáváme se studii, které se zabývají buď detekcí GPL nebo NL.

Při chromatografii GPL se nejčastěji uplatňují kolony C18^{18, 19, 35, 47, 51} nebo zřídka C8^{37, 40, 44} rozličných velikostí. Obvykle se setkáváme s reverzní fází, použití normální fáze je pro chromatografii GPL spíše výjimkou¹⁷. Stejně je tomu u chromatografie NL. Pokusy o zavedení normální fáze do běžné praxe skončily jen s omezenými úspěchy⁶⁹, a proto se nyní k dělení TG používá převážně reverzní fáze^{22, 52, 59, 69, 70}. Také se častěji setkáváme se systémem dvou stejných nebo různých kolon zapojených za sebou⁴³. Časy takto prováděných analýz však přesahují 100 minut^{22, 59, 70}.

S rutinním využitím UHPLC v praxi v rámci detekce GPL a NL se v literatuře zatím setkáme zřídka. Obecně však UHPLC slouží k chromatografii složitější směsí lipidů, například v plazmě či mléce.^{61, 71-73}

1.2.2.3 Detekce glycerolipidů

Rozmanitost glycerolipidů a náročnost jejich detekce již byla zmíněna. Pro naše cílové analyty se rutinně používá několika druhů detekce. Detektor rozptylu světla (ELSD)^{16, 17, 21, 30, 36, 42-44} a UV detektor^{19, 32, 44, 47} byly dříve k detekci GPL a NL hojně využívány, a to především pro jejich dostupnost, mají však své limitace jako například omezenou citlivost a spotřebu velkého množství vzorku.² Další možnou analytickou technikou je nukleární magnetická rezonance, která je však instrumentálně velmi náročná.³⁸ V poslední době ruku v ruce s rozvojem instrumentální analytické chemie se pro analýzu lipidů používá hmotnostní spektrometrie. Pro determinaci a identifikaci lipidů je tato metoda ve spojení s LC přímo klíčová.⁸

1.2.2.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická technika, která nám umožňuje určit hmotnost volných molekul a jejich fragmentů na základě délky doby pobytu ve vakuu v elektromagnetickém poli. Základní podmínkou hmotnostní spektrometrie je ionizovatelnost měřených analytů. Pokud jsou cílové analyty těžko nebo vůbec ionizovatelné, používají se derivatizační postupy, které zavedou do molekuly ochotně se ionizující funkční skupinu.

1.2.2.3.1.1 Ionizace

Ionty vznikají v iontovém zdroji. Nejčastěji používáme měkké ionizační techniky. Příkladem měkké ionizační techniky používané ve spojení s HPLC/MS je elektropray (ESI) nebo ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Dalším měkkým iontovým zdrojem je MALDI, ten se obvykle používá ve spojení s analyzátozem délky času letu (TOF), či iontovou cyklotronovou rezonancí (FTICR). Podle literatury se dá říci, že oblíbenější metodou pro stanovení GPL je ESI². Důvod je zřejmě ten, že při APCI dochází k vytržení zbytku kyseliny fosforečné a vlastně celé polární „hlavičky“ z molekuly fosfolipidu. Ve spektru pak nevidíme molekulární ion, ale pouze jeho fragmenty. TG a DG jsou molekuly, které jsou obvykle měřeny právě pomocí APCI. Během procesu ionizace dochází k částečné fragmentaci, a tím již první záznam bez použití MSⁿ techniky nám díky fragmentacím v iontovém zdroji umožní nejen určit její m/z, ale také složení FA a jejich *sn* polohy na glycerolové kostře. Pro tuto techniku byl dokonce vyvinut automatický rozpoznávací program TriglyAPCI, který na základě poměru fragmentů určí polohu konkrétních FA.⁶⁰

1.2.2.3.1.2 Separace

Pro detekci GL ve spojení s ESI či APCI se v zásadě používá lineární iontová past^{22, 59, 70, 74} nebo trojitý kvadrupól.⁷⁵

1.2.2.3.2 Určení třídy a FA v glycerolipidu pomocí MS

Příslušnost analytu k jednotlivé třídě lipidů je první otázka pokládaná při kompletování lipidomu. Již po SPE a následném měření frakcí tuto informaci získáme²³ a je to proto velmi užitečný diagnostický nástroj. K získání této informace můžeme použít SPE i HPLC. Navíc při použití ESI/MS dosáhneme dvoudimenzionální determinace, jednak retenčním časem analytu opouštějícím chromatografickou kolonu, jednak i údajem z hmotnostního spektrometru - m/z ⁷⁶.

Velmi dobré informace nám také poskytne chování analytu během ionizace^{77, 78}. NL se ionizují pouze v pozitivním spektru a nikoliv protonací. Do mobilní fáze je nutné přidávat solná aditiva, jako například octan amonný nebo alkalické acetáty. TG a DG se nejčastěji ionizují jako amonné addukty $[M+NH_4]^+$ nebo iony $[M+Kat]^+$ (Kat = Li^+ , K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+). V ESI nedochází k jejich fragmentaci přímo ve zdroji⁴. Oproti NL se GPL, jmenovitě PC a PE, ionizují velmi ochotně, jak v pozitivním, tak negativním náboji. V pozitivním módu tvoří protonované ionty $[M+H]^+$ a velmi časté jsou také addukty s alkalickými kovy např. $[M+Na]^+$ ⁵⁵. V negativním spektru můžeme vidět molekulární ion u PE $[M-H]^-$, ale nikoliv u PC, kde jsou hlavními ionty $[M+OAc]^-$ nebo $[M+Cl]^-$ ^{8, 55}. Při použití retenčního času z HPLC lze porovnat chování analytu, jak v negativním a pozitivním spektru, tak eventuálně potvrdit jeho příslušnost k lipidické třídě nalezením jeho adduktu.

Poslední úroveň systému HPLC/ESI/MS/MS je stanovení konkrétních FA přítomných v molekule, počet jejich dvojných vazeb a určení polohy FA na glycerolové kostře lipidu. Tyto charakteristiky se určují na základě fragmentace molekul a poměru jednotlivých fragmentů⁶⁰. K fragmentaci molekul se využívá collision-induced decomposition (CID), který zajišťuje charakteristickou fragmentaci lipidických molekul⁵⁵. Pro určení polohy dvojných vazeb v rámci jedné molekuly FA je však systém LC/MS nevhodný, a proto se rutinně používá GC v kombinaci s FID (detektor s plamennou ionizací) nebo MS detekcí, toto však není předmětem této diplomové práce.

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

2.1.1 Studované látky – standardy glycerolipidů

Standardy glycerolipidů byly pořízeny od firem:

- Sigma-Aldrich spol. s.r.o.: 3-*sn*-phosphatidylethanolamid diheptadecanoyl (PE17:0/17:0); 3-*sn*-phosphatidylethanolamine-2(β)-oleoyl-1(γ)-palmitoyl (PE16:0/18:1); 3-*sn*-phosphatidylcholine-2(β)-oleoyl-1(γ)-stearoyl (PC18:1/18:0); tripalmitin (TG3x16:0); tripalmitolein (TG 3x16:1)
- Avanti Polar Lipids, inc.: 3-*sn*-phosphatidylethanolamine-1-palmitoyl-2-linoleoyl (PE16:0/18:2); 3-*sn*-phosphatidylcholin-1-stearoyl-2-linoleoyl (PC 18:0/18:2); 3-*sn*-phosphatidylcholin-dilinoleoyl (PC 18:2/18:2)
- Larodan Fine Chemicals AB: 1,3-Linoleoyl-2-Stearin-glycerol (TG18:2/18:0/18:2); 1-Palmitoyl-3-stearoyl-*rac*-glycerol (DG16:0/18:0); 2-*sn*-glycerol-1,3dipalmitoyl (DG16:0/16:0)

2.1.2 Reagencie pro přípravu extrakčních roztoků

Jedním z cílů práce je také porovnání dvou technik pro extrakci lipidů. První z nich je dle Folcha, která byla jemně upravena pro LC-MS⁷⁹. Jako extrakční roztok je použita směs CHCl₃ a MeOH v poměru 2:1, při posledním kroku je použito místo „Ringerova roztoku“ 0,1M roztok AcONH₄ ve H₂O.

*CHCl₃ – Sigma-Aldrich; Chromasolv stabilizovaný 0,5-1% EtOH, stabilizace je u CHCl₃ velmi důležitá, je možné ji provádět také amylenem, ale takto stabilizovaný CHCl₃ není vhodný pro práci s lipidy.

*MeOH – Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*AcONH₄ – Sigma; pro molekulární biologii >98%

*H₂O – deionizovaná

Další extrakční technikou je metoda navržená Mathyashem¹², kde je extrakčním činidlem methyl (tert-butyl) ether.

*MTBE – Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*MeOH – Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*H₂O – deionizovaná

2.1.3 Reagencie pro přípravu separačních roztoků (SPE)

SPE je metoda, jejíž přesnost velmi závisí na použitých chemikáliích. Zvláště u této metody je nutné držet se následujících sloučenin nejenom z hlediska čistoty chemikálie, ale také jejího výrobce. Toto pravidlo je ještě přísnější u používání SPE kolonek.

*CH₃COOH - Merck; Suprapur

**n*-C₆H₆ – Merck, Suprasolv

*MeOH - Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*2-Propanol - Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*Diethylether – Aldrich; EC 200-467

*CHCl₃ – Sigma-Aldrich; Chromasolv stabilizovaný 0,5-1% EtOH

*ACN - Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

2.1.4 Reagencie pro přípravu mobilních fází HPLC/UHPLC

Pro optimální separaci byla zvolena metoda, při níž dochází k míchání tří kanálů chromatografické pumpy, tedy k míchání tří mobilních fází.

*MeOH - Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

*AcONH₄ – Sigma; pro molekulární biologii >98%

*NH₄OH - Hydroxid amonný ≥25% in H₂O, TraceSELECT[®]

*2-Propanol - Sigma-Aldrich; Chromasolv pro HPLC

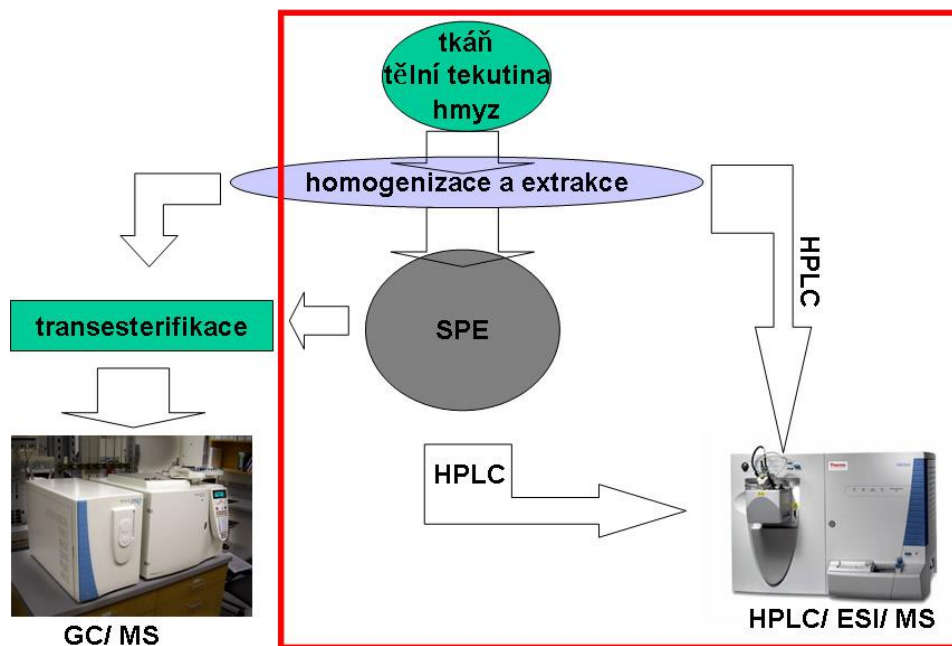
*H₂O – deionizovaná

2.2 Od vzorku po informaci

Biologické vzorky jsou obvykle ve dvou formách – kapalina, což jsou různé tělní tekutiny jako např. krev, plasma, haemolymfa či mléko a pevná látka jako například kousek tkáně, někdy i celý hmyz (př. *Drosophila melanogaster* – octomilka obecná). Pro práci s tkáněmi je nezbytně nutný homogenizátor (Diax 100 - Heidolph, Německo), aby došlo k mechanické homogenizaci tkáně, a tím se extrakční roztok dostal k co nejvíce lipidům. Při tekutých vzorcích mechanický homogenizační krok odpadá, používá se pouze ultrazvuku.

Jak bylo na začátku řečeno, je potřeba získat mnoho informací, abychom s jistotou identifikovali daný lipid. Je mnoho analytických přístupů k detekci lipidů, přičemž nejprogressivnější metodou je jistě HPLC v kombinaci s ESI/MS/MS experimenty^{2, 77}. Tato metoda má však také své limity, není schopna v jedné společné analýze bez předchozích úprav odhalit polohu dvojných vazeb v partikulární molekule FA. Pro získání této informace je vhodné použití komplementárních metod, jako je derivatizace vzorku a identifikace jednotlivých mastných kyselin a poloh jejich dvojných vazeb pomocí GC s FID či MS detekcí, tato metodika však nespadá do tématu této práce.

Celý postup je schématicky znázorněn na obrázku 2. V této studii se však věnujeme pouze červeně ohraničené oblasti.



Obrázek 2.: Schéma všech analytických metod použitých pro přesnou determinaci lipidů. Červený obdélník znázorňuje oblast, kterou se zabývá tato práce.

Možná by se zdálo zbytečné provádět přečištění a předseparaci na kolonkách SPE, nicméně je to krok analytický a slouží k potvrzení identifikace jednotlivých tříd lipidů, dá se zde tedy opět hovořit o komplementární metodě.

2.3 HPLC/ESI/MS sestava

Celý systém je poháněn ternárním čerpadlem Rheos Alegro (Flux instruments, Basilej, Švýcarsko). Vzorek je do systému zaveden pomocí autosampleru Accela (Thermo, San Jose, CA, USA) vždy v množství 5 μl a pak dále pokračuje na chromatografické kolony:

- Gemini – C18 150x2.0 mm i.d. 3 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Synchronis – C18 100x2.1 mm, 1,7 μm (Thermo, San Jose, CA, USA)
- Kinetex – C18 150x2.1 mm, 1,7 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Chromatografická separace zde probíhá a jednotlivé analyty jsou ionizovány pomocí ESI sondy a jsou následně analyzovány a detekovány v lineární iontové pasti přístroje LCQ fleet (Thermo, San Jose, CA, USA).

2.4 Pracovní postup

2.4.1 Extrakce – Folchova metoda

Na základě povahy vzorku se rozhodneme pro využití homogenizace. V případě celého hmyzu či tkáně postupujeme následujícím způsobem. Jestliže se jedná o vzorek kapalný, začínáme celý postup od bodu 3.

- 1) Spočítáme kusy hmyzu v ependorfce nebo zvážíme danou tkáň a zaznamenáme údaj.
- 2) V případě malého hmyzu každý kus rozstříhneme (podélně) a poloviny zvířat dáme do extrakční ependorfky se 400 μ l extrakčního roztoku (CHCl_3 :MeOH; 2:1). V případě tkáně není nutné vzorek rozstříhat (hmyz má vnější exoskelet a rozstříhnutí usnadní homogenizaci).
- 3) Provedeme homogenizaci tkáně pomocí elektrického homogenizátoru a získáme zakalený roztok s kusy chitinového exoskeletu. Pokud je vzorek kapalný, do vzorku přidáme extrakční medium a dále postupujeme stejně.
- 4) Ependorfky vložíme do ultrazvukové lázně na dobu cca 10 minut. Do lázně je vhodné vložit led či suchý led, aby se vzorky nepřehřívaly.
- 5) Centrifugujeme při 10000 g 10 minut při 4°C, odebereme supernatant S1 (použijeme Hamiltonovy stříkačky)
- 6) Rehomogenizujeme zbylý pelet s dalšími 400 μ l extrakčního roztoku
- 7) Ponoříme do ultrazvuku na cca 10 minut
- 8) Centrifugujeme při 10000 g 10 minut při 4°C, odebereme supernatant S2 (použijeme Hamiltonovy stříkačky).
- 9) Spojíme supernatanty (S1+S2).
- 10) K supernatantům přidáme 300 μ l 0,1M octanu amonného (AcOHN_4) ve H_2O a ponoříme do ultrazvuku na 10 minut.
- 11) Centrifugujeme při 10000 g 10 minut při 4°C, odebereme spodní organickou fází obsahující lipidy.
- 12) Odebíráme do vialek s teflonovým uzávěrem, řádně popíšeme a uložíme do -20°C; vzorek je v CHCl_3 .

13) Pro měření HPLC/ESI/MS (LCQ) patřičně naředíme (například v případě plošnice ředíme 100 µl vzorku + 400 µl MeOH) a do systému nastříkujeme 5 µl.

Obyčejně se při použití CHCl_3 nedoporučuje používat plastové nádoby⁷⁹, nicméně při našem objemu vzorků je velmi obtížné recyklovat skleněné ampule. Navíc občas dochází k jejich nechtěné destrukci během centrifugace a tím ke ztracení vzorku. Z tohoto důvodu bylo provedeno porovnání extrakcí ve skleněných ampulích a v plastových mikrozkušných značce Eppendorf. Výsledek tohoto porovnání neodhalil žádné změny ani významné kontaminace.

2.4.2 Extrakce – methyl (terc-butyl) ether (MTBE)

- 1)** Spočítáme kusy hmyzu v eppendorfci nebo zvážíme tkáň a zaznamenáme údaj.
- 2)** V případě malého hmyzu každý kus rozstříháme (podélně) a poloviny zvířat dáme do extrakční zkumavky se 150 µl MeOH. Hmyz má vnější exoskelet a rozstříhnutí usnadní homogenizaci, kdežto v případě tkáně není nutné vzorek zstříhat.
- 3)** Provedeme homogenizaci tkáně pomocí elektrického homogenizátoru a získáme zakalený roztok s kusy chitinového exoskeletu. Pokud je vzorek kapalný, do vzorku přidáme extrakční medium a dále postupujeme stejně.
- 4)** Přidáme 500 µl MTBE, třepeme 1 hodinu.
- 5)** Přidáme 125 µl H_2O , inkubujeme 10 minut.
- 6)** Centrifugujeme při 10000 g 10 minut při 4°C.
- 7)** Odebereme horní vrstvu (HV1).
- 8)** Opakujeme krok 3-6.
- 9)** Odebereme horní vrstvu (HV2)
- 10)** Spojíme HV1 a HV2.
- 11)** Odpaříme do sucha, přidáme 500 µl CHCl_3 a uskladníme k měření (skleněná vialka s teflonovým uzávěrem).
- 12)** Pro měření HPLC/ESI/MS (LCQ) patřičně naředíme (například v případě plošnice ředíme 100 µl vzorku + 400 µl MeOH) a do systému nastříkujeme 5 µl.

2.4.3 SPE

SPE je extrakční postup, pro který je velmi důležitý výběr vhodné kolonky a také používání stejných, čistých reagensů pro přípravu mobilních fází. Pro SPE lipidů byly na základě studie Kalužného vybrány SPE kolonky Bond Elut LRC-NH₂ od firmy Varian, Inc. (USA) s 500 mg sorbentu. Kolonky Bond Elut NH₂ mají velmi polární sorbent a užívají se ve dvou modelech, extrakce na normální fázi nebo iontově výměnné. Chová se jako slabý anion s pK_a 9,8. Při pH nižším než 9,8 je funkční skupina pozitivně nabitá. Jako slabší ionex se s výhodou používá pro silné anionty. Může být použita i jako nepolární izolace od polárních skupin. NH₂ skupina je výborná na oddělení strukturních izomerů. Iontově výměnná kapacita je 1,10 meq/g a velikost pórů nosiče 60 Å. Koncentrace lipidů v biologických vzorcích vyžaduje použití SPE kolonek s 500 mg sorbentu. Dále postupujeme dle návodu. K celému procesu používáme zařízení SPE (policová skleněná vakuová vana).

- Roztok A: chloroform:2-propanol 2:1
- Roztok B: 2% kyselina octová v dietyleru
- Roztok C: methanol:voda 9:1

- 1) Kondicionování kolonky: nanese 4 ml *n*-Hexanu, necháme prokapat, dokud kolonka nezbělá (je suchá), zavřeme ventil a nanášíme vzorek.
- 2) Nanese vzorek 100 µl – vzorek musí být rozpuštěn v CHCl₃ ~ EtOH (nanášíme Hamiltonovou stříkačkou)
- 3) Hned za vzorkem nanese 4 ml roztoku A (skleněnou pipetou) a necháme prokapat
- 4) Vypneme vakuum a nalijeme roztok B, potom vyměníme vialky na odběr jednotlivých frakcí. Poté opět zapojíme vakuum a necháme prokapat roztok B
- 5) Opakujeme od kroku 3 s roztokem C.

Takto získáme ze 100 µl vzorku 3 frakce - každou po 4 ml. V první frakci A by se měly vyskytovat nepolární lipidy (TG a DG), ve frakci B volné mastné kyseliny (FFA) a ve frakci C polární lipidy (GPL). Frakce pomocí vakuové odpařovačky SpeedVac (Labconco, USA) odpaříme do sucha a rozpustíme v 500 µl roztoku MeOH a

CHCl₃ v poměru 1:2. Takto připravené vzorky vhodně naředíme a měříme pomocí HPLC/ESI/MS nebo v případě frakce B derivatizujeme a měříme systémem GC/MS.

2.4.4 HPLC/ UHPLC

Byly vyzkoušeny 3 chromatografické kolony na bázi C18. Byly provedeny experimenty na vliv množství vody a vliv průtoku, který se pohyboval od 200-400 µl roztoku za minutu na samotnou separaci látek a také ionizaci.

2.4.5 ESI/MS/MS

V hmotnostní spektrometrii se jako inertní plyn používá helium, jako plyn nosný a sušící se pak používá dusík. Z analytických důvodů probíhalo měření ve dvojím módu – pozitivním a negativním – v tomto nastavení (pro lepší opakovatelnost je nastavení uvedeno v originále).

Tabulka 1.: Parametry nastavení iontového zdroje a hmotnostního spektrometru

Source Type	ESI
Capillary Temp (C)	220.00
APCI Vaporizer Temp (C)	0.00
Sheath Gas Flow (l)	40.00
Aux Gas Flow (l)	8.00
Sweep Gas Flow (l)	0.00
Injection Waveforms	On
Injection Waveforms	On
Zoom AGC Target	200.00
Full AGC Target	2000.00
SIM AGC Target	500.00
MSn AGC Target:	500.00

Tabulka 2.: Parametry nastavení hmotnostního spektrometru v pozitivním a negativním módu

Positive polarity		Negative polarity	
Source Voltage (kV)	4.00	Source Voltage (kV)	4.50
Source Current (uA)	100.00	Source Current (uA)	100.00
Capillary Voltage (V)	36.00	Capillary Voltage (V)	-15.00
Tube Lens (V)	75.00	Tube Lens (V)	-30.00
Multipole RF Amplifier (Vp-p)	430.00	Multipole RF Amplifier (Vp-p)	400.00
RF Lens Offset (V)	-1.50	RF Lens Offset (V)	1.00
Lens 0 Voltage (V)	-5.00	Lens 0 Voltage (V)	3.00
Multipole 0 Offset (V)	-6.75	Multipole 0 Offset (V)	4.75
Lens 1 Voltage (V)	-13.00	Lens 1 Voltage (V)	24.00
Gate Lens Offset (V)	-54.00	Gate Lens Offset (V)	43.00
Multipole 1 Offset (V)	-13.50	Multipole 1 Offset (V)	22.00
Front Lens (V)	-38.93	Front Lens (V)	59.00
Zoom Micro Scans	5.00	Zoom Micro Scans	5.00
Zoom Max Ion Time (ms)	100.00	Zoom Max Ion Time (ms)	100.00
Full Micro Scans:	3.00	Full Micro Scans	3.00
Full Max Ion Time (ms)	100.00	Full Max Ion Time (ms)	100.00
SIM Micro Scans:	3.00	SIM Micro Scans	3.00
SIM Max Ion Time (ms)	100.00	SIM Max Ion Time (ms)	100.00
MSn Micro Scans	2.00	MSn Micro Scan	3.00
MSn Max Ion Time (ms)	50.00	MSn Max Ion Time (ms)	100.00

Aktivační energie pro MS/MS experimenty byla nastavena na 35% jak v pozitivním, tak negativním módu.

Nastavení hmotnostního spektrometru bylo získáno empiricky a pomocí poloautomatického ladění, které je součástí softwarového vybavení. Systém je naladěn a optimalizován na PC 18:0/18:2.

3 Externí standard

3.1 Složení externího standardu

Práce se systémem HPLC/ESI/MS je kromě základních teoretických znalostí založena především na empirii. Pro získání těchto zkušeností a porozumění, jak chromatografii, tak základním ionizačním a fragmentačním principům jednotlivých lipidických tříd jsme použili vnější standard. Tento standard se skládá z 18 přesně definovaných glycerolipidů náležících ke čtyřem třídám lipidů, dvou polárních PC a PE

a dvou nepolárních TG a DG. Přesné složení je v tabulce 1, kde jsou jednotlivé látky pro přehlednost a demonstraci elučního pořadí seřazeny podle retenčních časů.

Tabulka 3: Detailní složení externího unimolárního standardu. U každé látky je zaznamenána její identifikace, její m/z -chování v pozitivním a negativním spektru a příslušný poměr náboje a hmotnosti. TG a DG se v negativním módu neionizují.

Látka	m/z +		m/z -	
PE 18:2/18:2	740.1	[M+H] ⁺	738.1	[M-H] ⁻
PE 16:0/18:2	716.1	[M+H] ⁺	714.1	[M-H] ⁻
PE 16:0/16:0	692.1	[M+H] ⁺	690.1	[M-H] ⁻
PE 18:1/16:0	718.1	[M+H] ⁺	716.1	[M-H] ⁻
PC 18:2/18:2	782.3	[M+H] ⁺	840.2	[M+CH ₃ COO] ⁻
PE 17:0/17:0	720.1	[M+H] ⁺	718.1	[M-H] ⁻
PC 16:0/16:0	734.3	[M+H] ⁺	792.3	[M+CH ₃ COO] ⁻
PC 18:1/16:0	760.3	[M+H] ⁺	818.3	[M+CH ₃ COO] ⁻
PC 18:2/18:0	786.3	[M+H] ⁺	844.3	[M+CH ₃ COO] ⁻
PE 18:0/18:0	748.2	[M+H] ⁺	746.3	[M-H] ⁻
PC 17:0/17:0	762.4	[M+H] ⁺	820.3	[M+CH ₃ COO] ⁻
PC 18:1/18:0	788.4	[M+H] ⁺	846.3	[M+CH ₃ COO] ⁻
DG 16:0/16:0	586.1	[M+NH ₄] ⁺	-	-
DG 16:0/18:1	612.1	[M+NH ₄] ⁺	-	-
PC 18:0/18:0	790.4	[M+H] ⁺	848.4	[M+CH ₃ COO] ⁻
TG 3x 16:1	818.3	[M+NH ₄] ⁺	-	-
TG 18:2/18:0/18:2	900.4	[M+NH ₄] ⁺	-	-
TG 3x 16:0	824.3	[M+NH ₄] ⁺	-	-

3.2 Vlastnosti HPLC ESI MS systému

Kapalinové hmotnostní spektrometry jsou obecně velmi závislé na práci operátora, který díky nastavení může ovlivňovat výsledky jednotlivých analýz. Proto je velmi důležité důsledně dodržet stejný druh nastavení, aby se získané výsledky mohly mezi sebou porovnávat. Bylo proto provedeno poloautomatické ladění hmotnostního spektrometru na PC 18:0/18:2 jehož výsledek je popsán v kapitole 2.4.5 ESI/MS/MS.

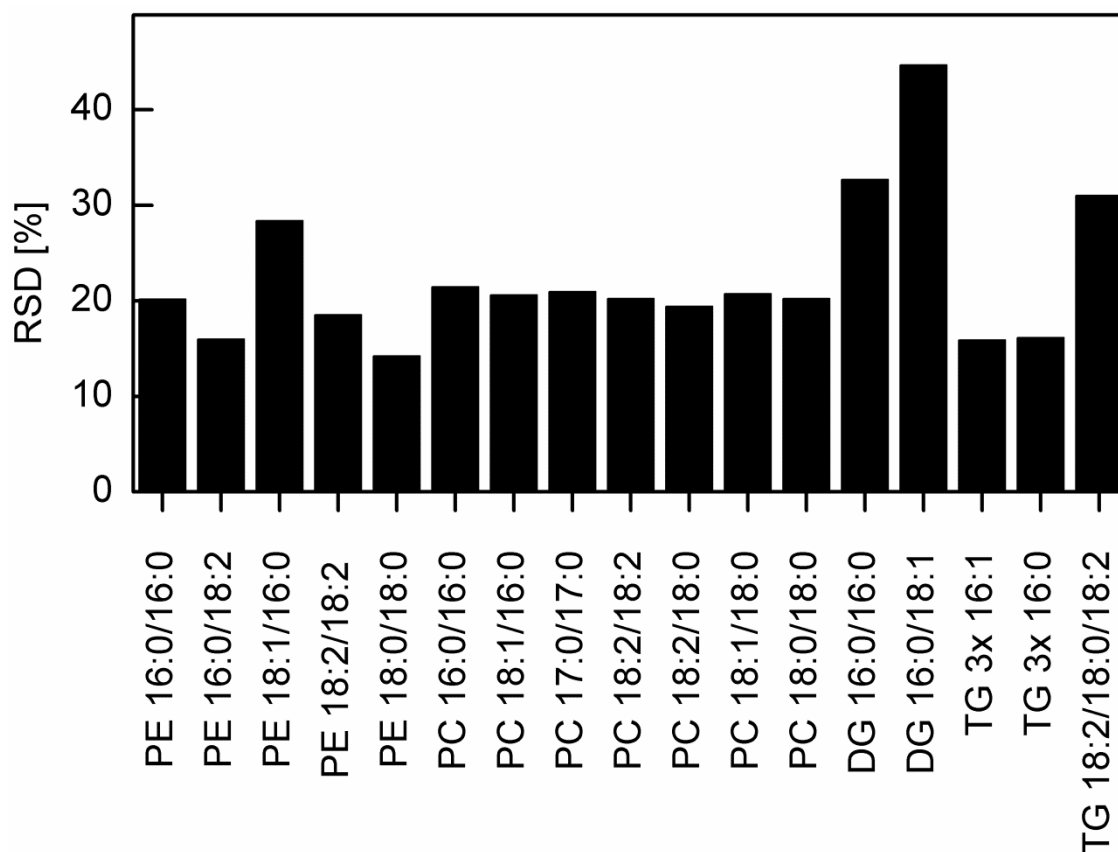
3.2.1 Opakovatelnost měření

K upřesnění výsledků byla dále kvantifikována opakovatelnost celého systému HPLC/ESI/MS při stejném nastavení, a to:

- a) v průběhu celého roku
- b) v rámci jedné sekvence, tedy řádově ve dnech.

Byly porovnány jak surové plochy píků jednotlivých analytů, tak jejich poměr.

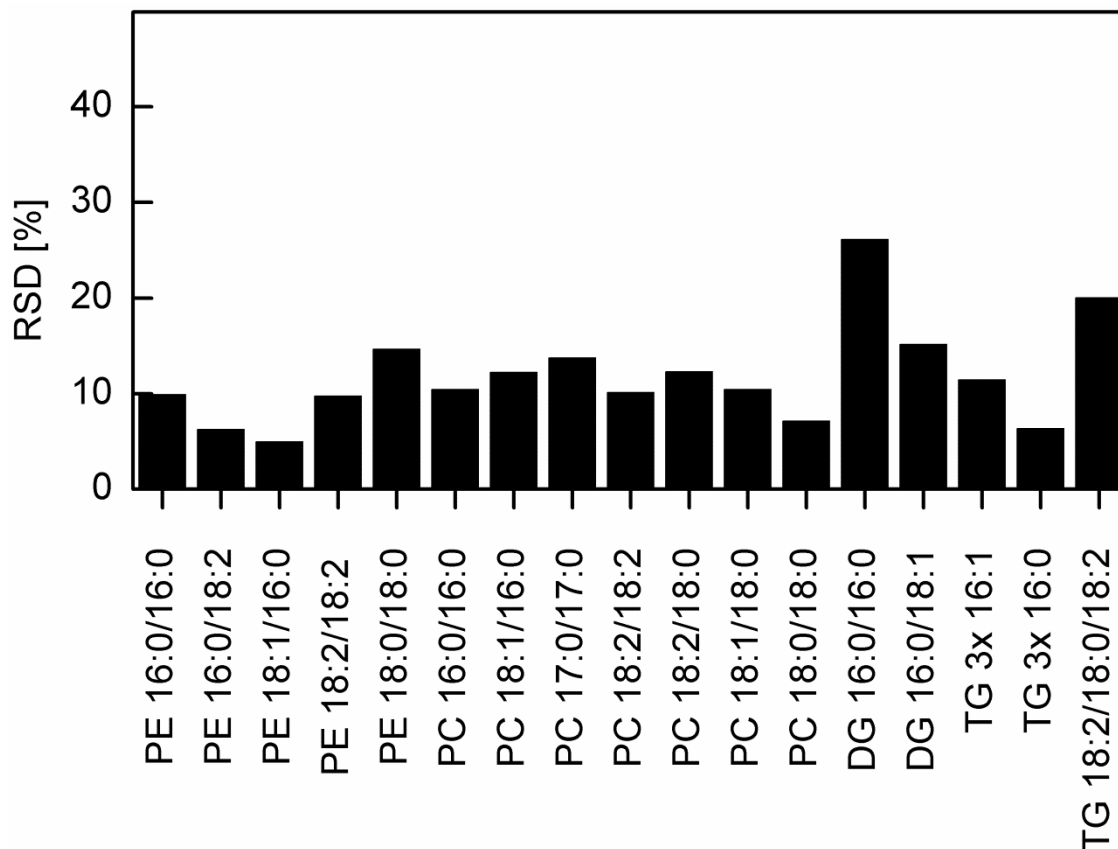
Ad a) Procentuelní poměr analytů unimolárního standardu byl porovnán měřeními v průběhu celého roku a to celkem šestkrát po třech opakováních. Výsledky opakovatelnosti z hlediska porovnání plochy píků ukázalo odchytku v rámci několika desítek procent (50-70%). Po přepočtení na procentuelní poměr jednotlivých analytů se tato odchytky dramaticky snížila a je ukázána na obrázku 3.



Obrázek 3: Relativní směrodatná odchylka jednotlivých analytů ve standardu měřených na koloně Gemini a to výchozí chromatografickou metodou ($n=18$) v průběhu celého roku.

Na obrázku je patrné, že opakovatelnost systému HPLC/ESI/MS je v průběhu roku nevalná a pohybuje se kolem 20% až na výjimky u DG, kdy se vyšplhala až na hranici 30%.

Ad b) Dlouhodobá opakovatelnost systému nepřinesla nejlepší výsledky, proto byla porovnána měření standardů v rámci jedné sekvence vzorků, kdy byl standard měřen po 10 vzorcích. Výsledek je patrný na obrázku 4.

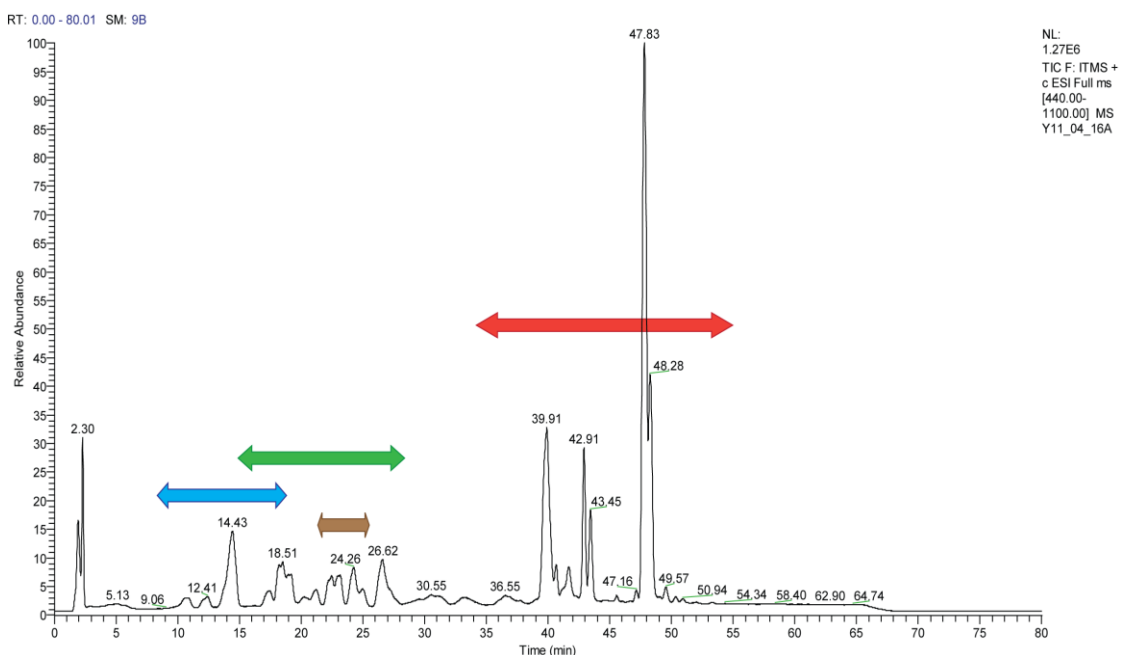


Obrázek 4.: Relativní směrodatná odchylka jednotlivých analytů ve standardu měřených na koloně Gemini a to výchozí chromatografickou metodou ($n=5$) v rámci jedné sekvence analýz.

Porovnáním těchto dat byla zjištěna opakovatelnost u PC a TG s výjimkou TG 18:2/18:0/18:1 do 10%, u PE a DG do 20%.

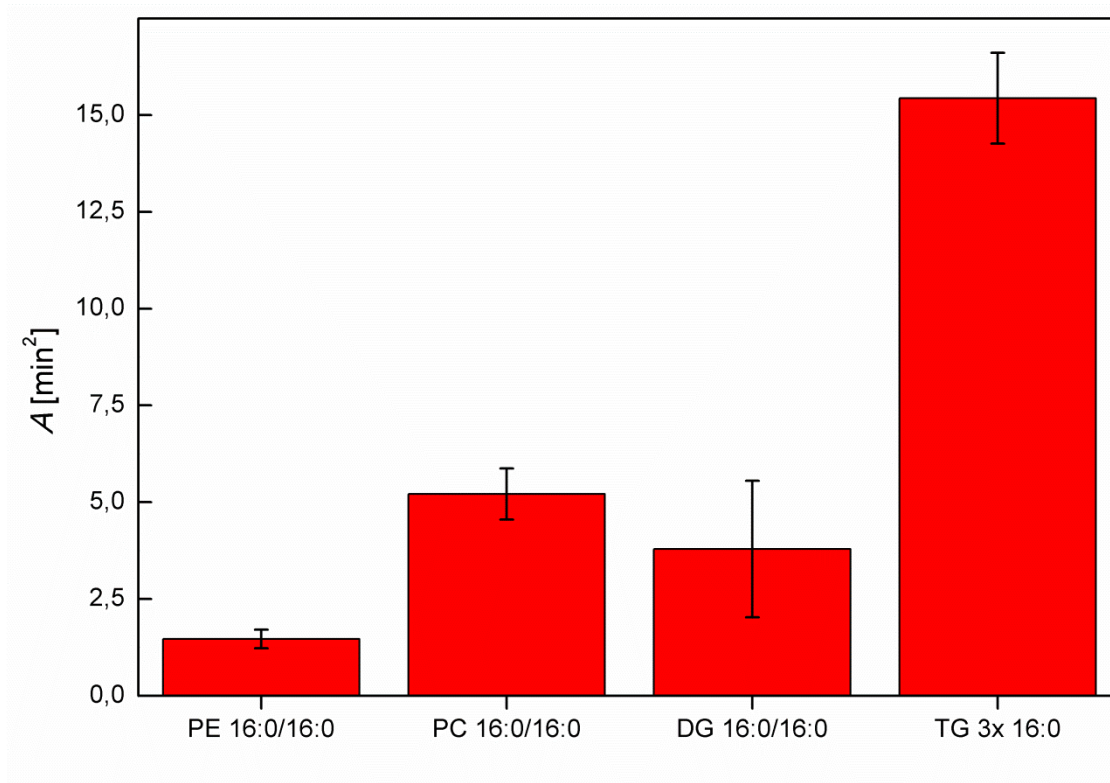
3.2.2 Ionizace jednotlivých tříd lipidů

Na obrázku 5. je reprezentativní chromatogram unimolárního standardu. Je patrné, že některé třídy lipidů se ionizují ochotněji než jiné, proto bylo provedeno srovnání plochy píků, tedy odezvy pro jednotlivé třídy lipidů. Jednotlivé lipidy obsahují pouze kyselinu palmitovou, tím je eliminován faktor délky řetězce a nenasycenosti mastné kyseliny. Výsledky tohoto srovnání jsou znázorněny na obrázku 6.



Obrázek 5.: Chromatogram unimolárního standardu pořízený v pozitivním spektru na koloně Gemini. Chromatogram zobrazuje všechny zaznamenané ionty – TIC (total ion current). Šípky vymezují oblasti, ve kterých se daná třída glycerolipidů eluuje. Pro PE je to modrá šipka, zelená pro PC, hnědá pro DG a červená pro TG.

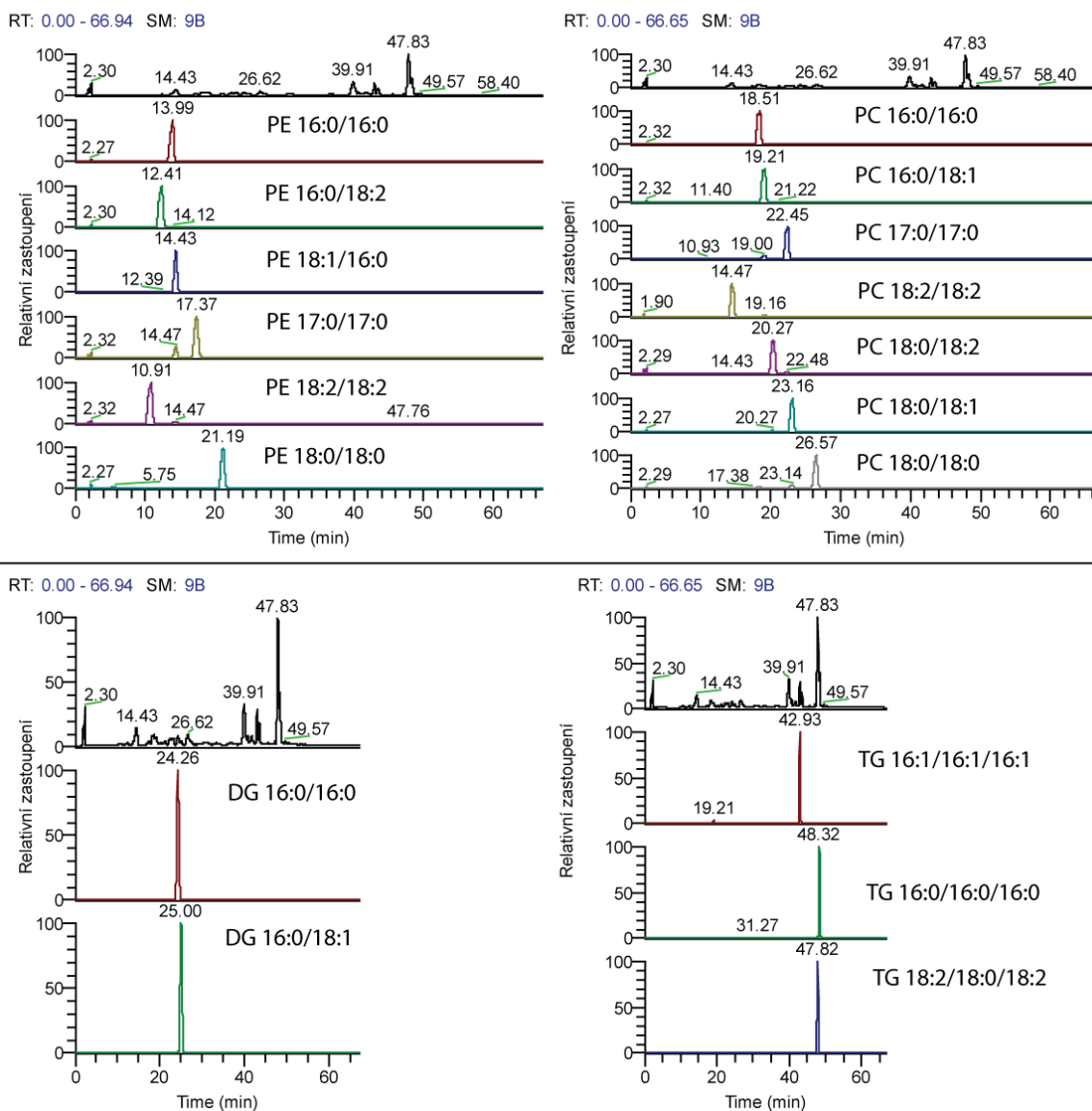
V obrázku 6 můžeme vidět, že nejmenší ochotu ionizovat se mají PE, naopak nejlépe se ionizují TG. Toto srovnání platí pouze pro pozitivní ESI mód.



Obrázek 6.: Porovnává odezvy jednotlivých tříd lipidů obsahující kyselinu palmitovou. Data jsou získána z opakovaného měření standardu v rámci měřené sekvence v pozitivním ESI módu.

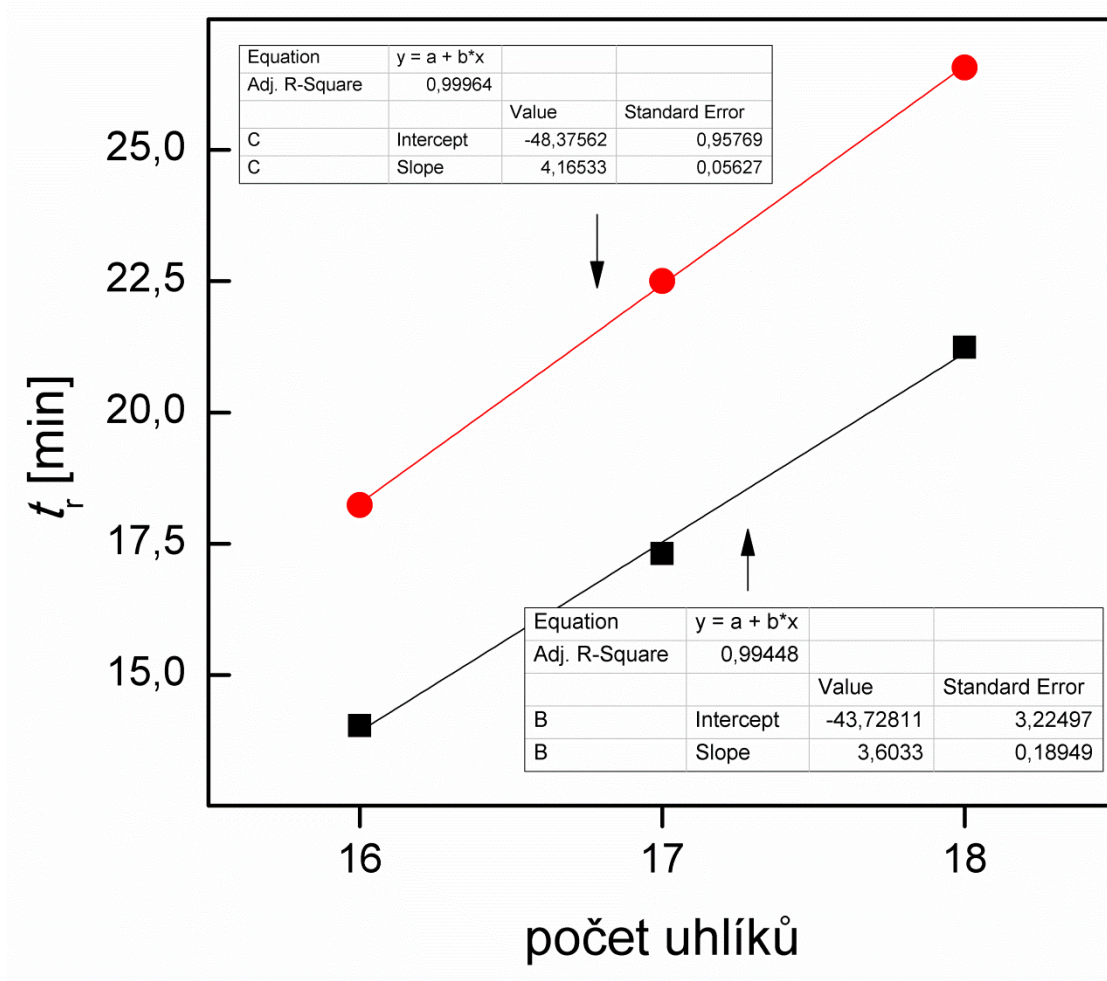
3.2.3 Chování jednotlivých lipidů na chromatografické koloně C18

Samotné chování látek na chromatografické koloně je zdrojem informací o jejich struktuře. Z tabulky 3., kde jsou uvedeny také retenční časy, a také z chromatogramu na obrázku 5. vyplývá, že se nejdříve eluují látky nejvíce polární (PE) následované méně polárními (PC) až k úplně nepolárním, jako jsou TG. Detailnější pohled na chování jednotlivých analytů lze vidět na obrázku 7.

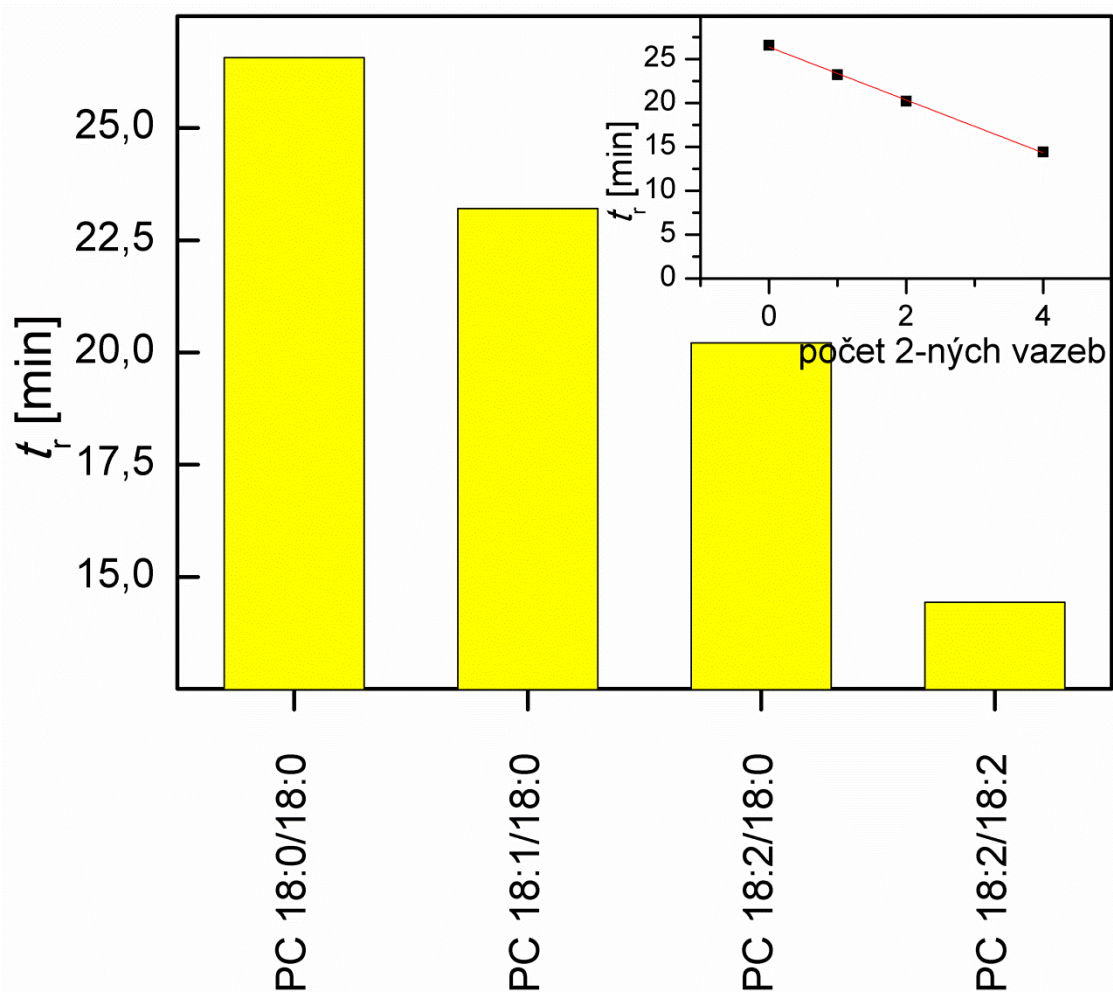


Obrázek 7.: Chromatogramy unimolárního standardu pořázené v pozitivním spektru na koloně Gemini. Chromatogramy ukazují eluci jednotlivých glycerolipidů.

Na základě chromatografických záznamů konkrétních GL lze usuzovat, že na retenční čas má vliv nejenom délka řetězce mastné kyseliny, ale také její nenasycenost. Vliv délky řetězce na retenční čas lze sledovat na obrázku 8, porovnání 3 analytů s nasycenými FA se podařilo získat lineární odezvy, což potvrzují obě hodnoty spolehlivosti R, které se blíží k 1 a to konkrétně 0.9972 pro PE a 0.9998 pro PC. Retenční čas roste s délkou uhlíkového řetězce. Naopak při pohledu na obrázku 9 je jasné, že míra nenasycenosti má přesně opačný efekt. Čím více je látka nenasycená, tím více se její retenční čas zkracuje.



Obrázek 8.: Linearitu odezvy PC a PE molekul obsahujících pouze nasycené mastné kyseliny.

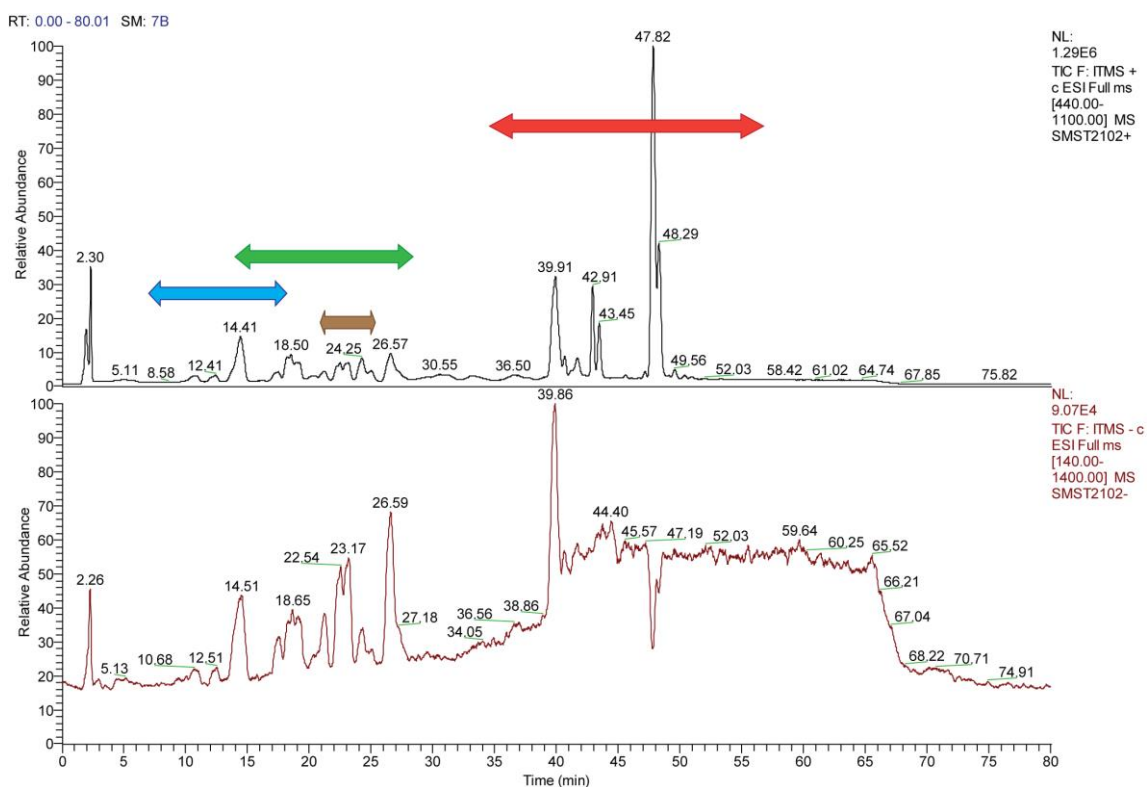


Obrázek 9.: Negativní korelace mezi retenčním časem a množstvím dvojných vazeb v uhlíkovém řetězci mastných kyselin. Vložena závislost retenčního času na počtu dvojných vazeb.

Na základě zkušeností s biologickými vzorky lze oba tyto fenomény aplikovat na všechny studované třídy glycerolipidů.

3.2.4 Chování lipidických tříd v pozitivním a negativním ESI módu

Jednou ze základních informací vedoucí k determinaci lipidů je jeho chování v pozitivním a negativním módu ESI. Bylo provedeno opakované měření standardů v obou módech. Reprezentativní chromatogram je na obrázku 10. Je zde patné, že vůbec nedochází k ionizaci TG. Stejně je tomu tak v případě DG, což je pozorovatelné na obrázku 10.



Obrázek 10.: Reprezentativní chromatogramy unipolárního standardu měřené v pozitivním (nahore) a v negativním (dole) ESI módu. Zobrazení je v módu TIC. Jako v předchozím případě jsou eluční oblasti jednotlivých tříd glycerolipidů označeny barevnými šipkami. Pro PE je to šipka modrá, pro PC zelená, pro DG hnědá a červená šipka pro TG.

Na obrázku 11 je 8 spekter, záznamů z hmotnostního spektrometru po ionizaci pomocí ESI. Pro každou látku jsou získána spektra jak v negativním, tak pozitivním módu. V pozitivním módu lze u PE pozorovat proponovaný ion $[M+H]^+$ a v negativním módu deprotonovaný ion $[M+H]^-$. U PC je situace odlišná. V pozitivním spektru se chovají stejně jako PE a vytváří majoritní proponovaný ion $[M+H]^+$. V negativním módu však dochází k ionizaci pomocí addukce zbytku kyseliny octové, ale jen

v případě, že je v mobilní fázi přítomen acetátový anion. Pouhé porovnání pozitivních a negativních spekter nám určí příslušnost analytu k dané lipické třídě.

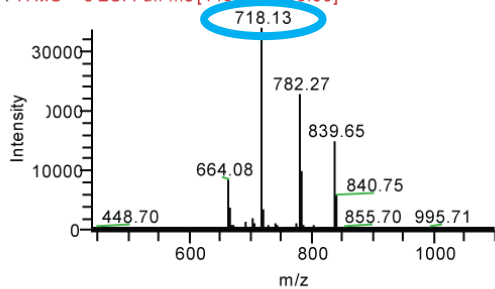
V případě PE byl vybrán PE 18:1/16:0, jehož retenční čas byl 14.42. Na základě dat získaných z 5 měření v průběhu sekvence cca 90 vzorků bylo zjištěno, že dochází k posunu jednotlivých píků analytů, a to v rozsahu 0.5–0.3 minuty s tím, že nebyl patrný žádný trend. Proto bylo zvoleno časové okno od 14.20 minuty do 14.60 minuty.

V pozitivním módu je dominantní ion 718.13, což odpovídá ionu $[M+H]^+$ PE 18:1/16:0. Stejně parametry byly vybrány pro negativní mód, kde je dominantním iontem 716.29, který odpovídá iontu $[M-H]^-$ PE 18:1/16:0. Aplikací stejného postupu byly objeveny ionty $[M+H]^+$ a $[M+CH_3COO]^-$ pro PC 18:0/18:0 odpovídající hmotám 790.37 a 848.25. Početní rozdíl je 58 jednotek, což koresponduje s acetátovým aniontem.

V našem systému je dominantním iontem charakteristickým pro DG a TG amonný adukt $[M+NH_4]^+$. Za DG byla vybrána látka DG 16:0/18:1, již odpovídá hmotě m/z 612.10. V negativním spektru však pro analyt DG 16:0/18:1 nebyly nalezeny žádné analytické ionty. Stejně chování bylo zaznamenáno u TG. Jejich zástupcem na obrázku 5 je TG 16:1/16:1/16:1, který v pozitivním spektru odpovídá hmotě m/z 818.30.

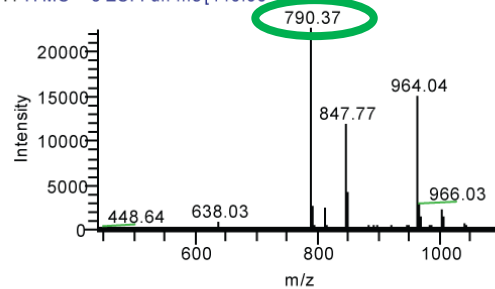
PE 18:1/16:0

SMST2102+ #1499-1555 RT: 14.20-14.62 AV: 29 NL:
F: ITMS + c ESI Full ms [440.00-1100.00]

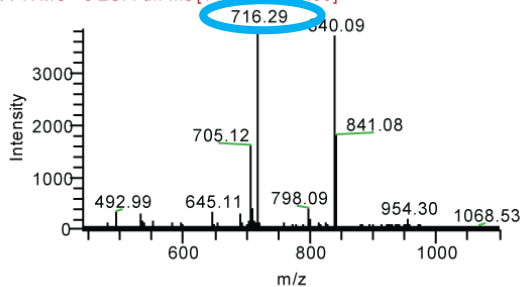


PC 18:0/18:0

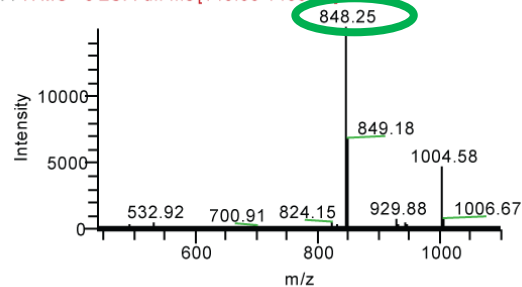
SMST2102+ #2920-2945 RT: 26.46-26.65 AV: 13 NL:
T: ITMS + c ESI Full ms [440.00-1100.00]



SMST2102- #1002-1034 RT: 14.21-14.61 AV: 16 NL:
F: ITMS - c ESI Full ms [140.00-1400.00]

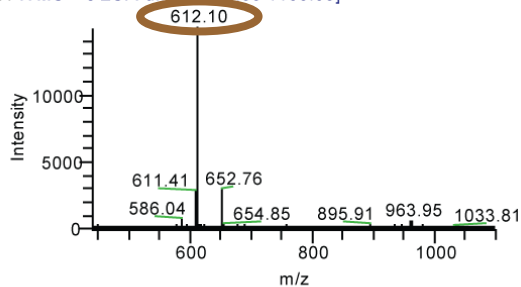


SMST2102- #1896-1912 RT: 26.46-26.64 AV: 8 NL: 1.50E4
F: ITMS - c ESI Full ms [140.00-1400.00]



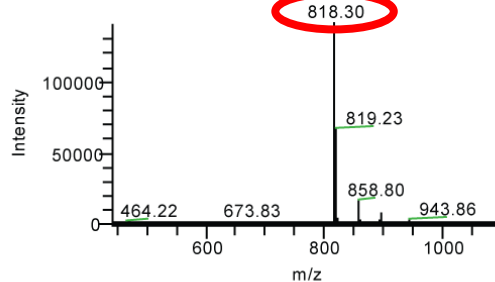
DG 16:0/18:1

SMST2102+ #2733-2757 RT: 24.80-25.00 AV: 13 NL:
T: ITMS + c ESI Full ms [440.00-1100.00]

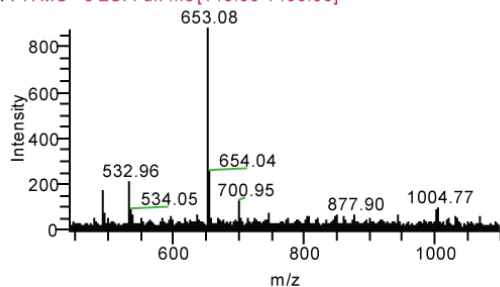


TG 16:1/16:1/16:

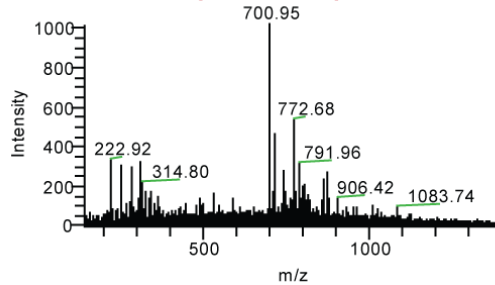
SMST2102+ #4759-4786 RT: 42.80-42.99 AV: 14 NL:
T: ITMS + c ESI Full ms [440.00-1100.00]



SMST2102- #1775-1790 RT: 24.80-24.99 AV: 8 NL: 8.67E2
F: ITMS - c ESI Full ms [140.00-1400.00]



SMST2102- #3110-3125 RT: 42.82-42.99 AV: 8 NL: 1.01E3
F: ITMS - c ESI Full ms [140.00-1400.00]

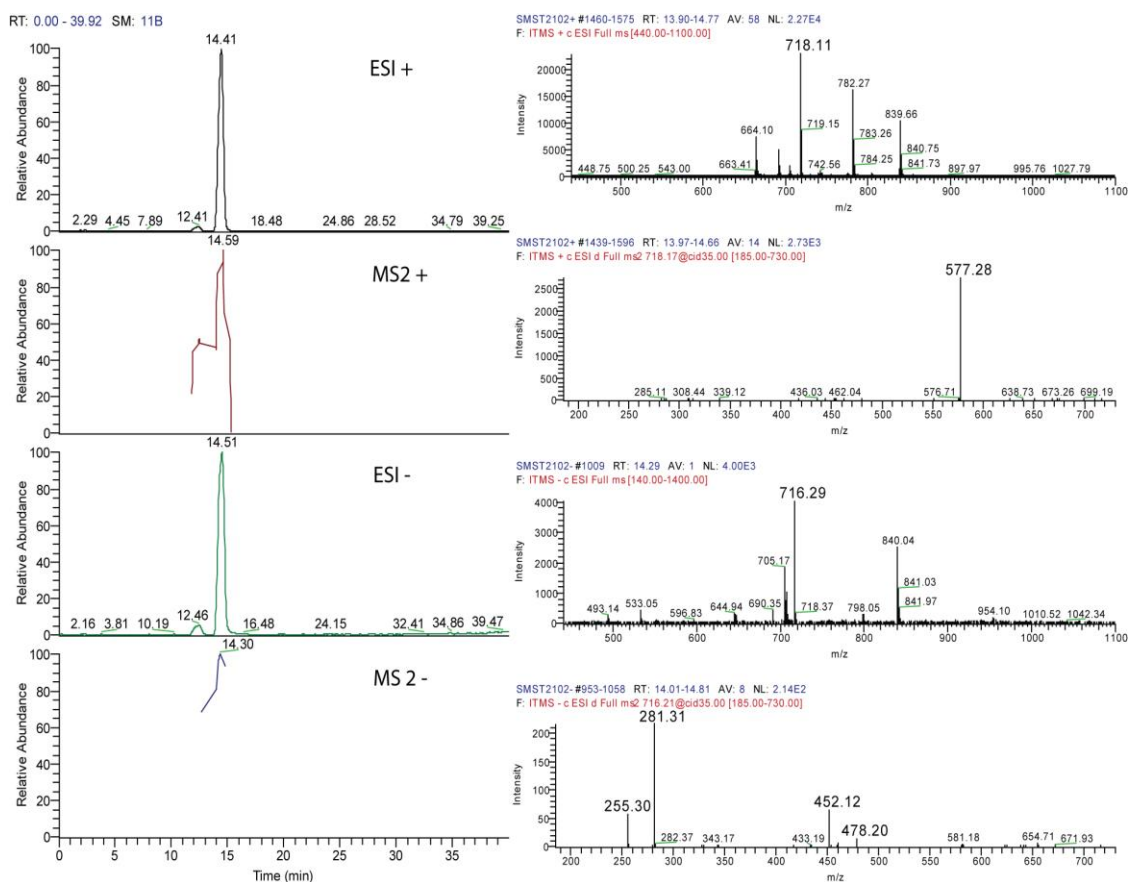


Obrázek 11.: Spektra získaná v určitém časovém rozmezí zachycující jednoho zástupce jednotlivých tříd glycerolipidů. Nahoře je vždy pozitivní a dole negativní spektrum. Ionty, které označují jednotlivé analyty, jsou zakroužkovány barevně dle příslušnosti k lipidické třídě. Pro PE je použito modré barvy, pro PC zelené, pro DG hnědé a červené pro TG.

3.2.5 MS² experimenty

Doposud se nám podařila na základě chování analytu v pozitivním a negativním ESI módu stanovit příslušnost analytu k lipidické třídě a jeho m/z , jak v pozitivním, tak i v negativním módu. Z této informace lze usuzovat na celkový počet uhlíkových atomů ve všech mastných kyselinách a celkový počet dvojných vazeb.

Například lze tvrdit, že m/z 718.1 patřící k PE obsahuje celkem 32 uhlíků a jednu dvojnou vazbu. Determinaci jednotlivých mastných kyselin navázaných na glycerolové kostře poskytne až fragmentační vzor molekuly získaný díky MSⁿ experimentům (obrázek 12).

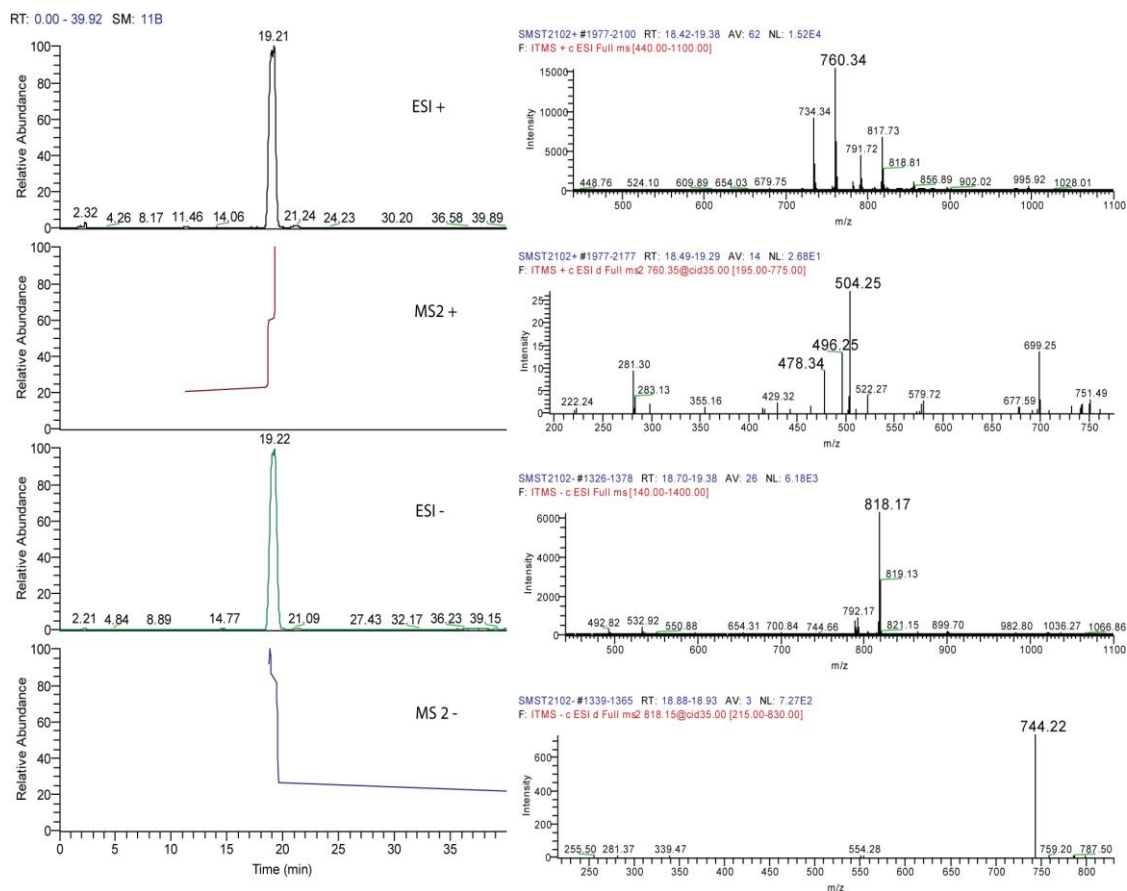


Obrázek 12.: Chování PE 16:0/18:1 v pozitivním a negativním ESI módu, jeho spektra a také MS² experimenty obou polarit. Analytické ionty jsou vyznačeny větším písmem. K získání MS² informace byla použita aktivační energie 35%.

Charakteristická ztráta pro PE při MS² experimentech je 141, což odpovídá ztrátě ethanolaminu z molekuly lipidu. V našem případě je tato ztráta reprezentována m/z 577.28. Tato informace potvrzuje příslušnost analytu k lipidické třídě, ale nedokáže

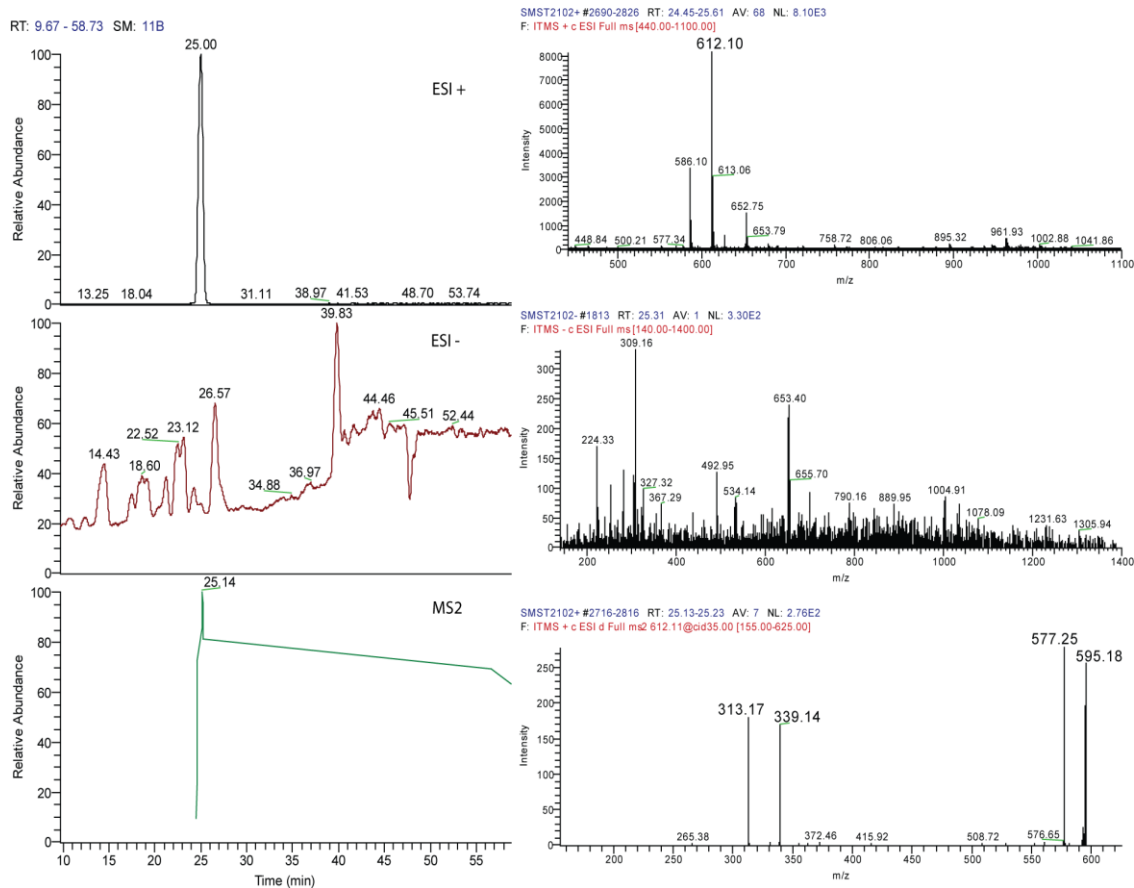
odhalit konkrétní mastné kyseliny na glycerolové kostře - tuto informaci lze tedy považovat za komplementární.

Strukturní informace o molekule PE přináší až MS² experiment v negativním ESI módu. Majoritními ionty jsou 281.31 a 255.30, které odpovídají zbytkům mastných kyselin [RCOO]⁻. Ion 281.31 odpovídá kyselině olejové a ion 255.30 reprezentuje kyselinu palmitovou. Strukturní informaci polohy mastných kyselin prozradí majoritní ion [M-R₂CO]⁻, který indikuje ztrátu acylového zbytku mastné kyseliny v *sn*-2 poloze. V tomto případě ion 452.12 odpovídá ztrátě olejové kyseliny. Minoritní ion 478.20 pak reprezentuje ztrátu kyseliny palmitové v poloze *sn*-1.



Obrázek 13.: zachycuje chování PC 18:1/16:0 v pozitivním a negativním ESI módu, jeho spektra a také MS² experimenty obou polarit. Analytické ionty jsou vyznačeny větším písmem. K získání MS² informace byla použita aktivací energie 35%.

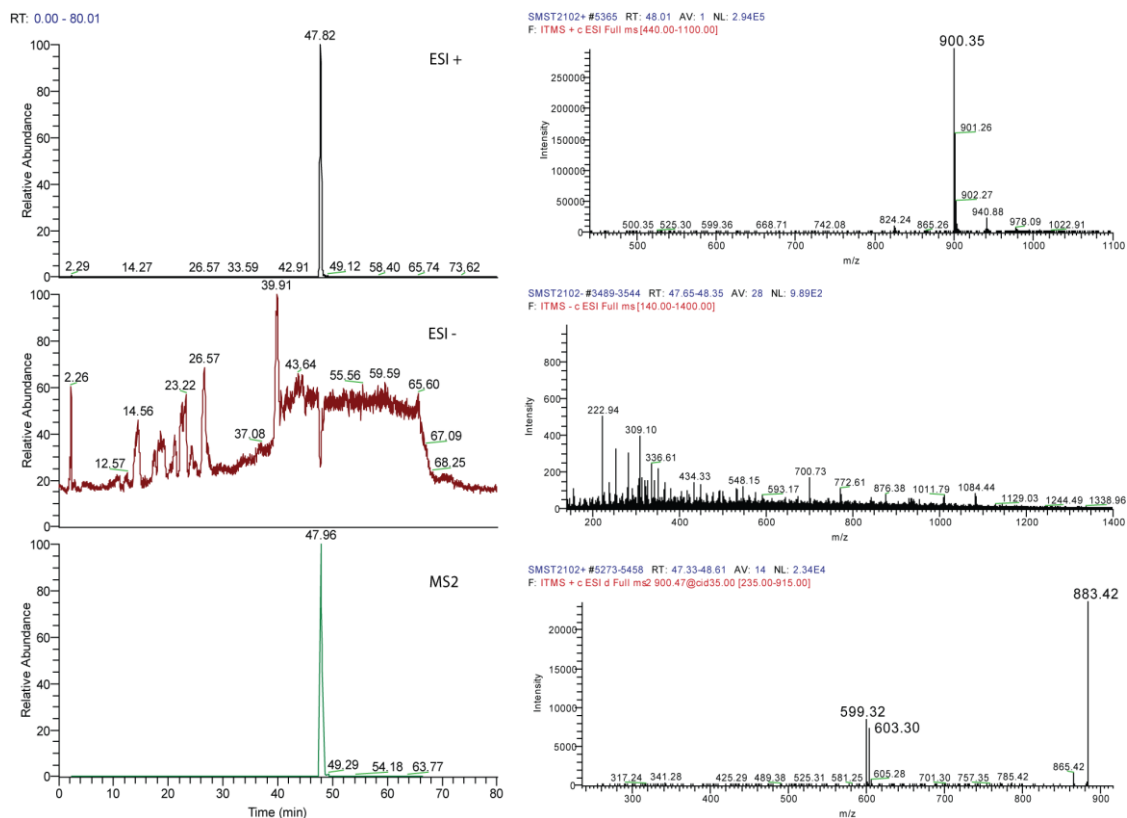
Z hlediska identifikace a použité polarity se PC chovají zcela odlišně od PE. Strukturální informace je uložena již v MS² pozitivních experimentech (obrázek 13). Při fragmentaci dochází ke ztrátě ketenu typu $[RCH=C=O]$, a to přednostně z polohy *sn*-2. V našem případě je tato ztráta $[MH-R_2CH=C=O]^+$ reprezentována ionem 496.25, který odpovídá kyselině palmitové. Ionty 504.25 a 478.34 jsou výsledkem ztráty $[MH-RCOOH]$ kyseliny palmitové a olejové. V negativním spektru je majoritním iontem addukt se zbytkem kyseliny octové $[M+CH_3COO]^-$, a to díky přidavku octanu amonného v mobilní fázi. Typickým ionem MS² fragmentace je ztráta 74 jednotek, čemuž odpovídá ion 744.22 $[M-CH_3CH_2COOH]^-$. Jedná se o ztrátu octanu a jedné molekuly CH₃ z cholinové části molekuly. Tuto informaci lze považovat za komplementární, protože pouze potvrzuje příslušnost k lipidické třídě, ale neprozrazuje nic o detailní struktuře glycerolipidu.



Obrázek 14.: Chování DG 16:0/18:1 v pozitivním a negativním ESI módu, jeho spektra a také MS² experiment pouze kladné polarity. Analytické ionty jsou vyznačeny větším písmem. K získání MS² informace byla použita aktivační energie 35%.

Příslušnost analytu k nepolárním třídám lipidů, jako jsou DG a TG, je patrná již z jeho chování v pozitivním spektru, kde tyto látky v našem systému HPLC/ESI nejsou schopny tvořit pouze protonované ionty. Vyskytují se jako amonné addukty $[M+NH_4]^+$. V negativním módu ESI není přítomnost analytu pozorována, analyty se neionizují (obrázky 11 a 14).

Determinace DG je založena na MS² experimentech v pozitivním módu (obrázek 14). Jsou patrné dva majoritní ionty 595.18 a 577.25. První je molekulární ion $[M+H]^+$ vzniklý odtržením amoniaku. Druhý ion vzniká odtržením NH_4OH . Toto chování je ze zkoumaných lipidů charakteristické pro DG. Ionty 313.17 a 339.14 jsou diagnostické ionty determinující mastné kyseliny navázané na glycerolovou kostru. Ion 313.17 odpovídá ztrátě kyseliny olejové $[MH-RCOOH]^+$ a ion 339.14 ztrátě kyseliny palmitové. Determinace poloh jednotlivých mastných kyselin se nám nepodařila spolehlivě ověřit.



Obrázek 15.: Chování TG 18:2/18:0/18:2 v pozitivním a negativním ESI módu, jeho spektra a také MS² experiment pouze kladné polarity. Analytické ionty jsou vyznačeny větším písmem. K získání MS² informace byla použita aktivační energie 35%.

Podobný fragmentační vzor jako je u DG lze pozorovat u TG s tím rozdílem, že ion $[M-NH_4-OH]^+$ není přítomen v takové abundanci (obrázek 15). Dominantní ion v MS² spektru je stejně jako u DG molekulární ion vzniklý odtržením amoniaku, v našem případě se jedná o ion 883.42. Ionty 599.32 a 603.30 vznikly odtržením kyselin stearové $[MH-RCOOH]^+$ a linolové.

Výsledky MS² experimentů v pozitivním a negativním ESI módu jsou shrnuty v tabulce 4.

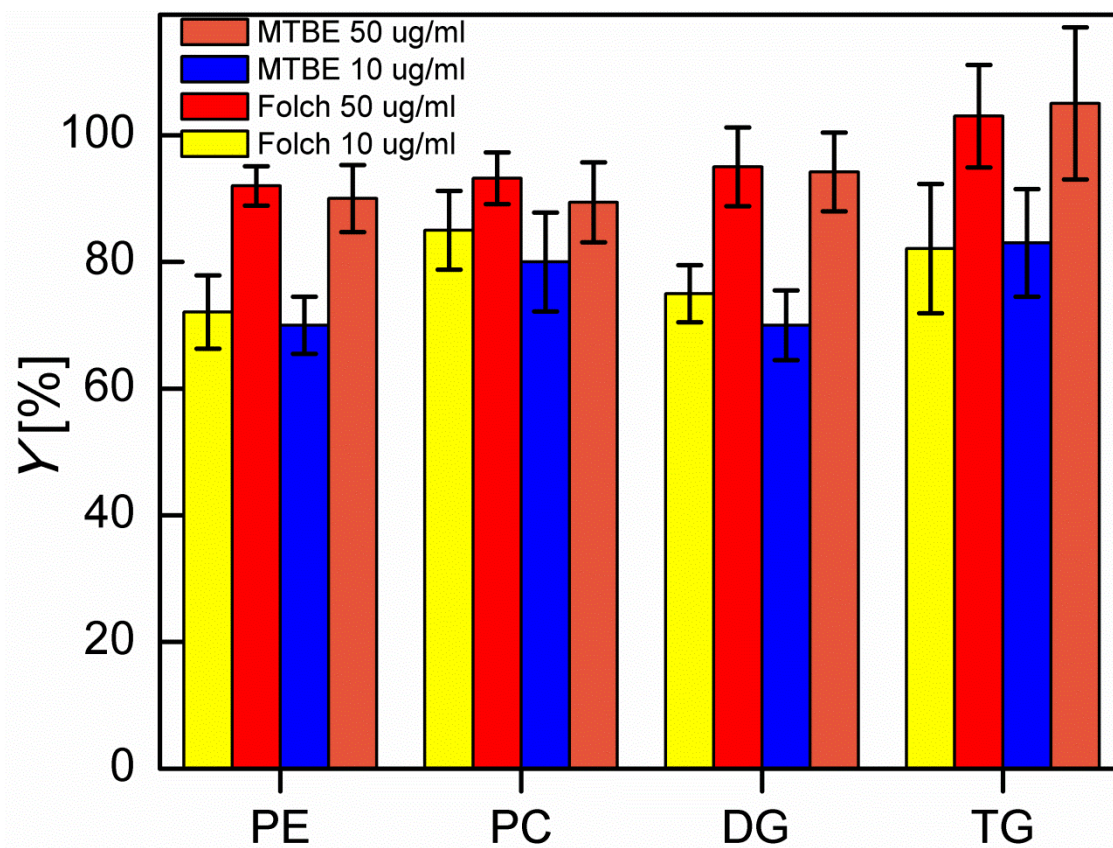
Tabulka 4.: Charakteristické ztráty jednotlivé třídy lipidů a také zbytky mastných kyselin v pozitivním a negativním módu ionizace.

Třída lipidů	Ztráty v MS ² positivech		Ztráty v MS ² negativech	
PE	[M-PE] ⁺	[M-141] ⁺	[RCOOH] ⁻ [M-R ₂ CO] ⁻	
PC	[M-R ₂ CH=OH] ⁺ [M-RCOOH] ⁺		[M-CH ₃ CH ₂ COOH] ⁻	[MCH ₂ COOH-74] ⁻
DG	[MH-NH ₄] ⁺ [MH-NH ₄ -OH] ⁺ [M-RCOOH] ⁺	[M-17] ⁺ [M-35] ⁺	x	x
TG	[MH-NH ₄] ⁺ [M-RCOOH] ⁺	[M-17] ⁺	x	x

4 Extrakce – Folchova metoda versus MTBE

Jedním ze základních úkolů této diplomové práce bylo otestovat metody extrakce dle Folcha – chloroform:methanol 2:1 (a) a pomocí methyl (terc-butyl) etheru (b). Jedním z hlavních důvodů, proč bylo toto testování provedeno, je ten, že díky extrakci MTBE lze použít automatické extrakční zařízení, protože organická vrstva se nachází nahoře. Další důvod je ekonomický. Likvidace chlorovaných rozpouštědel podléhá přísné kontrole a je několikanásobně dražší, než je tomu u MTBE. Posledním a neméně závažným důvodem je ochrana životního prostředí. Odbouratelnost chloroformu v přírodě je totiž výrazně náročnější než je tomu u MTBE.

Byly provedeny experimenty s unimolárním standardem. Jeho originální koncentrace se pohybovala 10 µg/ml. Aby mohl být proveden pokus alespoň na dvou koncentračních hladinách, byla část standardu odpařením zakoncentrována na 50 µg/ml. Jako matrice bylo použito vzorek tkáně pstruha. Výsledky jsou prezentovány na obrázku 16, kde je patrné, že vyšší výtěžnosti bylo dosaženo při vyšší koncentraci standardu a také chyba výtěžku se snižuje, celkový počet opakování $n=10$. Lze též vypořádat, že výtěžky naměřené při extrakci dle Folcha vykazují nižší variabilitu, ale současně dosahují o něco málo vyšší výtěžnost.

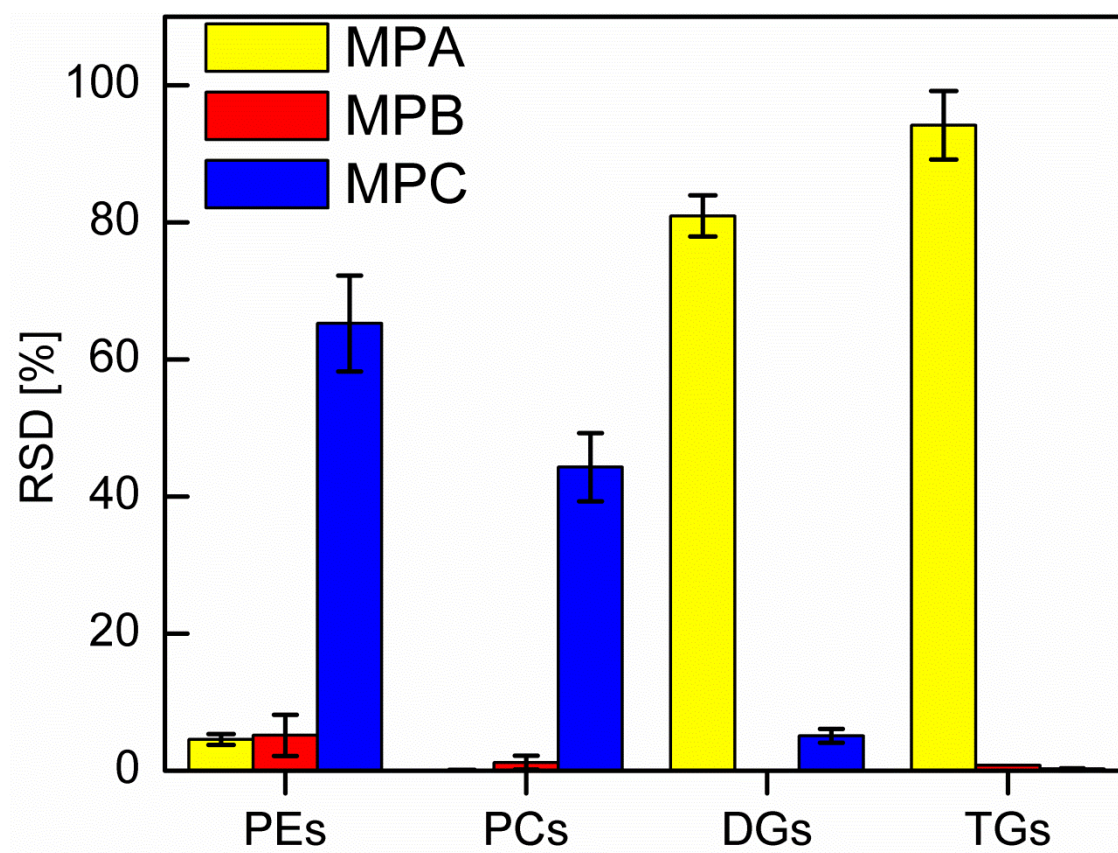


Obrázek 16.: Výtěžnosti dvou testovaných extrakcí (n=10).

5 SPE

5.1 SPE dle originální receptury dle Kalužného

Pro ověření spolehlivosti byla otestována SPE metoda, která byla navržena a publikována Kalužným²³ *et al* v roce 1985. Při 10 opakováních se podařilo dosáhnout výsledku prezentovaného na obrázku 17. Je patrné, že výtěžek cca 45% u PC je nevyhovující. Výtěžky u polárních lipidů se pohybují v rozmezí 80-94%, což lze považovat za uspokojivý výsledek.



Obrázek 17.: Výtěžky jednotlivých tříd glycerolipidů po provedení SPE dle originální receptury.

5.2 Optimalizace SPE metody pro separaci glycerolipidů na základě polarity

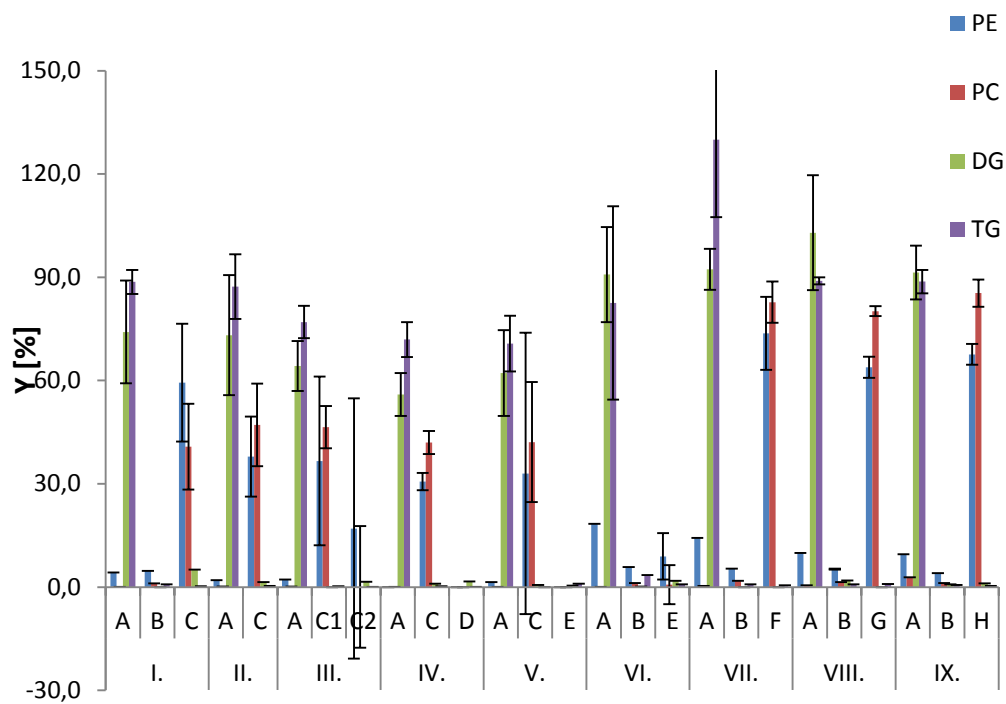
Pro dosažení lepší výtěžnosti v oblasti nepolárních lipidů bylo navrženo osm variant.

- **Varianta I:** pouhé opakování původní receptury.
- **Varianta II:** testuje, zda promývací roztok B nemůže mít vliv na pozdější eluci polárních lipidů
- **Varianta III:** testuje, zda jsou 4ml promývacího roztoku dostatečné množství k eluci většiny polárních lipidů. Jak je patrné došlo k další eluci PE, ale PC zůstávají na hladině cca 40%.
- **Varianty IV, V a VI:** testují acetonitril jako rozpouštědlo s větší eluční silou, nicméně bezúspěšně.
- **Varianty VII a VIII:** testují vliv pH na eluci. Většího výtěžku bylo dosaženo použitím přídavku amoniaku, ale lze také pozorovat větší odchylku. Při přídavku kyseliny octové se podařilo snížit odchylku, ale také výtěžek.
- **Varianta IX:** testuje vliv polarity posledního promývacího roztoku na eluci polárních glycerolipidů . Při této variantě bylo dosaženo nejvyššího výtěžku s nejnižší odchylkou.

Shrnutí jednotlivých variant je uvedeno v tabulce 5 a na obrázku 18.

Tabulka 5.: Seznam variant a pořadí promývacích roztoků

Mobilní fáze		Frakce			
		varianta	1	2	3
A	chloroform:isopropanol 2:1	I.	A	B	C
B	2% kyselina octová v diethyletheru	II.	A	C	-
C	methanol	III.	A	C	C
D	acetonitril	IV.	A	C	D
E	acetonitril+čpavek	V.	A	C	E
F	methanol + čpavek	VI.	A	B	E
G	methanol + 2% kyselina octová	VII.	A	B	F
H	methanol:voda 9:1	VIII.	A	B	G
		IX.	A	B	H



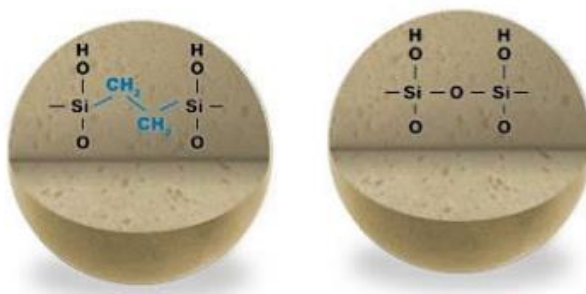
Obrázek 18.: Výtěžky variant a opakovatelnost při $n=10$. Z důvodu přehlednosti byly vynechány odchylky u frakcí, ve kterých se nemají dané lipidy eluovat, tedy pro PC a PE jsou to frakce A a B a pro DG a TG frakce B-H.

6 HPLC/UHPLC

Na základě studia literatury byly vybrány tři chromatografické kolony pro reverzní fázi, všechny na bázi C18. Rozdíl mezi nimi je v průměru, délce a vnitřním uspořádání kolony.

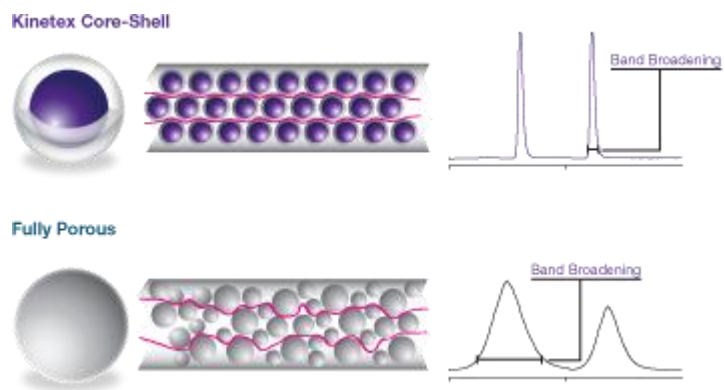
Kolona Gemini® 3 μm C18 110 Å, 150x2 mm je nejstarší pořízenou kolonou. Ve své době dosahovala jedny z nejlepších výsledků. Byla vybrána na základě publikací⁸⁰ a popsané chromatografické podmínky se staly pro tuto studii výchozí. Kolona Gemini je plněna plně porézním organo-křemičitanem, což znamená, že organická skupina je přímo naroubována na vrstvy křemičitých částecek (obrázek 19 – vlevo). Tato struktura způsobuje větší odolnost křemičitých částí proti vymývání při vyšších pH.

Další vybraná kolona je Synchronic 1.7 μm , C18, 100Å, 100x2.1 mm byla pořízená od firmy Thermo a je založena na bázi klasického plně porézního křemene (obrázek 19 – vpravo). Její odolnost je také menší a rozpětí pH, při kterém lze použít taktéž.



Obrázek 19.: Vnitřní uspořádání C18 chromatografických kolon vlevo Gemini a vpravo Synchronis.⁸²

Kolona Kinetex™ 1,7 μm , C18, 100Å, 150x2,1 mm patří technologicky k chromatografickým kolonám, které mají „core-shell particles“ – částice s pevným jádrem pod 2 μm . Ty umožňují větší permeabilitu a dosahují stejné efektivity dělení jako klasické kolony s plně porézními částicemi, a to v kratším čase⁸¹.



Obrázek 20.: Srovnání kolon s klasickým uspořádáním a s částicemi s pevným jádrem.⁸²

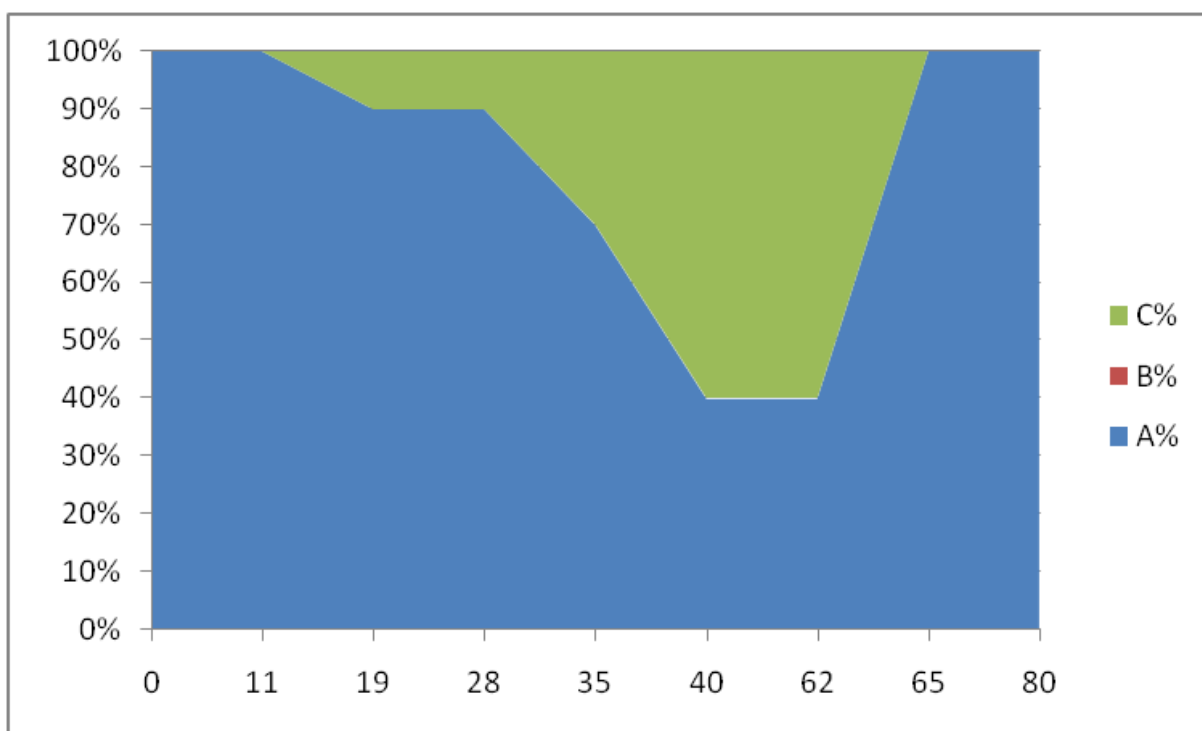
6.1 Podmínky Chromatografie

Využívali jsme gradientovou chromatografii, která se skládá ze tří mobilních fází:

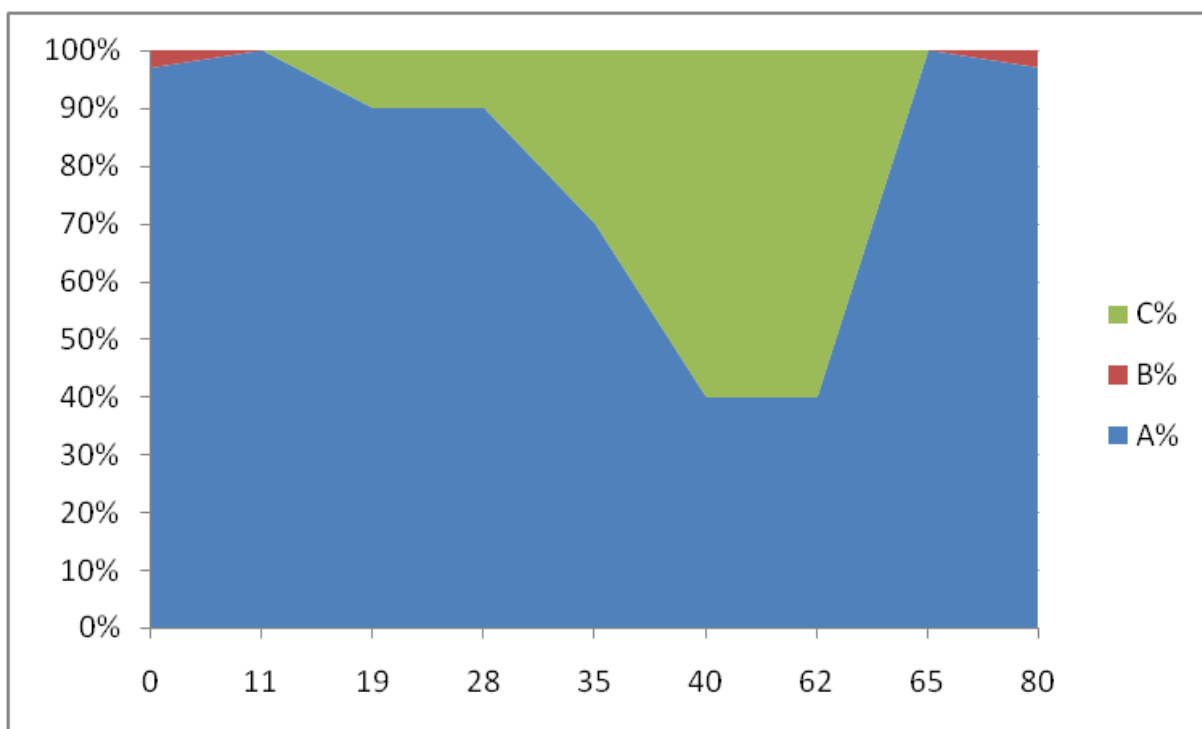
- A: 5mM AcONH₃+ NH₄ (5 ml do 500 ml MeOH)
- B: H₂O
- C: MeOH:Isopropanol 20:80

Do systému byla vmíchávána voda a to v pěti variantách 0, 3, 8, 13 a 20 % přičemž gradienty jsou zachyceny na obrázcích 21 až 25.

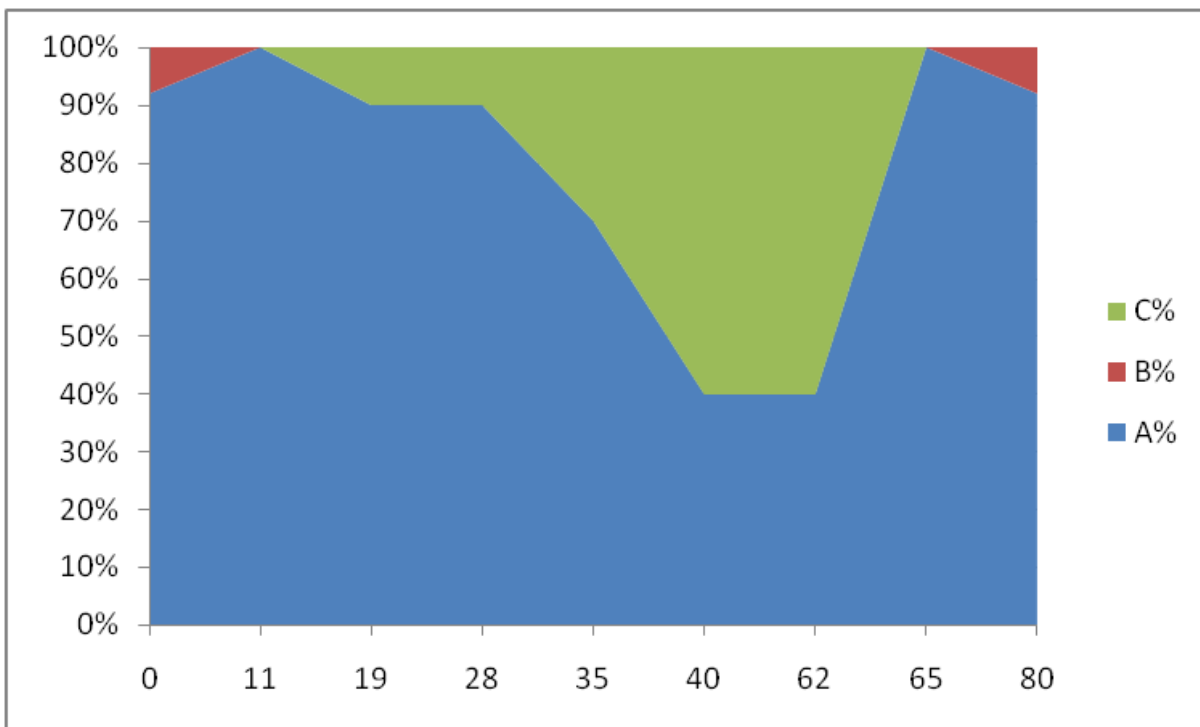
U všech zmíněných variant byl průtok mobilní fáze 200 μ l za minutu.



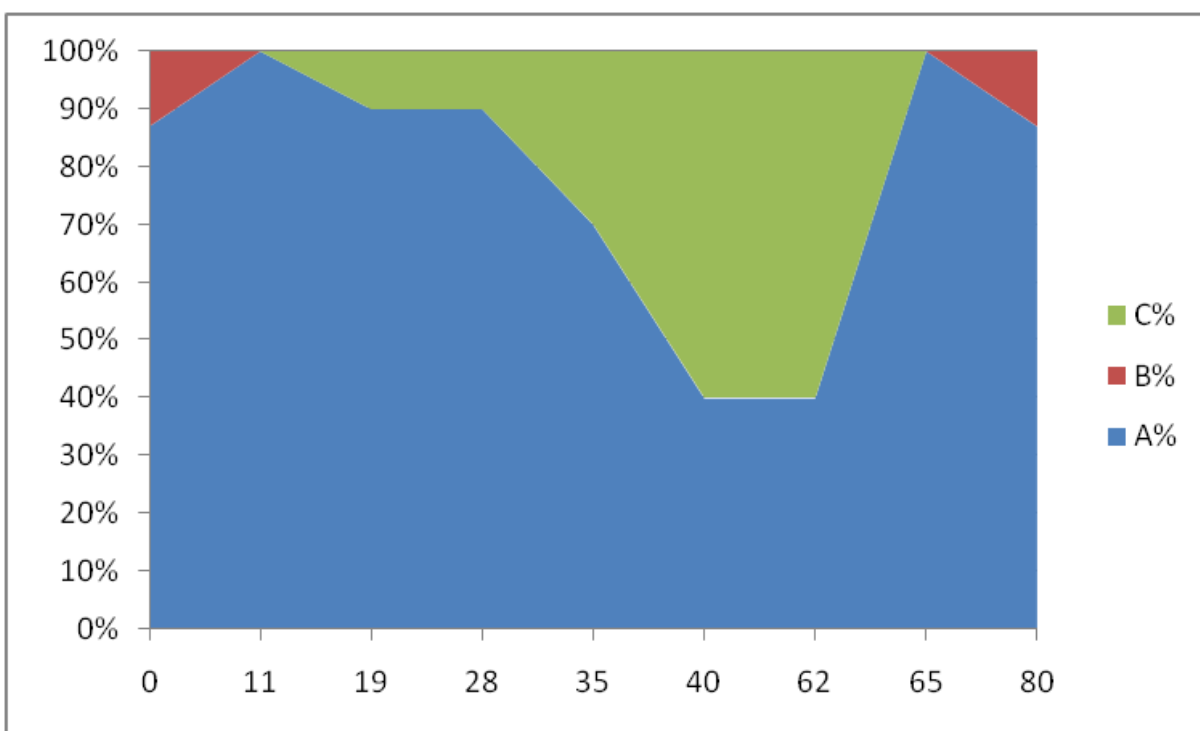
Obrázek 21.: Grafické vyjádření míchání mobilních fází v chromatografickém gradientu pro Variantu 1



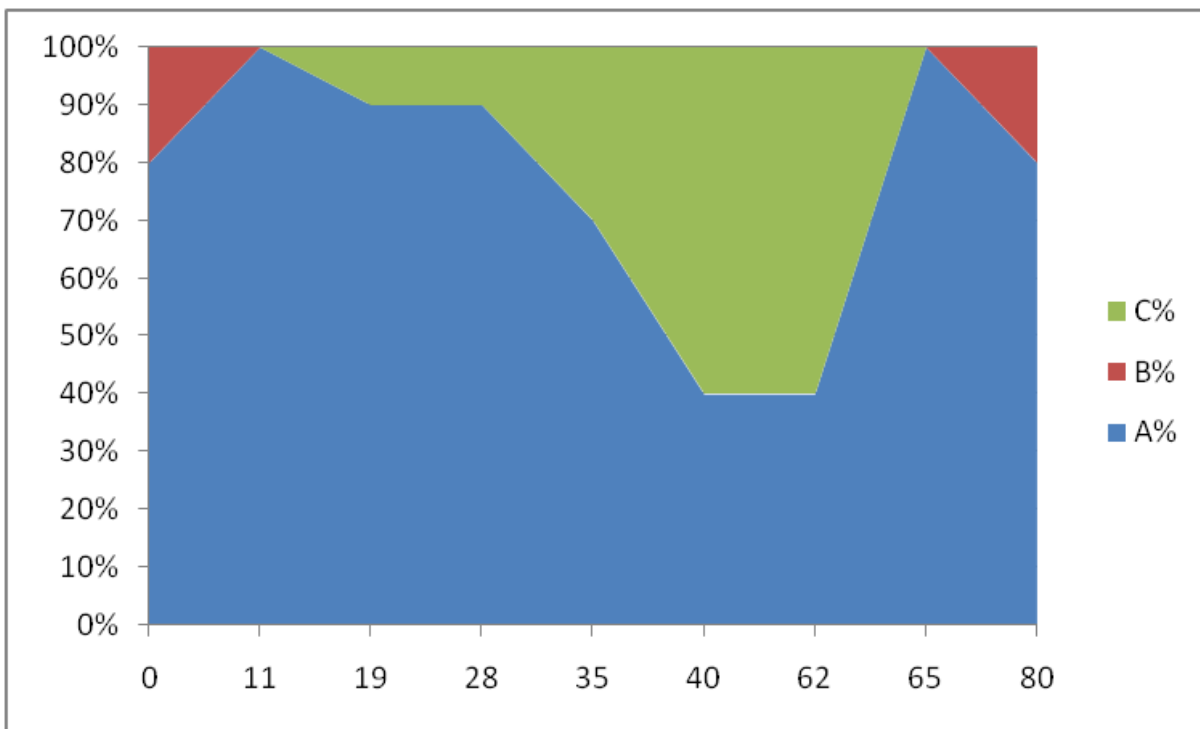
Obrázek 22.: Grafické vyjádření míchání mobilních fází v chromatografickém gradientu pro Variantu 2



Obrázek 23.: Grafické vyjádření míchání mobilních fází v chromatografickém gradientu pro Variantu 3



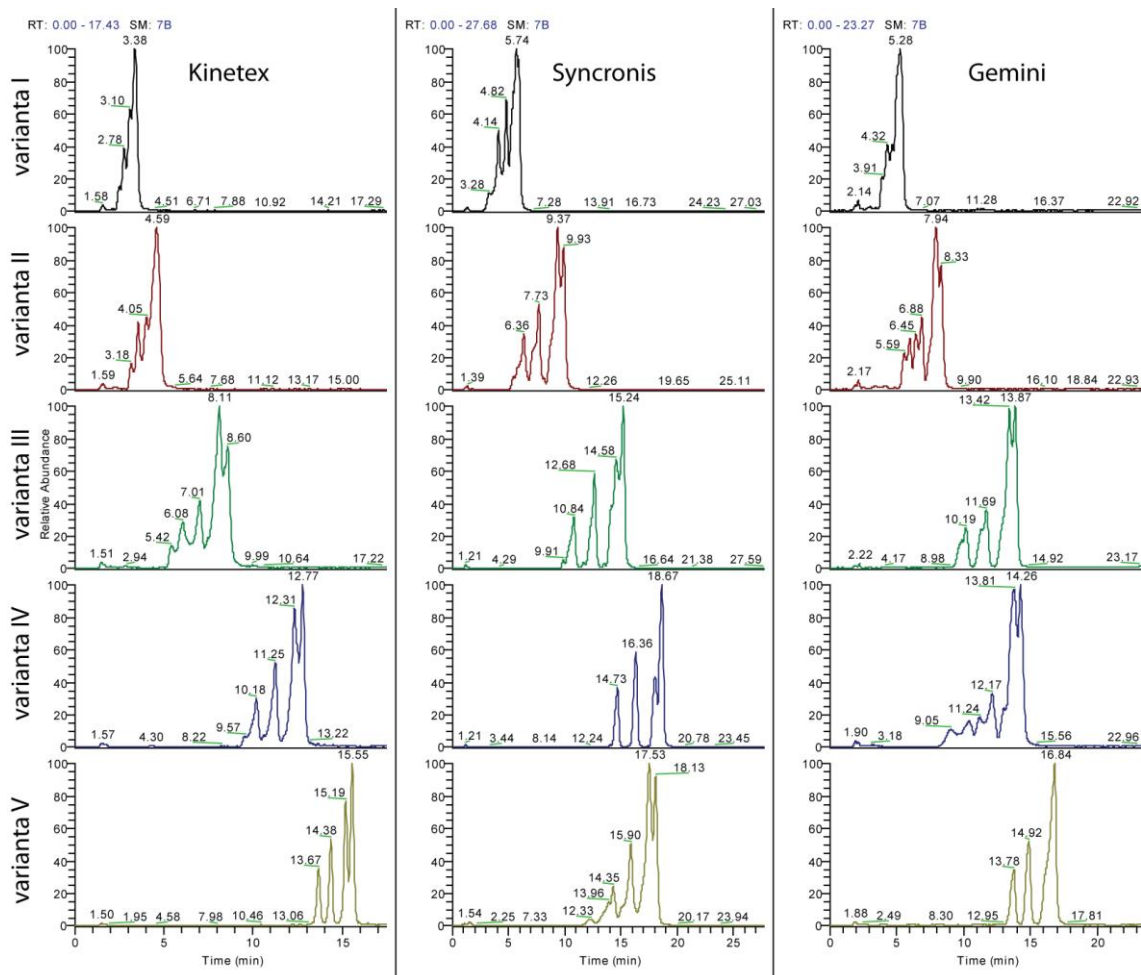
Obrázek 24.: Grafické vyjádření míchání mobilních fází v chromatografickém gradientu pro Variantu 4



Obrázek 25.: Grafické vyjádření míchání mobilních fází v chromatografickém gradientu pro Variantu 5

6.2 Vliv vody a typu kolony na separaci různých tříd lipidů

6.2.1 Phosphatidylethanolaminy

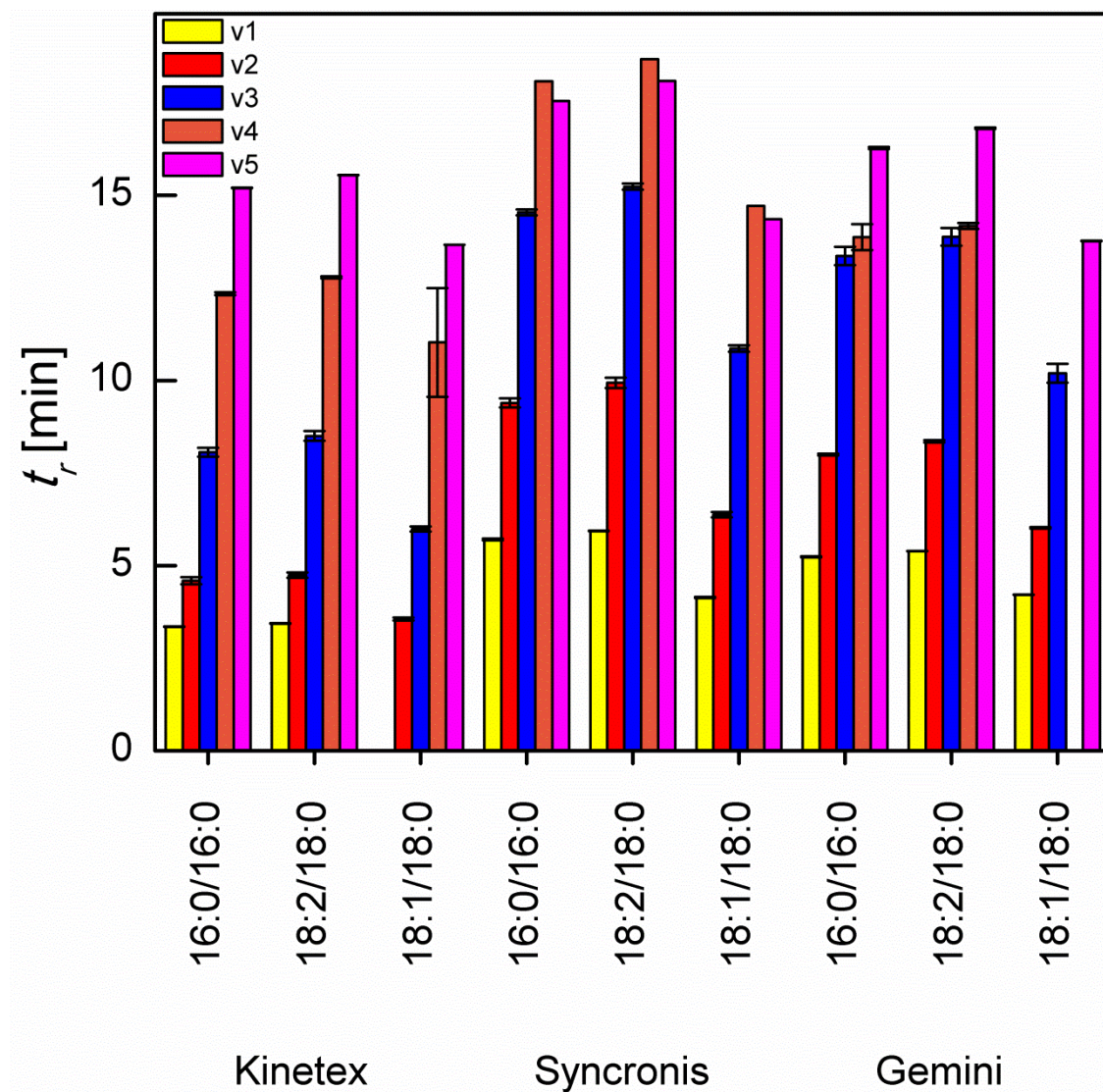


Obrázek 26.: Base pík záznam čtyř PE a srovnání chromatografií tří kolon a pěti variant vmíchávání vody do mobilní fáze.

Na obrázku 26 jsou chromatogramy v režimu base pík PE 18:2/18:2, PE 16:0/18:2, PE 16:0/16:0 a PE 18:1/16:0. Látky jsou uvedeny podle jejich eluce. Ukazuje se, že vmíchání vody do mobilních fází má u různých kolon různý vliv, ale principiálně výrazně zlepšuje separaci jednotlivých PE. Nejlepšího tvaru píku bylo dosaženo separací variantou 5 (20% vody) na koloně Kinetex, kdy se dá hovořit o kompletní separaci všech sledovaných PE. Pro kolonu Synchronis byla z hlediska tvaru píků nejvhodnější varianta 4 (13% vody). Kolona Gemini nejlépe separuje PE variantou 3 (8% vody), nicméně varianta 5 (20% vody) poskytuje nejpohlednější píky.

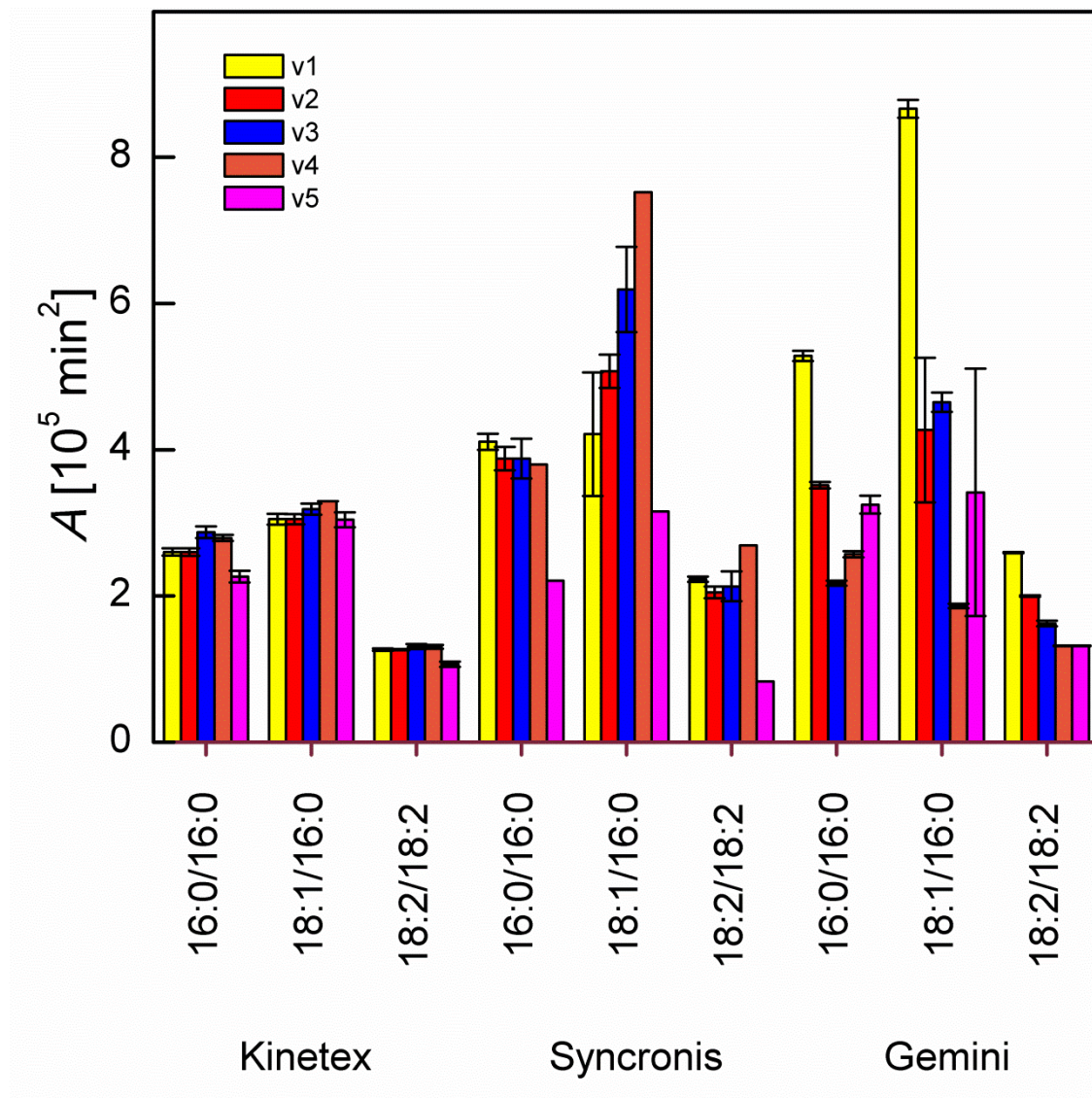
Pro lepší přehlednost byly pro další srovnání vybrány jenom 3 molekuly PE, a to s nasycenými kyselinami PE 16:0/16:0, s jednou nasycenou a jednou nenasycenou

mastnou kyselinou PE 18:1/16:0 a se dvěma nasycenými mastnými kyselinami PE 18:2/18:2.



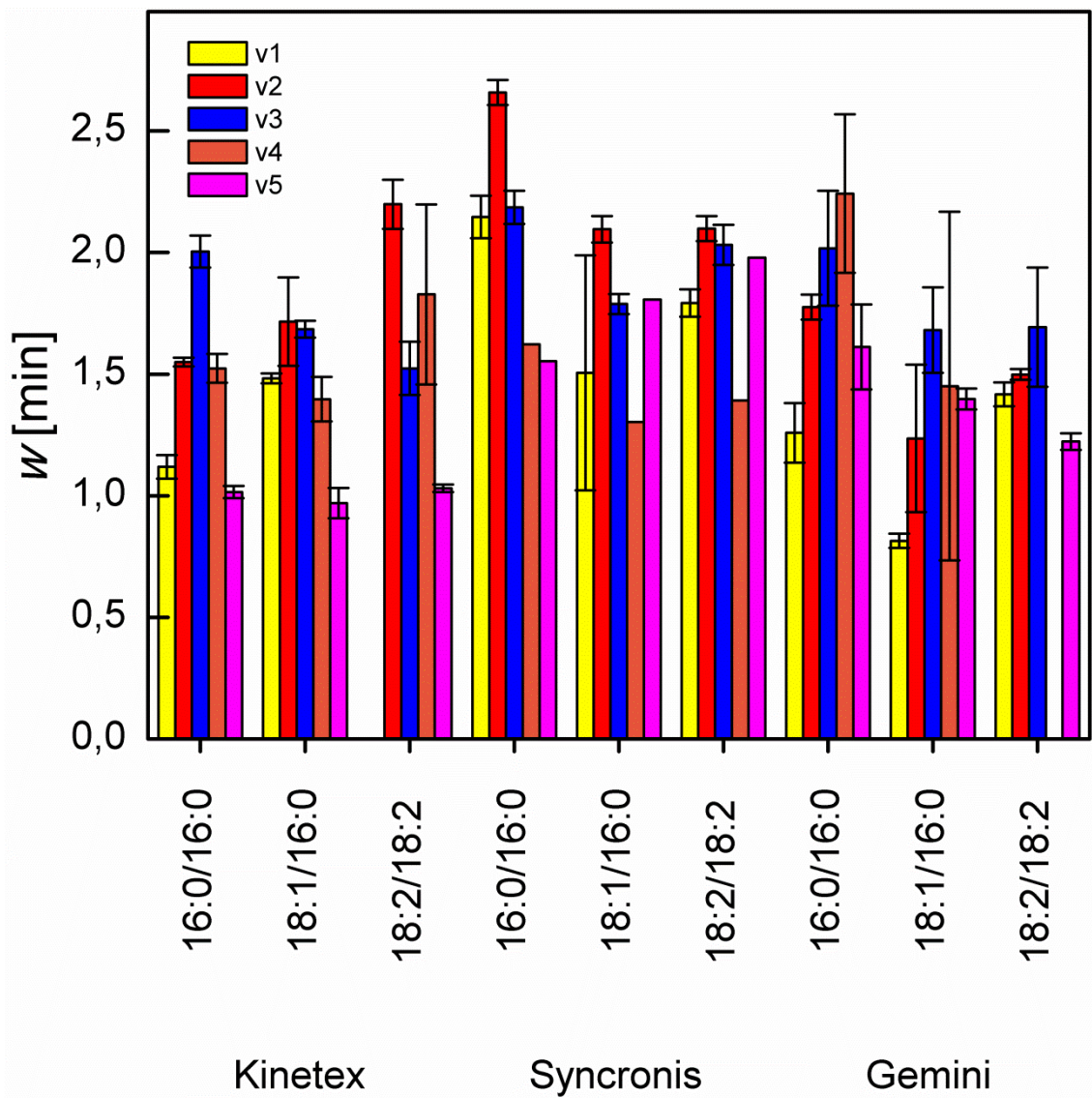
Obrázek 27.: Vývoj retenčního času PE u jednotlivých kolon při zavádění vody do mobilní fáze.

Zavedení vody do systému mobilních fází zvýšilo retenční čas všech sledovaných analytů. Čím více vody, tím větší retence. Výjimkou je poslední varianta u kolony Synchronis.



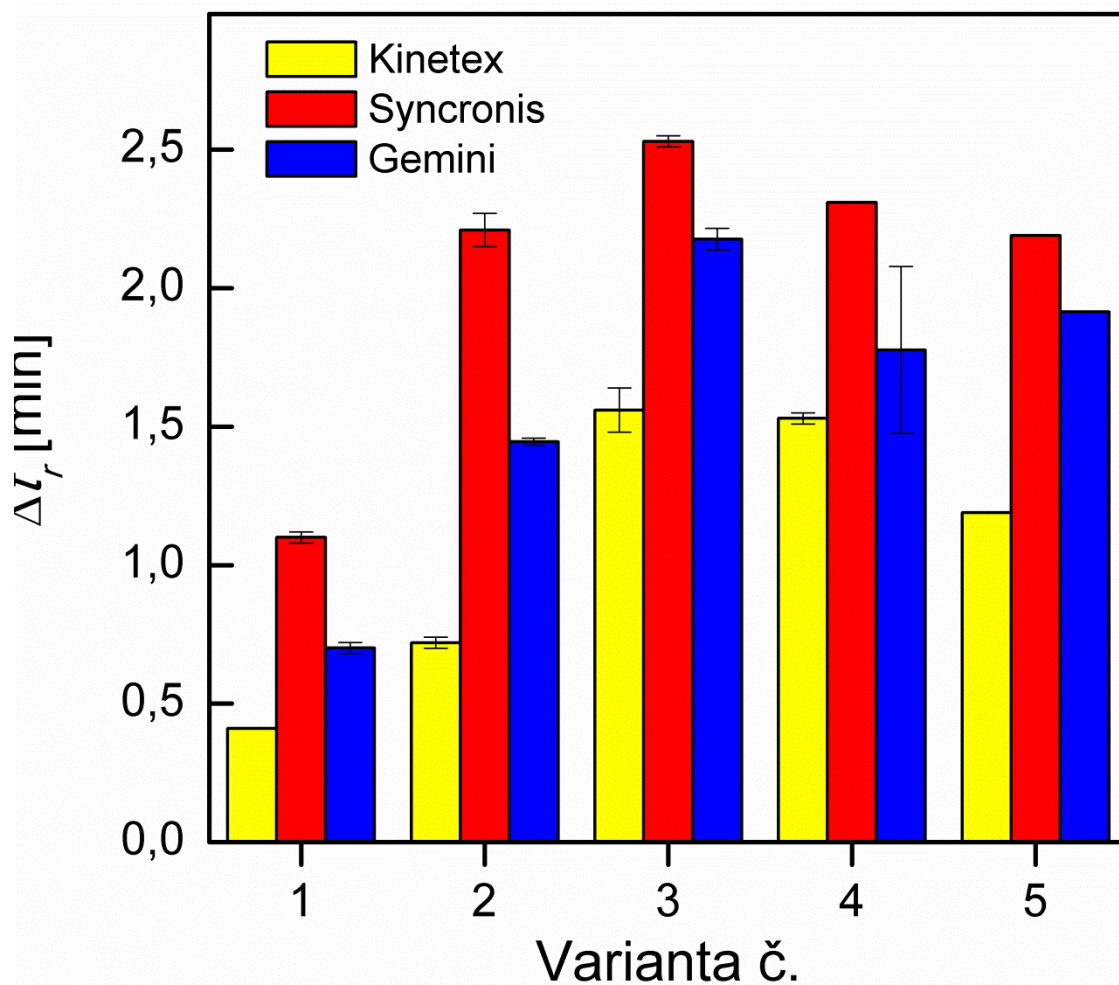
Obrázek 28.: Odezva jednotlivých PE ve formě integrovaných ploch píků.

U jednotlivých kolon i variant byla sledována také opakovatelnost odezvy jednotlivých druhů PE. Odezva jednotlivých analytů byla deklarována integrovanou plochou píku v modulu Quanbrowser programu Xcalibur (Thermo). Je naprosto patrné, že největší opakovatelnosti s nejmenší odchylkou a nejmenším vlivem složení mobilní fáze bylo dosaženo u kolony Kinetex. Pro kolonu Gemini je z hlediska opakovatelnosti odezvy nejvhodnější varianta 3.



Obrázek 29.: Šířku píků jednotlivých PE.

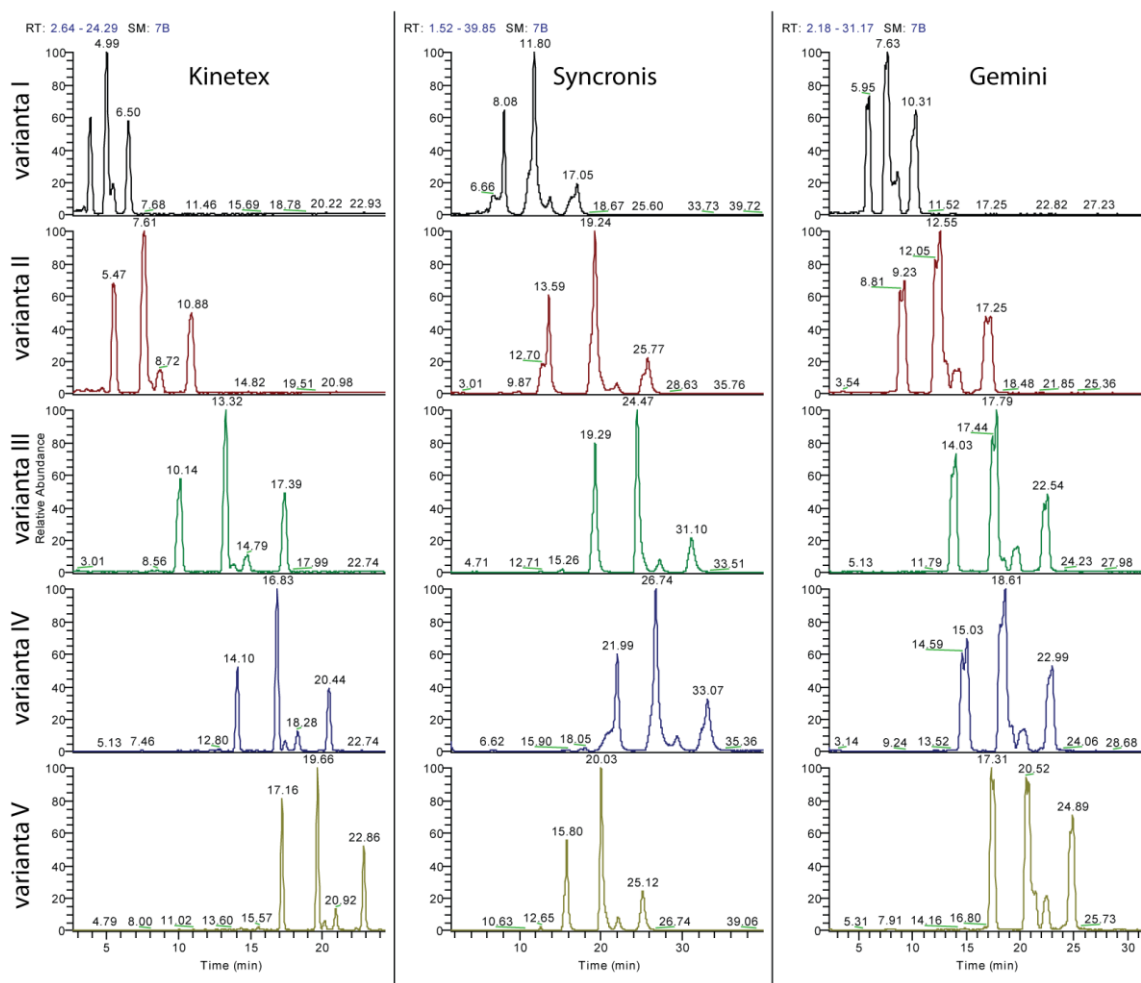
Jedním z hledisek, podle kterého se posuzuje úspěšnost chromatografie, je šířka píku. Nejužších píků dosahuje kolona Kinetex ve variantě 5, rovněž opakovatelnost je velmi dobrá. Vliv vody na šířku píku je jiný u všech tří kolon a takřka nevykazuje žádnou pravidelnost.



Obrázek 30.: Časová vzdálenost mezi píky Δt_r PE 16:0/18:2 - PE 16:0/18:1 u jednotlivých variant a tří chromatografických kolon.

Další vlastností, jež charakterizuje kvalitu separace, je vzdálenost jednotlivých dvou píků od sebe. Zde byly dosaženy nejlepší výsledky na koleně Synchronis. Dále následuje kolona Gemini. Přestože na koloně Kinetex bylo dosaženo nižšího rozdílu v jednotlivých pících, proběhla celá separace dříve než u dalších dvou kolon. Zavedení vody do systému nejdříve vzdálenost píků zvyšuje. Maxima je dosaženo u varianty 3, dále již nedochází ke zvyšování vzdálenosti píků.

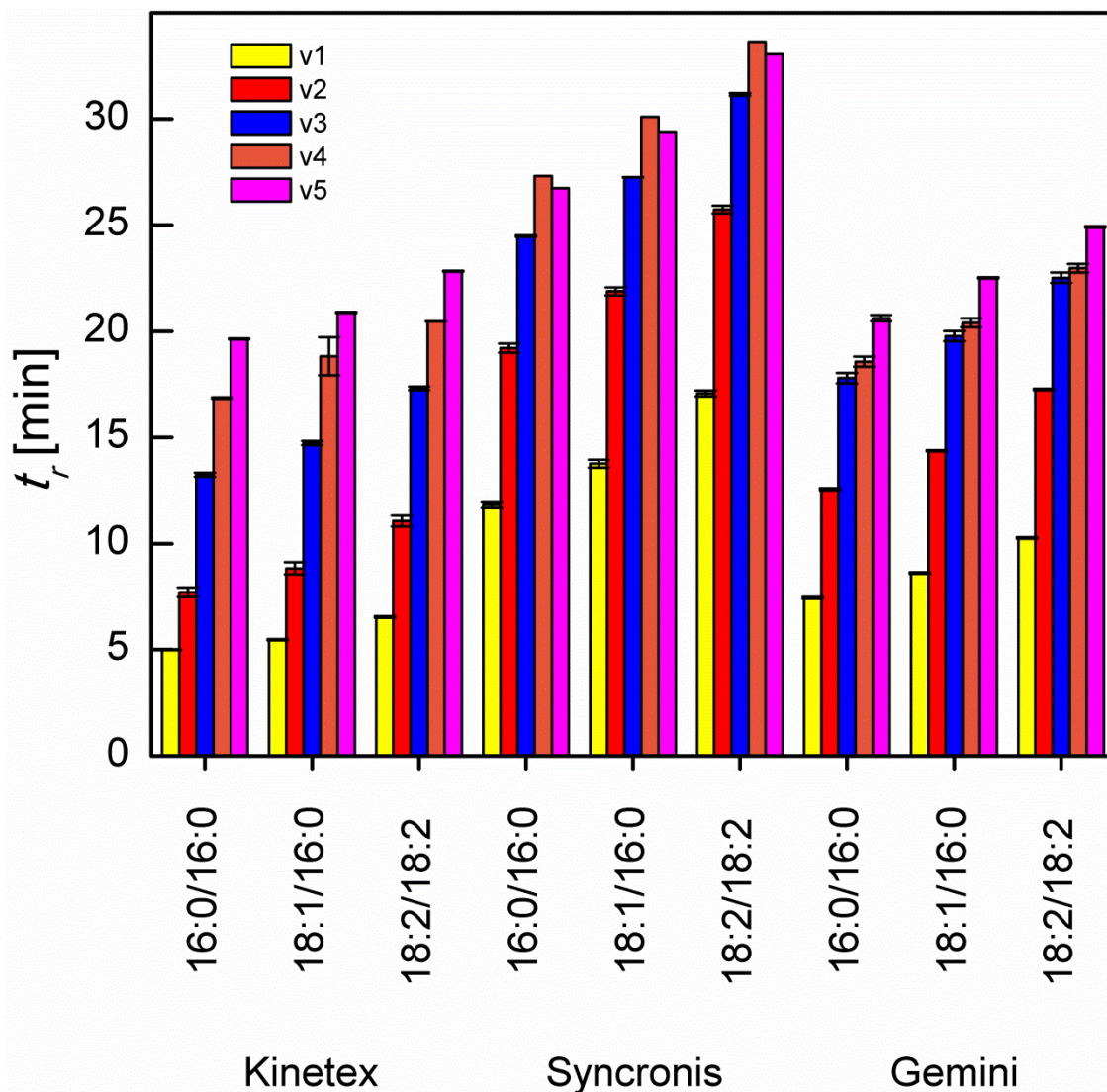
6.2.2 Phosphatidylcholiný



Obrázek 31.: Srovnání chromatografií tří kolon a pěti variant vmíchávání vody do mobilní fáze v režimu base pik pro čtyři různé PC

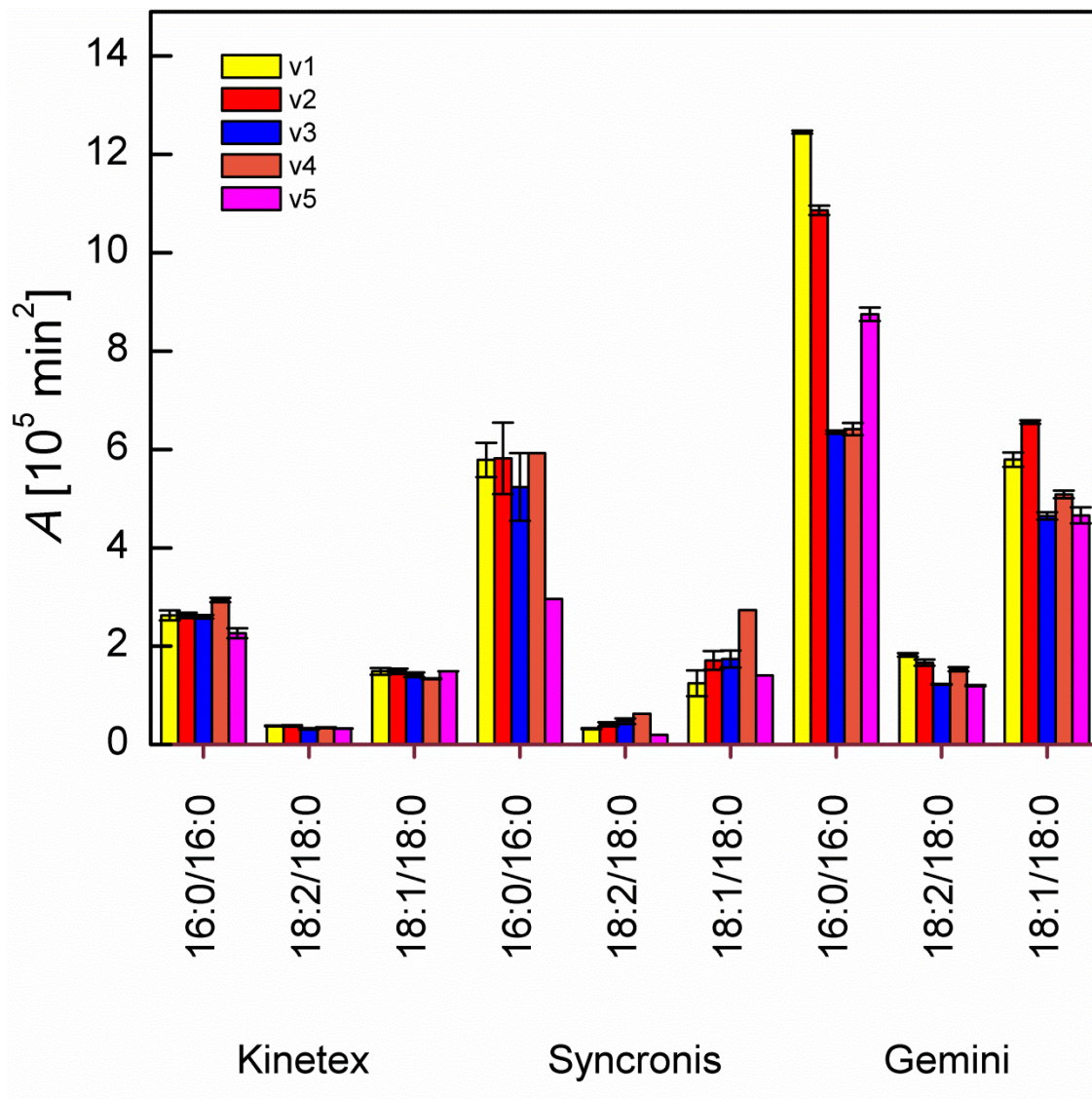
Na obrázku 31 jsou chromatogramy v režimu base pik (neintenzivnější pik ve spektru, je užíván jako základ, proti němuž jsou všechny intenzity ostatních analytů normalizovány) analytů: PC 18:2/18:2, PC 16:0/16:0, PC 18:2/18:0 a PC 18:1/18:0. Látky jsou uvedeny podle jejich eluce. Opět nejpohlednější píky lze sledovat u kolony Kinetex, kde je kompletní separace pozorována již u druhé varianty, nicméně 4 a 5 má nejhezčí píky. U kolony Synchronis lze za dosažení kompletní separace považovat již variantu 2, přičemž nejlepší tvar píků je u varianty 3 a 5. Kolona Gemini dosáhla separace píků, ale jejich tvar není vůbec hezký, všechny standardy tvoří na vrcholu dva drobné píky, ačkoliv se jedná jen o jeden analyt.

Pro lepší přehlednost byly pro další srovnání vybrány jenom 3 molekuly PC, a to s nasycenými kyselinami PC 16:0/16:0, s jednou dvojnou vazbou PC 18:1/18:0 a se dvěma dvojnými vazbami PC 18:2/18:0.



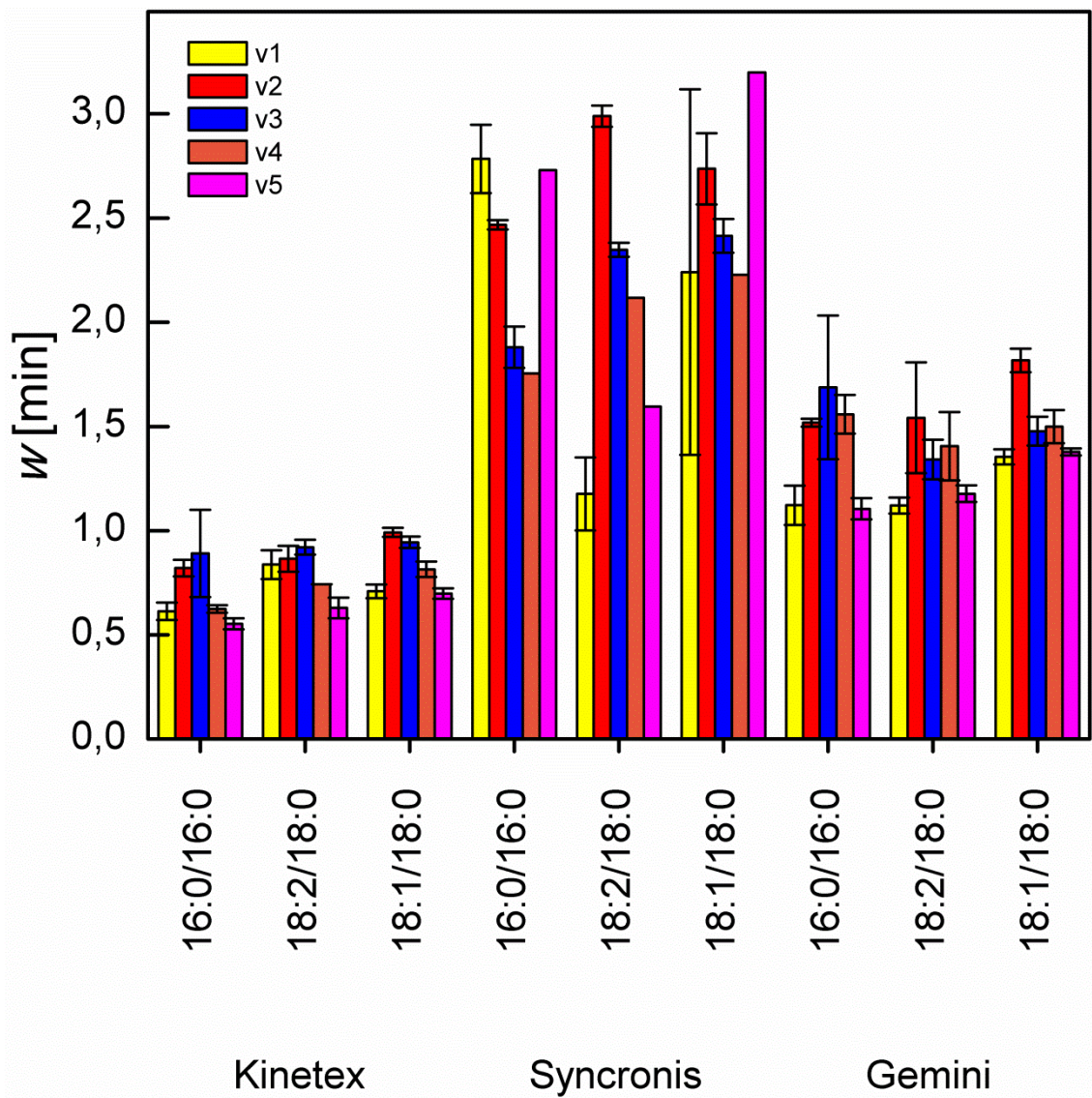
Obrázek 32.: Vývoj retenčního času u jednotlivých kolon při zavádění vody do mobilní fáze.

Na vývoji retenčního času u všech kolon je patrná pozitivní korelace mezi množstvím vody a hodnotou retenčního času. Výjimku stejně jako u PE, lze vidět u varianty 5 kolony Synchronis. Nejnižší retenci vykazuje kolona Kinetex následovaná kolonou Gemini.



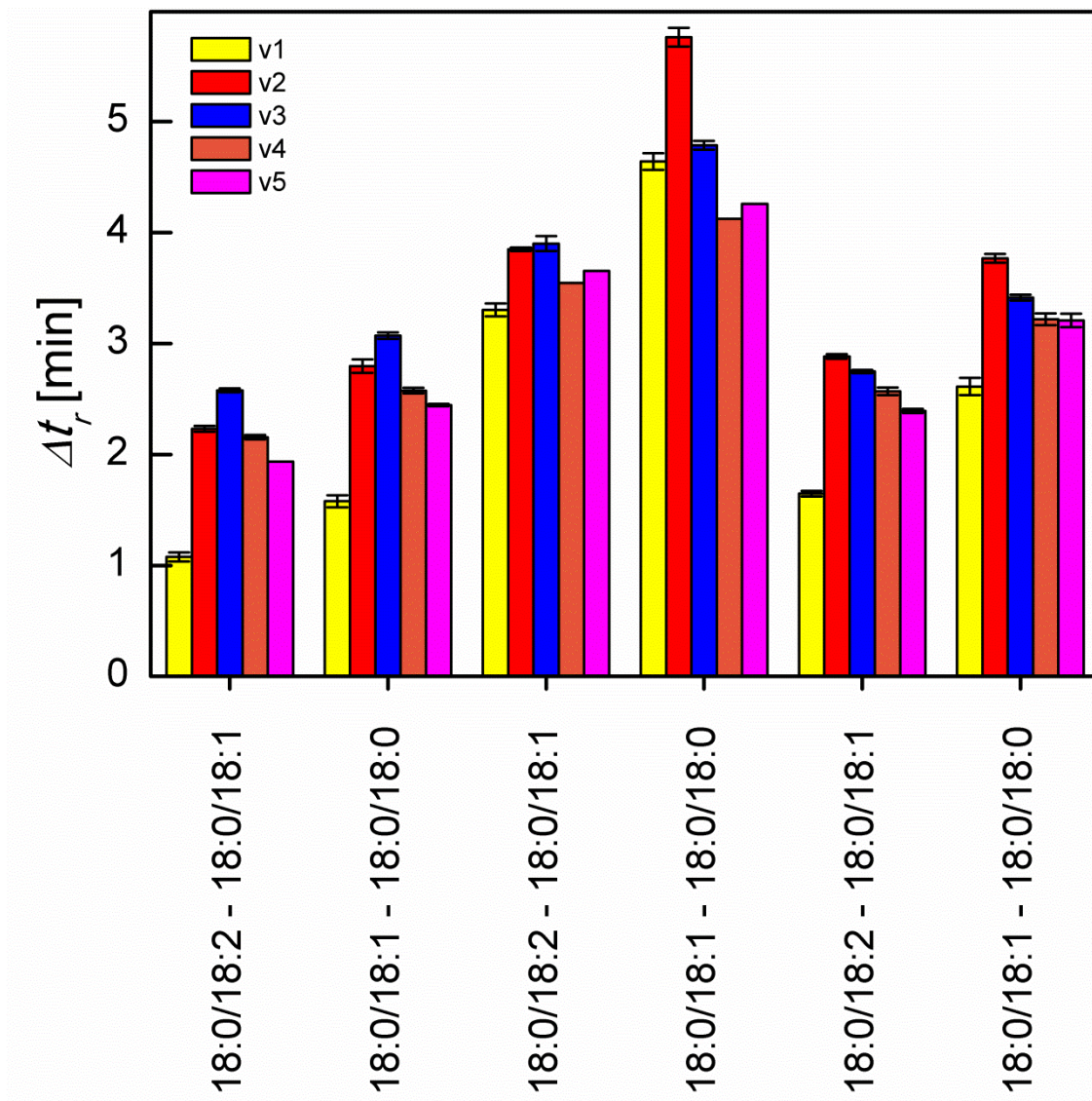
Obrázek 33.: Odezva jednotlivých PC ve formě integrovaných ploch píků.

Odezva jednotlivých systémů prozrazuje, že nejvíce ovlivněnou kolonou přimícháváním vody do mobilní fáze je kolona Gemini. Nejstabilnější je opět kolona Kinetex, která však vykazuje výrazně menší odezvu než zbývající dvě kolony.



Obrázek 34.: Šířka píků jednotlivých PC.

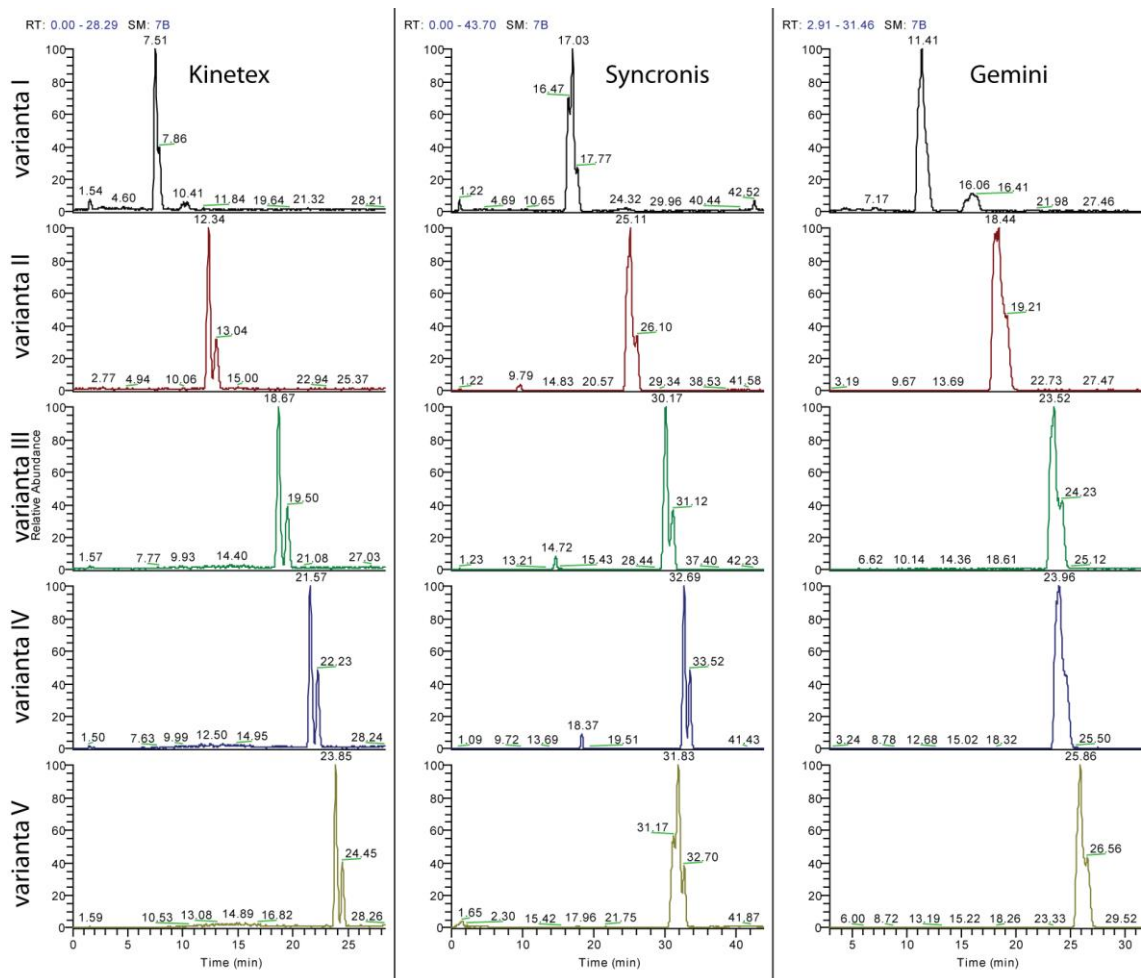
Nejužších píků bylo dosaženo na koloně Kinetex, naopak nejširší píky má kolona Synchronis. Vliv vody na šířku píků je nejmenší u kolony Kinetex.



Obrázek 35.: Časová vzdálenost mezi píky ΔPC 18:0/18:2 - PC 18:0/18:1 a ΔPC 18:0/18:1 - PC 18:0/18:0 u jednotlivých variant a tří chromatografických kolon.

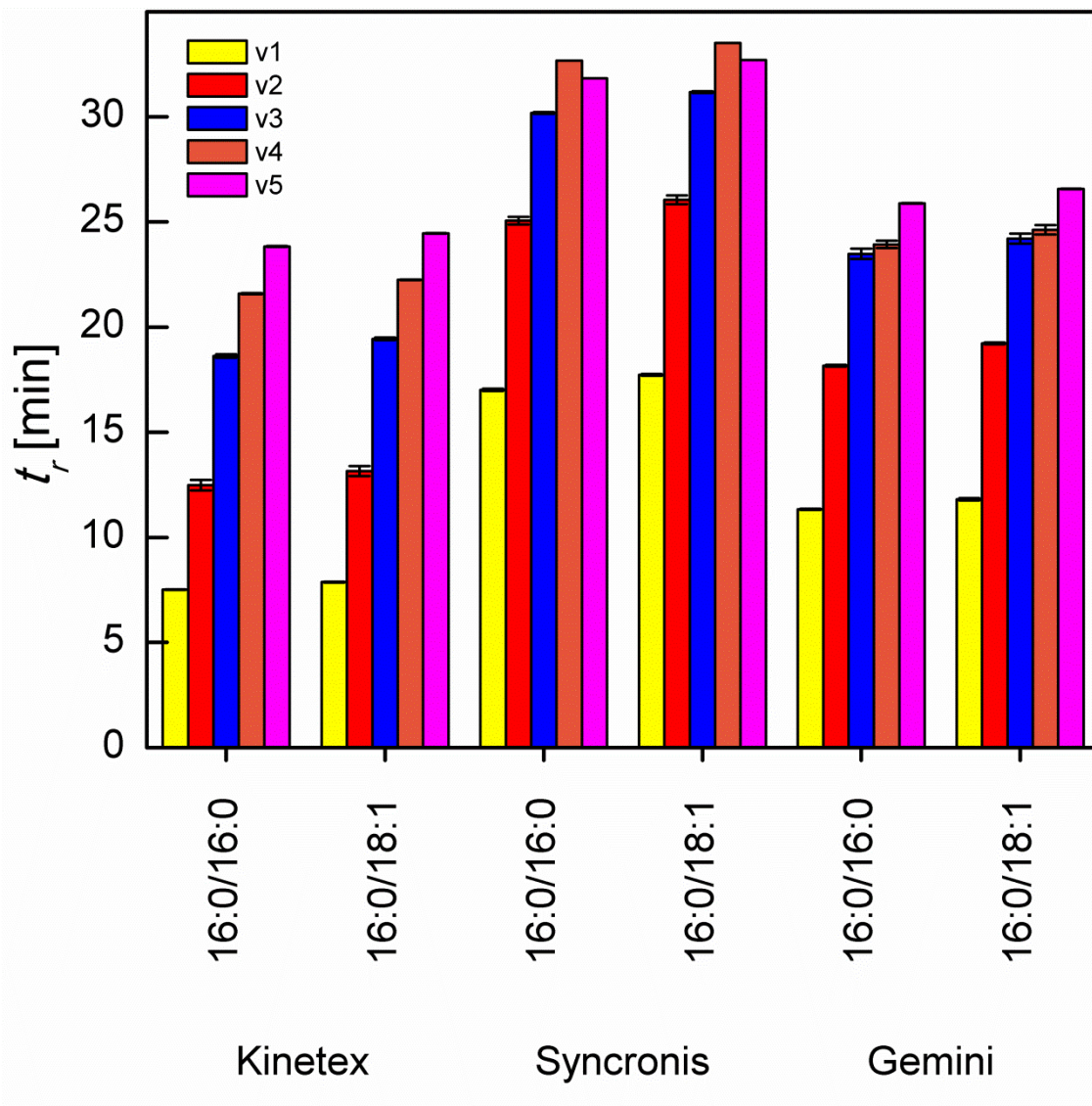
Na obrázku 35 je patrné, že vzdálenost píků molekul PC s jednou a dvěma dvojnými vazbami je menší než vzdálenost píků molekuly PC s jednou dvojnou vazbou a s molekulou nenasycenou. Vmíchání vody do systému způsobí rozšíření mezery mezi jednotlivými píky a opět je dosaženo maxima v variantě 3 nebo 2. V dalších variantách dochází ke stagnaci.

6.2.3 Diacylglyceroly



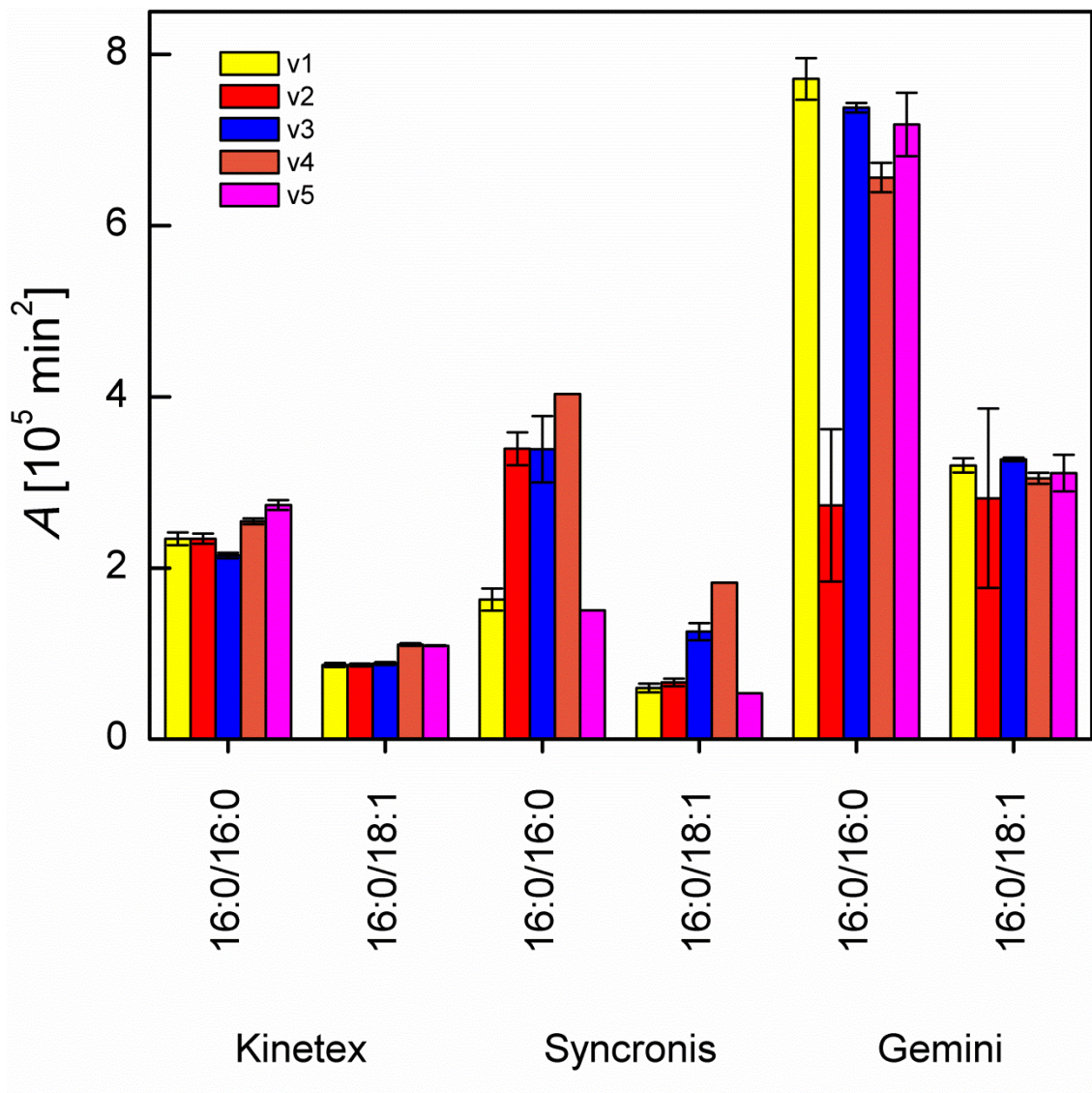
Obrázek 36.: Base pík záznam dvou DG a srovnání chromatografií tří kolon a pěti variant vmíchávání vody do mobilní fáze.

Na obrázku 36 jsou chromatogramy v režimu base pík DG 16:0/16:0 a DG 16:0/18:1. Látky jsou uvedeny podle jejich eluce. Je zřejmé, že na koloně Gemini nedošlo k jejich rozdělení. Stejněho výsledku dosahujeme u zbylých dvou kolon u první varianty. U variant 2-5 byly analyty rozděleny kolonou Kinetex. U kolony Synchronis došlo k optimálnímu rozdělení analytů i tvaru píků ve variantě 4. Nejhezčí píky můžeme opět pozorovat u kolony Kinetex.



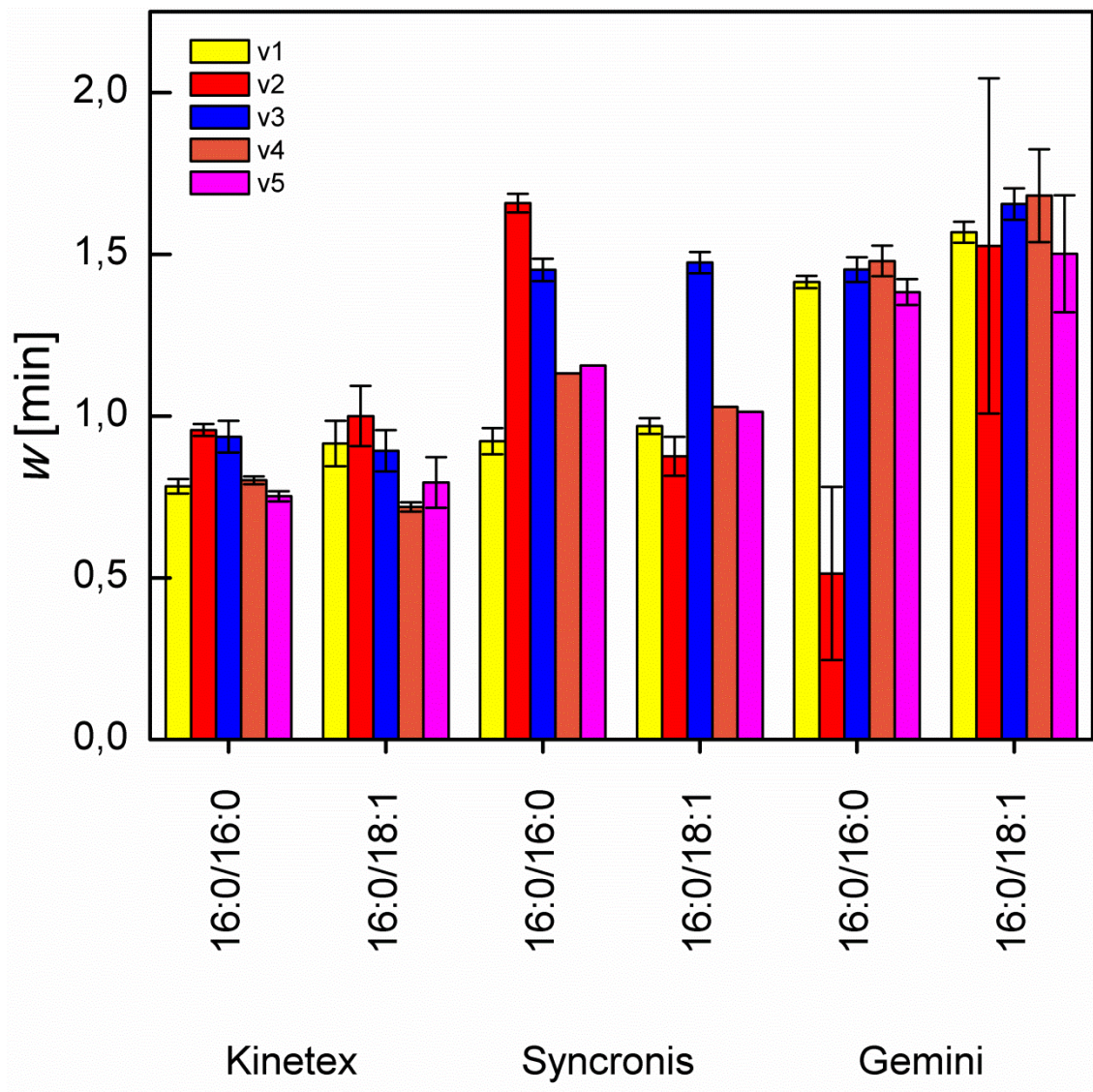
Obrázek 37.: Vývoj retenčního času DG u jednotlivých kolon při zavádění vody do mobilní fáze.

Na obrázku 37 lze pozorovat stejný fenomén jako u PE a PC, nicméně varianta 4 a 5 u kolon Synchronis i Gemini neměla tak výrazný vliv na zvýšení retenčního času. Nejdelší doba eluce je u kolony Synchronis, nejkratší pak u Kinetex.



Obrázek 38.: Odezva jednotlivých DG ve formě integrovaných ploch píků.

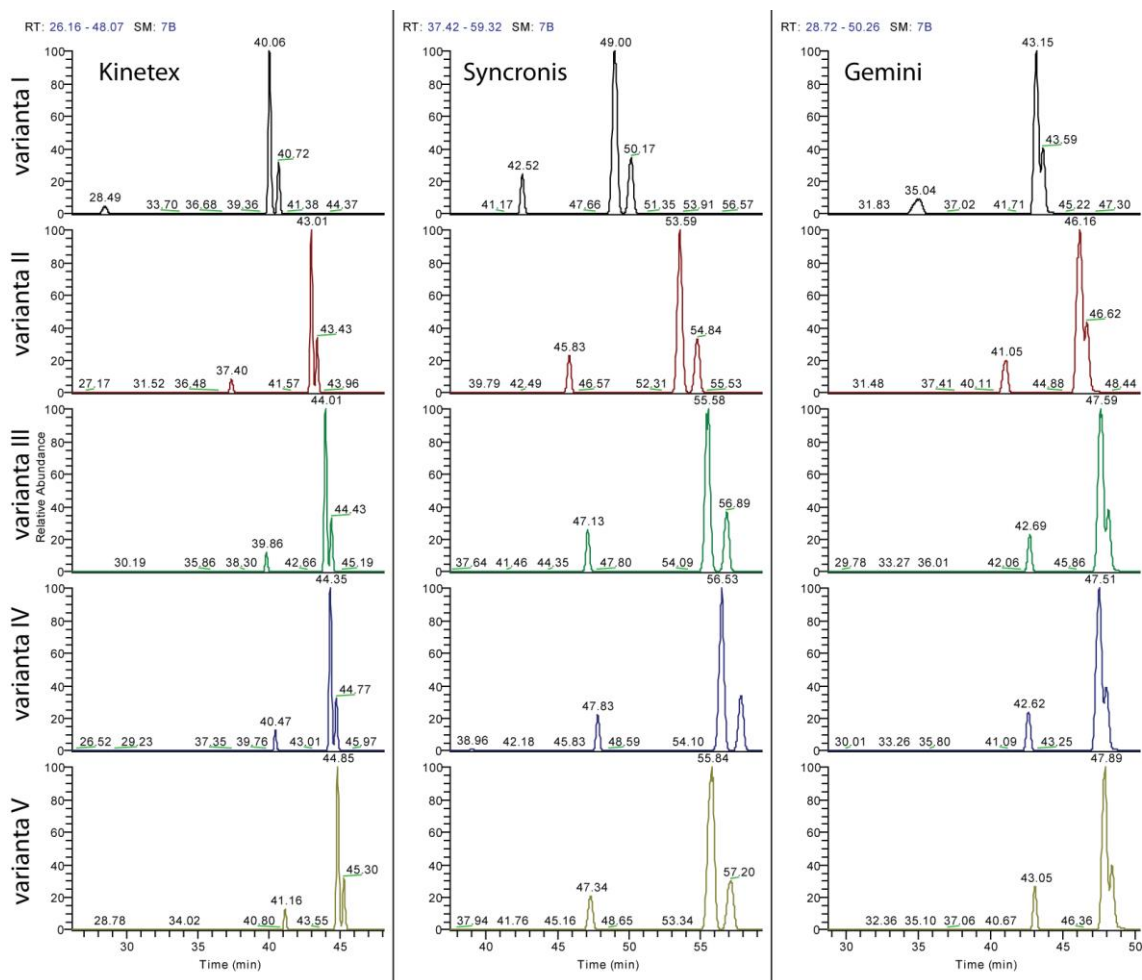
Kolona Kinetex dosáhla opět nejlepší opakovatelnosti, nicméně odezva je opět nejnižší a také vliv vody na stabilitu odezvy je minimální. Nejlepší odezvy bylo dosaženo na koloně Gemini, a to především u variant 1, 3, 4 a 5.



Obrázek 39.: Šírka píků jednotlivých DG.

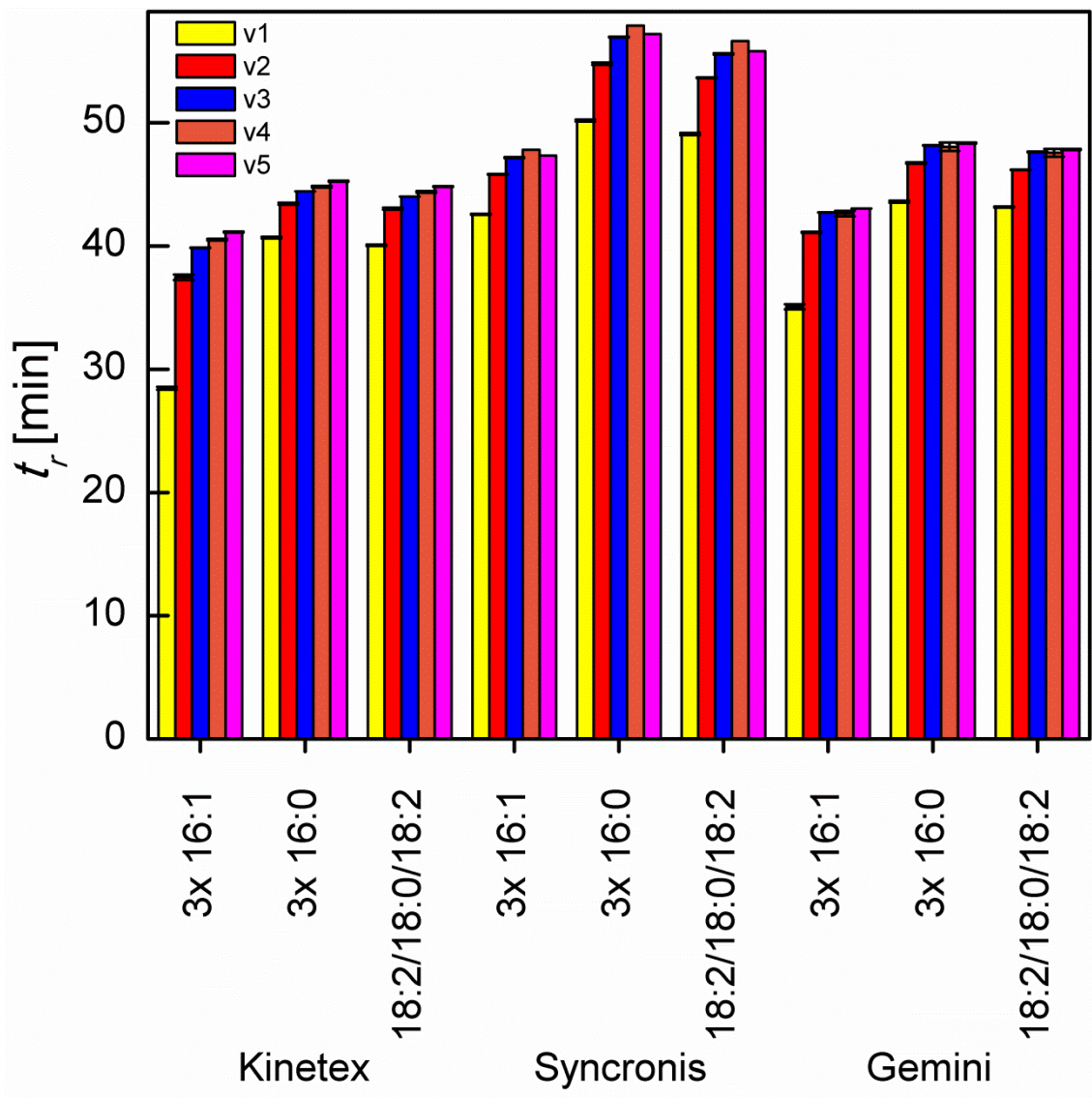
Kolona Gemini vykazuje vznik nejširších píků. Naopak nejužší píky byly dosaženy na koloně Kinetex.

6.2.4 Triacylglyceroly



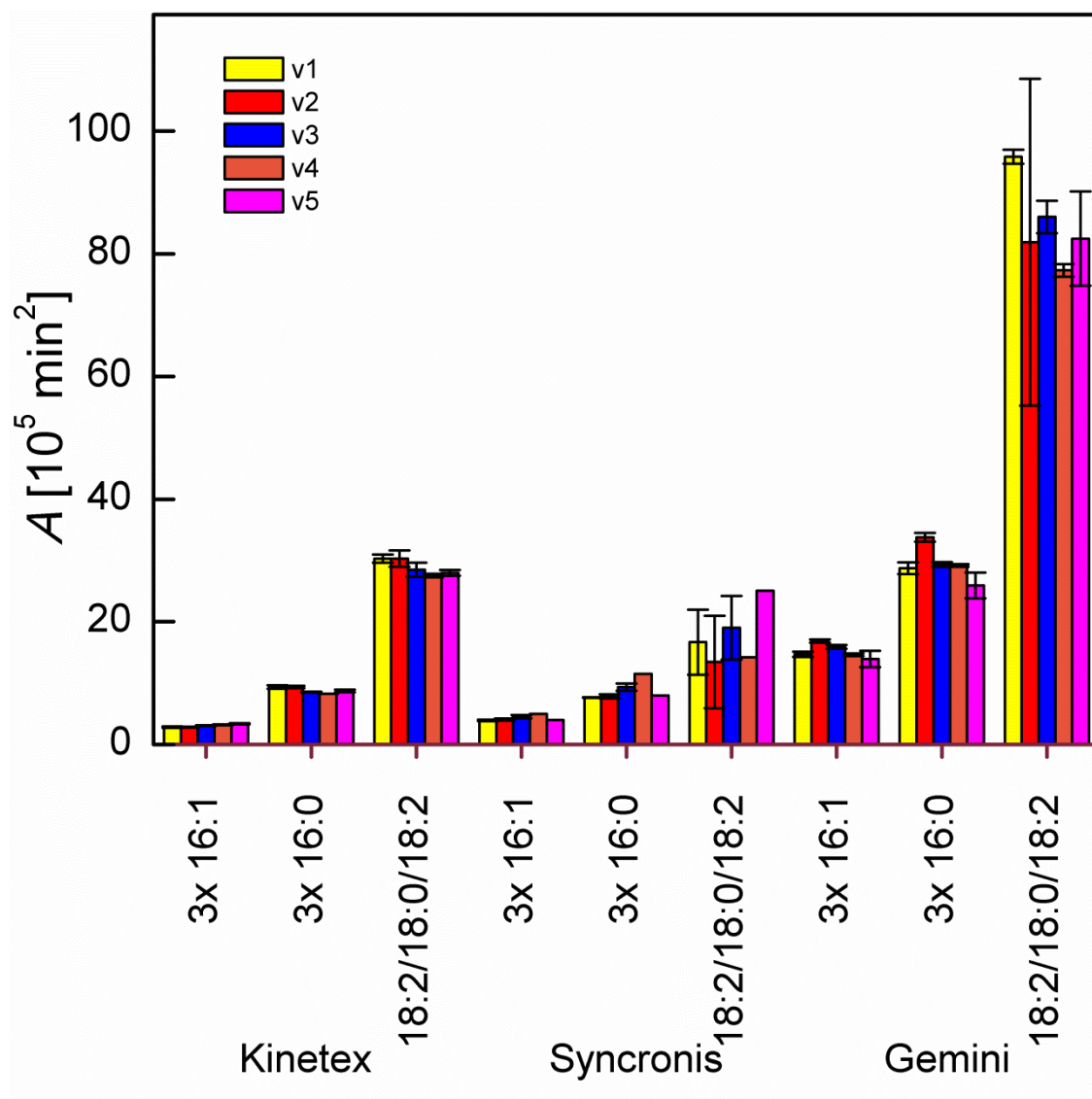
Obrázek 40.: Base pik záznam tří TG a srovnání chromatografií tří kolon a pěti variant vmíchávání vody do mobilní fáze.

Na obrázku 40 jsou chromatogramy v režimu base pik analytů TG 3x16:1, TG 18:2/18:0/18:2 a TG 3x16:0. Látky jsou uvedeny podle jejich eluce. Částečnou separaci TG 18:2/18:0/18:2 a TG 3x16:0 lze pozorovat u kolony Gemini, kdežto u kolon Kinetex a Synchronis byla separace kompletní. Tvar píků je u všech kolon solidní a evidentně na něj zvýšení množství vody v mobilní fázi nemá vliv.



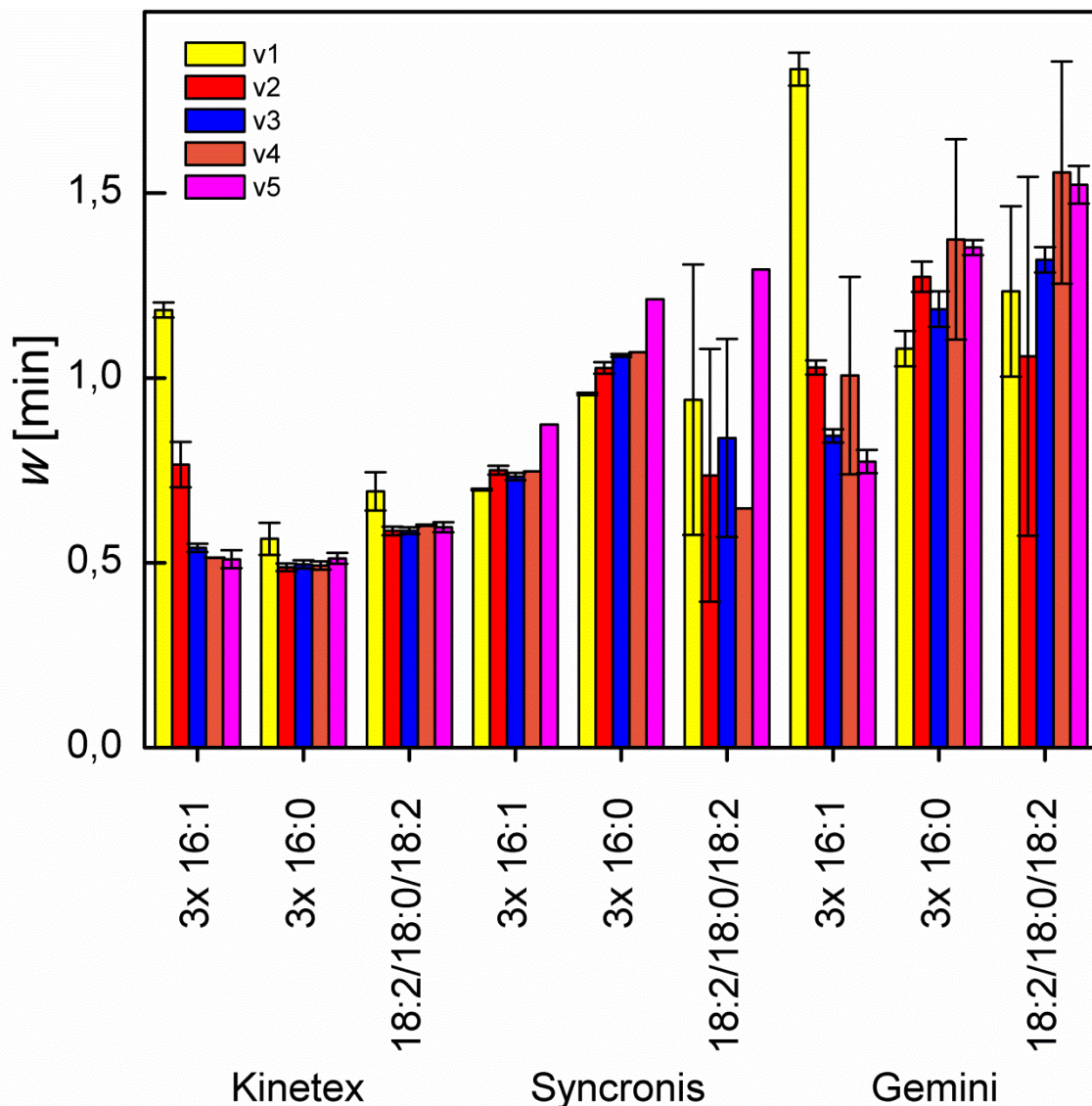
Obrázek 41.: Vývoj retenčního času TG u jednotlivých kolon při zavádění vody do mobilní fáze.

Vliv vmíchávání vody do mobilní fáze má na retenci TG podobný vliv, jako lze pozorovat u DG. Díky vysoké retenci se zdají být rozdíly méně patrné.



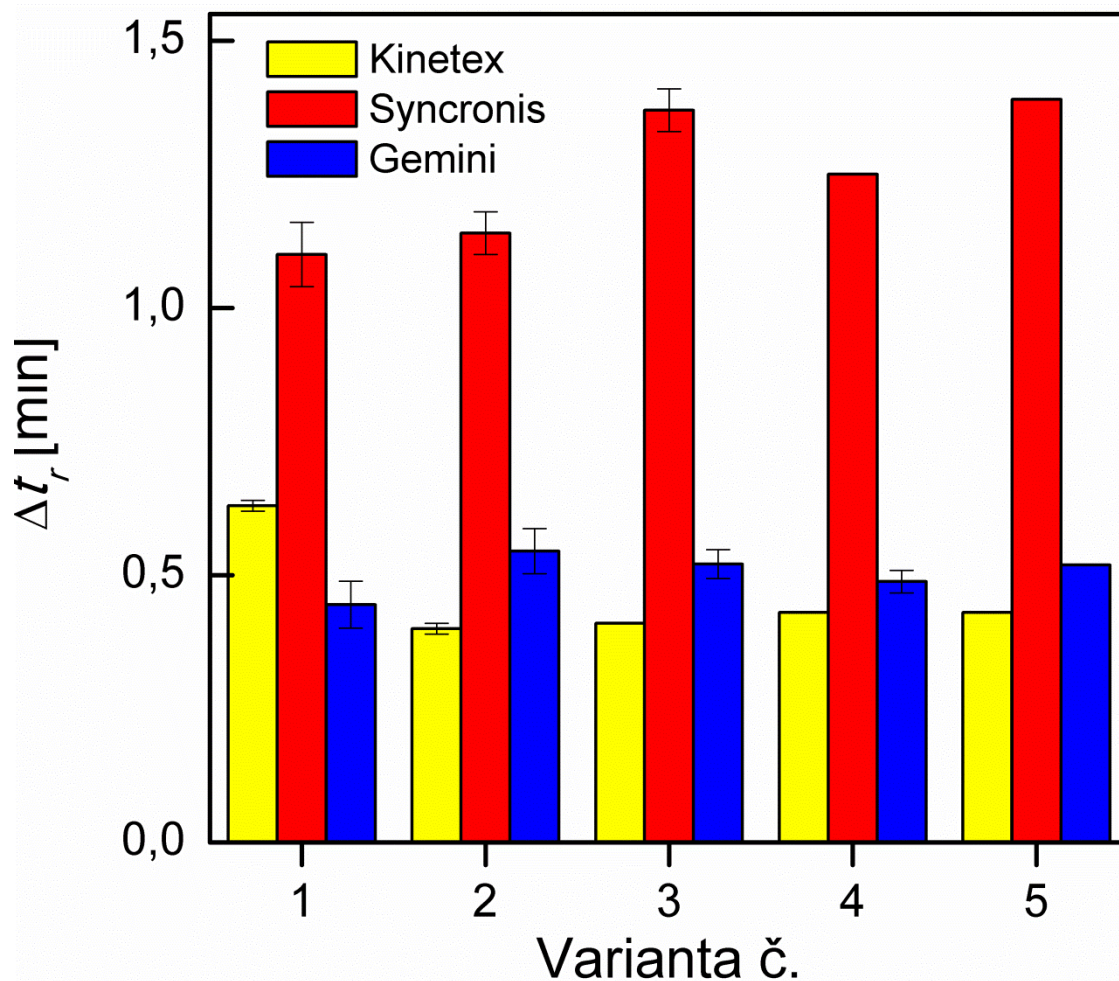
Obrázek 42.: Odezva jednotlivých TG ve formě integrovaných ploch piků.

Nejlepší odezvy bylo dosaženo na koloně Gemini, avšak rozptyl odezvy u TG 18:2/18:0/18:2 je dost vysoký. Standardně nejstabilnější odezva byla zaznamenána u kolony Kinetex.



Obrázek 43.: Šířka píků jednotlivých TG.

Nejužší píky lze pozorovat u kolony Kinetex. Vliv vody na šířku píku není patrný až na výjimku u TG 3x 16:1. U kolony Synchronis se se zvyšujícím procentem vody v mobilní fázi zvětšuje i šířka píku. Podobný fenomén lze v omezené míře pozorovat i u kolony Gemini.



Obrázek 44.: Časová vzdálenost mezi píky ΔT_G 16:0/16:0/16:0 - TG 18:0/18:2/18:0 u jednotlivých variant a tří chromatografických kolon.

Největší vzdálenost píků dosahuje kolona Synchronis. Naopak nejmenší vzdálenost mezi píky lze pozorovat u kolony Kinetex.

6.2.5 Vyhodnocení nejvhodnější varianty a nejvhodnější kolony

Díky experimentům s druhem kolony a vmícháváním vody do mobilní fáze se podařilo získat velké množství dat. Na základě předchozích zkušeností jsme vyhodnotili několik vlastností popisujících chromatografii.

Těmito vlastnostmi jsou: tvar píku, separace vybraných lipidů, délka retence – (nižší je lepší), stabilita a síla odezvy a šířka píku (užší je lepší). Každé vlastnosti byla přidělena hodnota 1, 2 nebo 3 dle pořadí v jednotlivých „disciplínách“ přičemž hodnota 3 byla nejlepší. Výjimku tvořila separace, kdy byla přiřazována pouze hodnota 1 pro

ano a 0 pro ne. Pro separaci a retenci se vyplňovaly všechny varianty chromatografie, pro ostatní „disciplíny“ byla vybrána pro jednu kolonu pouze jedna varianta. Součtem bodů, tedy výsledků všech hodnocených parametrů, byly získány výsledky vedoucí k určení vhodnosti kolony a varianty vmíchávání vody do mobilní fáze. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 6. Zde je patrné, že pro detekci glycerolipidů jak polárních (PE, PC), tak nepolárních (DG, TG), je nejvhodnější kolona Kinetex, a to přesně varianta 5.

Tabulka 6.: Kvalita jednotlivých separací a variant.

GL „disciplína“	Kinetex					Synchronis					Gemini				
	v1	v2	v3	v4	v5	v1	v2	v3	v4	v5	v1	v2	v3	v4	v5
PE	tvar píku				3				2						1
	separace			1	1			1	1			1			
	nejkratší retence	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	stabilita odezvy				3				1					2	
	nejvyšší odezva				1				2		3				
	nejužší píky					3			1		2				
PC	tvar píku				3					2			1		
	separace		1	1	1	1		1	1	1			1	1	1
	nejkratší retence	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	stabilita odezvy				1			2				3			
	nejvyšší odezva				2		1							3	
	nejužší píky					3			1						2
DG	tvar píku				3				2				1		
	separace		1	1	1	1		1	1						
	nejkratší retence	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	stabilita odezvy				3		1							2	
	nejvyšší odezva					2					1	3			
	nejužší píky					3	2					1			
TG	tvar píku				3				2				1		
	separace	1	1	1	1	1	1	1	1	1				1	1
	nejkratší retence	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	stabilita odezvy					3			1					2	
	nejvyšší odezva					1			2		3				
	nejužší píky					3	2							1	

nejlepší varianta 13 15 15 29 43 11 8 7 22 10 23 8 21 12 13

V tabulce 7 jsou vyzvednuty jednotlivé přednosti kolon v konkrétních disciplínách. Tvar píků je u všech tříd lipidů nejlepší u kolony Kinetex. Separace je nejvhodnější opět na koloně Kinetex, která také vykazuje nejmenší retenci a stabilitu odezvy. Výjimkou je u PC, kdy se jeví nejlepší kolona Gemini. Nejvyšší odezva je u všech tříd lipidů u kolony Gemini, nicméně jejich odezva není stabilní. Nejužší píky jsou u všech tříd opět v separaci kolony Kinetex.

Tabulka 7.: Pořadí kolon v jednotlivých „disciplínách“, větší úspěch je značen větším počtem bodů, nejlepší výsledky jsou zvýrazněny tučným písmem.

GL	PE						PC						DG						TG					
disciplína	tvár piku	separace	nejkratší retence	stabilita odezvy	nejvyšší odezva	nejúžší píky	tvár piku	separace	nejkratší retence	stabilita odezvy	nejvyšší odezva	nejúžší píky	tvár piku	separace	nejkratší retence	stabilita odezvy	nejvyšší odezva	nejúžší píky	tvár piku	separace	nejkratší retence	stabilita odezvy	nejvyšší odezva	nejúžší píky
Kinetex	3	2	15	3	1	3	3	4	15	1	2	3	3	4	15	3	2	3	3	5	15	3	1	3
Synchronis	2	2	5	1	2	1	2	4	5	2	1	1	2	2	5	1	1	2	2	5	5	1	2	2
Gemini	1	1	10	2	3	2	1	3	10	3	3	2	1	0	10	2	3	1	1	2	10	2	3	1

Celkový výsledek je shrnut v tabulce 8, vyjadřuje sumu všech bodů, které byly věnovány jednotlivým kolonám, variantám chromatografie, a také jednotlivým třídám lipidů.

Tabulka 8.: zhodnocení kolon a variant separace nejvhodnějších pro specifickou třídu glycerolipidů, nejlepší výsledky jsou zvýrazněny tučným písmem.

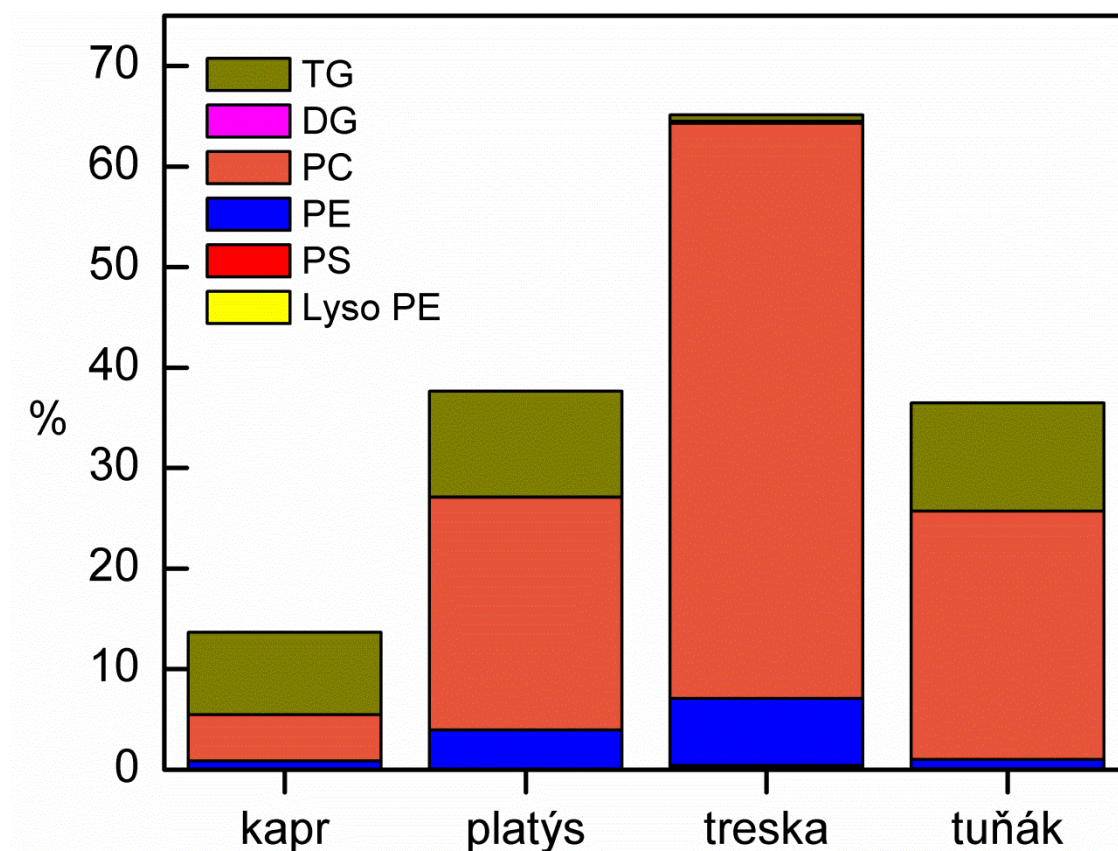
GL	Kinetex					Synchronis					Gemini				
	v1	v2	v3	v4	v5	v1	v2	v3	v4	v5	v1	v2	v3	v4	v5
PE	3	3	3	8	10	1	1	1	8	2	7	2	5	2	3
PC	3	4	4	7	10	2	4	2	3	4	5	2	7	3	5
DG	3	4	4	10	9	4	1	2	4	2	6	2	3	4	2
TG	4	4	4	4	14	4	2	2	7	2	5	2	6	3	3

Při porovnání tří chromatografických kolon a pěti variant složení mobilních fází bylo zjištěno, že pro chromatografii sledovaných tříd glycerolipidů je nejvhodnější kolona Kinetex s gradientem mobilní fáze varianty 5, která vykazuje nejlepší výsledky pro 3 ze 4 zkoumaných lipidů (PE, PC, TG) a u DG druhý nejlepší výsledek.

7 Využití optimalizované metody UHPLC/ESI/MS v praxi

Metoda vyhodnocená jako nejlepší - kolona Kinetex varianta 5 (20% vody) - byla použita v nutriční studii zabývající se obsahem kyseliny eicosapentanové (EPA 20:5) a kyseliny dokosahenaenové (DHA 22:6) v rybím masu. Je obecně známo, že tyto omega-3 nenasycené mastné kyseliny jsou pro člověka esenciální. Jejich zdrojem jsou především mořské ryby.⁸³ Tento nutriční výzkum byl zaměřen na vyhledání zdroje mastných kyselin v různých rybách, včetně sladkovodních.

Na základě identifikace v modulu Qualbrowser program Xcalibur (Thermo) bylo celkově detekováno 178 GL. Nejvíce byly zastoupeny TG (90), následovány PC (37) a PE (25), zbylé GL tvoří fosfatidylseriny a lysofosfolipidy (z důvodu velkého rozsahu nebyly fragmentační analýzy zahrnuty do této práce). Kompletní výsledky jsou v Příloze A tabulka 1. Z těchto záznamů byla extrahována data týkající se pouze sledovaných nenasycených mastných kyselin. Bylo celkově určeno 55 GL, které obsahovaly DHA a EPA, z toho 18 PE, 17 PC a 15 TG. Procentuelní poměr zastoupení DHA a EPA v jednotlivých třídách lipidů je znázorněn na obrázku 45.



Obrázek 45.: Procentuelní zastoupení omega 3 nenasycených mastných kyselin ve čtyřech druzích ryb.

Byly porovnávány 4 druhy ryb, jedna sladkovodní (*Cyprinus carpio* – kapr obecný) a tři mořské (*Hippoglossus hippoglossus* – platýs obecný, *Gadus morhua* – treska obecná, *Thunnus thynnus* – tuňák obecný). Je patrné, že ryba s největším obsahem omega-3 nenasycených mastných kyselin je treska následována platýsem a tuňákem. Jako jediný zástupce sladkovodních ryb vykazuje kapr mnohé fenomény. Obsah omega-3 nenasycených mastných kyselin je nejnižší ze všech měřených ryb. Obsah těchto mastných kyselin je nejvíce zastoupen v TG, kdežto u všech ostatních druhů mořských ryb jsou omega-3 nenasycené mastné kyseliny majoritně zastoupeny v glycerolfosfolipidech (PE, PC).

Díky použití chromatografické kolony Kinetex a varianty 5 chromatografického gradientu mobilních fází byla získána nová informace o zdroji omega-3 nenasycených mastných kyselin v rybách, a to na molekulární úrovni. Je patrné, že většina omega-3 nenasycených mastných kyselin je uložena ve formě polárních lipidů PC a PE.

8 Závěr

Tato práce si kladla za úkol optimalizovat separační metodu HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií pro detekci mnoha tříd lipidů. Studie zahrnuje extrakci lipidů, jejich preseparaci, separaci a identifikaci na základě fragmentačních spekter.

Díky již navrženým technikám⁸⁰ byla metoda využívající kolonu Gemini testována na opakovatelnost celého systému včetně ochoty ionizace zvolených tříd lipidů.

Z dostupné literatury byly zjištěny dvě běžně používané extrakce lipidů založené na chloroformu a MTBE, bylo provedeno jejich srovnání. Výhodnější ze všech analytických hledisek byla vyhodnocena první metoda dle Folcha.

Velmi důležitým krokem k identifikaci je proces preseparace pomocí techniky SPE. Optimalizací původní receptury se podařilo dosáhnout lepší výtěžnosti této techniky, a to především úpravou mobilních fází, konkrétně poslední z nich. Ta je odpovědná za eluci polárních lipidů.

Unimolární roztok standardů lipidů byl základem pro fragmentační vzory, které pak byly využity pro určení třídy lipidů a také identitu mastných kyselin obsažených v molekule glycerolipidu.

Tentýž roztok standardů byl testován na tvar píku, retenční čas, odezvu, šířku píku a vzdálenost jednotlivých píků mezi sebou. Do optimalizace byly zapojeny tři druhy kolon s rozdílnou technologií vnitřní struktury. Následné vyhodnocení vyšlo ve prospěch chromatografické kolony Kinetex a varianty 5 (20% vody na začátku separace).

Optimalizovaná metoda byla následně testována na biologickém vzorku a stala se základem studie popisující lipidické složení masa různých druhů ryb s důrazem na stanovení omega-3 nenasycených mastných kyselin v intaktních molekulách glycerolipidů. Výsledky jasně prokazují, že mořské ryby obsahují většinu svých omega-3 nenasycených mastných kyselin ve formě fosfolipidů.

Seznam použité literatury

- 1 Fahy, E., S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, and E. A. Denis: *J. Lipid Res.* 46, 839–861, 2005
- 2 Hu, C.; Heiden, R. van der; Wang, M.; Greef, J. van der; Hankemeier, T.; Xu, G.: *Journal of Chromatography B* 877, 2836-2846, 2009
- 3 Voet, D.; Voet, J.G. – *Biochemistry*. John Wiley & Sons, inc., 1995
- 4 Gross, M.L.; Caprioli, R. M.: *The Encyclopedia of Mass Spectrometry Volume 3*, Elsevier Science; 1 edition, 397-447, 2005
- 5 Gennis, R.B. – *Biomembranes Molecul Structure and Function*, Springer. Verlag New York Inc., 1989
- 6 Yi, Lun-Zhao; Liang, Yi-Zeng; Yuan, Da-Li; Chau, Foo-Tim: *FEBS Letters* 580, 6837-6845, 2006
- 7 Biederman, W.; Luckner, E.; Porchmann, J.; Lachhab, A.; Truyen, U.; Hensel, A.: *Anal Bioanal Chem* 379, 1031-1038, 2004
- 8 Han, X.: *Journal of Chromatography B*, 877:2663, 2009
- 9 Folch, J.; Lees, M.; Stanley, H. S.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 - 509, 1957
- 10 Blight, E. G.; Dyer, W. J. : *Ca. Journal Biochemistry and Physiology* 37:911-917, 1959
- 11 Hara, A.; Radin, N. S.: *Analytical Biochemistry* 90, 420-426, 1978
- 12 Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Schevchenko, A.; Schwudke, D.: *Journal of Lipid Research* 49, 1137-1146, 2008
- 13 X.Han, R. W. Gross.: *Mass Spectrometry Reviews*, 24:367-412, 2005
- 14 Duffin, K. L.; Henion, J. D.: *Anal. Chem.* 63, 1781 – 1788, 1991
- 15 Sherma, J.; Mukherjee, K. D.; Weber, N. – *Analysis of Lipids. CRC Handbook of chromatography*, CRC press, 1993
- 16 Caboni, M. F.; Menotta, S.; Lercker, G.: *JAOCs* 73 (no.11), 1561 – 1566, 1996
- 17 Silversand, Ch.; Haux, C. : *Journal of Chromatography B* 703, 7- 14, 1997
- 18 Qui, D.-F.; Games, M. P. L.; Xiao, X.-Y.; Games, D. E.; Walton, T. J.: *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 14, 1586 – 1591, 2000
- 19 Ostrowaka, J.; Skrzydlewska, E.; Figaszewski, Z. A.: *Chem. Anal.* 45, 613 – 629, 2000
- 20 Ramadan, M.F.; Morsel, J.T. : *Phytochemical analysis* 14, 366-370, 2003
- 21 Neron, S.; Amrani, F. E.; Potus, J.; Nicolas, J. : *Journal of Chromatography A* 1047, 77-83, 2004
- 22 Cvacka, J.; Kafronova, E.; Vasickova, S.; Stransky, K.; Jiros, P.; Hovorka, O.; Kindl, J.; Valterova, I.: *Lipids* 43, 441-450, 2008
- 23 Kaluzny, M. A.; Duncan, L. A.; Merritt, M. V.; Epps, D. E.: *Journal of Lipid Research* 26, 135-140
- 24 Pietch, A.; Lorenz, R. L.: *Lipids* 28, no.10, 945-947, 1993
- 25 Pinkart, H. C.; Devereux, R.; Chapman, P. J.: *Journal of Microbiological Methods* 34, 9-15, 1998
- 26 Burdge, G. C.; Wright, P.; Jones, A. E.; Wootton, S. A.: *British Journal of Nutrition* 84, 781-787, 2000
- 27 Pernet, F.; Pelletier, C. J.; Milley, J.: *Journal of Chromatography A* 1137, 127-137, 2006

- 28 Cascone, A.; Eerola, S.; Ritieni, A.; Rizzo, A.: *Journal of Chromatography A* 1120, 211-220, 2006
- 29 Persson, E.; Lofgren, L.; Hansson, G.; Abrahamsson, B.; Lennas, H.; Nilsson, R.: *Journal of Lipid research* 48: 242-251, 2007
- 30 Sas, B.; Peys, E.; Helsen, M. : *Journal of Chromatography A* 864, 179 – 182, 1999
- 31 Carrier, A.; Parent, J.; Dupuis, S.: *Journal of Chromatography A* 876, 97 – 109, 2000
- 32 Lesnefsky, E. J.; Stoll, M. S. K.; Minkler, P. E.; Hoppel, Ch. L.: *Analytical Biochemistry* 285, 246 – 254, 2000
- 33 Morrill, G. A.; Ma, G.-Y.; Kostellow, A.: *Cellular Signalling*, 12:787-796, 2000
- 34 Mu, H.; Hoy, C.-E.: *Journal of Chromatography B*, 48:425-437, 2000
- 35 Larsen, A.; Mokastet, E.; Lundanes, E.; Hvattum, E.: *Journal of Chromatography B* 774, 115 – 120, 2002
- 36 Fagan, P.; Wijesundera, Ch.: *Journal of Chromatography A*, 1054, 241-249, 2004
- 37 Adachi, J.; Yoshioka, N.; Funae, R.; Nushida, H.; Asano, M.; Ueno, Y.: *Journal of Chromatography B* 806, 41 - 46, 2004
- 38 Ohler, B.; Graf, K.; Bragg, R.; Lemons, T.; Coe, R.; Genain, C.; Israelachvili, J.; Husted, C. : *Biochimica et Biophysica Acta* 1688, 10-17, 2004
- 39 Lee, J. H.; Jones, K. C.; Foglia, T.A.; Nunez, A.; Lee, J. H.; Kim, Y. M.; Vu, P-L.; Lee, K-T.: *Journal of American Oil Chemical Society* 84: 211-217, 2007
- 40 Marcato, B.; Cecchin, G. : *Journal of Chromatography A* 730, 83 – 90, 1996
- 41 Aitzetmuller, K. : *Lipids* 4, 8 - 19, 1997
- 42 Homan, R.; Anderson, K. M.: *Journal of Chromatography B* 708, 21 – 26, 1998
- 43 Brouwers, J. F. H. M.; Vernooij, E. A. A. M.; Tielens, A. G. M.; Golde, L.M.G. van : *Journal of Lipid Research* 40, 164 – 169, 1999
- 44 Lin, J.-T.; McKeon, T. A.: *Recent Res. Devel. Lipids Res.* 3, 87 – 95, 1999
- 45 Genge, R. B.; Wu, L.N.Y.; Wuthier, R. E. : *Analytical Biochemistry* 322, 104-115, 2003
- 46 Nissen, H.P.; Kreysel, H.W.: *Chromatographia* 30 (No. 11/12), 686 - 690, 1990
- 47 McHowad, J.; Jones, J. H.; Creer, H. M.: *Journal of Lipid Research* 37, 2450 – 2460, 1996
- 48 Klift, E. J. C. Van der; Vivo-Truyols, G.; Claassen, F. W.; Van Holthoon, F. L.; Geek T. A. Van.: *Journal of Chromatography A*, 1178:43-55, 2008
- 49 Jensen, N. J.; Gross M. L. – A comparison of massspectroscopy methods for structural determination and analysis of phospholipids. *Maas Spectroscopy reviews* 7, 41-69, 1988
- 50 Kim, H. Y.; Salem, jr.N.: *Prog. Lip. Res.* 32 (No.3), 221 - 245, 1993
- 51 Kim, H.-Y.; Wang, T.-Ch. L.; Ma, Y.-Ch.: *Anal. Chem.* 66, 3977 – 3982, 1994
- 52 Byrdwell, Wm. C.; Emken, E. A.; Neff, W. E.; Adolf, R. O.: *Lipids* 31, 919-935, 1996
- 53 Fang, J.; Barcelona M.J.: *Journal of Microbiological Methods* 33, 23 – 35, 1998
- 54 Hvattum, E.; Larsen, A.; Uran, S.; Michelsen, P.M.; Skotland, T.: *Journal of Chromatography B* 716, 47 – 56, 1998
- 55 Murphy, R. C.; Krank, J.; Barkley R. B.: *LC/MS methodology in lipid analysis and structural characterization of novel lipid species. Functional Lipidomics/* edited by L. Feng and G.D. Pretswitch: 17-57, Taylor and Francis Group 2006
- 56 Uran, S.; Larsen, A.; Jacobsen, P. B.; Skotland T.: *Journal of Chromatography B* 758, 265 – 215, 2000

- 57 Ekroos, K.; Ejsing, C. S.; Bahr, U.; Karas, M.; Simons, K.; Shevchenko, A.: *Journal of Lipid Research* 44, 2181-2192, 2003
- 58 McAnoy, A. M.; Wu, C. C.; Murphy, R. C.: *J Am Soc Mass Spectrom* 16, 1498-1509, 2005
- 59 Cvacka, J.; Hovorka, O.; Jiros, P.; Kindl, J.; Stransky, K.; Valterova, I.: *Journal of Chromatography A* 1101, 226-237, 2006
- 60 Cvacka, J.; Krafkova, E.; Jiros, P.; Valterova, I.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3586-3594, 2006
- 61 Xu, J.; Chen, D.; Yan, X.; Chen, J.; Zhou, C.: *Analytica Chimica Acta* 663, 60-68, 2010
- 62 Hamilton, R. J.; Hamilton S.: *Lipid Analysis A practical Aproach*, Oxword University Press 1992
- 63 Hejtmánek, M.; Zýka, J.: *Analytická příručka díl I.*, 163-200, Nakladatelství technické literatury 1979
- 64 Ruiz, J.; Antequera, T.; Andres, A.I.; Petron, M. J.; Muriel, E.: *Analytica Chimica Acta* 520, 201-205, 2004
- 65 Berková, P.: *Diserační práce*, 2003
- 66 Hennion, M. C.: *Journal of Chromatography A* 856, 3-54, 1999
- 67 Bateman, H. G. II.; Jenkis, T. C.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 132-134, 1997
- 68 Taylor, L. A.; Ziroli, V.; Massing, U.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 912-919, 2009
- 69 Buchgraber, M.; Ulberth, F.; Emons, H.; Anklam, E.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 621-648, 2004
- 70 Lisa, M.; Holcapek, M.: *Journal of Chromatography A* 1198-1199, 115-130, 2008
- 71 Chauveau-Duriot, B.; Doreau, M.; Noziere, P.; Graulet, B.: *Anal Bioanal Chem* 397, 777-790, 2010
- 72 Tarvainen, M.; Soumela, J. P.; Kallio, H.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 409-422, 2011
- 73 Rainville, P. D.; Stumpf, C. L.; Shockcor, J. P.; Plumb, R. S.; Nicholson, J. K.: *Journal of Proteome research* 6, 552-558, 2007
- 74 M. Koivusalo, P. Haimi, L. Heikinheimo, R. Kostianen, P Somerharju: *Journal of Lipid Research*, 42:663-672,2001
- 75 Kerwin, J. L.; Tuininga, A. R.; Ericsson, L. H.: *Journal of Lipid Research* 35, 1102 – 1114, 1994
- 76 Taguchi, R.; Hayakawa, J.; Takeuchi, Y.; Ishida M.: *Journal of Mass Spectrometry*,35:953-966, 2000
- 77 Han, X.; Gross, R. W.: *Journal of Lipid Research*, 44:1071-1079, 2003
- 78 Hsu, F.F.; Truk, J., *Journal of Chromatography B* 877, 2673-2695, 2009
- 79 Kostal, V.; Simek, P.: *Journal of Comparative Physiology* 168 (B), 453-460, 1998
- 80 Tomcala, A.; Tollarova, M.; Overgaard, J.; Simek, P.; Kostal, V.: *Journal of Experimental Biology* 209, 41002-4114, 2006
- 81 Gritti, F.; Guiochon, G.: *Journal of Chromatography A* 1228, 2-19, 2012
- 82 <http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- 83 Adkins, Y.; Kelley, D.S.: *Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 9, 781-792, 2010

Příloha A

Tabulka 1.: Poměrové procentní zastoupení všech detekovaných lipidů v rybím mase. Data byla získána porovnáním integrovaných ploch peaků.

	Kapr (%)	Platýz (%)	Treska (%)	Tuňák (%)
Lyso PE 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00
Lyso PE 22:6	0.00	0.05	0.16	0.09
Lyso PC 14:0	0.00	0.05	0.02	0.00
Lyso PC 16:0	0.01	0.89	0.29	0.21
Lyso PC 18:1	0.00	0.22	0.05	0.27
Lyso PC 18:0	0.01	0.09	0.16	0.08
PS 22:6/16:0	0.01	0.02	0.17	0.00
PS 22:6/22:6	0.00	0.00	0.08	0.00
PE 20:5/14:0	0.00	0.00	0.01	0.00
PE 22:6/14:0	0.00	0.02	0.04	0.00
PE 20:5/16:0	0.12	0.19	0.07	0.02
PE 18:2/18:2	0.10	0.10	0.00	0.04
PE 18:2/18:1	0.01	0.00	0.01	0.00
PE 22:6/15:0	0.22	0.80	0.11	0.44
PE 20:5/18:3	0.02	0.00	0.05	0.00
PE 20:5/18:2	0.03	0.01	0.00	0.00
PE 22:6/16:1	0.01	0.10	0.17	0.00
PE 20:4/18:2	0.11	0.28	0.00	0.00
PE 22:6/16:0	0.11	0.46	0.97	0.19
PE 20:4/18:1	0.18	0.37	0.35	0.07
PE 18:0/20:4	0.32	0.26	0.05	0.32
PE 18:0/20:0	0.01	0.05	0.02	0.00
PE 20:5/20:5	0.02	0.06	0.11	0.00
PE 22:6/18:3	0.04	0.04	0.00	0.00
PE 22:6/18:2	0.03	0.03	0.00	0.01
PE 22:6/18:1	0.12	1.01	0.03	0.05
PE 22:5/18:1	0.17	1.30	0.47	1.51
PE 22:6/18:0	0.00	0.00	1.29	0.00
PE 22:6/20:5	0.02	0.17	0.92	0.00
PE 22:6/20:4	0.03	0.07	0.07	0.02
PE 22:6/20:1	0.08	0.61	0.28	0.15
PE 22:6/22:6	0.00	0.21	2.25	0.05
PE 22:6/22:5	0.01	0.09	0.31	0.00
PE 22:6/22:1	0.00	0.01	0.00	0.00
PC 16:1/16:0	0.47	0.73	0.29	0.22
PC 16:0/16:0	0.14	0.15	0.09	0.15
PC 20:5/14:0	0.06	0.30	0.36	0.00
PC 16:0/18:4	0.09	0.11	0.11	0.01

	Kapr (%)	Platýz (%)	Treska (%)	Tuňák (%)
PC 20:3/16:0	0.05	0.01	0.01	0.00
PC 18:3/16:0	0.13	0.00	0.17	0.00
PC 16:1/18:1	0.24	0.24	0.09	0.25
PC 16:0/18:2	0.95	0.77	1.46	0.92
PC 16:0/18:1	2.58	1.93	4.13	4.41
PC 15:1/20:4	0.05	0.04	0.01	2.02
PC15:0/20:4	0.07	0.06	0.03	0.17
PC 22:6/14:0	0.29	0.61	0.47	0.01
PC 16:1/20:4	0.13	0.20	0.06	0.03
PC 16:0/20:5	1.92	9.25	13.78	1.38
PC 16:0/20:4	1.05	2.63	1.70	3.14
PC 18:1/18:2	0.11	0.01	0.08	0.01
PC 16:0/20:3	0.09	0.00	0.03	0.05
PC 18:1/18:1	0.17	0.07	0.27	0.09
PC 22:6/15:1	0.13	0.03	0.07	0.92
PC 22:6/15:0	0.20	0.36	0.67	0.56
PC 18:3/20:5	0.12	0.02	0.16	0.00
PC 20:4/18:3	0.19	0.01	0.41	0.00
PC 16:1/22:6	0.15	0.47	0.93	0.14
PC 20:4/18:2	0.46	0.85	2.48	0.00
PC 22:6/16:0	1.00	8.06	21.81	15.25
PC 18:0/20:5	0.70	1.90	0.68	0.29
PC 18:4/22:6	0.03	0.18	0.47	0.02
PC 18:3/22:6	0.08	0.12	0.47	0.06
PC 18:2/22:6	0.06	0.06	0.94	0.17
PC 18:1/22:6	0.42	2.41	5.52	2.57
PC 20:1/22:5	0.26	0.15	0.17	0.09
PC 22:6/18:0	0.05	0.13	0.50	0.44
PC 20:5/22:6	0.03	0.67	5.20	0.35
PC 22:6/20:4	0.01	0.14	0.48	0.57
PC 22:6/20:1	0.02	0.06	0.11	0.00
PC 22:5/20:1	0.02	0.00	0.00	0.00
PC 22:1/20:1	0.00	0.00	0.22	0.00
PC 22:6/22:6	0.00	0.27	5.27	2.25
DG 16:0/18:1	0.13	0.19	0.21	0.16
DG 16:0/16:0	0.02	0.02	2.13	0.01
DG 20:5/16:0	0.01	0.03	0.19	0.01
DG 18:1/18:1	0.06	0.08	0.06	0.05
DG 18:1/18:0	0.03	0.05	0.05	0.03
DG 18:0/18:0	0.00	0.00	1.53	0.00
TG 16:1/16:0/2:0	0.01	0.00	0.31	0.00
TG 16:0/14:0/4:0	0.12	0.07	0.11	0.07
TG 18:1/16:0/6:0	0.06	0.03	0.05	0.03

	Kapr (%)	Platýz (%)	Treska (%)	Tuňák (%)
TG 18:1/18:0/4:0	0.02	0.02	0.03	0.02
TG 14:0/14:0/12:0	0.04	0.05	0.09	0.04
TG 14:0/14:1/14:0	0.04	0.05	0.05	0.03
TG 14:0/14:0/14:0	0.19	0.13	0.23	0.14
TG 14:0/15:0/14:0	0.01	0.02	0.01	0.02
TG 14:0/14:0/16:1	0.21	0.43	0.23	0.20
TG 14:0/14:0/16:0	0.12	0.18	0.31	0.25
TG 14:0/14:0/17:1	0.30	0.15	0.01	0.03
TG 16:1/15:0/14:0	0.30	0.00	0.01	0.04
TG 14:0/14:0/18:4	0.10	0.15	0.00	0.00
TG 14:0/18:3/14:0	0.11	0.24	0.00	0.01
TG 16:1/14:0/16:1	0.58	1.25	0.08	0.14
TG 16:0/14:0/16:1	1.56	1.47	0.37	0.92
TG 16:0/16:0/14:0	0.68	0.07	0.33	0.63
TG 17:1/14:0/16:1	0.22	0.42	0.00	0.15
TG 18:1/15:0/16:0	0.24	0.46	0.02	0.27
TG 14:0/14:0/20:5	0.27	0.32	0.00	0.01
TG 18:4/16:1/14:0	0.36	0.26	0.00	0.04
TG 16:1/18:3/14:0	0.32	0.36	0.00	0.01
TG 16:3/18:1/14:0	0.43	0.49	0.00	0.02
TG 18:4/16:0/14:0	0.29	0.11	0.00	0.05
TG 18:2/16:1/14:0	0.50	2.92	0.01	0.16
TG 18:1/14:0/16:1	3.06	3.48	0.30	1.53
TG 16:0/18:1/14:0	3.34	0.36	0.72	1.33
TG 16:0/18:0/14:0	1.26	0.24	0.42	1.75
TG 17:1/17:0/15:0	0.66	0.74	0.11	0.27
TG 16:1/16:1/18:4	0.97	0.57	0.00	0.00
TG 20:5/14:0/16:1	1.04	1.25	0.00	0.14
TG 22:6/14:0/14:0	0.16	0.02	0.00	0.14
TG 18:4/18:1/14:0	0.80	0.07	0.00	0.02
TG 20:5/14:0/16:0	1.07	0.37	0.01	0.16
TG 18:3/18:1/14:0	0.77	0.75	0.02	0.03
TG 16:0/18:3/16:0	2.08	3.02	0.14	0.34
TG 18:1/16:1/16:1	0.60	1.38	0.00	1.19
TG 18:1/18:1/14:0	5.03	2.79	0.92	4.92
TG 16:0/20:1/14:0	4.63	0.37	1.51	1.83
TG 18:1/16:0/17:1	0.57	0.62	0.00	0.00
TG 20:1/15:0/16:1	1.28	1.16	0.11	3.34
TG 20:1/15:0/16:0	0.71	0.11	0.03	0.04
TG 21:1/16:0/14:0	0.59	0.51	0.01	2.61
TG 18:1/16:0/18:3	1.38	0.72	0.05	0.35
TG 18:1/18:2/16:1	3.12	0.00	0.08	0.11
TG 18:1/18:1/16:1	2.11	0.00	0.19	0.00

	Kapr (%)	Platýz (%)	Treska (%)	Tuňák (%)
TG 18:1/18:2/16:0	3.86	2.51	0.42	1.67
TG 20:1/14:0/18:1	7.15	1.26	2.88	1.06
TG 22:1/14:0/16:0	3.34	0.18	1.65	0.00
TG 20:5/16:1/18:4	0.19	0.35	0.00	0.04
TG 18:1/18:1/17:1	0.71	0.54	0.02	0.46
TG 20:5/16:0/18:4	0.56	0.08	0.08	0.00
TG 18:1/17:0/18:1	0.41	1.15	0.00	2.18
TG 22:6/18:2/14:0	0.80	1.70	0.00	0.59
TG 22:1/15:0/16:0	0.32	0.00	0.00	0.00
TG 22:1/17:0/14:0	0.21	0.20	0.00	1.04
TG 18:1/20:5/16:1	1.27	0.78	0.10	0.81
TG 22:6/16:0/16:1	1.32	2.39	0.13	4.18
TG 18:1/18:1/18:4	0.68	0.56	0.02	0.46
TG 20:5/16:0/18:1	1.56	2.04	0.13	0.88
TG 18:1/18:3/18:1	1.30	0.09	0.10	0.64
TG 18:4/22:1/14:0	0.67	0.00	0.03	1.64
TG 20:1/16:0/18:3	2.07	0.07	0.24	0.57
TG 20:1/16:1/18:2	1.56	1.01	0.17	0.29
TG 18:1/20:1/16:1	3.92	3.68	1.04	3.05
TG 20:1/18:2/16:0	0.16	0.00	0.00	0.75
TG 20:1/16:0/18:1	2.88	0.00	0.98	0.00
TG 20:1/16:0/18:1	0.00	0.00	0.00	0.00
TG 22:1/18:1/14:0	0.68	0.37	0.23	1.90
TG 16:0/16:0/22:1	0.05	0.00	0.03	0.00
TG 22:6/14:0/20:5	0.05	0.71	0.02	0.19
TG 18:1/20:1/17:1	0.25	0.11	0.00	0.05
TG 22:1/15:0/18:1	0.14	0.00	0.03	0.01
TG 22:1/17:1/16:0	0.21	0.37	0.02	0.62
TG 22:1/17:0/16:0	0.05	0.01	0.00	0.00
TG 22:6/16:0/18:1	0.77	0.66	0.09	0.46
TG 18:1/18:1/20:5	0.49	1.98	0.29	2.64
TG 20:5/20:1/16:0	0.57	0.41	0.02	1.82
TG 18:2/22:1/16:1	0.34	0.20	0.00	0.13
TG 22:1/16:0/18:3	0.18	0.39	0.00	0.03
TG 18:2/22:1/16:0	0.70	1.46	0.08	0.56
TG 22:1/14:0/20:1	0.00	0.00	0.24	0.01
TG 22:1/16:1/18:0	0.56	0.00	0.50	0.00
TG 22:0/20:0/14:1	0.00	0.00	0.13	0.00
TG 22:1/18:0/16:0	0.05	0.00	0.00	0.00
TG 22:6/18:1/18:4	0.22	0.61	0.08	0.69
TG 18:1/22:1/17:1	0.09	0.03	0.00	0.00
TG 22:1/17:0/18:1	0.05	0.00	0.00	0.00
TG 19:0/22:1/16:0	0.01	0.00	0.00	0.00

	Kapr (%)	Platýz (%)	Treska (%)	Tuňák (%)
TG 20:1/18:1/20:5	0.27	0.32	0.01	0.03
TG 20:5/22:1/16:0	0.15	1.06	0.09	0.87
TG 20:1/20:2/18:1	0.08	0.18	0.01	0.00
TG 22:1/16:1/20:1	0.19	0.55	0.01	0.22
TG 22:1/16:0/20:1	0.14	0.22	0.04	1.42
TG 22:0/14:0/22:1	0.02	0.00	0.00	0.41
TG 22:1/20:1/17:1	0.02	0.01	0.00	0.05
TG 22:1/19:1/18:2	0.01	0.00	0.00	0.04
TG 22:1/17:0/22:1	0.00	0.10	0.00	0.03
TG 22:6/22:1/18:1	0.00	0.13	0.02	0.31
TG 22:6/22:1/20:1	0.00	0.03	0.00	0.37