

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie životního prostředí



Marie Moravcová

CÍLENÁ ANALÝZA EIKOSANOIDŮ POMOCÍ LC/MS

Targeted analysis of eicosanoids by LC/MS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Kuda, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

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

Jsem si vědoma 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 6. května 2014.

Marie Moravcová

Abstrakt

Eikosanoidy představují velkou třídu biologicky aktivních metabolitů polynenasycených mastných kyselin, které hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech. Metabolismus těchto látek je velice složitý a pro jeho pochopení byly použity metody analýzy zahrnující preseparaci z biologického vzorku pomocí extrakce na pevné fázi a kapalinovou chromatografii ve spojení s detekcí na hmotnostním spektrometru.

V rámci této bakalářské práce byly porovnány způsoby preseparace eikosanoidů z biologických vzorků na kolonkách pro extrakci na pevné fázi rozdělené podle typu sorbentu. Extrakce na pevné fázi byla testována na čtyřech kolonkách pro reverzní fázi, která se prokázala jako nejúčinnější metoda za použití kolonky Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA). Extrakce na pevné fázi byla optimalizována také pomocí alternativních metod za použití dvou kolonek s iontovou výměnou a jedné s normální fází, které se ukázaly jako nevhodné pro cílenou analýzu eikosanoidů. Zvolená metoda extrakce na kolonkách Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) byla použita pro separaci frakce eikosanoidů ve vzorku gonadálního tuku myši. Eikosanoidy byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie, kde byly testovány mechanismy separace pomocí tří kolonek Kinetex o různých délkách (50 mm, 100 mm, 150 mm), účinná separace prostaglandinu E2 a prostaglandinu D2 byla dosažena na nejdelší koloně Kinetex 150 mm \times 2,1 mm, 2,6 μm . V této práci byly optimalizovány ionizační parametry hmotnostního spektrometru, kolizní energie a deklasterační potenciál pro účinnou fragmentaci prostaglandinu D2. Získané parametry optimalizované pro analýzu byly použity pro určení množství vybraných eikosanoidů v gonadálním tuku, játrech a srdci myši.

Abstract

Eicosanoids represent large group of biologically active lipid metabolites synthesized from polyunsaturated fatty acids that play an important role in many physiological processes. To describe complex metabolism of these compounds, analytical methods including extraction from a biological sample using solid phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometer detection were used.

Solid phase extraction of biological samples was optimized on four types of reverse phase columns of which column Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) was the most effective. Also, alternative solid phase extraction of eicosanoids using columns with ion exchange sorbents and a column with normal phase were tested, but proved to be unsuitable for targeted analysis of eicosanoids. The extraction method yielding the best results - Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) was used for the separation of eicosanoids from mouse gonadal fat samples. Eicosanoids were analyzed by liquid chromatography and the separation mechanisms were tested on three UPLC core-shell columns of different lengths (50 mm, 100 mm, 150 mm). The most effective separation of prostaglandin E2 and prostaglandin D2 was achieved using the longest column Kinetex 150 mm \times 2,1 mm, 2,6 μm . Furthermore, ionization parameters, such as declustering potential, of selected eicosanoids were optimized and fragmentation of prostaglandin D2, including modulation of collision energy, were explored in detail. Final method optimized for the analysis of eicosanoids was used to measure quantity of selected eicosanoids in gonadal fat, liver and heart of mice.

Předmětová hesla: analytická chemie, separační metody

Klíčová slova: extrakce na pevné fázi, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, eikosanoidy

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Kudovi, Ph.D. za poskytnutí odborných rad, věcné připomínky, ochotu, množství času a vstřícný přístup během zpracování této práce. Mé poděkování patří také prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za cenné rady při konzultacích. Velké poděkování náleží mé rodině za podporu a trpělivost po dobu mého studia.

Obsah

Seznam zkratek	8
1 Teorie	11
1.1 Lipidy – definice	11
1.2 Eikosanoidy	11
1.3 Analytické metody pro identifikaci lipidů	13
1.3.1 Extrakce kapalina–kapalina	13
1.3.2 Extrakce na pevné fázi	13
1.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
1.3.4 Hmotnostní spektrometrie	18
1.3.5 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	18
2 Cíl práce	20
3 Experimentální část	20
3.1 Optimalizace ionizace eikosanoidů na hmotnostním spektrometru	22
3.2 Optimalizace separace eikosanoidů podle délky HPLC kolony	22
3.3 Popis použitých SPE metod	23
3.3.1 Reverzní fáze	23
3.3.2 Frakcionace na Strata-X	25
3.3.3 Iontová výměna	25
3.3.4 Normální fáze	26
3.4 Určení množství eikosanoidů v orgánech myši	27
4 Experimentální výsledky	28

4.1 Optimalizace ionizace eikosanoidů na hmotnostním spektrometru	28
4.2 Optimalizace separace eikosanoidů podle délky HPLC kolony	31
4.3 Porovnání kolonek - reverzní fáze	33
4.4 Efektivita fracionace na Strata-X	34
4.5 Porovnání kolonek - iontová výměna a normální fáze	35
4.6 Množství vybraných eikosanoidů v orgánech myši	37
5 Diskuze	39
6 Závěr	40
7 Literatura	41

Seznam zkratek

15d – PGJ2	15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2
6-keto-PGF1 α	6-keto-prostaglandin F1 α
AA	kyselina arachidonová (C20:4 n-6)
AcA	kyselina octová
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AW	slabá iontová výměna
C18	oktadecylový uhlíkatý řetězec (vázaný na silikagel)
C8	oktylový uhlíkatý řetězec (vázaný na silikagel)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CE	kolizní energie
CN	kyano skupina
COX	cyklooxygenáza (prostaglandin-endoperoxid syntáza)
DHA	dokosahexaenová kyselina (C22:6 n-3)
EPA	eikosapentaenová kyselina (C20:5 n-3)
ESI	elektrosprej
FTICR	iontově cyklotronová rezonance
GC	plynová chromatografie
GC – FID	plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí
HETE	hydroxyeikosatetraenová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEX	iontová výměna
LLE	extrakce kapalina - kapalina
LOX	lipoxygenáza
LT	leukotrien

LX	lipoxin
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MRM	sledování vícenásobné reakce
MS	hmotnostní spektrometrie
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NL	ztráta neutrální částice
NP	normální fáze
PG	prostaglandin
PGA2	prostaglandin A2
PP	polypropylen
PGB2	prostaglandin B2
PGD2	prostaglandin D2
PGE2	prostaglandin E2
PGJ2	prostaglandin J2
PLA2	fosfolipáza A2
PUFAs	polynenasycené mastné kyseliny
Q1, Q2, Q3	kvadrupól 1, 2, 3
QTRAP	hybridní hmotnostní analyzátor
RP	reverzní fáze
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TBME	<i>terc</i> -butylmethylether
TOF	průtokový analyzátor
TX	tromboxan

TXB2	tromboxan B2
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
WAT	bílá tuková tkáň

1 Teorie

1.1 Lipidy – definice

Lipidy jsou obecně jakékoliv molekuly, které jsou nerozpustné ve vodě a rozpustné v organických rozpouštědlech. Lipidy zahrnují široké skupiny přirozeně se vyskytujících molekul, vosky, eikosanoidy, monoacylglyceroly, diacylglyceroly, triacylglyceroly, fosfolipidy, sfingolipidy, steroly, terpeny, prenoly, vitaminy rozpustné v tucích (jako jsou vitaminy A, D, E a K) a další [1]. Hlavní biologické funkce lipidů jsou skladování energie, působí jako strukturní složky buněčných membrán a mohou být významnými signalizačními molekulami.

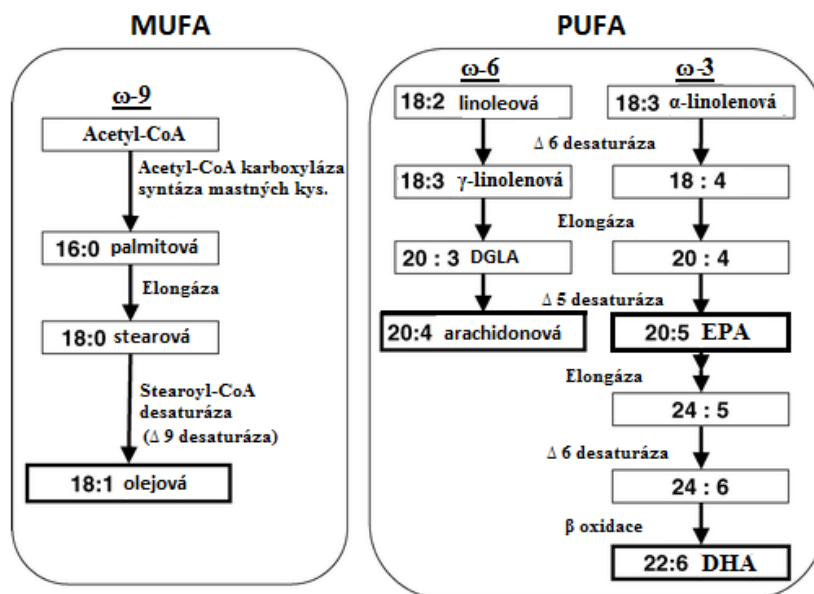
1.2 Eikosanoidy

Eikosanoidy jsou sloučeniny odvozené od polynenasycených mastných kyselin (PUFAs) s řetězcem dlouhým 20 uhlíků. Jsou to lipidické signální molekuly syntetizované z kyseliny arachidonové (AA), eikosapentaenové (EPA) nebo dokosahexaenové (DHA). Patří mezi ně: prostanoidy tj. prostaglandiny (PG) a tromboxany (TX), dále pak leukotrieny (LT), lipoxiny (LX), hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETE) a hepoxiliny [2]. Uplatňují se především lokálně, interakcí s receptory na membráně buňky nebo v buněčném jádře. Účastní se fyziologických funkcí organismu, jako je regulace stahů hladkého svalstva, propustnost cév a srážení krevních destiček, jsou také spojeny se zánětlivými, autoimunitními a alergickými procesy [3].

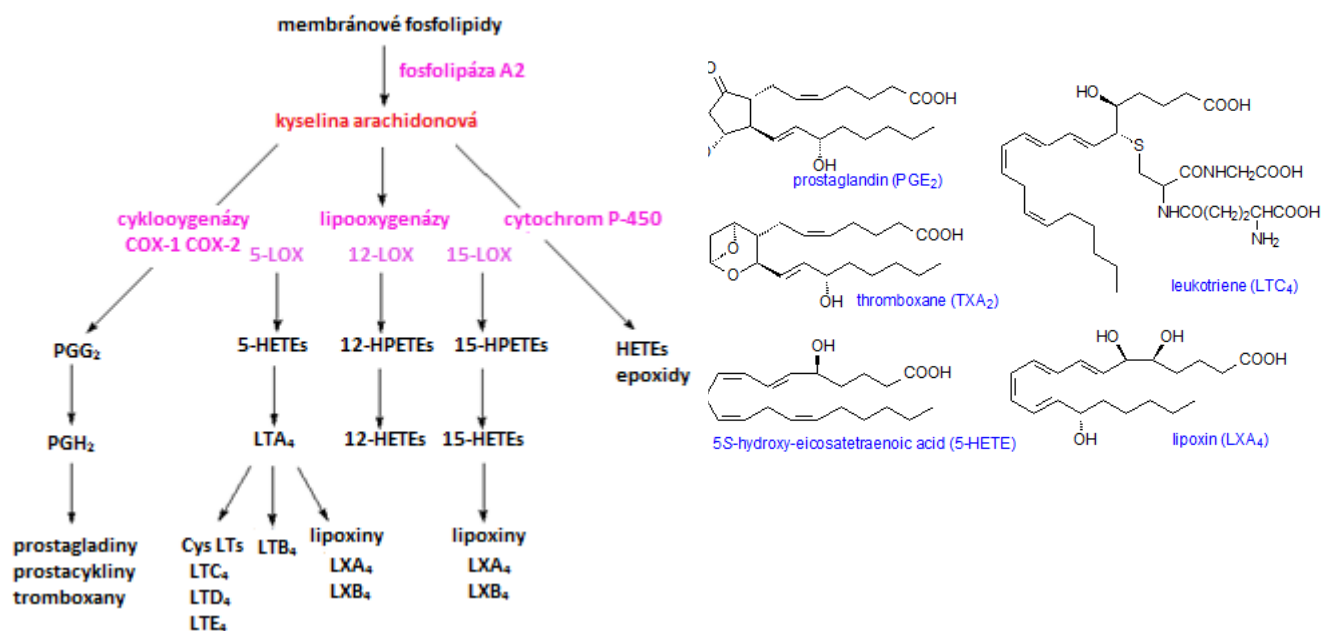
Nenasycené mastné kyseliny se dělí podle geometrické izomerie na cis a trans nebo podle umístění první dvojné vazby od methylového uhlíku na omega-9, omega-3 a omega-6 mastné kyseliny. Dvě podskupiny polynenasycených mastných kyselin s opačným efektem ω -3 (kyselina α -linolenová, EPA a DHA) a ω -6 (kyselina linolová, γ -linolenová, dihomogamma-linolenová a AA) jsou označovány jako esenciální mastné kyseliny. Kyselina linoleová a kyselina α -linolenová jsou prekurzory AA, EPA, DHA, mají zásadní roli při tvorbě eikosanoidů a jsou tedy prekurzory prostaglandinů, tromboxanů a leukotrienů (**obrázek 1**). Po stimulaci buňky, enzym cytosolická fosfolipáza A2 (cPLA2) uvolní AA z buněčných fosfolipidů a volná AA může být přeměněna třemi různými oxidačními dráhami na stovky bioaktivních produktů.

Biosyntéza eikosanoidů probíhá dráhou cyklooxygenázovou (COX), která vede ke vzniku PG a TX; lipoxygenázovou (LOX), která vede ke vzniku LT, LX, hepoxilinů, HETE a dráhou cytochromů P450 epoxygenáz, která vede ke vzniku dalších HETE (**obrázek 2**). Některé druhy eikosanoidů mohou být produkovány více než jedním enzymem, podobně, některé enzymy jsou schopné produkovat více než jeden typ eikosanoidů. Kromě těchto reakcí mohou být AA a jeho metabolity také tvořeny neenzymatickými oxidačními a dehydratačními reakcemi [26, 27, 30].

Kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová kyselina (DHA) jsou přijímány jako klíčové ω -3 PUFA, které mají zdraví prospěšné účinky, nacházejí se v rybím oleji a mohou být také vytvořeny v organismu prostřednictvím prodloužení α -linolenové kyseliny, esenciální mastné kyseliny ω -3. Studie prokázaly, že diety obsahující rybí olej jsou kardioprotektivní, stejně jako protizánětlivé a protikarcinogenní [34, 35].



Obrázek 1: Rozdělení nenasycených mastných kyselin podle počtu dvojných vazeb na mononenasyčené (MUFA) a polynenasycené (PUFA) a podle umístění první dvojně vazby od methylového uhlíku na ω -9, ω -6 a ω -3.



Obrázek 2: Biosyntéza eikosanoidů z AA. Reakcí na různé stimulační organismu je AA uvolněna z buněčných fosfolipidů enzymem fosfolipázou, především cytosolickou formou fosfolipázy A₂ (cPLA₂). Volné AA mohou být převedeny na bioaktivní eikosanoidy přes tři dráhy biosyntézy (COX, LOX, cyt P-450). LOX enzymy katalyzují vznik LTs a LXs, COX enzymy katalyzují vznik PGH₂, které jsou dále převedeny na biologicky aktivní produkty, tj. prostanoidy, P-450 katalyzuje vznik HETEs a epoxidů [2].

1.3 Analytické metody pro identifikaci lipidů

Lipidy jsou přírodní látky rozpustné v organických rozpouštědlech. Prvním krokem při analýze lipidů je jejich extrakce z biologického materiálu, např. extrakce kapalina - kapalina (LLE), extrakce na pevné fázi (SPE), dále separace pomocí různých chromatografických metod, chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo plynová chromatografie (GC) a posledním krokem je detekce, kde je vedle UV detekce nejpoužívanější technikou hmotnostní spektrometrie (MS). Extrakci lipidů z pevných i kapalných vzorků biologických materiálů lze provést extrakcí kapalina - kapalina (LLE) nebo SPE: extrakční kolonky, disky, mikroextrakce (SPME). Nejčastější používané metody LLE jsou Folchova, metoda Bligha a Dyera a TBME (*tert*-butylmethyletherem) [4, 14, 24]. Metody Folche a Bligh Dyera používají k extrakci jako rozpouštědlo směs chloroform/methanol/voda v různých poměrech. Chloroformová frakce s lipidy tvoří spodní vrstvu a horní vodná vrstva obsahující látky pro analýzu eikosanoidů nepotřebné (tj. polární látky, proteiny, aminokyseliny aj.) je odstraněna. V roce 2008 byla navržena extrakce TBME, při které se lipidy drží v horní etherové vrstvě [24].

1.3.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

Cílem všech postupů extrakce je oddělit buněčné tekutiny nebo lipidy od ostatních složek tj. proteinů, polysacharidů, malých molekul (aminokyseliny, cukry aj.), ale zároveň zachovat lipidy pro další analýzy.

LLE využívá distribuci lipidů a ostatních organických látek mezi dvě nemísitelné kapaliny. Polární lipidy (např. glykolipidy a fosfolipidy) jsou lépe rozpustné v polárních rozpouštědlech (např. alkoholy), než v nepolárních (např. hexan). Nepolární lipidy (např. triacylglyceroly) jsou lépe rozpustné v nepolárních rozpouštědlech než v polárních. Lipidy mají různé polaritu, což znamená, že není možné extrahovat všechny lipidy jedním organickým rozpouštědlem. Celkový obsah lipidů závisí na povaze organického rozpouštědla použitého k provedení extrakce.

Metoda dle Folche et al. [16] používá jako extrakční činidlo chloroform/methanol v poměru 2:1, kdy po protřepání s fyziologickým roztokem vzniká spodní vrstva chloroform/methanol/voda v objemovém poměru 86:14:1 obsahující lipidy a horní vrstva obsahující nečistoty, kde poměr rozpouštědel je 3:48:47 [25]. Metoda Bligha a Dyera [4] je jednoduchá úprava této metody, pro zvýšení výtěžnosti polárních lipidů. Extrakce používající TBME [24] byla navržena pro preciznější získání lipidů, kdy organická fáze obsahující lipidy tvoří horní vrstvu a tu lze odebrat bez ztrát, což je důležitý předpoklad při použití minima vzorku k extrakci.

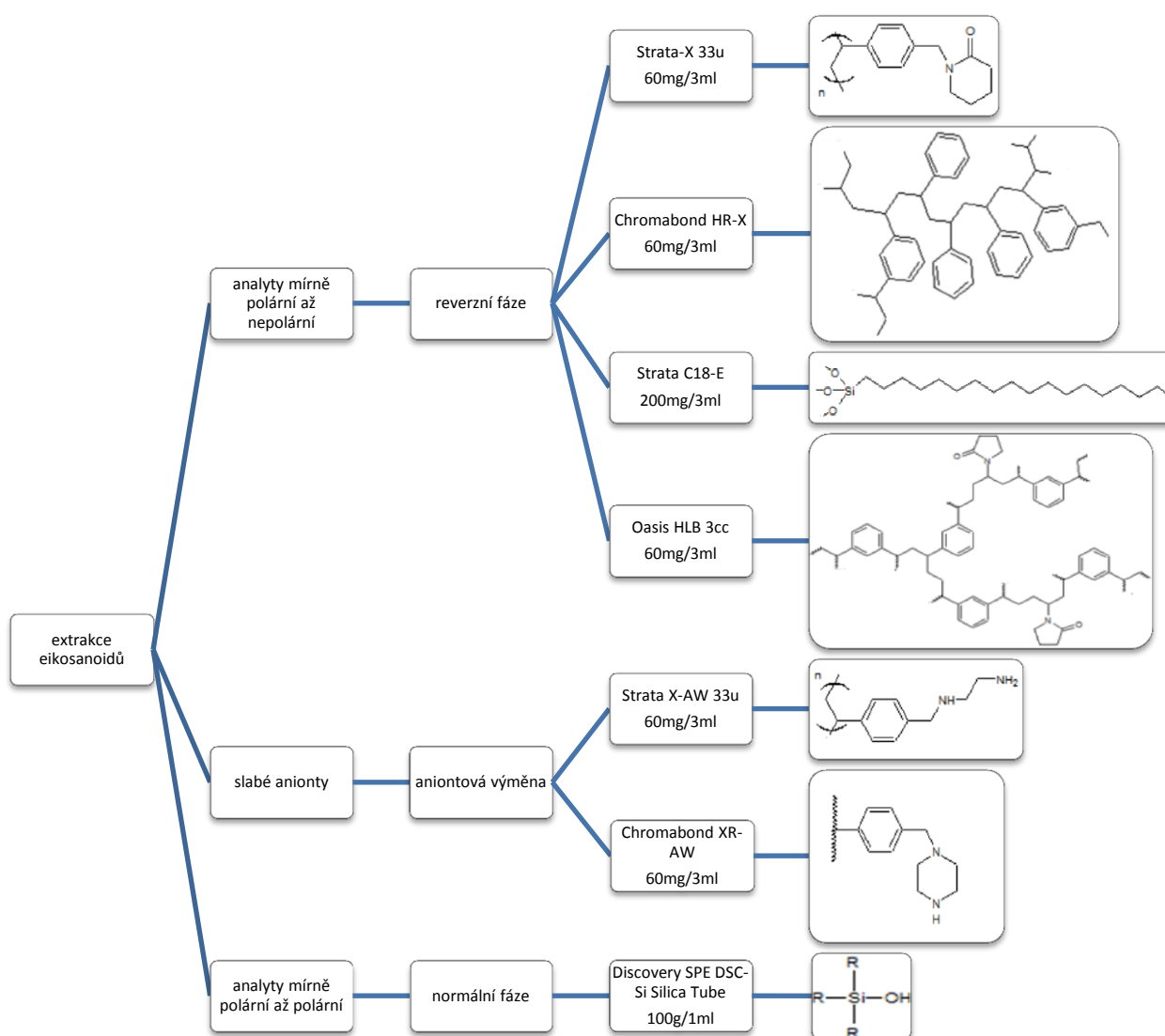
1.3.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

SPE je jednostupňová metoda rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá (tj. fáze stacionární) a jedna kapalná (tj. fáze mobilní). Používají se různé typy tuhých fází a tomu také odpovídají různé mechanismy sorpce (**obrázek 3**). Většinou se plní do krátkých kolonek (polymerní a silikagelové sorbenty), vzorkovacích terčů s průměrem kolem 3 cm a s tloušťkou aktivní vrstvy 1 mm (např. pro analýzy ovzduší) či trubic naplněných rozpouštědlem (např. analýzy organických látek ve vodách). Kolonky se odlišují typem tuhé fáze, objemem kolonky, maximální průtokovou rychlostí, kapacitou tuhé fáze, minimálním a maximálním elučním objemem a také materiálem kolonky (PP, sklo).

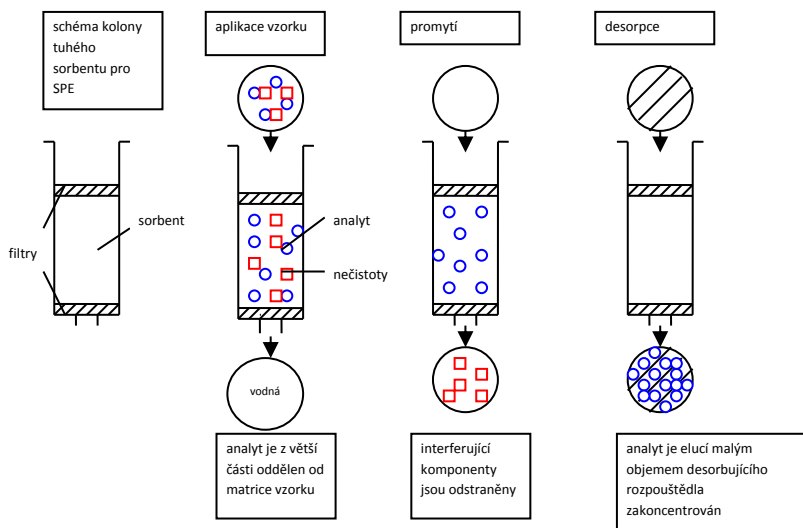
SPE lze použít k odstranění rušivých složek matrice, nakoncentrování vzorku, izolaci stopových látek nebo změně rozpouštědla vzorku. Proces SPE se skládá z několika kroků: předúprava (kondicionace) kolonky, dávkování vzorku, promývání, sušení, eluce (vymývání).

V první fázi kondicionace se kolonka propláchne vhodným rozpouštědlem (aktivace pevné fáze pro interakce se vzorkem) a následně rozpouštědlem podobným vzorku (úprava prostředí pro vlastní vzorek). Následuje dávkování vzorku, při němž dochází ke specifickým reakcím látek s tuhou fází a to podle druhu tuhé fáze a vzorku. Žádaná skupina látek se selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) procházejí volně kolonkou. Promýváním kolonky vhodným rozpouštědlem dojde k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky a žádané látky zůstávají sorbovány na pevné fázi. Pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku. Nyní se kolonka promývá elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci žádaných látek z tuhé fáze a k jejich vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále upravuje, např. pro chromatografickou analýzu (**obrázek 4**).

Technika SPE má řadu výhod, mezi ně patří rychlost, selektivita, citlivost, dobrá opakovatelnost, možnost automatizace a snadné spojení s řadou analytických metod (GC - FID/MS, HPLC – MS) [5, 27].



Obrázek 3: Dostupné typy kolonek SPE, rozdělené podle typu extrakce, objemu kolonek (ml), hmotnosti sorbentu (mg) a struktury sorbentu.



Obrázek 4: Schéma metody extrakce tuhým sorbentem („solid phase extraction = SPE“).

a) Normální fáze (NP)

NP slouží k extrakci polárních analytů z nepolárních organických rozpouštědel. Mechanismus je založen na vodíkových vazbách, dipól – dipól a $\pi - \pi$ interakcích mezi polárním analytem a polární stacionární fází. Vysoké specifity extrakce lze dosáhnout optimalizací polarity rozpouštědel pro kondicionaci a ředění vzorku. Analyty mohou být eluovány už pomocí nízkých koncentrací polárních organických rozpouštědel, jako je methanol nebo isopropanol s nepolárními organickými rozpouštědly [5, 6].

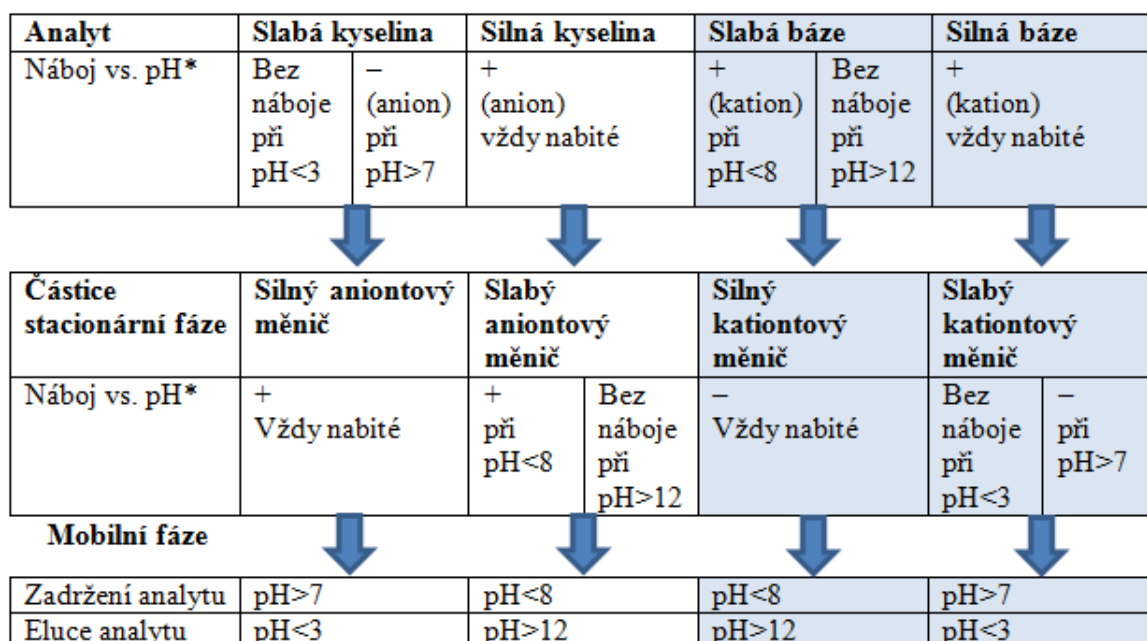
b) Reverzní fáze (RP)

Reverzní fáze SPE jsou užívány pro extrakci hydrofobních nebo polárních organických analytů z vodného vzorku. Vazby analytu i sorbentu jsou k sobě přitahovány pomocí van der Waalsových sil. Běžně RP sorbenty obsahují nasycené uhlíkové řetězce jako např. u C18 nebo aromatické kruhy (fenyl). Extrakce na reverzní fázi je relativně nespecifická a proto je důležité optimalizovat extrakční podmínky a složení promývacích rozpouštědel. Analyty jsou typicky eluovány organickými rozpouštědly jako je methanol nebo acetonitril v kombinaci s vodou, kyselinami, zásadami či jinými rozpouštědly [5, 6].

c) Iontová výměna (IEX)

IEX SPE používá pro extrakci analyty z vodných nebo organických vzorků. V nabitých sorbentech se drží analyty opačného náboje. Například pozitivně nabitý analyt obsahující aminy jsou drženy na negativně nabitých katechách (kationtové měniče), jako jsou sulfonové nebo karboxylové kyseliny. Naproti tomu negativně nabitý analyt obsahující sulfonové kyseliny nebo karboxylové kyselé skupiny jsou drženy na kladně nabitých anexech (aniontové měniče) obsahujících amino skupinu. IEX mechanismy jsou založeny na vysoce specifických coulombických interakcích mezi sorbentem a analytem. Většina kontaminantů je odstraněna během vymývacích kroků extrakce. Analyty jsou typicky eluovány silnými kyselinami či zásadami.

Katexy a anezy jsou dále rozděleny na slabé nebo silné měniče, v závislosti na typu iontové skupiny a jeho povrchu. Silné katexy mají kyselý povrch, např. sulfonová kyselina, která je vždy ionizovaná (záporně nabitá) v celém rozsahu pH. Slabé katexy mají také kyselý povrch, ale používají karboxylovou kyselinu, která je negativně nabitá při vysokém pH, ale bez náboje při nízkém pH. Podobně silné anezy nesou kvartérní amoniové skupiny, které jsou vždy kladně nabitě, zatímco slabé anezy mají primární, sekundární a terciální aminoskupiny, které mohou být kladně nabitě při nízkém pH, neutrální při vysokém pH (obrázek 5) [5, 7].



Obrázek 5: Schéma slabé a silné výměny iontů.

1.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

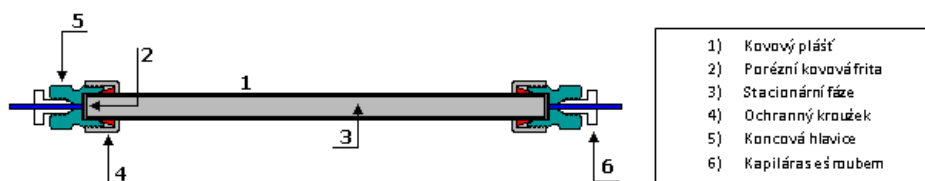
Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické metody s kapalnou mobilní fází. HPLC vznikla v počátcích 70. let a vychází z teoretických a praktických poznatků GC. Podobně jako SPE kolony jsou kolony určené pro HPLC vyráběny s různými typy sorbentů a jejich funkčních skupin (obrázek 6).

HPLC se používá pro separaci komplikovaných směsí látek. Vysoký tlak zajišťuje průtok mobilní fáze (jednotky až desítky MPa), proto se HPLC také překládá jako vysokotlaká kapalinová chromatografie. Citlivé detektory umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony a signál detektoru je dále zpracován počítačem (obrázek 7).

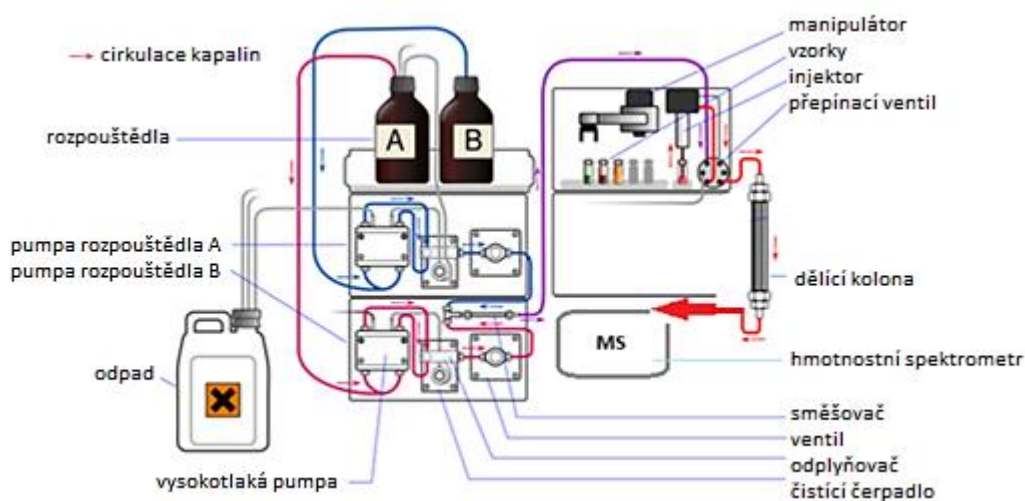
Mezi výhody HPLC patří široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (asi 80 % veškerých známých látek), nevýhodou je pak náročnější instrumentace. Separace závisí na vlastnostech analyzovaných látek a jejich interakcích s mobilními a stacionárními fázemi, na typu a vlastnostech stacionární fáze, na složení mobilní fáze, na geometrických parametrech kolony, dávkovacího zařízení, detektoru, na průtoku a pracovní teplotě. Použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, lze dosáhnout vysoké účinnosti. Prvním typem je chromatografie s normálními fázemi (NP) s polární stacionární a nepolární mobilní fází a obráceným typem je chromatografie reverzní (RP), která je dnes nejpoužívanější metodou HPLC v praxi.

RP-HPLC se používá k separaci látek, mezi něž patří většina léčiv, biochemických sloučenin a jiných látek používaných člověkem. U této metody má stacionární fáze nepolární charakter a mobilní fáze je polární. Nejčastějším nosičem stacionární fáze je silikagel, na jehož povrchové hydroxylové skupiny se naváže vhodný ligand – např. oktadecylový uhlíkatý řetězec (-C18), oktylový uhlíkatý řetězec (-C8), kyano skupina (-CN) aj. Jako mobilní fáze se používají nejčastěji směsi vody či pufru s polárními organickými rozpouštědly (zejména acetonitril či methanol). Molekuly rozpuštěných látek interagují se stacionární fází podle své polaritativy - polární látky interagují se stacionární fází málo, či vůbec a jsou eluovány nejdříve a s klesající polaritou látek vzrůstá jejich zadržování (retence) v koloně. Retence látek vzniká na základě jejich hydrofobních interakcí se stacionární fází. Zpravidla se pracuje v režimu gradientové eluce, při níž se během analýzy snižuje polarita mobilní fáze (vyšším přírůstkem organické fáze), což umožňuje rychlejší eluci nepolárních látek z kolony. Je-li složení mobilní fáze během celé separace konstantní, jde o tzv. izokratickou eluci.

Při gradientové eluci se pracuje s mobilními fázemi odlišného složení, které se míchají ve směšovači HPLC aparatury podle předem zvoleného programu. Toto uspořádání umožňuje rychlou eluci složek silněji zadržovaných v koloně a jejich píky v chromatogramu jsou potom užší, ostřejší oproti izokratické eluci. Díky tomu je možné tyto složky detekovat i při nižších koncentracích. Zároveň je možné vhodnou volbou gradientu optimalizovat separaci mnohasložkových směsí. Nevýhodou je však drift základní linie, nezbytný čas na ekvilibraci kolony na počáteční složení mobilní fáze a možnost použití jen některých typů detektoru [5, 8].



Obrázek 6: Chromatografická kolona [8].



Obrázek 7: HPLC aparatura. Rozpouštědla jsou smíchána a stlačena vysokým tlakem procházejí kolonou, vzorek je nakonec analyzován pomocí hmotnostního spektrometru [31].

1.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Základní podmínkou hmotnostní spektrometrie je ionizovatelnost měřených analytů. Hmotnostní spektrometr se skládá z několika hlavních částí zahrnujících iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor iontů a zdroj vakua.

Ionty vznikají v iontovém zdroji. Pro analýzu lipidů nejčastěji používáme měkké ionizační techniky. Z analytů vstupujících do iontového zdroje společně s matricí (mobilní fáze z kapalinového chromatografu, doprovodné složky vzorku) vznikají kladně nebo záporně nabitě ionty molekulární (M^+ , M^-), aduktové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_4]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ ap.) nebo v některých případech méně stabilních látek i fragmenty ionizované molekuly. Příkladem měkké ionizační techniky používané ve spojení s HPLC/MS je elektrosprej (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Dalším měkkým iontovým zdrojem je MALDI, ten se obvykle používá ve spojení s průletovým analyzátozem (TOF), či iontovou cyklotronovou rezonancí (FTICR).

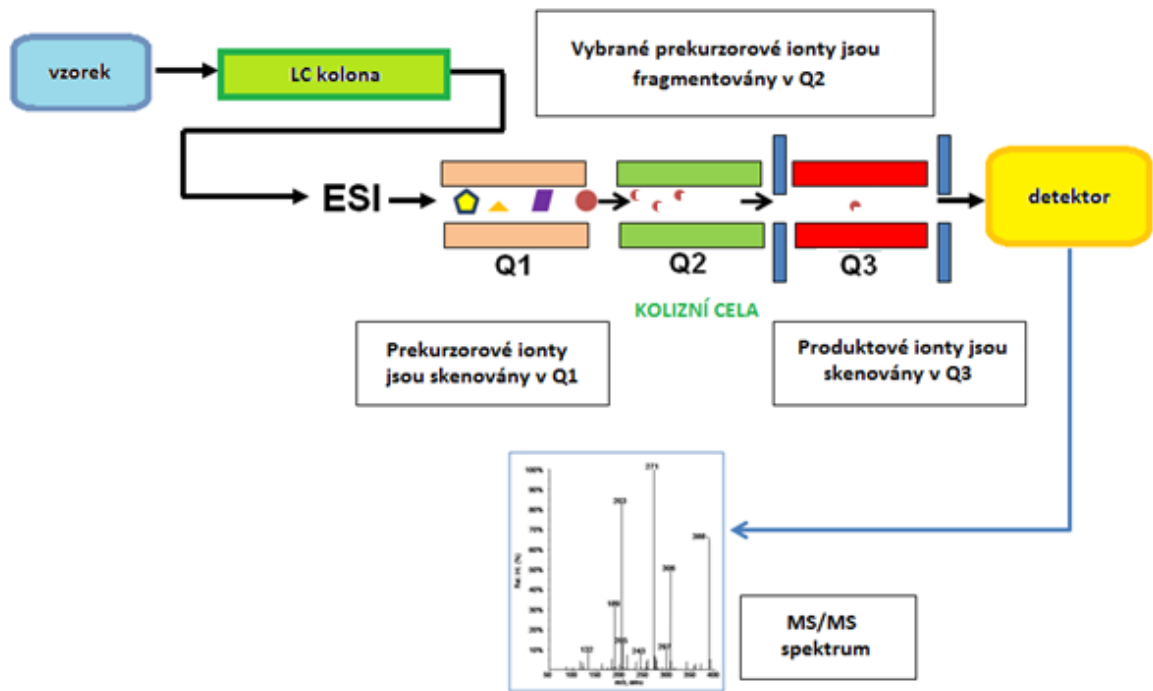
Vzniklé ionty procházejí iontovou optikou do hmotnostního analyzátoru. Příkladem hmotnostního analyzátoru je kvadrupólový analyzátor (jednoduchý, trojitý), iontová past, průletový analyzátor (TOF) nebo hybridní (QTOF, QTRAP). Detektor iontů poskytuje signál úměrný počtu dopadajících částic [5, 9].

1.3.5 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

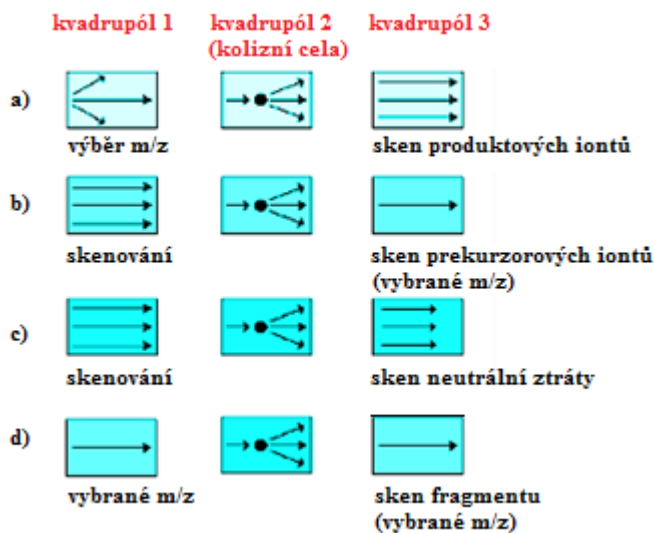
Základním předpokladem úspěšného spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací. Z hlediska instrumentální kompatibility s kapalinovým chromatografem neexistuje žádné omezení při volbě hmotnostního analyzátoru. Nejčastěji používaným je kvadrupólový hmotnostní analyzátor a mezi výhody LC/MS s těmito analyzátozem je dostatečná citlivost a vysoká rychlost skenování. Kvadrupól je tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno napětí.

Trojitý kvadrupól je tvořen třemi kvadrupóly zapojenými sériově za sebou, první a třetí kvadrupól slouží jako filtry hmot a druhý kvadrupól slouží jako kolizní cely (**obrázek 8**) [10]. Po separaci analytů na LC a jejich převedení na ionty pomocí iontového zdroje, jsou tyto ionty vedeny iontovou optikou do prvního kvadrupólu. Ionty jsou vedeny do kolizní cely, kde dochází (na základě zvolené kolizní energie) k fragmentaci. Takto vznikají produktové ionty, které jsou vedeny do třetího kvadrupólu. Detektorem iontů může být elektronásobič, popřípadě fotonásobič.

Existuje několik typů skenování s použitím trojitého kvadrupólu (**obrázek 9**): a) skenování produktových iontů: Q1 je nastaven na ion se specifickým m/z , Q3 skenuje určitý interval m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji, se vybere jeden (Q1) a po fragmentaci v Q2 se pomocí Q3 sledují všechny jeho fragmenty, b) skenování prekurzorových iontů: Q1 skenuje určitý interval m/z , Q3 je nastaven na ion se specifickým m/z , tzn. že Q1 postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q3 sleduje, zda a v jaké míře z nich vzniká fragment s nastavenou hodnotou m/z , c) skenování ztráty neutrální částice (NL): Q1 skenuje interval m/z , Q3 zároveň skenuje interval s m/z nižší o určitou konstantní hodnotu, tzn. Q1 postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q3 sleduje, zda a v jaké míře při fragmentaci ztrácejí ze své struktury neutrální část dané hmotnosti, d) monitorování vybraných reakcí (MRM): Q1 a Q3 jsou nastaveny na ionty se specifickým m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji, se vybere jeden (Q1) a po fragmentaci v Q2 se pomocí Q3 vybere jeden fragment, který prochází až do detektoru [11, 28, 29].



Obrázek 8: Schéma detekce pomocí LC/MS. Vzorek prochází přes LC kolonku, následuje nástřik elektrosprejem, ionty jsou skenovány v prvním kvadrupólu, fragmentovány v druhém kvadrupólu (kolizní cela), fragmenty jsou skenovány v třetím kvadrupólu a pomocí fotonásobiče zaznamenány detektorem.



Obrázek 9: Typy skenování v MS [9].

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je optimalizovat metodu pro analýzu eikosanoidů v komplexních biologických vzorcích. Specifickými úkoly jsou a) osvojení si základů práce s kapalinovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, b) porovnání extrakčních metod pro eikosanoidy, c) testování alternativních metod extrakce lipidů pro analýzu eikosanoidů a d) stanovení koncentrace eikosanoidů v biologických vzorcích.

3 Experimentální část

Popis použitých metod a jejich parametrů, chemikálií a přístrojů.

Přístroje:

- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Rapid Separation LC System (Dionex, USA)

PUMPA

Rozsah průtoku	0,05–8 mL/min (0.001–8 mL/min)
Přesnost průtoku	± 0,1%
Rozsah tlaku	2-103,4 MPa až do 5 mL/min, 2-80 MPa až do 8 mL/min
Odplynění rozpouštědla	Externí

AUTOSAMPLER

Objem nástřiku	0,01–100 µL (1–100 µL)
Rozsah	Volitelný: 0,2–25 µL, 1,5–250 µL, 1,5–500 µL
Přesnost nástřiku	± 0,5 % na 20 µL
Doba cyklu	< 15 s pro 5 µL
Termostat – ohřev vzorku	4–45 °C

PROSTOR PRO KOLONY

Předeheřívání mobilní fáze	2 µL
Teplotní rozsah	5 °C–110 °C (min. 18 °C)

DETEKTOR

Typ detektoru	Diode Array
Počet kanálů	8 + 3D pole
Rozsah vlnových délek	190–800 nm
Doporučený průtok	Semi-micro, 2,5 µL, 7 mm dráha [31]

- hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB SCIEX Instruments, USA)

TROJITÝ

KVADRUPÓL

Rychlost skenování	50 Da/s QQQ, 200-20000 Da/s LIT
Dwell time	5 ms

Rozsah m/z 5 - 1250
 Typy skenování Plný sken MS a sken vybraných iontů pro Q1 a Q3, sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sledování rozpadu iontu (SRM), sken neutrální ztráty, rozšířený MS sken, MS3 sken, MRM3 sken, a TripleTrap™ skenovací módy

TripleTrap™ doba cyklu 1,5 s
 skenování

Typ detektoru AcQuRate™ Pulse Counting CEM
 Zdroj ionizace Turbo V™ zdroj s TurboIonSpray®
 Průtok 5 µL/min až 3 mL/min
 Software Analyst® 1.6.1 software [32]

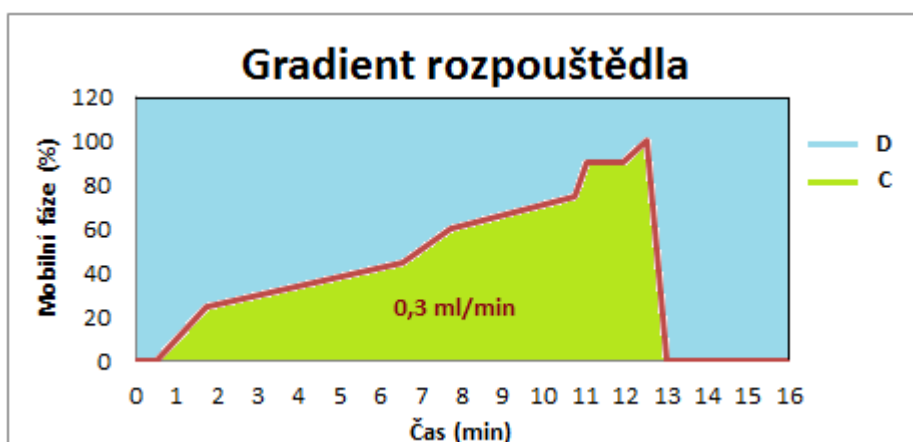
– oscilační mlýnek MM400 (Retch, Gemany)

Princip snížení velikosti náraz, tření
 Vstupní velikost ≤ 8 mm
 materiálu
 Konečná jemnost ~ 5 µm
 Počet mlecích stanic 2
 Počet míst pro uložení 2 × 9
 Nastavení frekvence 3 - 30 Hz (180 až 1800 min⁻¹)
 vibrací
 Průměrná doba mletí 30 s - 2 min [33]

Použitá metoda LC/MS:

Extrakt jsem analyzovala na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 Rapid Separation LC System (Dionex, USA), pro chromatografii jsem použila kolonu Kinetex C18, 150 x 2,1 mm, 2,6 µm (Phenomenex, USA) a detekovala hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB SCIEX, USA) za použití elektrospreje – Turbo Spray, teplota zdroje 550 °C, gradientová eluce (**obrázek 10**) - mobilní fáze C 30 % acetonitril s 0,02 % kyselinou octovou ve vodě, mobilní fáze D acetonitril – isopropanol 50:50, objem nástřiku 10 µl, průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, negativní mód, MRM skenování (**tabulka 1**).

Time (min)	C %	D %
0	100	0
0,53	100	0
1,73	75	25
6,53	55	45
7,73	40	60
10,73	25	75
11,03	10	90
11,93	10	90
12,5	0	100
13	100	0
16	100	0



Obrázek 10: Dávkování rozpouštědla C a D v průběhu eluce. Při gradientové eluci se pracuje s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvyšování její eluční síly.

Tabulka 1: MRM přechody analyzovaných eikosanoidů.

	MRM (m/z)	Q1→Q3 CE (V)	DP (V)
5-HETE	319→115	-20	-80
(d8) 5-HETE	327→116	-20	-80
12-HETE	319→179	-20	-80
(d8) 12-HETE	327→183	-20	-80
15-HETE	319→219	-15	-70
(d8) 15-HETE	327→226	-20	-80
PGD2	351→189	-25	-70
(d4) PGD2	355→275	-25	-70
TXB2	369→169	-25	-75
6-keto-PGF1a	369→163	-35	-85
AA	303→259	-17	-140

3.1 Optimalizace ionizace eikosanoidů na hmotnostním spektrometru

Optimalizovala jsem parametry hmotnostního spektrometru QTRAP 5500 (AB SCIEX, USA) za použití přímé infúze vzorku do iontového zdroje (ESI), dávkování 10 $\mu\text{l}/\text{min}$: kolizní energii (CE), která určuje sílu fragmentace v kolizní cele, deklasterační potenciál (DP) pro zajištění optimální desolvatace bez vyvolání fragmentace pro MRM přechody PGD2. Rozmezí hodnot kolizní energie jsem nastavila na -5 až -40 V postupně po 5 V. Hodnoty deklasteračního potenciálu jsem měřila po 10 V intervalech od -120 do 0. Nastavenou metodou jsem měřila optimální hodnoty vykazující nejvyšší intenzitu.

3.2 Optimalizace separace podle délky HPLC kolony

Pro analýzu jsem použila vzorek standardů (Cyclopentenone Prostaglandin HPLC mixture, catalog no. 10000, Cayman Chemical, USA - směs prostaglandinů PGE2, PGD2, PGB2, PGA2, PGJ2, 15d-PGJ2). Koncentrace prostaglandinů ve směsi byla 6 ng/ml. K dispozici jsem měla tři chromatografické kolony Kinetex (Phenomenex, USA) o různých délkách 150 x 2,1 mm, 2,6 μm , 100 x 2,1 mm, 2,6 μm , 50 x 2,1 mm, 1,7 μm . Zjišťovala jsem vliv parametrů kolony na separaci PGE2 a PGD2, velikost a tvar píků.

Pro jednotlivé kolony jsem vypočítala [5] počet teoretických pater n (tj. účinnost kolony):

t_R je retenční čas

w je šířka píku při základně

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (1)$$

výškový ekvivalent teoretického patra H :

L je délka kolony

$$H = \frac{L}{n} \quad (2)$$

a rozlišení dvou píků $R_{1,2}$:

w_1, w_2 jsou šířky píků při základně.

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{w_2 + w_1} \quad (3)$$

3.3 Popis použitých SPE metod

Pro extrakci eikosanoidů jsem vyzkoušela tři různé způsoby SPE. Každá z kolonek má jiné složení tuhé fáze, vyžaduje jinou úpravu vzorku, kondicionaci kolony, jiné promývací a eluční rozpouštědlo. Porovnála jsem jejich účinnost při analýze eikosanoidů.

3.3.1 Reverzní fáze

Chemikálie:

- roztok methanolu - 100 ml methanol, 0,1 ml kyselina octová, 100 mg butylhydroxytoluen
- antioxidační roztok - 4 ml butylhydroxytoluen (2 mg/ml), 4 ml ethylendiamintetraoctová kyselina (2 mg/ml)
- ethylacetát
- methanol
- hexan
- promývací roztok - 10 ml 100 % methanol, 0,2 ml kyselina octová, 190 ml voda

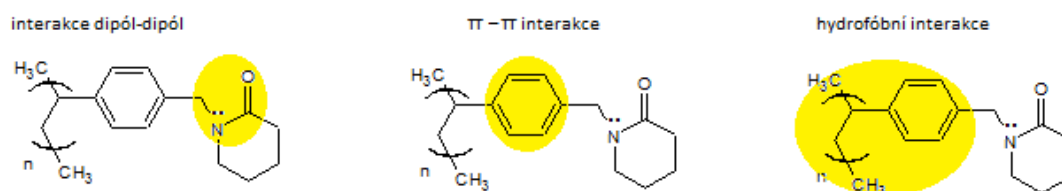


Obrázek 11: Schéma analýzy vzorku pomocí kolonek reverzní fáze.

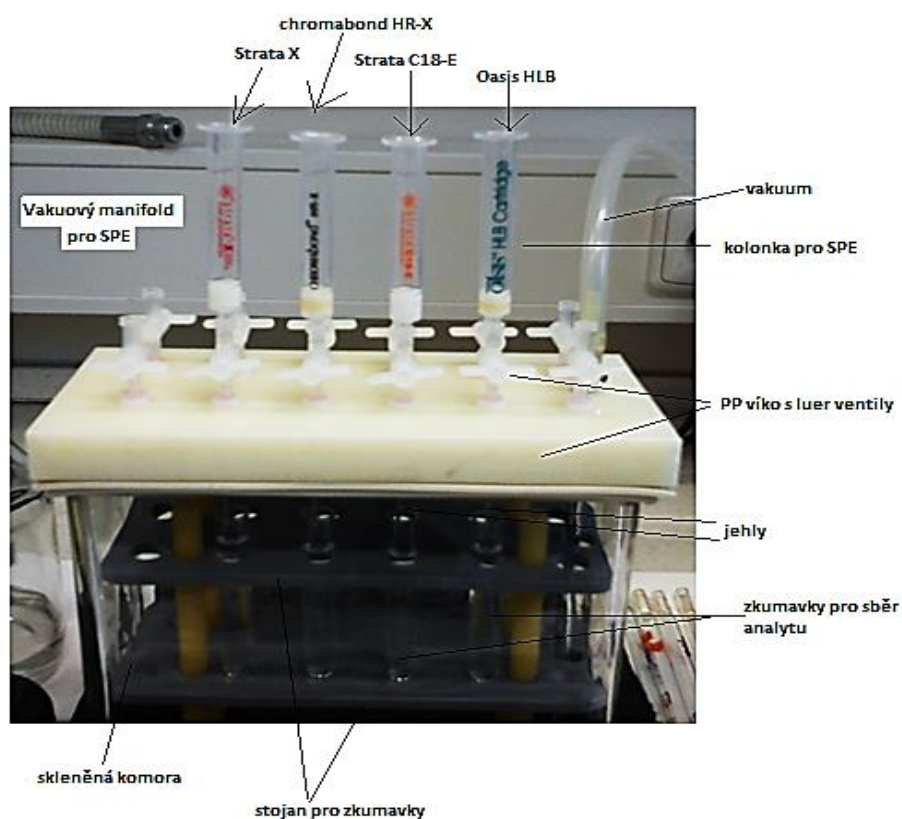
Použila jsem kolony od čtyř různých výrobců: Strata X 60 mg/3 ml, 33 µm (Phenomenex, USA), Chromabond HR-X 60 mg/3 ml, 45 µm (Macherey-Nagel, Germany), Strata C18 200 mg/3 ml, 55 µm (Phenomex, USA) a Oasis HLB 60 mg/3 ml, 30 µm (Waters, USA), (obrázek 3, obrázek 11, obrázek 12). Nejdříve jsem odvážíla 50 mg bílé tukové tkáň (WAT), přidala jsem 450 µl studeného roztoku methanolu, 10 µl roztoku antioxidantů a vzorek jsem uložila na 30 minut do -80 °C. Vzorek jsem homogenizovala na oscilačním mlýnku MM400 a poté centrifugovala 12000 g, 10 minut při 4 °C. Supernatant jsem odebrala do skleněné zkumavky a přidala vodu pro vytvoření 15 % roztoku methanolu.

Použila jsem dvanáctipozicový vakuový manifold se skleněnou komorou a pro extrakci jsem připravila čtyři SPE kolonky od různých výrobců (**obrázek 13**). Kolonky jsem promyla 3 ml ethylacetátu, 3 ml methanolu a dvakrát 3 ml promývacího roztoku. Vzorek jsem nanesla na kolonky a přidala dvakrát 3 ml promývacího roztoku (včetně promytí zkumavky) a sorbent jsem vysušila proudem vzduchu. Promyla jsem 3 ml hexanu pro odstranění zbytku vody z kolony. Eluovala jsem do zkumavky s 10 μ l 30 % glycerolu v methanolu 2 ml ethylacetátu a 2 ml methanolu. Eluát jsem odpařila dusíkem a rezidua rozpustila ve 100 μ l methanolu, přefiltrovala (mikrozkumavky s filtrem Durapore PVDF 0,1 μ m, Merc Millipore, Germany) 12000 g, 10 minut při 4 °C a uložila do -80 °C [12].

Strata X:



Obrázek 12: Mechanismy reakcí na kolonce Strata X.



Obrázek 13: Schéma SPE manifoldu a použité kolonky s reverzní fází.

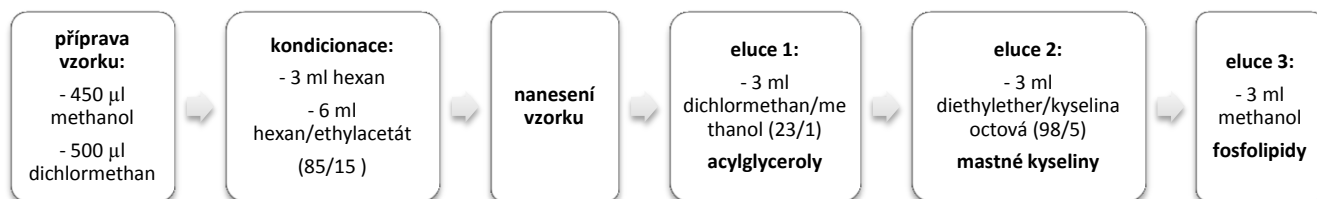
3.3.2 Frakcionace na Strata-X

Kolonku Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) jsem použila pro identifikaci jednotlivých fází extrakce. Použila jsem metodu již aplikovanou na kolonky reverzní fáze (viz 3.3.1) a do vzorku k extrakci jsem pipetovala 5 ng deuterovaných standardů 5(S)-HETE- d_8 , 12(S)-HETE- d_8 , 15(S)-HETE- d_8 , Prostaglandin $\text{D}_2\text{-d}_4$ (Cayman Chemical, USA). V rámci extrakce jsem analyzovala celkem šest frakcí: první eluát byl vzorek v 10 % methanolu, druhý 5 % methanol s 0,1 % kyselinou octovou, třetí 5 % methanol s 0,1 % kyselinou octovou, čtvrtý eluát hexan, pátý ethylacetát a šestý methanol.

3.3.3 Iontová výměna

Chemikálie:

- methanol
- dichlormethan
- hexan
- hexan/ eltylacetát (85/15)
- dichlormethan/methanol (23/1)
- diethylether/kyselina octová (98/5)

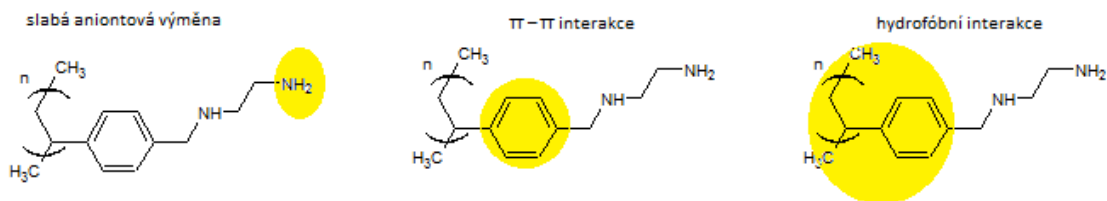


Obrázek 14: Schéma analýzy vzorku pomocí kolonek reverzní fáze.

Použila jsem kolonky od dvou různých výrobců Strata X-AW 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) a Chromabond HR-XAW 60 mg/3 ml, 45 μm (Macherey-Nagel, Germany), (**obrázek 3**, **obrázek 14** a **15**). Vzorek k analýze jsem připravila z 10 mg WAT, homogenizovala na oscilačním mlýnku MM400 s 450 μl 100 % methanolu a přenesla do skleněné zkumavky. Vzorek s methanolem jsem centrifugovala 3000 g, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$. Čistý supernatant jsem odebrala do zkumavky s 10 μl 30 % glycerolu v methanolu a odpařila methanol dusíkem. Peletu jsem extrahovala s 500 μl dichlormethanu 20 minut, vzorek centrifugovala stejně jako v předchozím případě a odebrala supernatant, který jsem přidala do zkumavky, z které jsem předtím odpařila methanol. Výsledných 500 μl vzorku jsem odpařila dusíkem zhruba na polovinu objemu.

Kolonku jsem promyla 3 ml hexanu a 6 ml hexan/ethylacetát (85/15). Nanesla jsem vzorek a eluovala jednotlivé frakce do zkumavek s 10 μl 30 % glycerolu v methanolu. Nejdříve jsem eluovala acylglyceroly dvakrát 1,5 ml roztoku dichlormethan/methanol (23/1), dvakrát 1,5 ml roztoku diethylether/kyselina octová (98/5) volné mastné kyseliny a poté zbylé lipidy dvakrát 1,5 ml 100 % methanolu. Vzorky jsem sušila dusíkem, přidala 100 μl MeOH, filtrovala (mikrozkumavky s filtrem Durapore PVDF 0,1 μm , Merc Millipore, Germany) a uložila do -80 $^{\circ}\text{C}$ [13].

Strata X-AW:

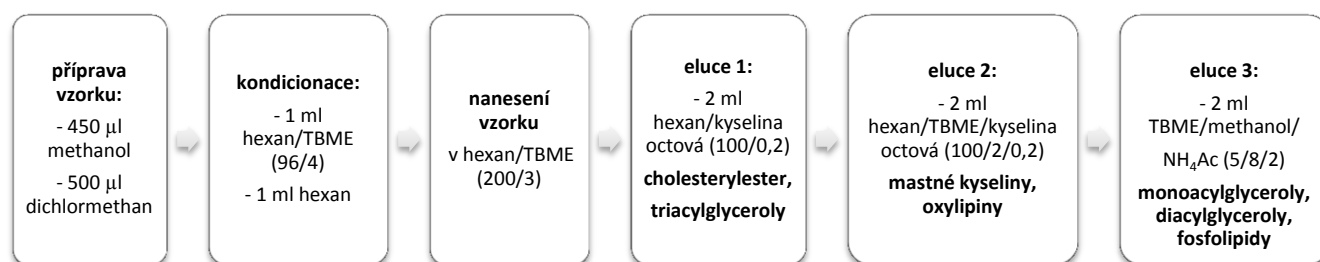


Obrázek 15: Mechanismy reakcí na kolonce Strata X-AW.

3.3.4 Normální fáze

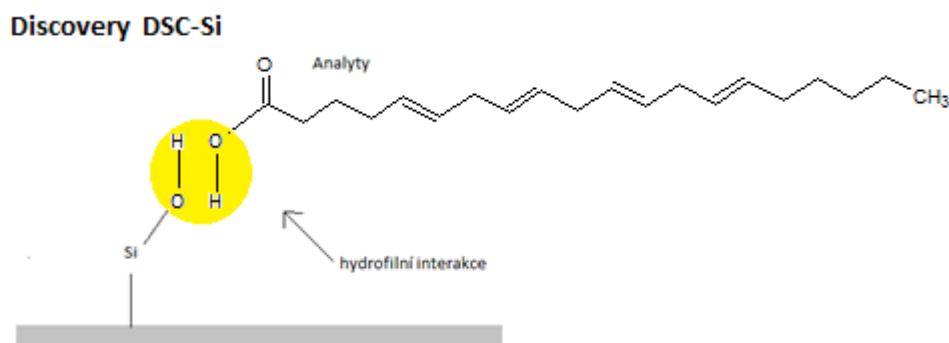
Chemikálie:

- methanol
- dichlormethan
- hexan
- hexan/TBME (96/4)
- hexan/TBME (200/3)
- hexan/kyselina octová (100/0,2)
- hexan/TBME/kyselina octová 100/20,2)
- TBME/methanol/acetát amonný (5/8/2)



Obrázek 16: Schéma analýzy pomocí kolonky normální fáze.

Vzorek k analýze jsem připravila z 10 mg bílé tukové tkáně dle Folche et al. [16]. Neutrální lipidy a fosfolipidy jsem separovala pomocí kolonky Discovery DSC Si-Silica 100 mg/1 ml, 50 µm (Sigma Aldrich, Germany), (**obrázek 16 a 17**). Kolonky jsem kondicionovala dvakrát 0,5 ml hexan/*tert*-butylmethylether (96/4) a dvakrát 0,5 ml hexanu. Vzorek lipidů jsem rozpustila v 200 µl hexan/*tert*-butylmethylether (200/3) a nanasla je na kolonu. Nejdříve jsem eluovala cholesteryl estery a triacylglyceroly 2 ml hexan/kyselina octová (100/0,2), jako druhou frakci jsem eluovala mastné kyseliny a oxylipiny 2 ml hexan/*tert*-butylmethylether/kyselina octová (100/2/0,2) a poslední frakce obsahovala steroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a fosfolipidy, které jsem eluovala 2 ml *tert*-butylmethylether/methanol/acetát amonný pH=8,6 (5/8/2). Vzorky jsem sušila dusíkem a rezidua jsem rozpustila ve 100 µl methanolu, filtrovala (mikrozkumavky s filtrem Durapore PVDF 0,1 µm, Merc Millipore, Germany) [14] a pipetovala do vialek pro LC/MS analýzu, vzorky jsem uložila do -80 °C.



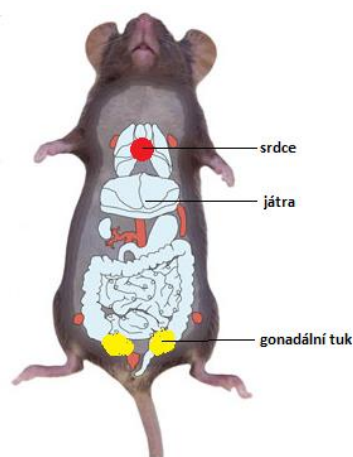
Obrázek 17: Mechanismus reakce na kolonce Discovery DSC Si-Silica.

3.4 Určení množství eikosanoidů v orgánech myši

Chemikálie:

- roztok methanolu - 100 ml methanol, 0,1 ml kyselina octová, 100 mg 0,1 % butylhydroxytoluen
- antioxidační roztok - 4 ml butylhydroxytoluen (2 mg/ml), 4 ml ethylendiamintetraoctová kyselina (2 mg/ml)
- ethylacetát
- methanol
- hexan
- promývací roztok - 10 ml 100 % methanol, 0,2 ml kyselina octová, 190 ml voda

Zjišťovala jsem množství eikosanoidů ve vybraných orgánech myši (**obrázek 18**). Pro extrakci eikosanoidů (PGD2, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE) jsem použila SPE kolonku Strata-X 200 mg, 3 ml, 33 μ m (Phenomenex, USA). K analýze jsem odebrala 50 mg gonadálního tuku, jater a srdce. Ke každé tkáni jsem přidala 10 μ l antioxidačního roztoku a 650 μ l studeného roztoku methanolu, tkáň v methanolu jsem uložila na 30 minut do -80 °C. Po homogenizaci na vymraženém oscilačním mlýnku MM400 jsem homogenát uložila na 30 minut do -80 °C. Poté jsem vzorek centrifugovala 12000 g, 10 min, 4 °C. Odebrala jsem dvakrát 325 μ l supernatantu a přidala jsem dvakrát 2,925 ml vody, pro vytvoření 10 % roztoku methanolu. Vzorek pro analýzu jsem připravila dle metody 3.3.1 [12].



Obrázek 18: Anatomie myši a umístění tukové tkáně [15].

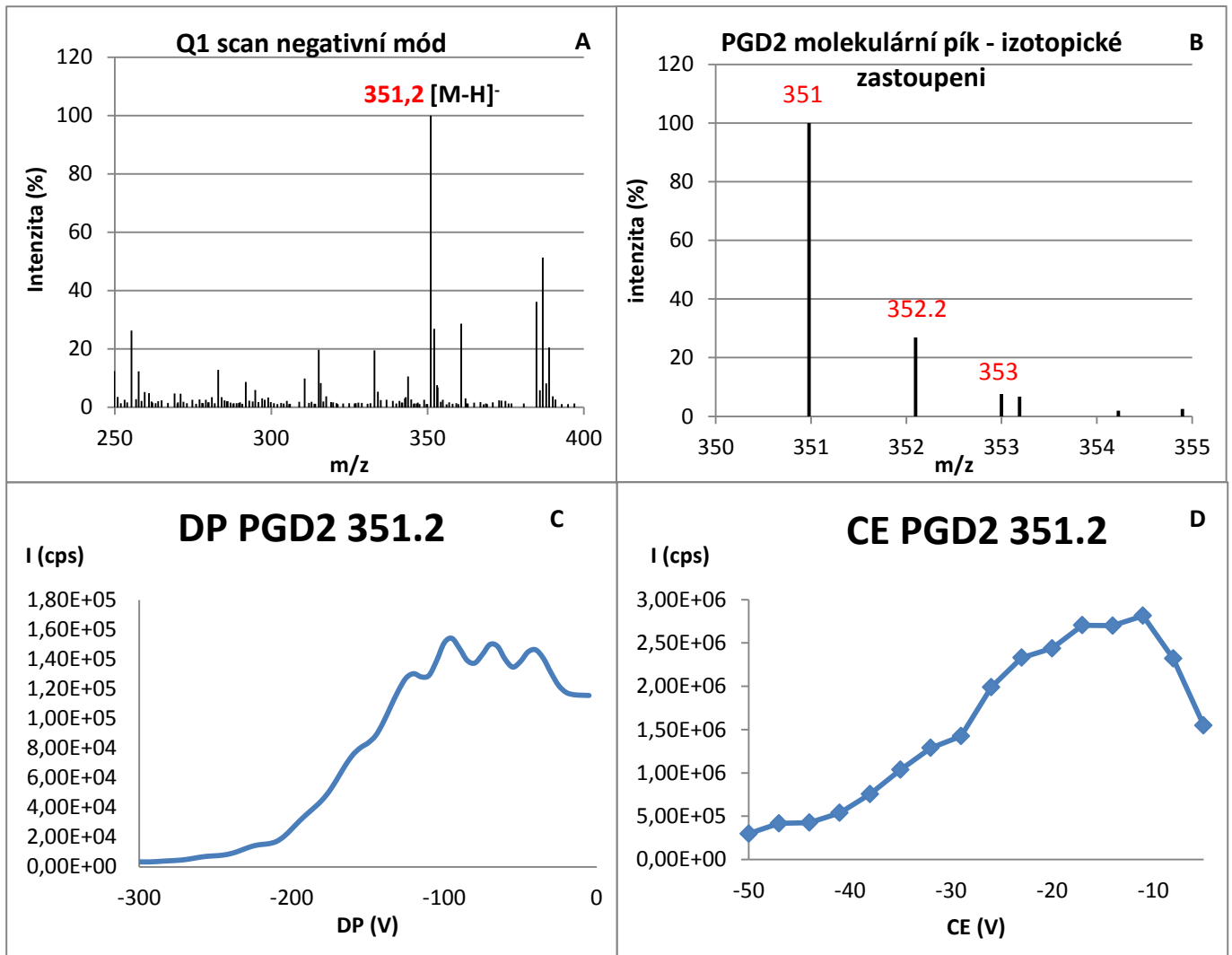
4 Experimentální výsledky

4.1 Optimalizace ionizace eikosanoidů na hmotnostním spektrometru

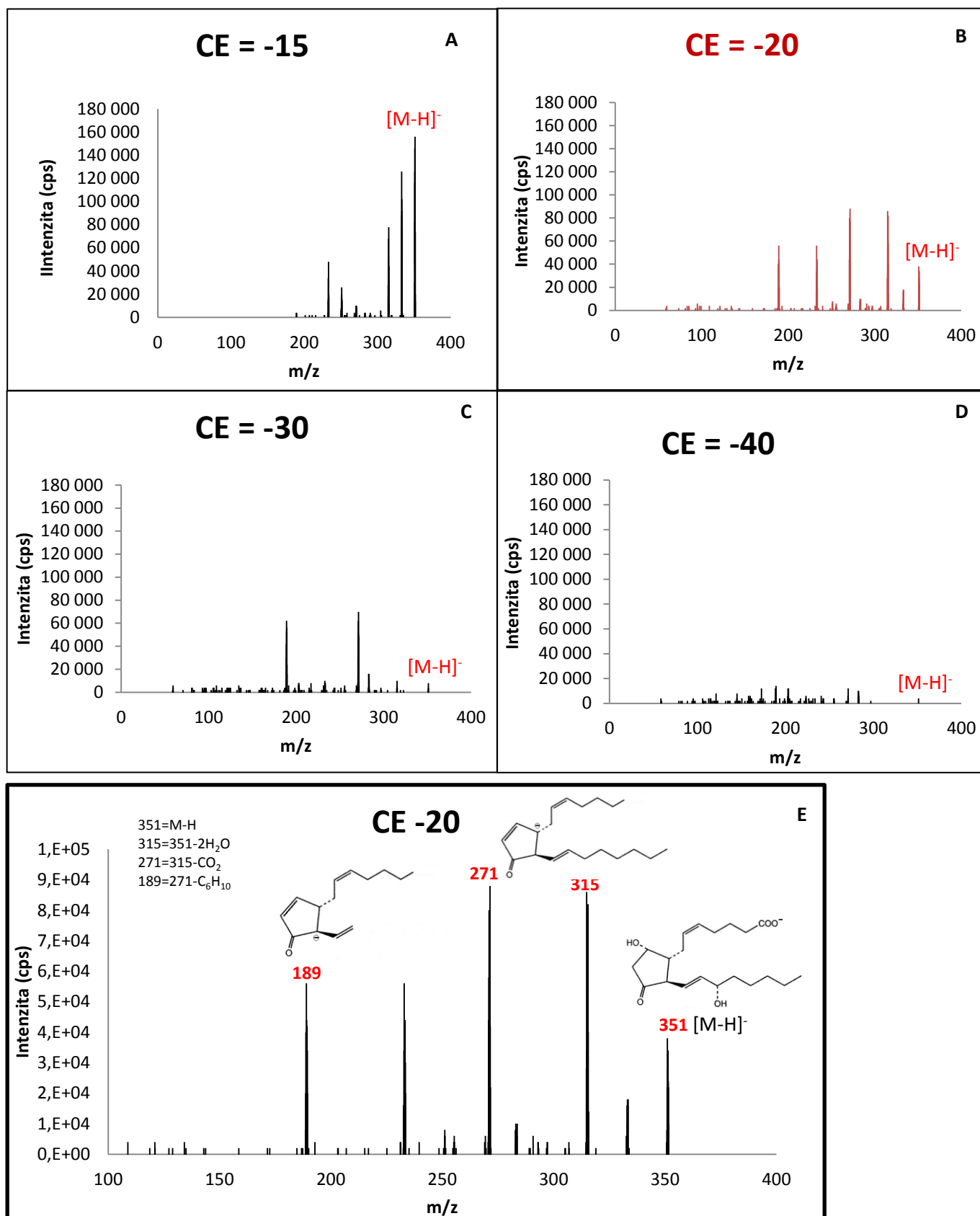
Optimalizovala jsem ionizační parametry hmotnostního spektrometru u PGD2. Optimalizace byla prováděna v negativním módu. Jako první jsem použila Q1 sken relevantního rozsahu hmotnostního spektra pro určení píku PGD2 $[M-H]^-$ (**obrázek 18 A**), při větším rozlišení je dobře vidět izotopické zastoupení PGD2 (**obrázek 18 B**), kde m/z 351 je deprotonovaný PGD2 molekulární ion $[M-H]^-$ s přírodními ^{13}C izotopy s píky m/z 352,2 a 353. Ion PGD2 m/z 351 byl zastoupen 100%, 352,2 - 27 %, 353 - 7%, pro porovnání jsou dány teoretické hodnoty dle [26] pro izotopy PGD2 $[M-H]^-$ m/z 351 - 100 %, 352 - 22,3 %, 353 - 3,3 %.

Určila jsem optimální hodnotu deklasteračního potenciálu PGD2 m/z 351,2, největší intenzitu jsem zaznamenala při nastavení -90 V (**obrázek 18 C**) a kolizní energie, kdy jsem v daném rozsahu -15, -20, -30, -40 V sledovala účinnost fragmentace. Energie -15 V byla příliš nízká, PGD2 se fragmentoval nedostatečně a bylo možné vidět pík m/z 351 s nejvyšší intenzitou, dále m/z 333 a 315, kde PGD2 ztrácela molekuly vody, energie -30 a -40 V byla příliš vysoká a PGD2 se fragmentoval zcela. Jako optimální jsem určila hodnotu -20 V (**obrázek 19 A, B, C, D**), kdy došlo k účinné fragmentaci PGD2 na fragmenty m/z 333 za ztráty molekuly vody, fragment bez dvou molekul vody m/z 315, bez oxidu uhličitého m/z 271 a při ztrátě šestiuhlíkatého řetězce m/z 189 (**obrázek 19 E**).

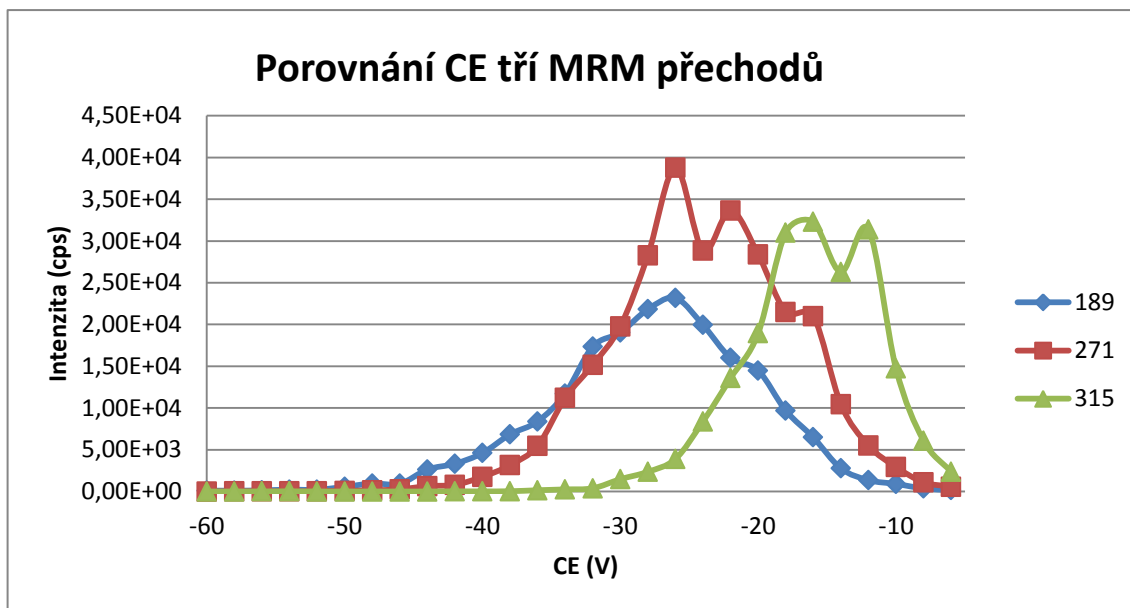
Z optimální nalezené hodnoty kolizní energie jsem vybrala tři fragmenty s nejvyšší intenzitou m/z 315, 271 a 189. Pro tyto tři MRM přechody tj. 351→315, 351→271, 351→189 jsem určila specifické hodnoty kolizní energie, kdy jsem zadala rozpětí -60 V až -5 V a sledovala jsem intenzitu jednotlivých signálů, určující optimální hodnoty CE. Jak je vidět na **obrázku 20** a v **tabulce 2** pro každý MRM přechod lze určit jiný vývoj při fragmentaci a jinou hodnotu CE. Nejvyšší hodnotu jsem určila pro MRM 351→189 a nejnižší pro MRM 351→315.



Obrázek 18: Kroky k určení optimálních ionizačních parametrů PGD2. A) Stanovení full scan spektra PGD2 v negativním modu pro m/z 351, B) jeho izotopické procentuální zastoupení, C) optimální hodnoty deklasteračního potenciálu a D) kolizní energie.



Obrázek 19: Vybrané CE pro zajištění optimální fragmentace $[M-H]^-$ PGD2 m/z 351, A) Nízká CE kdy se PGD2 nedokázal úplně fragmentovat, B) Optimální CE kdy se fragmentuje, C), D) příliš vysoká energie, kdy dochází i k rozbití primárních fragmentů, E) Ukázka optimální CE a fragmentů PGD2 315, 271 a 189.



Obrázek 20: Určení CE pro jednotlivé fragmenty (MRM 351→315, 351→271, 351→189).

Tabulka 2: Optimální hodnoty deklasteračního potenciálu a kolizní energie pro fragmenty PGD2.

MRM Q1→Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	DT (ms)
351→315	-90	-15	5
351→271	-90	-20	5
351→189	-90	-30	5

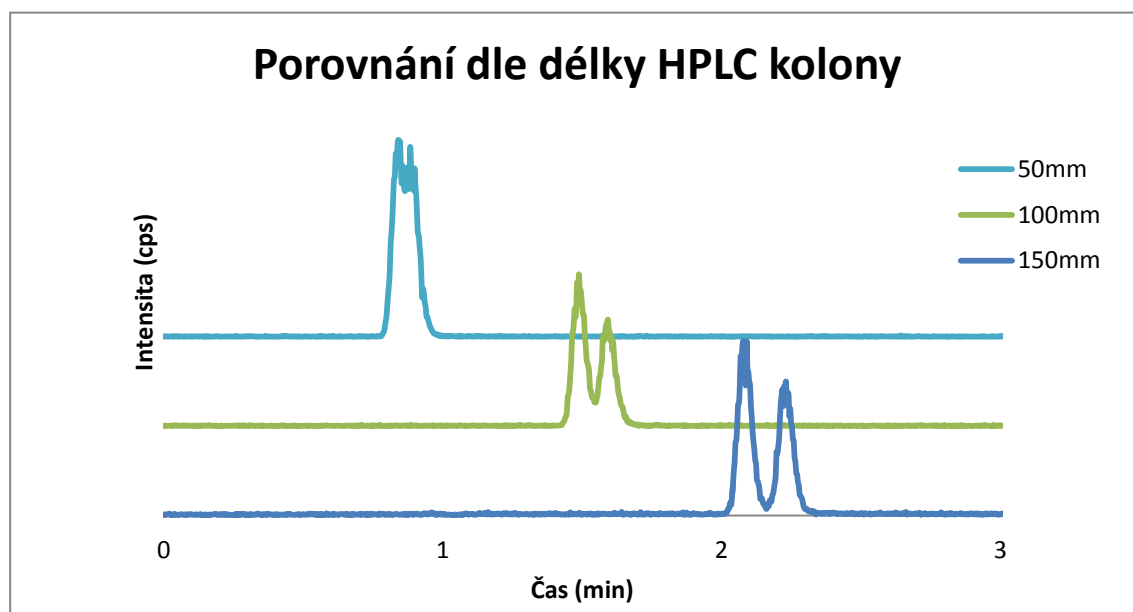
4.2 Optimalizace separace eikosanoidů podle délky HPLC kolony

K dispozici jsem měla 3 chromatografické kolony: 150 x 2,1 mm, 2,6 μm, 100 x 2,1 mm, 2,6 μm, 50 x 2,1 mm, 1,7 μm. Při porovnání jsem sledovala velikost píků PGD2 a PGE2 a jejich vzájemnou separaci při MRM 351→271, negativní mód. Jak lze vidět (**tabulka 3, obrázek 21**), nejkratší kolona (50 mm) má malý retenční čas a k separaci PGE2 a PGD2 nedošlo, u druhé kolony (100 mm) se retenční čas prodloužil a k rozdělení píků částečně došlo, nejdelší kolona (150 mm), kterou jsem používala pro všechny analýzy na kapalinovém chromatografu, vykazuje nejlepší rozlišení píků, separaci, účinnost a nejdelší retenční čas, je tedy nejvhodnější pro analýzu eikosanoidů.

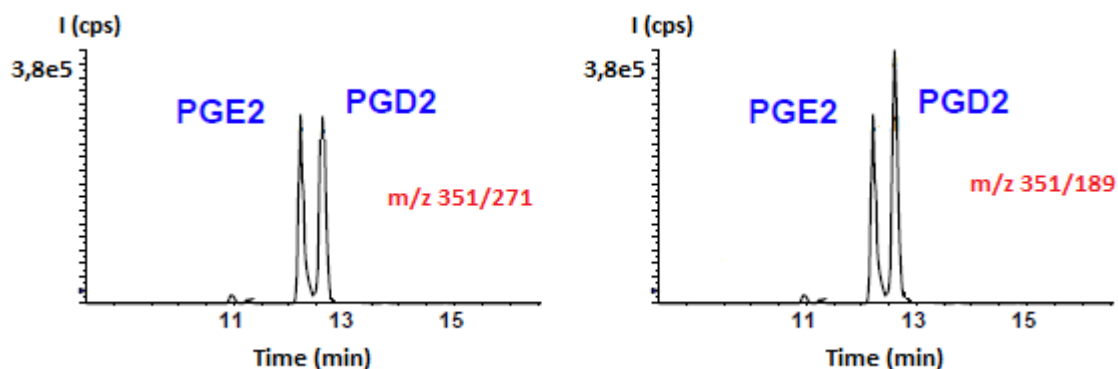
Porovnávala jsem také píky PGE2 a PGD2 při různých MRM přechodech. Přestože MRM 351→271 byl dříve použit pro kvantifikaci PGE2 a PGD2, výsledky ukazují, že MRM 351→189 získává vyšší selektivitu pro analýzu. Oba prostaglandiny sdílejí kvantifikační přechod MRM 351→271, kdy se fragmentují stejně, a není možné je rozeznat. Kvalifikačním MRM přechodem pro PGD2 je tedy 351→189, kdy je na **obrázku 22** vidět větší intenzita píku PGD2, dokazující přítomnost většího množství m/z 189 [18, 19].

Tabulka 3: Charakteristiky jednotlivých chromatografických kolon podle délky.

	délka kolony		
	150 mm	100 mm	50 mm
počet teoretických pater	710	350	220
výškový ekvivalent teoretického patra, mm	0,2	0,3	0,9
rozlišení	1,1	0,7	0,4



Obrázek 21: Porovnání HPLC kolon dle délky, píky eikosanoidů PGE2 a PGD2 (MRM 351→271), se snižováním délky kolon se zároveň snižuje rozlišení píků.



Obrázek 22: Dva MRM přechody a vliv na tvar píků PGD2 a PGE2 [19].

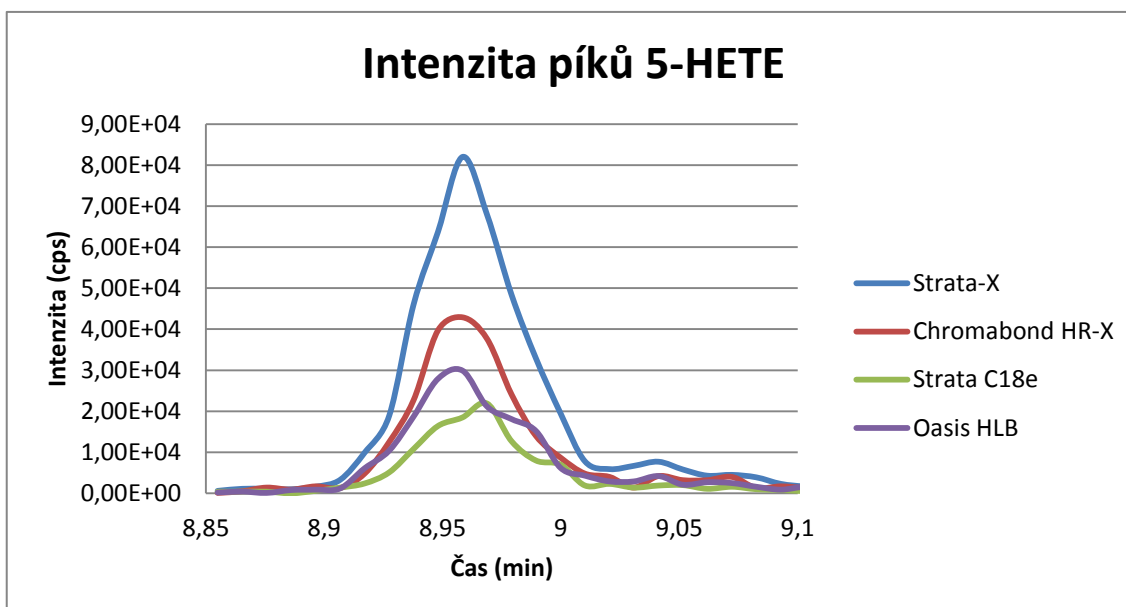
4.3 Porovnání kolonek - reverzní fáze

Porovnála jsem čtyři kolonky od různých výrobců, poskytující podobnou selektivitu založenou na chemických a fyzikálních vlastnostech sorbentu tj. Strata X 60 mg/3 ml, 33 µm (Phenomenex, USA) se styren divinylbenzen kopolymerním sorbentem [12, 21, 22], Chromabond HR-X 60 mg/3 ml, 45 µm (Macherey-Nagel, Germany) obsahující polystyren-divinylbenzen kopolymerní sorbent, Strata C18 200 mg/3 ml, 55 µm (Phenomex, USA) s polymerně vázanou oktadecylovou fází [22, 23] a Oasis HLB 60 mg/3 ml, 30 µm (Waters, USA) obsahující N-vinylpirrolidon divinylbenzen kopolymerní sorbent [17, 20, 22], za použití stejného protokolu extrakce. Cílem bylo určit při použití dané metody SPE nejúčinnější kolonku reverzní fáze, kterou je vhodné použít pro dosažení největšího výtěžku při analýze eikosanoidů, z důvodu omezeného množství lidských vzorků, kdy musí být použita ta nejlepší možná kvantitativní analýza.

Zjišťovala jsem účinnost separace a koncentraci vybraných eikosanoidů (tj. 6-keto-PGF1a, TXB2, PGD2, 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE a AA) v bílé tukové tkáni v závislosti na typu kolonky použité při extrakci (**tabulka 4**). Ve všech případech jsem ve vzorcích detekovala eikosanoidy, které se mi podařilo separovat, ale výsledky se lišily v účinnosti kolonek, tzn. v koncentracích, jaké jsem byla schopná naměřit ve čtyřech vzorcích. Pro přehlednost jsem použila procentuální zastoupení ve vzorku, kdy je vidět, že Strata-X téměř ve všech případech zajišťuje největší odezvu, další použité kolonky vykazují méně než poloviční množství získaná ze vzorku. Odlišnost kolonek je jasně viditelná (**obrázek 23**), pro porovnání jsem použila 5-HETE, kdy stupňovitě klesá množství eikosanoidu v řadě Strata-X, Chromabond-X, Strata-C18e a Oasis HLB.

Tabulka 4: Koncentrace jednotlivých eikosanoidů v tukové tkáni při použití čtyř kolonek od různých výrobců.

	Koncentrace (% m/m)				
	Strata-X	Chromabond-X	Strata-C18e	Oasis HLB	RT(min)
6-keto-PGF1a	100,00	21,85	22,37	26,26	2,85
TXB2	100,00	34,29	2,94	31,62	3,35
PGD2	100,00	36,92	12,31	10,72	3,86
15-HETE	100,00	57,41	24,50	35,01	8,39
12-HETE	100,00	41,37	22,05	26,91	8,69
5-HETE	100,00	55,65	27,70	39,19	8,96
AA	100,00	176,00	167,50	155,00	10,90

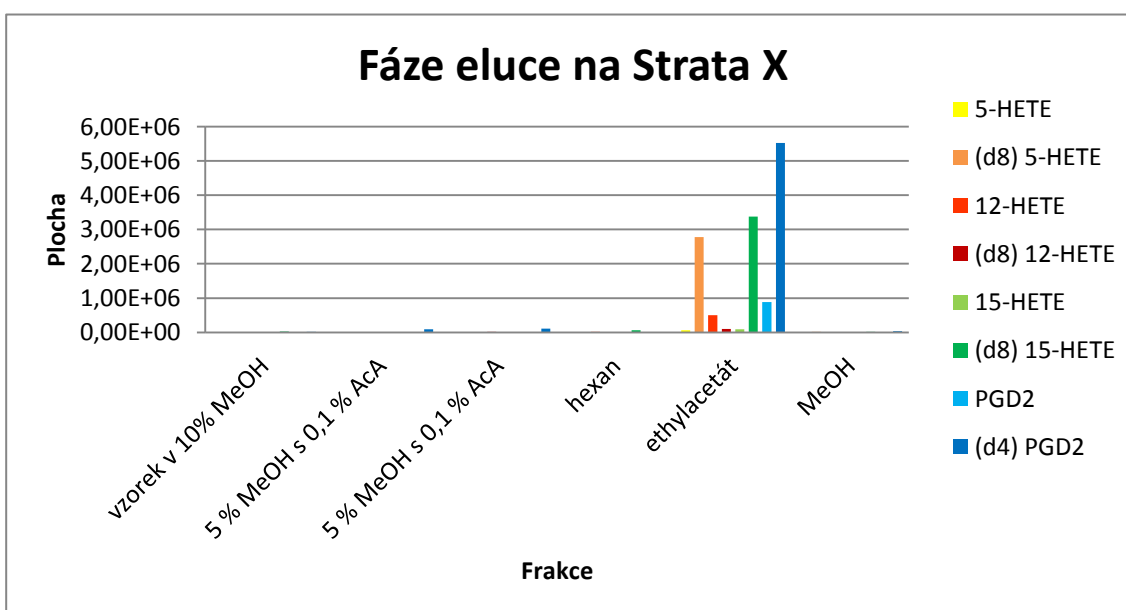


Obrázek 23: Porovnání kolonek reverzní fáze, účinnost detekce 5-HETE v tukové tkáni.

Analýzou za použití kolonek s reverzní fází jsem zjistila, že pro separaci a detekci eikosanoidů pomocí této metody je neúčinnější Strata-X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA).

4.4 Efektivita frakcionace na Strata-X

Extrakci na kolonce Strata-X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) jsem rozdělila do šesti kroků, kdy se postupně eluovaly jednotlivé lipidové třídy: cholesterylestery, acylglyceroly, mastné kyseliny a fosfolipidy. Eikosanoidy 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, PGD2 a jejich deuterované standardy 5(S)-HETE-d₈, 12(S)-HETE-d₈, 15(S)-HETE-d₈, Prostaglandin D₂-d₄ jsem identifikovala v páté frakci eluované ethylacetátem (**obrázek 24**).



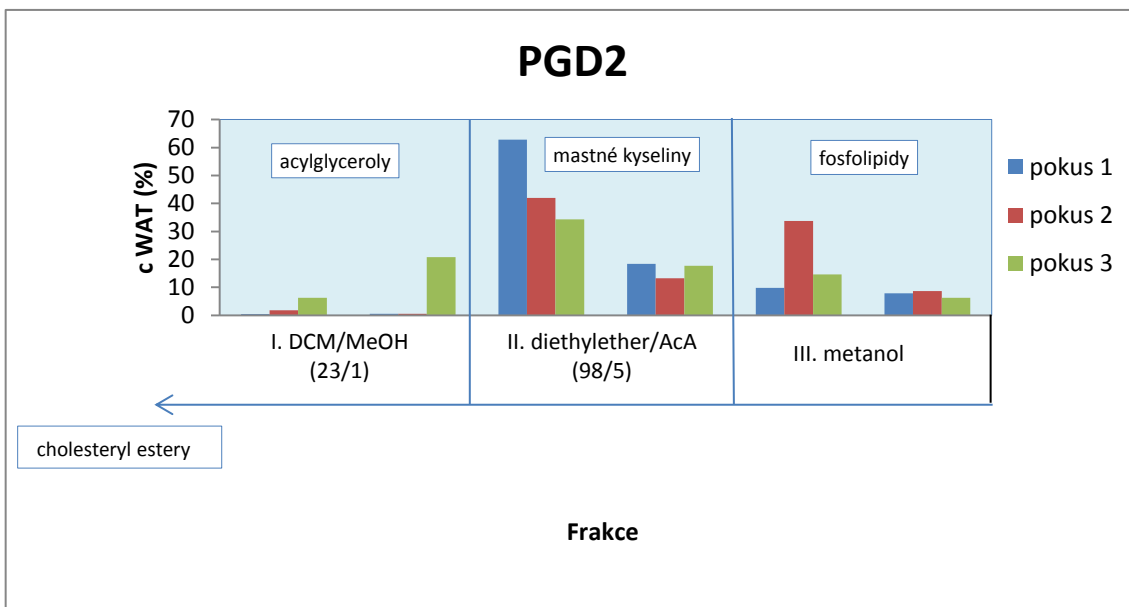
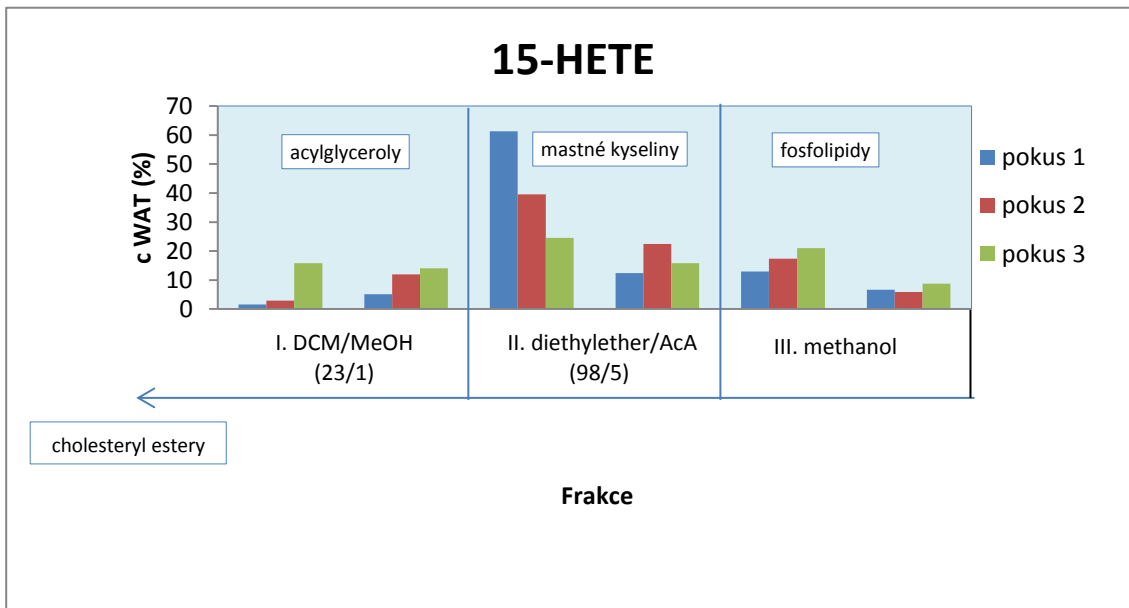
Obrázek 24: Jednotlivé fáze eluce. Eikosanoidy byly eluovány ethylacetátem jako pátá frakce.

4.5 Porovnání kolonek - iontová výměna a normální fáze

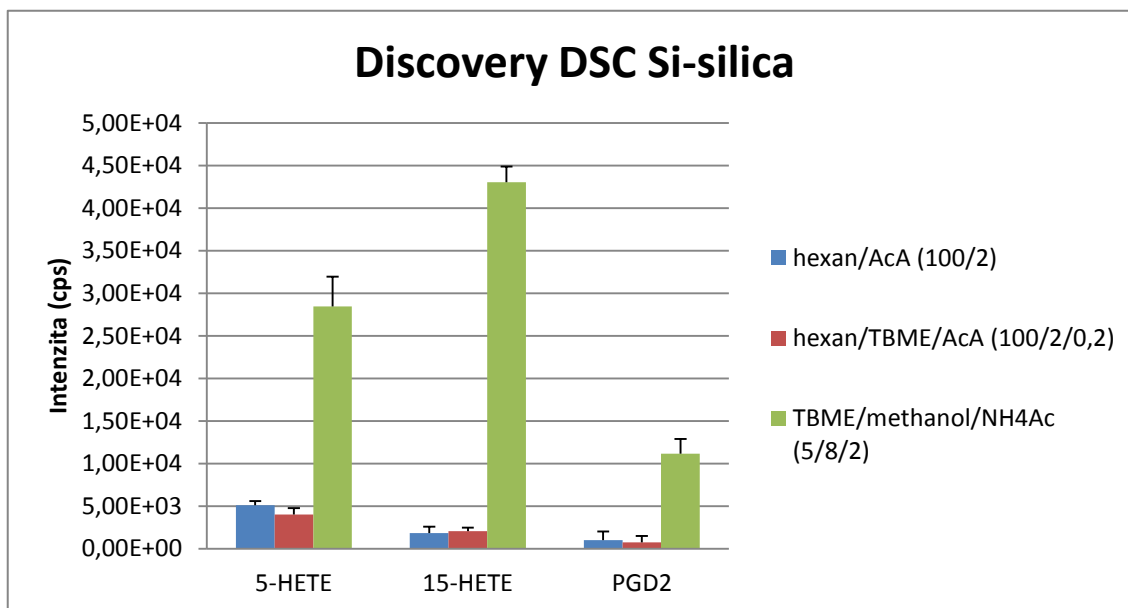
Porovnávala jsem dvě kolonky Strata X-AW 60 mg/3 ml, 33 µm (Phenomenex, USA) se styren divinylbenzen kopolymerním sorbentem s primárními a sekundárními aminovými skupinami a Chromabond HR-XAW 60 mg/3 ml, 45 µm (Macherey-Nagel, Germany) obsahující polystyren divinylbenzen polymerní sorbent a aminovými skupinami, umožňující zadržení eikosanoidů [6, 7]. Eluce probíhala ve třech fázích: acylglyceroly, mastné kyseliny a fosfolipidy, které jsem pro přesnost rozdělila do šesti elučních kroků, aby bylo možné přesně sledovat eluci eikosanoidů. Ty měly být eluovány v druhé fázi pomocí celkem 3 ml diethylether/kyselina octová (98/5). Použitá metoda na kolonce Strata X-AW [13] se projevila jako neúčinná při cílené analýze eikosanoidů ve vzorku, které vzhledem k rozmanitosti struktur nebyly v daných fázích eluce separovány a byly eluovány mezi všemi fázemi extrakce, proto jsem se rozhodla ji dále pro analýzu nepoužívat a zaměřila jsem se na kolonku Chromabond HR-AW, kde jsem docílila separace eikosanoidů.

Porovnávala jsem píky vybraných eikosanoidů (tj. PGD2, 15-HETE). Eikosanoidy se eluovaly nejvíce v druhé fázi, ale výsledky nejsou opakovatelné (**obrázek 25**) takto použitá metoda na kolonce Chromabond HR-AW není robustní, i malé změny podmínek ovlivní konečný výsledek extrakce. Vzhledem k malému množství vzorku, který máme pro analýzu k dispozici, se na tuto metodu nelze spolehnout, výsledky nedosahují účinnosti a spolehlivosti separace pomocí kolonek reverzní fáze.

Při porovnávání jsem měla k dispozici i kolonku Discovery DSC Si-Silica 100 mg/ 1 ml, 50 µm (Sigma Aldrich, Germany), obsahující nejpolarnější sorbent, používaný jako normální fáze pro separaci molekul postupnou elucí rozpouštědly se stoupající polaritou, principem lze přirovnat k TLC [7]. Za použití dané metody [14], nedošlo k separaci eikosanoidů od neutrálních lipidů a fosfolipidů, protože jejich fyzikální a chemické vlastnosti jsou natolik specifické, že je nelze takto jednoduchým mechanismem účinně separovat. Eikosanoidy byly eluovány *tert*-butylmethylether/methanol/acetát amonný pH=8,6 (5/8/2) ve třetí frakci (**obrázek 26**).



Obrázek 25: Procentuální koncentrace eikosanoidů v tukové tkáni během šesti fází eluce za použití kolony Chromabond HR-AW. Eikosanoidy byly nejvíce zastoupeny v druhé fázi extrakce.

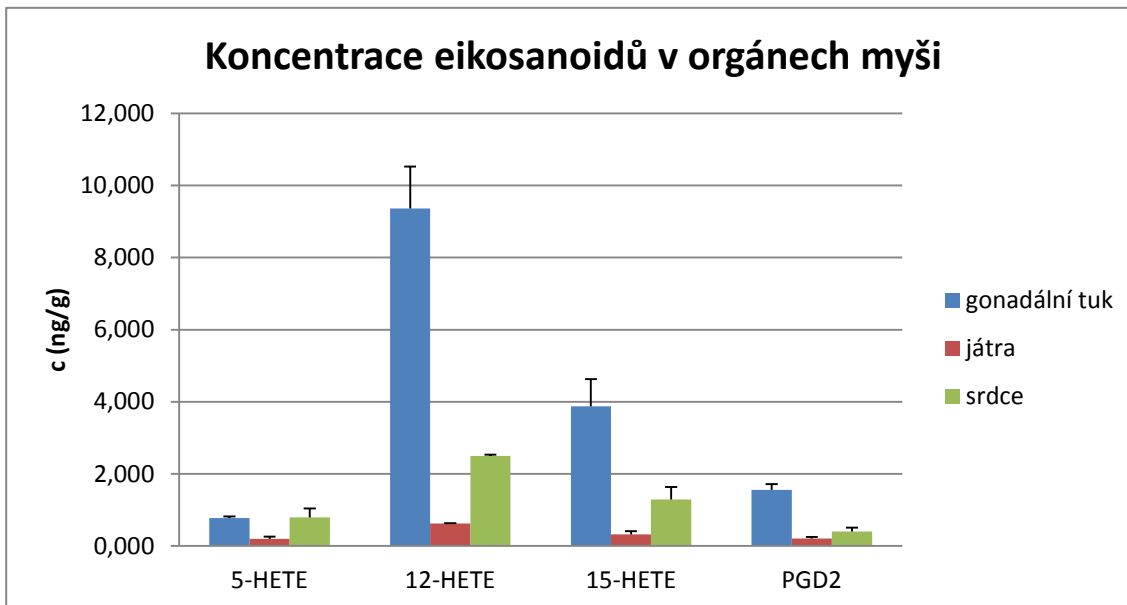


Obrázek 26: SPE za použití normální fáze. Eluce eikosanoidů ve třetí fázi extrakce.

4.6 Množství vybraných eikosanoidů v orgánech myši

Množství eikosanoidů v tkáních závisí na množství AA v buněčných membránách a na místní tvorbě těchto mastných kyselin z prekurzorů PUFA. Důležitým regulátorem produkce eikosanoidů je typ buněk, protože typ buňky definuje poměry a množství různých enzymů, které jsou v buňce aktivní. Různé enzymy vedou k produkci různých eikosanoidů, a ty se tím pádem podílejí na různých fyziologických procesech.

Tímto pokusem jsem chtěla ukázat schopnost vytváření eikosanoidů v širokém spektru orgánů. Množství vybraných eikosanoidů jsem stanovila ve vybraných orgánech myši tj. gonadální tuk, játra a srdce. Naměřené hodnoty jsem získala použitím metody extrakce na pevné fázi a následně ESI-HPLC/MS detekce a porovnála jsem je s hodnotami již naměřenými, kde Balvers et al. [17] a Morgantini et al. [36], uvádí koncentrace jednotlivých eikosanoidů v játrech a tukové tkáni. Největší koncentraci zaujímá 12-HETE a celkově největší zastoupení eikosanoidů je v tukové tkáni. Toto tvrzení jsem pokusem potvrdila (**obrázek 27, tabulka 5**). Různé odchylky v měření poukázaly na rozmanitost tvorby eikosanoidů v různých částech odebírané jaterní a srdeční tkáně. Při odběru tkáně jsem se proto snažila použít jen specifickou část tj. u jaterní tkáně okraj pravého laloku, u srdce svalovinu ze špičky, tak abych získala co nejpřesnější výsledky o místní produkci eikosanoidů.



Obrázek 27: Koncentrace eikosanoidů 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE a PGD2 naměřené v tkáních myši.

Tabulka 5: Koncentrace jednotlivých eikosanoidů v tukové tkáni, játrech a srdci myši.

c (ng/g)	5-HETE	12-HETE	15-HETE	PGD2
gonadální tuk	0,77 ± 0,04	9,36 ± 1,17	3,88 ± 0,75	1,55 ± 0,16
gonadální tuk*	0,32	47,36	4,77	4,30
játra	0,19 ± 0,06	0,62 ± 0,01	0,32 ± 0,09	0,20 ± 0,05
játra*	0,2	15,8	1,70	0,58
játra**	-	1,55±0,81	0,83±0,40	0,47±0,33
srdce	0,79 ± 0,25	2,49 ± 0,03	1,29 ± 0,35	0,40 ± 0,10

*koncentrace eikosanoidů dle Balvers et al. [17].

**koncentrace eikosanoidů dle Morgantini et al. [36].

5 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat analýzu eikosanoidů. Použila jsem metodu extrakce na pevné fázi, kdy jsem testovala možnosti extrakce eikosanoidů v závislosti na typu kolonek podle složení sorbentů, podle reakcí na kolonkách (reverzní, normální fáze a iontová výměna) a typu rozpouštědel použitých k eluci. Dle literatury [12, 21, 22] je zřejmé, že pro analýzu eikosanoidů jsou nejvhodnější kolony s reverzní fází, vzhledem k schopnosti účinně zadržet eikosanoidy a pro rychlý a snadný postup při extrakci. Toto se potvrdilo i v experimentální části, kdy jsem pomocí kolonek reverzní fáze dosáhla separace eikosanoidů, což dokázala následná HPLC/MS analýza, kdy píky dosahovaly největší intenzity proti metodám použitým pro normální fázi a iontovou výměnu, kde se metoda projevila jako nestabilní a eikosanoidy jsem detekovala mezi fázemi. Tato metoda se ukázala jako robustní a dobře opakovatelná, což je jeden z rozhodujících faktorů při dostupnosti minimálního množství vzorku k analýze. Metoda aplikovaná na kolony s iontovou výměnou Chromabond AW není robustní a extrakce na kolonkách s normální fází Discovery se projevila jako nespecifická, tudíž nepoužitelná pro efektivní analýzu eikosanoidů.

Optimalizovala jsem další parametry pro analýzu eikosanoidů a to účinnost HPLC kolon v závislosti na jejich délce. Na chromatogramech bylo viditelné, že čím delší je kolona, tím delší je eluční čas, a tím lepší rozlišovací schopnost. Nejlepší výsledky jsem naměřila při použití nejdelší kolony Kinetex 150 mm × 2,1 mm, 2,6 μm, kterou jsem nadále používala pro HPLC/MS analýzu eikosanoidů v tkáních. V následujícím experimentu jsem se zaměřila na PGE2 a PGD2, které jsou detekovány vždy společně jako dvojpík s malým rozdílem v retenčních časech. Pomocí nejdelší kolony byly rozděleny, nijak se nepřekrývaly a naměřila jsem největší plochu tzn. koncentraci těchto eikosanoidů. Kolony 100 mm a 50 mm měly kratší retenční čas a nízkou účinnost, v 50 mm kolony nedošlo k rozdělení dvou píků vůbec.

Zabývala jsem se i optimalizací ionizace, kdy jsem určovala hodnoty kolizní energie a deklasteračního potenciálu nejvhodnější pro analýzu PGD2 a jeho fragmentů. Postupně jsem od Q1 skenu určila pík PGD2 [M-H]⁻ m/z 351,1 a současně jeho izotopové zastoupení, kde se se snižující intenzitou prokázaly následující píky iontu PGD2 m/z 352 a 353 se zastoupením 27 % a 7 %.

Pomocí nastavení hmotnostního spektrometru jsem určila křivku kolizní energie a deklasteračního potenciálu, kde jsem pomocí intenzity odezvy detektoru určila optimální hodnotu energie v kolizní cele -20 V a deklasterační potenciál -90 V. Zároveň jsem poukázala na výskyt fragmentů 315, 271 a 189. Pro tyto MRM přechody jsem dále učila pro ně specifické křivky kolizní energie.

Získaných znalostí z celého procesu analýzy eikosanoidů týkajících se extrakce, kapalinové chromatografie, ionizace a hmotnostní detekce jsem využila při určení koncentrace těchto látek ve vybraných orgánech myši. V tomto experimentu jsem se zaměřila na gonadální tuk, srdeční, jaterní tkáň a několikanásobným opakováním analýzy jsem určila koncentraci eikosanoidů porovnanou s Balvers et al. [17], Morgantini et al. [36] a zároveň proměnlivost v tvorbě těchto látek v závislosti na typu a části jednotlivých tkání. Stanovila jsem množství 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE a PGD2, kdy největší koncentrace byly zjištěny v tukové tkáni a 12-HETE byla celkově ve všech orgánech tvořena nejvíce.

6 Závěr

Optimalizací extrakce na pevné fázi byla potvrzena nejlepší účinnost kolonek reverzní fáze, konkrétně kolonky Strata-X 60mg/3ml, 33 μ m (Phenomenex, USA). Nejlepší vlastnosti jsem prokázala u nejdelší HPLC kolony Kinetex 150 \times 2,1 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, USA). Při optimalizaci parametrů ionizace hmotnostního spektrometru pro detekci PGD2 jsem určila hodnotu kolizní energie -20 V a deklasteračního potenciálu -90 V. Ve vybraných orgánech myši jsem stanovila koncentrace jednotlivých eikosanoidů. Nejvíce byla zastoupena 12-HETE. Všechny eikosanoidy byly nejvíce obsaženy v tukové tkáni.

7 Literatura

1. Lipid maps: Tutorials and lectures on lipids. Dostupné z URL: <http://www.lipidmaps.org/resources/tutorials/lipid_tutorial.html#D> [cit. 18. 10. 2013]
2. Lipid Library: Eicosanoid Structures and Key Enzymes. Dostupné z URL: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/eicintro/index.htm>> [cit. 18. 10. 2013]
3. Harizi, H.; Corcuff, J. B.; Gualde, H.: Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine* 14, 461-469 (2008).
4. Bligh, E.G.; Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917 (1959).
5. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum, Praha 2004.
6. Phenomenex, Inc.: SPE Reference Manual & Users Guide, SPE Method Solution Guide. Dostupné z URL: <<http://www.gen-lab.hu/dokumentumok/speusers.pdf>> [20. 10. 2013]
7. Waters: SPE method development. Dostupné z URL: <http://www.waters.com/waters/en_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845> [cit. 20. 10. 2013]
8. Douša, M.: Teorie HPLC/ Základy HPLC. Dostupné z URL: <www.hplc.cz> [cit. 21. 10. 2013]
9. Poustka, J.: Hmotnostní spektrometrie, (2007). Dostupné z URL: <[http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM 20MS 20PRINCIP 20A 20IONIZACE 20 20102007.pdf](http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20MS%20PRINCIP%20A%20IONIZACE%2020102007.pdf)> [cit. 24. 10. 2013]
10. Holčápek M.; Jandera P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy* 92, 278-286 (1998).
11. Fryčák, P.; Lemr, K.; Adam, T.; Hušková, R.: Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím moderních ionizačních technik. *Chemické listy* 97, 93-100 (2003).
12. Dumlaio, D. S.; Buczynski, M. W.; Norris, P. C.; Harkewicz, R.; Dennis, E. A.: High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acyl ethanolamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 724-36 (2011).
13. Bodennec, J.; Koul, O.; Aguado, I.; Brichon, G.; Zwingelstein, G.; Portoukalian, J.: A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *The Journal of Lipid Research* 41, 1524-31 (2000).
14. Hamilton, J. G.; Comai, K.: Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids* 23, 1146-9 (1988).
15. Reid, F.: *A Field Guide to Mammals of North America North of Mexico*. Boston, Houghton Mifflin 2006.
16. Folch, J.; Lees, M.; Sloane, S. G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal for Biological Chemistry* 226, 497-509 (1957).
17. Balvers, M. G.; Verhoeckx, K. C.; Bijlsma, S.; Rubingh, C. M.; Meijerink, J.; Wortelboer, H. M.: Fish oil and inflammatory status alter the n-3 to n-6 balance of the endocannabinoid and oxylipin metabolomes in mouse plasma and tissues. *Metabolomics* 12, 1130-1147 (2012).
18. Brose, S. A.; Thuen, B. T.; Golovko, M. Y.: LC/MS/MS method for analysis of E2 series prostaglandins and isoprostanes. *The Journal of Lipid Research* 52, 850-859 (2011).
19. Prasain, J. K.: The use of mass spectrometry in lipidomics. Dostupné z URL: <https://www.uab.edu/proteomics/pdf_files/2009/Class%2002-06-09.pdf> [cit. 25. 11. 2013]
20. Strassburg, K.; Huijbrechts A. M.; Kortekaas, K. A.; Lindeman, J. H.; Pedersen, T. L.; Dane, A.; Berger, R.; Brenkman, A.; Hankemeier, T.; van Duynhoven, J.; Kalkhoven, E.; Newman, J. W.; Vreeken, R. J.: Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive

LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 1413-26 (2012).

21. Norris, P. C.; Dennis, E. A.: Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 109, 8517-22 (2012).

22. Sterz, K.; Scherer, G.; Ecker, J.: A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids, *The Journal of Lipid Research* 53, 1026-36 (2012).

23. Powell, S. W.: Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. *Methods in Enzymology* 86, 467-77 (1982).

24. Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D.: Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* 49, 1137-46 (2008).

25. Analytical Techniques in Aquaculture Research: Extraction and separation of fats and lipids. Dostupné z URL: <http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online20courses/ATA/analysis/lip_extr.htm> [cit. 25. 1. 2014]

26. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. Dostupné z URL: <<http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>> [cit. 1. 4. 2014]

27. Ruiz-Gutiérrez, V.; Perez-Camino M.C.: Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A* 885, 321-341 (2000).

28. Margalit, A.; Duffin, K.L.; Isakson, P.C.: Rapid quantitation of a large scope of eicosanoids in two models of inflammation: Development of an electrospray and tandem mass spectrometry method and application to biological studies. *Analytical Biochemistry* 235, 73-81 (1996).

29. Deems, R.; Buczynski, M. W.; Bowers-Gentry, R.; Harkewicz, R.; Dennis, E. A.: Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology* 432, 59-82 (2007).

30. Tapiero, H.; Nguyen Ba, G.; Couvreur, P.; Tew, K. D.: Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 215-222 (2002).

31. Thermo scientific, UltiMate 3000 Binary Rapid Separation LC System. Dostupné z URL: <<http://www.dionex.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-systems/rslc/binary/lp-72456.html>> [cit. 10. 12. 2013]

32. AB SCIEX, QTRAP® 5500 LC/MS/MS System, System Specifications. Dostupné z URL: <<http://www.absciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-lcms-systems/qtrap-5500-lcmsms-system>> [cit. 10. 12. 2013]

33. Retch, Mixer Mill MM 400, Function & Features: Dostupné z URL: <<http://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mixer-mill-mm-400/function-features/>> [cit. 10. 12. 2013]

34. De Caterina, R.: n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine* 364, 2439-2450 (2011).

35. Anti, M. et al: Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology* 103, 883-891 (1992).

36. Morgantini, C.; Imaizumi, S.; Grijalva, V.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Reddy S. T.: Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides Prevent Atherosclerosis Development and Reduce Plaque Inflammation in a Murine Model of Diabetes. *Diabetes* 59, 3223-3228 (2010).

