

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: analytická chemie



Mgr. Radka Míková

*Analýza lipidů novorozeneckého mazu chromatografickými metodami
a hmotnostní spektrometrií*

*Analysis of vernix caseosa lipids by chromatographic methods and mass
spectrometry*

Disertační práce

Praha 2016

Tato disertační práce zahrnuje výsledky získané v letech 2007 – 2016 během mého doktorského studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Vlastní práce byla prováděna na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i ve skupině hmotnostní spektrometrie pana Doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (projekt č. P206/12/0750), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt č. MSM 0021620857), projektu SVV Univerzity Karlovy v Praze a projektu podpory na rozvoj výzkumných organizací (RVO: 61388963; Z40550506) AV ČR, v.v.i.

Školitel: Doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.
Vědecko-servisní skupina hmotnostní spektrometrie
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i

Školitel-konzultant: Prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze, 10.5.2016

Mgr. Radka Míková

Poděkování:

Chci poděkovat Doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za vše, co jsem se pod jeho vedením naučila.

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za všestrannou podporu, kterou mi věnoval po celé mé vysokoškolské studium. Velmi si toho vážím.

Děkuji Prof. MUDr. Antonínu Doležalovi, DrSc., který určil směr mého doktorského studia a bez něhož by tato práce nevznikla.

Mé poděkování patří také Dr. Karlu Stránskému za cenné rady a pomoc s kolonovou chromatografií.

RNDr. Robertu Hanusovi, Ph.D. děkuji za statistický vhled do mých výsledků a pomoc s jejich publikováním.

RNDr. Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D. děkuji za uvedení do tajů MALDI-TOF MS.

Mé poděkování patří také všem spolupracovníkům ze skupin Hmotnostní spektrometrie a Chemie přírodních látek.

Klíčová slova:

Extrakce, separace, tenkovrstvá chromatografie, kolonová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, MALDI-TOF MS, lipidy, vernix caseosa

Keywords:

Extraction, separation, thin-layer chromatography, column chromatography, mass spectrometry, MALDI-TOF MS, lipids, vernix caseosa

Abstrakt (CZ)

Mázek (vernix caseosa) je bílý sýrovitý krém na povrchu těla novorozence, který je produkován kůží plodu v posledním trimestru těhotenství a chrání jej před vnějšími vlivy v době před porodem a novorozence v prvních sedmi až čtrnácti dnech života. Vernix caseosa má impregnační a termoregulační vlastnosti, poskytuje ochranu proti infekcím a pomáhá dokončit vývoj kůže a gastrointestinálního traktu. Předčasně narození jedinci mají mázku jen velmi málo nebo jim úplně chybí a jsou tak špatně chráněni proti vnějším vlivům. Proto je důležité důkladně poznat složení mázku a nalézt jeho vhodnou náhradu pro předčasně narozené novorozence. Mázek obsahuje lipidy, proteiny a 80 % vody.

Tato práce je zaměřena na lipidy, které tvoří přibližně 10 % vernixu. Byly zavedeny metody základního zpracování vernixu. Byla zoptimalizována izolace, separace a transesterifikace lipidů. Pro separaci byla zvolena tenkovrstvá chromatografie. Lipidy byly detekovány pomocí MALDI-TOF MS a výsledky ověřeny pomocí fragmentačních spekter a transesterifikace. Esterifikované lipidy byly měřeny pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro velké množství lipidů byla jako nejvhodnější zvolena extrakce podle Folche. Lipidový extrakt byl separován pomocí kolonové chromatografie.

Optimalizované metody byly aplikovány na sérii 20 vzorků vernixu. Ve vzorcích byl zjištěn rozdíl ve voskových esterech a triacylglycerolech v závislosti na pohlaví dítěte. Několika přístupy bylo prokázáno, že dívky mají větší množství delších řetězců mastných kyselin než chlapci.

Tato práce je základním stavebním kamenem pro další výzkum vernixu a byly v ní popsány analytické metody vhodné pro vernix caseosu. Dále byly charakterizovány čtyři méně polární lipidové třídy, které byly v intaktním stavu měřeny pomocí hmotnostní spektrometrie. Současně s novými poznatky o vernixu vyvstaly i otázky, které mohou určit směr dalšího výzkumu.

Abstract (EN)

Vernix caseosa is a white creamy substance that covers the skin of a newborn. It is produced during the third trimester by the skin of the baby and remains there until the age of one or even two weeks. It is uniquely human. In utero, vernix protects the skin from maceration, during the birth it serves as a lubricant and after the delivery it protects the baby against infection and regulates the temperature. As vernix is produced in third trimester, prematurely born infants lack it and this may lead to, among other things, suffering from desiccation and therefore heat loss. It is important to study it thoroughly and to find a suitable substitute of vernix for the preterm infants. Vernix consists of lipids, proteins and 80 % water.

This project is aimed at the lipids. Vernix is composed of 10 % of lipids. Basic analytical methods of processing vernix were searched. The methods of isolation, separation and transesterification have been optimized for the lipids. For separation, thin-layer chromatography has been chosen. The method of the lipid analysis of intact molecules by MALDI-TOF MS has been optimized for these lipids. The results were confirmed using fragmentation spectra and transesterification. Esterified lipids were measured by gas chromatography coupled with mass spectrometry detection. For a large amount of lipids, the extraction according to Folch has been adopted. The obtained lipid extract was separated using the column chromatography.

The above described methods were used for the series of 20 vernix samples. Gender-related differences were found in the spectra. Different quantitative patterns of wax esters and triacylglycerols in male and female samples were observed. It was proved that the longer-chain fatty acids are more abundant in girls.

This study is the cornerstone of further vernix research. Suitable analytical methods for vernix have been described. Furthermore, four less polar lipid classes of vernix were characterized by means of mass spectrometry. Along with better

knowledge, new questions about vernix caseosa have arisen that may define further studies of the subject.

Obsah

Prohlášení:.....	3
Poděkování:.....	4
Abstrakt (CZ)	6
Abstract (EN)	7
Obsah	9
Seznam zkratk	11
1. Cíl práce	14
2. Úvod.....	15
2.1. Vernix caseosa.....	17
2.1.1. Vznik vernixu.....	17
2.1.2. Funkce vernixu.....	19
2.1.3. Složení vernixu.....	20
2.1.4. Metody analýzy lipidů vernixu	21
2.1.5. Nemoci spojené s vernixem	22
2.1.6. Proč analyzovat vernix caseosu?.....	23
2.2. Izolace a separace lipidů.....	24
2.2.1. Lipidy – klasifikace.....	24
2.2.2. Fyzikální a chemické vlastnosti lipidů.....	25
2.2.3. Metody izolace lipidů.....	26
2.2.4. Separace lipidů	26
2.3. Detekce lipidů pomocí MS.....	27
2.3.1. Hmotnostní spektrometrie.....	27
2.3.2. MALDI-TOF MS	31
3. Experimentální část.....	36
3.1. Přístroje	36
3.2. Chemikálie.....	37
3.3. Zpracování vernixu.....	38
3.3.1. Odběr vzorků.....	38
3.3.2. Izolace lipidů vernixu.....	39
3.3.3. Extrakce lipidů vernixu	41

3.4.	Separace lipidů vernixu	43
3.4.1.	Příprava desek pro tenkovrstvou chromatografii	43
3.4.2.	TLC separace lipidů	45
3.4.3.	Příprava kolonové chromatografie	46
3.4.4.	Kolonová chromatografie	47
3.5.	Transesterifikace	48
3.6.	MS analýza a vyhodnocení lipidů	49
3.6.1.	Analýza frakcí pomocí ESI-Orbitrap MS	49
3.6.2.	Optimalizace matrice a analýza pomocí MALDI-TOF	49
3.6.3.	Statistické vyhodnocení	52
4.	Výsledky a diskuse	54
4.1.	Odběr vernixu a izolace lipidů	54
4.2.	TLC separace lipidů	56
4.3.	Transesterifikace	58
4.4.	Analýza pomocí MALDI-TOF MS	59
4.4.1.	Optimalizace maticí	59
4.4.2.	MALDI spektra intaktních lipidů vernixu	61
4.4.3.	Rozdíly v intaktních lipidech	61
4.4.4.	Fragmentační spektra lipidů různých tříd	66
4.4.5.	Složení vernixu v závislosti na pohlaví	67
4.5.	Zpracování velkého množství vernixu	68
4.5.1.	Optimalizace extrakcí	68
4.5.2.	Kolonová chromatografie	70
5.	Závěr	74
6.	Literatura	76
7.	Seznam publikací a plakátových sdělení	85
8.	Přiložené publikace	88

Seznam zkratek

[A+H] ⁺	Protonovaný molekulový iont
[A-H] ⁻	Deprotonovaný molekulový iont
4NA	4-Nitroanilin
9NA	9-Nitroanthracen
BHT	2,6-Di- <i>terc</i> -butyl-4-methylfenol
Cer	Ceramidy
DG	Diacylglyceroly
DHB	Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
Di	Diestery diolů
DIT	Dithranol
E _{kin}	Kinetická energie iontu
ESI	Ionizace elektrosprejem
ESI-Orbitrap MS	Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a orbitální pastí
FA	Mastné kyseliny
FFA	Volné mastné kyseliny
FFA:1	Jedenkrát nenasycené volné mastné kyseliny
GBS	Test na přítomnost <i>Streptokoka Agalactiae</i>
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPA	Kyselina 3-hydroxypikolinová
Chol	Cholesterol
LiDHB	Lithná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové
M/x	Nanášení překrytím vzorku maticí
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti k náboji
MG	Monoacylglyceroly
MALDI	Desorpční ionizace laserem za účasti matrice

MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací laserem za účasti matrice a analyzátozem doby letu
MBT	2-Merkaptobenzothiazol
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MTBE	Methyl- <i>terc</i> -butylether
Mx	Nanášení po předchozím smíchání matrice se vzorkem
NaDHB	Sodná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové
OHFA	ω -Hydroxy-mastné kyseliny
PA	Kyselina pikolinová
PCA	Analýza hlavních komponent
PEG	Polyethylenglykoly
PEGS	Polyethylenglykolsulfát
PL	Fosfolipidy
PS	Proton-sponge [®] , N,N,N',N'-tetramethyl-1,8-naftalendiamin
QQQ	Trojité kvadrupól
Q-TOF	Kvadrupól s analyzátozem doby letu
RDA	Analýza redundance
R _f	Retenční faktor
s	Délka průletové trubice
s.c.	Porod císařským řezem
SA	Kyselina sinapová
SD	Směrodatná odchylka
SE	Sterolestery, cholesterylestery
SE:1	Jedenkrát nenasycené sterolestery
SE:2	Dvakrát nenasycené sterolestery
SE:3	Třikrát nenasycené sterolestery
SQ	Skvalen
t	Čas
TG	Triacylglyceroly
TCNQ	7,7,8,8-Tetrakvanoquinodimethan

THAP	2,4,6-Trihydroxyacetofenon
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TOF	Analyzátor doby letu
TOF/TOF	Tandemová hmotnostní spektrometrie se dvěma analyzátory doby letu
Vernix	Vernix caseosa, mázek
WE	Voskové estery
WE:1	Jedenkrát nenasycené voskové estery
WE:2	Dvakrát nenasycené voskové estery
WE:3	Tříkrát nenasycené voskové estery
x/M	Nanášení překrytím matrice vzorkem
α -toko	α -Tokoferol

1. Cíl práce

- Optimalizace izolace lipidů novorozeneckého mazu
- Separace lipidových tříd vernixu pomocí tenkovrstvé chromatografie
- Optimalizace analýz na MALDI-TOF MS: určení vhodné matrice, způsobu nanášení vzorku a nastavení podmínek měření
- Analýza intaktních lipidů jednotlivých vzorků vernixu pomocí MALDI-TOF MS a MALDI-TOF/TOF MS a vyhodnocení spekter, porovnání výsledků, sledování souvislostí mezi jednotlivými vzorky z různých aspektů a ověření výsledků pozorování
- Optimalizace extrakce velkého množství lipidů vernixu caseosy
- Separace vyextrahovaných lipidů pomocí kolonové chromatografie a vyhodnocení výsledků

Cílem této práce bylo zavést analytické metody izolace a separace lipidů vernixu pro jednotlivé vzorky vernixu od každého dítěte zvlášť, aby zůstala zachována identita každého vzorku a bylo možné je mezi sebou porovnat. Dále charakterizovat a identifikovat intaktní lipidy pomocí MALDI-TOF MS, čemuž nezbytně předchází optimalizace metody pro lipidy vernixu.

Druhým hlavním cílem byla extrakce a separace směsného vzorku vernixu ve velkém množství, aby bylo možné pozorovat i lipidové třídy, které jsou ve vernixu zastoupeny v menším množství a je obtížné je separovat z jediného vzorku.

2. Úvod

Při narození je každý lidský jedinec vybaven několika různými mechanismy, které mu pomáhají adaptovat se na nové, vnější prostředí. Jedním z důležitých ochranných systémů u novorozence je pokrytí jeho těla látkou, která se tvoří v prenatálním období na kůži plodu a která je unikátní pro člověka. Tato látka se nazývá vernix caseosa (vernix) podle své bělavé barvy a sýrovité konzistence, nebo českým názvem mázek. Vernix je produkován kůží plodu ve třetím trimestru těhotenství a zůstává na povrchu těla novorozence jeden až dva týdny po narození.

Přestože počátky výzkumu vernixu caseosy sahají až do 19. století, nebylo o této substanci známo mnoho až do 60. let 20. století, kdy bylo publikováno větší množství prací, které se tímto tématem zabývají [1 – 3]. V 80. a 90. letech se výzkum vernixu téměř úplně odmlčel. Až v posledních deseti letech vyšlo opět několik prací, které zkoumají mázek novými metodami, a to jak z hlediska chemického složení, tak fyzikálně-chemických vlastností.

Vernix je tvořen buňkami v lipidové matrici. Chemicky je složen z lipidů, proteinů a vody, která je obsažena v buňkách. Struktura vernixu byla studována různými metodami [4 – 6]. Byly zkoumány funkce a jejich závislost na struktuře vernixu a na chemickém složení. Například byly prokázány antiinfekční vlastnosti některých proteinů a lipidů mázku [7, 8]. Byly také popsány odlišnosti ve složení vernixu a sekretu na pokožce dospělého člověka [3, 9 – 11]. Tento rozdíl byl pozorován zejména u lipidového složení.

Tato práce je zaměřena na výzkum lipidové části vernixu, která tvoří přibližně 10% jeho celkové hmotnosti. Pro vernix je charakteristické především široké rozpětí délek lipidových řetězců a polarit lipidových tříd, od nepolárního skvalenu až po vysoce polární fosfolipidy. V minulosti byly studovány mastné kyseliny jednotlivých tříd lipidů [1, 12, 13], dosud však nikdo neidentifikoval intaktní lipidy vernixu. Překvapivě se také velmi málo studií [14, 15] zabývá

odlišnostmi ve složení vernixu v závislosti na pohlaví, přestože lze tento rozdíl předpokládat vzhledem k faktu, že produkce vernixu je řízena hormonálně [16].

Jako výstupní měřicí metoda pro identifikaci intaktních lipidů byla zvolena desorpční ionizace laserem za účasti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS). Tato metoda hmotnostní spektrometrie se běžně používá pro určování proteinů a jiných velkých molekul, ale zvláště v poslední době se její užití rozšířilo i na malé molekuly a mezi nimi také lipidy. Výhodou je rychlost a nenáročnost měření a interpretace spekter, vysoká citlivost a odolnost vůči kontaminacím, dále pak možnost detekce intaktních molekul bez předchozí modifikace. Metodu je potřeba pro lipidy optimalizovat. Zvláště důležité je zvolit vhodnou matici, polaritu měření a intenzitu laseru.

Jedním z hlavních důvodů výzkumu vernixu caseosy je syntéza jeho náhrady pro novorozence, kteří mázku postrádají, neboť jeho nedostatek může vést k vážným zdravotním komplikacím nebo, ve spojení s dalšími faktory, dokonce k úmrtí dítěte [17]. Studium vernixu také pomáhá posouvat hranice medicínského poznání. Z pochopitelných příčin je velmi obtížné zkoumat detailně prenatální vývoj plodu. Díky vernixu můžeme nepřímou metodou získat přesnější obrázek o vývoji kůže plodu a výsledky poté aplikovat například v lékařské diagnostice.

Tato práce je prvním krokem ve výzkumu vernixu na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Byla započata spolupráce s Gynekologicko-porodnickou klinikou 1.LF UK a VFN a získán souhlas Etické komise s odběrem a zpracováním vzorků. Vzhledem k počáteční fázi výzkumu vernixu je tato studie zaměřena na vývoj a optimalizaci analytických metod vhodných pro tento neobvyklý biologický materiál a základní charakteristiku lipidů vernixu.

2.1. Vernix caseosa

Vernix caseosa je bílá až nažloutlá látka s konzistencí podobající se tavenému sýru. Pokrývá tělo plodu v poslední třetině těhotenství a novorozence jeden až dva týdny po narození. Vyskytuje se v různém množství. Někdy je pozorovatelná v tlusté vrstvě po celém těle novorozence, jak je ukázáno na **obrázku 1**, nebo jen na některých částech těla, například na zádech, v oblasti krku, podpaží a třísel. Jindy tvoří na kůži pouze tenký film. Doposud nebyl vernix prokázán u žádného jiného živočišného druhu, lze tedy předpokládat, že je unikátní pro člověka.



Zdroj:http://media.photobucket.com/image/vernix/momster_gina/Lachlan/lach-vernix.jpg

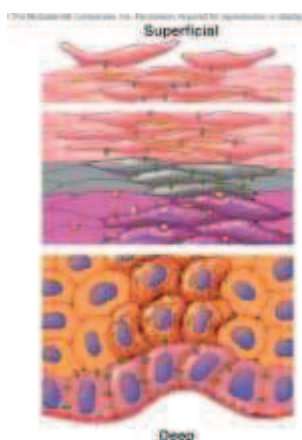
Obrázek 1 Novorozenec pokrytý vernixem.

2.1.1. Vznik vernixu

První jednovrstevná pokožka se objevuje ve třetím týdnu těhotenství [7]. V jedenáctém týdnu má pokožka již tři vrstvy: bazální, střední a svrchní (periderm). Na konci čtvrtého měsíce těhotenství se pokožka pod peridermem začíná

stratifikovat, dochází k diferenciaci buněk a tvoří se čtvrtá vrstva pokožky, stratum korneum. Periderm poskytuje pokožce ochranu před plodovou vodou, ale zároveň zajišťuje komunikaci s okolím aktivním transportem.

V 21. týdnu je již periderm plně odloučen a nahrazen stratem korneem tvořeným korneocyty, které se také postupně odlučují. Odloučené buňky peridermu a korneocyty se mísí se sekretem mazových žláz a tvoří vernix. Vrstvy pokožky a odlučující se korneocyty jsou znázorněny na **obrázku 2**.



<http://highered.mcgraw-hill.com>

Obrázek 2 Vrstvy pokožky.

Aktivita mazových žláz je regulována hormonálně působením pohlavních hormonů, androgenů a estrogenů [18, 19]. Studie provedená na krysách prokázala, že estrogen urychluje vývoj kožní bariéry a testosteron ji naopak zpomaluje [20]. Ve třetím trimestru těhotenství je činnost mazových žláz v pokožce v maximu a zvyšuje se tedy i tvorba vernixu. Intenzita produkce seba v tomto období je srovnatelná se zvýšením aktivity mazových žláz v pubertě. V posledním trimestru se také nejvíce vyvíjejí plíce, z nichž se do plodové vody uvolňuje surfaktant, který rozrušuje povrch vernixu. Stejný efekt má i moč přítomná v plodové vodě. Vernix se uvolňuje a

zvyšuje hustotu plodové vody. S ní se pak vernix dostává do gastrointestinálního traktu, kde vyživuje střevní sliznici a pomáhá dokončování jejího vývoje [7, 21].

2.1.2. Funkce vernixu

Vernix caseosa je jakýsi dočasný imunitní systém novorozence, který dítěti pomáhá v prvních dnech po narození, než si vytvoří svou vnitřní imunitu a přivykne na suché oxidační prostředí. Vernix hraje důležitou roli v termoregulaci novorozence tím, že omezuje odpařování vody z pokožky a brání tak ztrátě tepla v suchém prostředí, zároveň však propouští přebytečnou vodu, aby byla zajištěna stálá úroveň hydratace pokožky a to i v prostředí plodové vody [22, 23]. Funkce udržování stálé vlhkosti pokožky je tedy aktivní jak v prenatálním období, kdy je především zabráněno maceraci, tak postnatálně, kdy vernix pomáhá udržovat stálou teplotu těla [24]. Mázek dále obsahuje látky zvané přirozené zvlhčující faktory, které udržují poddajnost a vláčnost pokožky.

Kromě již zmíněného efektu na vývoj trávicí soustavy usnadňuje vernix průchod dítěte ven z dělohy snížením tření a působí jako bariéra proti bakteriím přítomným na rodidlech matky. Rovněž zajišťuje mírně kyselé pH, takže se na povrchu těla novorozence nemnoží patogenní bakterie. Vernix zajišťuje bakteriálně stálé prostředí také v dýchacích cestách, neboť obsahuje imunitní proteiny. Dále se předpokládá přítomnost feromonů, které přitahují k dítěti jeho pečovatele, jako je tomu u mateřského mléka [21]. Jejich přítomnost ve vernixu ale dosud nebyla prokázána.

U vernixu byly prokázány také antioxidační vlastnosti způsobené přítomností vitamínu E a melaninu, které pomáhají dítěti překonat oxidační stres z porodu a přechod do oxidačního prostředí. Vernix caseosa poskytuje novorozenci mechanickou i chemickou bariéru proti bakteriím a také proti průniku chymotrypsinu, který se dostává do plodové vody s mekoniem [25 – 28]. U mnoha proteinů obsažených ve vernixu byly prokázány antiinfekční účinky [29].

V neposlední řadě byly prokázány významné hojivé a regenerační účinky, které se projevují díky zvýšenému metabolismu, který vernix způsobuje. Pokud by se podařilo zachovat tyto vlastnosti u syntetické náhrady vernixu, dalo by se jich využít například při léčbě popálenin a některých onemocnění kůže [30 – 35]. Další mnohokrát ověřenou funkcí vernixu je jeho čistící účinek na pokožku, který je přibližně stejný jako u mýdla [36]. Vzhledem k výše uvedeným vlastnostem a účinkům se dnes již doporučuje ponechat vernix na povrchu těla novorozence, dokud se sám neodloučí [28].

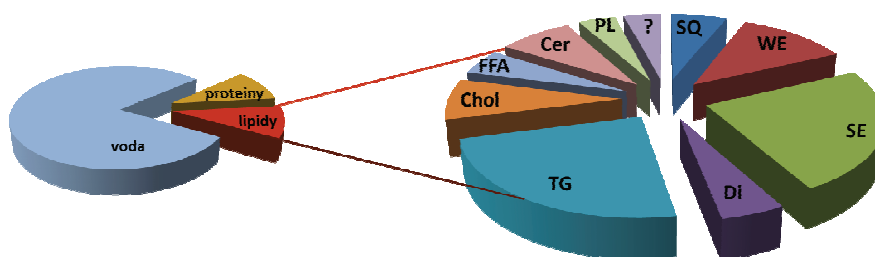
2.1.3. Složení vernixu

Vernix caseosa obsahuje přibližně 80% vody, 10% proteinů a 10% lipidů. Voda je v buňkách, korneocytech, kterými je mázek tvořen. Zmíněné hydratační vlastnosti jsou zprostředkovány právě těmito buňkami, které jsou schopné vodu absorbovat z prostředí a v případě potřeby pokožku hydratovat. Zároveň korneocyty zabraňují maceraci tím, že přebytečnou vodu absorbují a předávají do prostředí. Korneocyty vernixu nejsou propojeny desmosomy, a proto nemá stabilní strukturu a je možné je z povrchu těla otřít.

Proteiny nalezené ve vernixu mají různý původ. Na povrch kůže se dostávají z plodové vody, plic, tvoří se v kůži a v aktivních keratinocytech. Některé proteiny se mohou do vernixu dostat s krví, kterou může být kontaminován. Přibližně 40 % identifikovaných proteinů tvoří vrozenou imunitu novorozence (např. lysozym a laktoferrin) a asi 30 % proteinů má antimikrobiální vlastnosti (např. psoriasin, ubiquitin, cathelicidiny, alfa-defensiny, kalprotektin, ribonukleasa 7 a annexin 1). Vernix je také spojován se surfaktantovými proteiny A a D, které zajišťují bakteriálně stálé prostředí v dýchacích cestách novorozence. Podrobnější informace o proteinovém složení a funkcích jsou publikovány v práci Dr. Tollin [37 – 39].

Lipidy vernixu pocházejí ze dvou zdrojů, kterými jsou mazové žlázy a stratum korneum [10, 40, 41]. Mazovými žlázami jsou produkovány méně polární

lipidy: voskové estery (WE), sterol estery (SE), acylglyceroly, skvalen (SQ) a diestery diolů (Di) [31, 42], které jsou majoritními složkami lipidů vernixu. Největší část tvoří voskové estery a sterol estery, a to 45 % (w/w) z celkového množství lipidů, dále pak triacylglyceroly (kolem 35 %), skvalen (téměř 7 %) a diestery diolů (asi 5 %). Lipidy tvořené ve stratu korneu jsou značně polární a nazývají se bariérové lipidy [43, 44]. Zaujímají přibližně 10 % z celkové hmotnosti lipidů vernixu. Jsou jimi ceramidy (Cer), fosfolipidy (PL), volné mastné kyseliny (FFA) a cholesterol (Chol). Grafické znázornění složení vernixu a zastoupení jednotlivých lipidových tříd je na **obrázku 3**. Uvedené zastoupení lipidů je pouze přibližné vzhledem k vysoké variabilitě mezi vzorky. Hodnoty publikované v odborné literatuře byly většinou získány analýzou směsného materiálu získaného z několika novorozenců.



Obrázek 3 Složení vernixu a zastoupení jednotlivých lipidů.

2.1.4. Metody analýzy lipidů vernixu

Ve většině prací zabývajících se lipidy vernixu caseosy byl vzorek mázku rozpuštěn ve směsi chloroform/methanol 2:1 (v/v). V několika případech byla provedena extrakce lipidů podle Folche [1, 8, 45] a také byla vyzkoušena extrakce

podle Bligha a Dyera [5, 43, 46]. Obě metody byly vyvinuty pro extrakci lipidů z tkání, jako je mozek nebo sval, a liší se hlavně v poměru chloroformu a methanolu. Proto musely být pro vernix upraveny, neboť konsistence vernixu je jen obtížně srovnatelná s jinými tkáněmi. Jak již bylo popsáno výše, vernix obsahuje buňky, ale nikoli desmosomy, tudíž nemá stabilní strukturu. Popraskané korneocyty mají enormní schopnost nasávat vodu a díky mobilní struktuře neomezený prostor k bobtnání, což znemožňuje použití obvyklého postupu Folchovy extrakce.

Jako separační metody lipidových tříd vernixu byly užity různé typy chromatografie. Nejčastěji to byla tenkovrstvá chromatografie (TLC) [1 – 3, 5, 8, 13 - 15, 43, 45 – 50] s použitím různých stacionárních a mobilních fází, dále pak plynová chromatografie [2, 13, 42, 45, 48 – 50] s plamenovým ionizačním detektorem [1, 8, 47] nebo s hmotnostní detekcí [12, 47] a kapalinová chromatografie [1, 5, 13, 47]. V několika publikacích je použita rentgenová difrakce [5, 44] a infračervená spektroskopie [45, 50]. Detailnější analýza lipidových tříd byla prováděna po předchozí transesterifikaci mastných kyselin kyselou nebo alkalickou hydrolyzou [1, 2, 8, 12, 13, 45, 48 - 51]. Bylo určováno relativní zastoupení mastných kyselin, rozpětí délek uhlíkových řetězců, jejich větvení a počty a polohy násobných vazeb. Dále bylo zjišťováno množství neesterifikovatelných lipidů, skvalenu, alkoholů a cholesterolu. Ceramidy byly analyzovány pomocí protonové nukleární magnetické rezonance [47]. Dále byly porovnávány lipidy vernixu s lipidy různých živočišných druhů [45].

2.1.5. Nemoci spojené s vernixem

Vernix je spojován také s některými nemocemi a zdravotními komplikacemi. Lze díky němu diagnostikovat například rupturu dělohy podle výskytu vernixu v moči (vernixurie) [52, 53]. Vernix je možné diagnosticky využít také nepřímou. Podle jeho množství na pokožce po porodu, případně podle jeho množství v plodové vodě

před porodem, se dá usuzovat, v jakém stadiu vývinu se novorozenec v daném okamžiku nachází [54].

Některé zdravotní problémy může vernix naopak způsobit. Při ultrazvukovém zjištění velkého množství vernixu v plodové vodě je zvýšené riziko, že se u dítěte projeví vernix caseo-granulomatózní meningitis [7]. Dále byly popsány vernix caseosa granuloma a vernix caseosa peritonitis jako vzácné, ale závažné poporodní komplikace u matek, které rodily císařským řezem [55 – 60].

2.1.6. Proč analyzovat vernix caseosu?

Důležitost vernixu pro plod a novorozence již byla nastíněna výše při popisování jeho vlastností, funkcí a složení. Protože je vernix unikátní pro člověka, neexistuje žádný modelový živočišný druh, na němž by bylo možné jej pozorovat a zkoumat. Ze stejného důvodu je důležité syntetizovat vhodnou náhradu vernixu pro novorozence, kteří vernix nemají nebo ho mají velmi málo.

Nedostatek vernixu se vyskytuje u dětí předčasně narozených, jejichž pokožka není dostatečně vyvinutá, aby mohla vernix produkovat. Následkem je ztráta nebo omezení jednoho ze systémů vrozené imunity a tedy náchylnost k různým infekcím, vysychání pokožky, ztráta tepla, trávicí obtíže a mnoho dalších. Aby mohla být vytvořena látka, která má vlastnosti podobné vernixu, je nutné vernix detailně poznat a popsat.

Díky jedinečným hydratačním, antioxidačním a čistícím účinkům na pokožku by bylo možné výsledky výzkumu využít také v kosmetickém průmyslu pro vyvinutí vysoce účinných přípravků proti stárnutí a k léčbě kožních nemocí a popálenin. V neposlední řadě by analýza složení vernixu mohla napomoci v medicíně při diagnostice nemocí s ním spojených, usnadnit předporodní vyšetření a zpřesnit informace o plodu. Bylo by například možné prokázat souvislost mezi pohlavím plodu a některou složkou vernixu. Stejně tak můžeme hledat souvislost mezi složením vernixu a různými nemocemi, které jsou u novorozence obtížně

diagnostikovatelné. Podmínkou všech těchto výstupů je ovšem podrobná analýza všech složek vernixu a jejich vlastností.

2.2. Izolace a separace lipidů

2.2.1. Lipidy – klasifikace

Podle fyzikálních vlastností jsou jako lipidy označovány organické látky nerozpustné ve vodě [61, 62]. Chemická definice tuto skupinu omezuje na tzv. zmýdelnitelné lipidy, které jsou tvořeny estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů. Nezmýdelnitelné lipidy se nazývají isoprenoidy (skvalen, cholesterol). Lipidy můžeme také dělit na jednoduché a složené. Mezi jednoduché lipidy se řadí zejména málo polární acylglyceroly a vosky a jako složené lipidy označujeme hlavně polární fosfoacylglyceroly a sfingolipidy.

Základní součástí většiny molekul lipidů jsou alifatické mastné kyseliny s jednou karboxylovou skupinou. Mohou být větvené i nevětvené, nasycené nebo až několikanásobně nenasyčené. Mastné kyseliny obsažené v lipidových molekulách mají různé délky uhlíkových řetězců, obvykle je však počet uhlíků sudý. Druhým základním stavebním kamenem lipidů jsou esterově vázané alkoholy. Nejběžnějším lipidovým alkoholem je glycerol a dále pak sfingosin, aminoalkohol s jednou dvojnou vazbou.

Nejpočetnější lipidovou třídou jsou acylglyceroly, mezi nimi pak převažují triacylglyceroly. Patří do skupiny nepolárních lipidů spolu s voskovými estery a sterol estery. Voskové estery jsou estery mastných kyselin a alkoholů s dlouhými alifatickými řetězci. Pokud je místo alkoholu na kyselinu navázán některý sterol, jedná se o sterolestery. Mezi nepolární lipidy se řadí také diestery diolů. Z názvu této

třídy vyplývá, že na řetězci se dvěma alkoholovými skupinami jsou esterovou vazbou navázány dvě mastné kyseliny.

Polární lipidy obsahují kromě hydrofobní složky také hydrofilní část. Klasifikace je různá. Rozlišujeme fosfoacylglyceroly, odvozené od glycerolu, a sfingolipidy, odvozené od sfingosinu. Nebo podle obsahu kyseliny fosforečné dělíme polární lipidy na fosfolipidy a lipidy bez kyseliny fosforečné. Do fosfolipidů patří tedy fosfoacylglyceroly i sfingomyeliny, jako nejpočetnější skupina sfingolipidů.

2.2.2. Fyzikální a chemické vlastnosti lipidů

Jak je patrné z předcházející kapitoly, lipidy jsou látky velmi různorodé. Spojuje je však jedna vlastnost, a tou je hydrofobnost. Až na výjimky, kterými jsou některé složené lipidy, jsou tedy nerozpustné ve vodě. Rozpouštějí se v organických rozpouštědlech, např. etheru, chloroformu, tetrachlormethanu a kapalných uhlovodících.

Za určitých podmínek u nich dochází k samovolné oxidaci neboli žluknutí. Tato reakce probíhá na dvojných vazbách nenasycených mastných kyselin, které jsou následně rozštěpeny. Příkladem nesamovolné reakce některých lipidů je hydrolýza. Vzhledem k tomu, že lipidy s vodou nereagují, probíhá tato reakce pouze v přítomnosti anorganických kyselin (kyselá hydrolýza) nebo alkalických hydroxidů (alkalická hydrolýza – zmýdelnění). Kyselou hydrolýzou vznikají mastné kyseliny a glycerol. Produkty alkalické hydrolýzy jsou glycerol a soli mastných kyselin, nejčastěji sodné a draselné.

2.2.3. Metody izolace lipidů

Izolační metoda by měla splňovat několik požadavků. Měly by být izolovány pouze lipidy. Dále by měla být zachována nativní struktura lipidů, včetně nenasycených mastných kyselin, a v neposlední řadě omezena autooxidace lipidů. Nejčastěji se používá směs nepolárního a polárního rozpouštědla. Nepolárním rozpouštědlem je většinou uhlovodík, který přerušuje hydrofobní a van der Waalsovy interakce s matricí. Polárním rozpouštědlem bývá alkohol, který přerušuje vodíkové a iontové vazby.

Způsob izolace lipidů je určen materiálem a množstvím lipidů a vody v něm obsažených. Pro vysoký podíl lipidů se používá Soxhletova extrakce [63, 64]. Materiál je nejprve zhomogenizován, a poté extrahován několik hodin v Soxhletově nebo Twisselmannově extraktoru pomocí vhodného rozpouštědla.

Pro materiály s vysokým obsahem vody a bílkovin je vhodná metoda podle Folche, kdy je vzorek homogenizován v průběhu extrakce [65]. Rozpouštědlem je zde směs chloroformu a methanolu v poměru 2 : 1. Následuje filtrace a reextrakce vodou. Tato metoda je velmi rozšířená a používá se v mnoha úpravách [66, 67]. Obdobou je extrakce podle Bligha a Dyera, která používá opačný poměr chloroformu a methanolu, k nimž se přidává další chloroform a voda. Poté je směs zfiltrována. Alternativou je extrakce pomocí methyl-*tert*-butyl etheru (MTBE), kde je chloroform nahrazen MTBE [68]. Grossfeldova metoda a metoda podle Röseho a Gottlieba využívají kyselou hydrolýzu a jsou vhodné zejména v potravinářství [63].

2.2.4. Separace lipidů

Pro separaci jednotlivých tříd lipidů se používají různé chromatografické techniky. Nejčastěji je to tenkovrstvá nebo kolonová chromatografie [69 – 71].

Někdy lze použít i plynovou chromatografii, pokud je cílem analýzy pouze složení mastných kyselin [72].

Pro preparativní účely v malých objemech je vhodnější tenkovrstvá chromatografie vzhledem k jednoduchosti, variabilitě a rychlosti provedení. Pro větší objemy lipidů je nutná kolonová chromatografie [73]. K identifikaci jednotlivých lipidových tříd slouží v obou případech analytická tenkovrstvá chromatografie se standardy. Pro jednoduché směsi několika lipidů lze použít i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

Výběr stacionární a mobilní fáze závisí na složitosti lipidové směsi, polaritě lipidů a na tom, které lipidové třídy potřebujeme oddělit. Pro kapalinovou chromatografii na normální fázi se používá polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze. U reverzního uspořádání je tomu naopak. Nejrozšířenější stacionární fází je silikagel. Mobilní fáze jsou naopak velmi různorodé. Nejčastěji jsou to směsi dvou a více rozpouštědel v různých poměrech. Při tenkovrstvé chromatografii lze desky vyvíjet pouze v mobilní fázi o pevně daném složení. Případně je možné využít dvoukrokové metody vyvíjení. Při kolonové chromatografii se často využívá gradientové eluce.

2.3. Detekce lipidů pomocí MS

2.3.1. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je poměrně nové odvětví analytické chemie, kde je analyzovaná látka identifikována určením její molekulové hmotnosti, zjištěním elementárního složení, fragmentačními spektry a porovnáním s knihovnou spekter [74]. Používá se zejména pro strukturní analýzu organických molekul a biomolekul, ale také v anorganické chemii. Často je spojována s různými

separačními technikami, například s plynovou, kapalinovou či tenkovrstvou chromatografií nebo s kapilární elektroforézou. Nutnou podmínkou je ionizovatelnost zkoumaných molekul. Hmotnostní spektrometrií lze analyzovat látky pevné, kapalné i plynné, v různých biologických matricích nebo organických rozpouštědlech. Pomocí v současné době dostupných přístrojů lze dosáhnout téměř neomezeného rozlišení.

2.3.1.1. Ionizace

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji jsou molekuly vzorku ionizovány, aby se s nimi dalo snáze manipulovat pomocí elektrod. Ionty jsou přivedeny do analyzátoru, kde jsou rozděleny podle poměru m/z (hmotnost/náboj). Separované ionty jsou detegovány a jejich signál, včetně relativního zastoupení, je převeden na výsledná data v podobě hmotnostního spektra. Aby se ionty mohly pohybovat, aniž by se srážely s molekulami vzduchu, je nutné udržovat analyzátor a detektor pod vysokým vakuem. U iontového zdroje tato podmínka neplatí vždy.

Ionizační techniky se dělí na měkké a tvrdé podle množství energie použité k ionizaci. Dále je lze rozdělit podle toho, zda ionizace probíhá ve vakuu či nikoli, nebo zda jsou ionty generovány kontinuálně nebo pulsně. Přehled základních ionizačních technik je v **tabulce 1**. Pro organické molekuly a biomolekuly se nejčastěji využívá elektrosprejové ionizace (ESI) a desorpční ionizace laserem za účasti matrice (MALDI).

ESI je jedna z měkkých ionizací za atmosférického tlaku, která je určena hlavně pro polární molekuly a umožňuje měření v širokém rozmezí molekulových hmotností (~100 – 1 000 000 Da). Vzorek rozpuštěný v těkavém polárním rozpouštědle je kovovou kapilárou veden do iontového zdroje. Na konci kapiláry je vloženo vysoké napětí, díky němuž se kapalný vzorek rozptýlí v aerosol, jehož kapičky nesou vysoký náboj. Rozpouštědlo je odpařeno proudem dusíku, čímž dojde

k uvolnění iontů z roztoku. ESI je velmi citlivá technika, která je ovšem velmi málo tolerantní k nepolárním rozpouštědlům a jiným kontaminacím.

Tabulka 1 Základní ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii, jejich nejčastější použití a charakter ionizace.

Ionizační technika	Vzorek	Rozsah hmot	Charakteristika metody
Elektronová ionizace	Malé molekuly, těkavé	do 1 000 Da	Tvrdá ionizace
Chemická ionizace	Malé molekuly, těkavé	do 1 000 Da	Měkká ionizace
Ionizace elektrosprejem	Peptidy, proteiny, netěkavé	do 200 000 Da	Měkká ionizace
Ionizace urychlenými atomy	Uhlovodíky, organokovy, peptidy, netěkavé	do 6 000 Da	Měkká ionizace
MALDI	Peptidy, proteiny, nukleotidy, lipidy	do 500 000 Da	Měkká ionizace

2.3.1.2. Separace iontů

Ionty jsou rozděleny v analyzátoru podle hodnoty m/z . Analyzátoři pracují na základě různých principů, od magnetického a elektrického pole až po měření doby letu (TOF), a dosahují různého rozlišení. Nejznámější analyzátoři jsou uvedeny v **tabulce 2**. Všechny analyzátoři vyžadují vysoké vakuum. Lze je rozdělit na pulsní a kontinuální. Jednotlivé druhy analyzátorů umožňují měření v různých hmotnostních rozmezích. Pro získání přesnějších informací o struktuře analyzované

látky může být řazeno za sebou více analyzátorů (obvykle 2 až 4). V tom případě se jedná o tandemovou neboli MS/MS hmotnostní spektrometrii, kde se využívá možné fragmentace iontů. Analyzátoři řazené za sebou mohou být stejného druhu (TOF/TOF, QQQ) nebo různé, tzv. hybridní přístroje (Q-TOF).

Tabulka 2 Základní analyzátoři v hmotnostní spektrometrii

Analyzátor	Podstata separace
Magnetický sektor	Magnetický moment
Elektrický sektor	Kinetická energie
Kvadrupól	Stabilita trajektorií
Iontová past	Rezonanční frekvence
Orbitrap	Rezonanční frekvence
Analyzátor doby letu	Doba letu
Iontová cyklotronová rezonance	Rezonanční frekvence

2.3.1.3. Detekce iontů

Ionty jsou zaznamenávány v detektoru, znásobeny a signál je převeden na data, která jsou zaznamenána v podobě hmotnostního spektra. Spektrum poskytuje informaci o počtu složek vzorku, jejich molekulové hmotnosti a relativním zastoupení. Proti m/z je vynesena intenzita signálu. Nejběžnějšími detektory jsou elektronásobiče. Elektronásobiče jsou buď s destičkovými dynodami, nebo s kontinuální dynodou (trubicové). Někdy se používá i mikrokanálová destička (TOF). Typ detektoru závisí na zvoleném analyzátoru.

2.3.2. MALDI-TOF MS

Desorpční ionizace laserem za účasti matrice je měkká ionizační technika, při níž většinou nedochází k výrazné fragmentaci [75]. Tradičně se používá v proteomice, ovšem její pole působnosti se za posledních 20 let rozšířilo i do oblastí lipidomiky, anorganiky a dokonce i celých objektů [76 – 79]. Výhodou je zejména rychlost a jednoduchost měření, dále snadné ovládání přístroje a vyhodnocení spekter. Tato metoda je velmi odolná vůči kontaminacím a je též velmi citlivá a nevyžaduje velké množství vzorku. Nevýhodou je ne příliš vysoká reprodukovatelnost, která závisí na homogenitě krystalů, které tvoří matrice s analytem. Vzhledem k tomu, že se MALDI nepoužívá v lipidomice tak dlouho jako v proteomice, je nalezení vhodných maticí pro lipidy předmětem současného výzkumu.

2.3.2.1. *Princip metody*

MALDI metoda spočívá ve smíchání analytu s matricí, která absorbuje záření v ultrafialové oblasti. Vzorek s přebytkem matrice je nanesen na ocelové desce na tzv. spotu, kde po odpaření rozpouštědla dochází ke kokrytalizaci matrice a analytu. Na rozdíl od většiny metod hmotnostní spektrometrie je zde ionizován vzorek v pevném stavu. Spot je poté ostřelován pulsním laserem. Energie laseru je absorbována matricí, která se následně desorbuje z povrchu desky a strhává s sebou i molekuly analytu. Na ně se z matrice přenáší náboj a vznikají ionty.

Matrice nejen absorbuje energii laseru, aby ji mohla přenést na analyt, ale zároveň odděluje molekuly vzorku a tím zamezuje vzniku klastrů. Díky sekundárnímu přenosu náboje na analyt téměř nedochází k jeho fragmentaci, neboť vzorek je chráněn matricí. Měření lze provádět buď v pozitivním modu, kdy jsou výsledkem ionizace kationty, nebo v modu negativním, kdy jsou generovány anionty.

Nejčastěji vznikají protonované ionty, kdy se proton přenáší z mírně kyselé matrice. Ionty jsou obvykle jednou nabitě, vícekrát nabitě ionty jsou detegovány

v menší míře. Velice často vznikají také adukty s ionty kovů. Pokud je vzorek připravován ve skleněné nádobě, tvoří se většinou sodné a draselné adukty. Někdy se na analyt naaduje i celá molekula matrice nebo dokonce její dimer. K tomu dochází hlavně u maticí s nízkou molekulovou hmotností.

Vzniklé ionty jsou urychleny elektrickým polem do průletového analyzátoru, který pracuje na principu měření doby letu a kde již napětí vloženo není. Lehčí ionty letí rychleji a během letu trubicí analyzátoru se oddělí od těžších. Čím delší je vzdálenost, kterou musejí ionty urazit, tím vyšší je rozlišení spekter. Proto se často využívá reflekttron neboli tzv. elektrostatické zrcadlo, které zdvojnásobí dráhu iontů. Reflekttron je soustava mřížek napájených vysokým napětím opačné polaroty než mají nabitě částice. Ionty jsou přitahovány k reflekttronu, jejich dráha se zakřivuje, prodlužuje se doba letu a tím se zvyšuje rozlišení. Ionty s vyšší energií pronikají hlouběji do zrcadla, čímž se dále prodlouží doba letu. Takto lze dosáhnout výrazně lepšího rozlišení výsledného spektra, což v lineárním modu není možné. Dalším způsobem jak zvýšit rozlišení, které není v porovnání s jinými detekčními metodami příliš vysoké, je použití zpožděné extrakce (tzv. delayed extraction). Ta umožňuje snížit rozdíly v kinetických energiích iontů přicházejících do analyzátoru. Obvyklá délka analyzátoru je 1,5 – 3 m.

Na konci průletového analyzátoru je detegován signál každé skupiny separovaných iontů. Signál je zaznamenán jako funkce času (t). Hodnota m/z je poté odvozena podle následující rovnice, kde s je délka průletové trubice, m hmotnost iontu, z jeho náboj a E_{kin} je kinetická energie iontu:

$$m / z = 2 E_{kin} (t^2 / s^2) \quad (1)$$

2.3.2.2. Nanášení vzorku

Jedním z významných faktorů ovlivňujících reprodukovatelnost měření metodou MALDI-TOF MS je homogenita a velikost krystalů, které tvoří matrice

s analytem. Kromě výběru vhodné matrice lze kvalitu a reprodukovatelnost spekter nejspíše ovlivnit vhodným způsobem nanášení matrice a vzorku. Abychom získali co nejmenší a nejhomogennější krystaly, je třeba rozpouštědlo z desky odpařit velmi rychle. K tomu je možné použít proud teplého vzduchu, například z fěnu, nebo také slabé vakuum.

Jedním ze způsobů nanášení je metoda tzv. rychlého odpaření. Na desku je nejprve nanesen roztok matrice a po odpaření rozpouštědla je přidán roztok vzorku. Po uschnutí můžeme hned vložit desku do přístroje a měřit. Tato metoda se využívá u jednorázových desek dodávaných výrobcem již s vrstvou matrice.

Nejstarší je metoda tzv. suché kapky, kdy je matrice smíchána se vzorkem a poté je směs obou nanášena na desku. Tento způsob se někdy kombinuje s metodou rychlého odpaření. V tom případě je vrstva matrice překryta směsí matrice a vzorku. Obdobou této metody je tzv. "sandwichová" metoda, kdy je vrstva matrice překryta vzorkem a pak je přidána další vrstva matrice.

Velmi často používanou metodou je způsob zvaný „quick & dirty“. Do kapky vzorku se přidá kapka matrice a promíchají se přímo na desce pohybem skleněné kapiláry. Tento způsob je velmi rychlý, ale homogenita krystalů se v tomto případě jen obtížně kontroluje.

2.3.2.3. Matrice

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím celkový výsledek měření metodou MALDI je bezpochyby výběr vhodné matrice. Protože lipidomika objevila tuto metodu relativně nedávno, nebyly zatím nalezeny odpovídající matrice pro všechny lipidy. Na rozdíl od proteomiky jsou na matrice v lipidomice kladeny vyšší nároky zejména proto, že se jedná o poměrně malé molekuly. Často se stává, že matrice sice výborně ionizuje daný lipid, ale signál matrice interferuje s píky analytu. Aby mohla matrice se vzorkem tvořit krystaly, musí s ním být velmi dobře mísitelná, nesmí s ním reagovat a musí být rozpustná ve vhodném rozpouštědle. Samozřejmě podmínkou dobré matrice je absorpce záření o vlnové délce použitého laseru [80].

Matrice má v MALDI především dva úkoly: absorbovat energii laseru a oddělovat od sebe molekuly analytu. Proto je aplikována ve značném přebytku. Zatímco vzorku stačí obvykle 1 µg, matrice bývá připravována jako nasycený roztok. Tím se zabrání přímému ostřelování molekul analytu a energii laseru vstřebá matrice.

Zdaleka nejpoužívanější matricí v lipidomice je kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) [81 – 84]. Je schopná ionizovat mnoho tříd lipidů, přestože s různou citlivostí, a lze ji použít pro měření v kladném i záporném modu. Tato matrice netvoří mnoho iontů vznikajících fotochemickými reakcemi a tedy nezahluje detektor.

Jedna matrice ovšem rozhodně nemůže stačit pro ionizaci všech lipidů. Proto byla testována řada dalších často původně používaných v proteomice. Přestože existuje několik klíčů, jak vytipovat matrici, která by mohla v lipidomice fungovat, je nezbytné ověřit teorii v praxi. Často se stává, že matrice neodpovídají předpokladům. Tato skutečnost platí obousměrně, takže i matrice teoreticky určené pro proteomiku někdy výborně ionizují lipidy. Proto je skutečně obtížné vybrat matrice pro dané měření a více či méně se jedná o systém “pokus – omyl“, případně lze získat nějaké informace z literatury.

Matricemi testovanými jinými autory jsou například 4-nitroanilin (4NA) nebo grafit [85]. V proteomice používané kyseliny α -kyanohydroxyskořicová, 3-hydroxypikolinová (HPA), pikolinová (PA) a sinapová (SA) patří k matricím, které někteří autoři pro lipidy doporučují a jiní zase odmítají, neboť mají tendenci k oligomerizaci [86 – 88].

V současné době je vývoj matric na vzestupu. Testují se různé látky, které mají předpoklady k dobré ionizaci lipidů. Dále jsou nově syntetizovány matrice přímo určené pro konkrétní lipidy, které jsou z různých důvodů v popředí zájmu. Jedná se především o lipidy medicínsky významné [89 – 92].

2.3.2.4. *Měření a spektra*

Při analýze je potřeba nastavit určité parametry, jako je intenzita laseru, napětí na zdroji, počet laserových pulsů a potlačení matričních iontů. Intenzita laseru nesmí být příliš vysoká, aby nedocházelo k tepelnému rozkladu vzorku. Optimální hodnota je přibližně o 10 % vyšší než prahová energie laseru. Pro zvýšení rozlišení je možné použít zpožděnou extrakci a reflekttron. Hmotnostní spektra lze naměřit ručně nebo automaticky pomocí sekvence.

Pro kalibraci přístroje se používají hlavně směsi peptidů nebo proteinů. V případě měření lipidových vzorků jsou to polyethylenglykoly (PEG), případně samotná matrice. Kalibruje se pouze osa x, hodnoty na ose y jsou normalizované. Nejvyšší pík ve spektru má tedy vždy hodnotu 100 %.

Měření se provádí nejčastěji v pozitivním modu, kdy dochází převážně k tvorbě protonovaných molekul $[A+H]^+$. Dále se ve spektru mohou objevit vícenásobně nabitě molekulové ionty, dimery, adukty s alkalickými kovy, adukty s matricí, iontové klastry a fragmenty matrice a analytu. Při měření v negativním modu vznikají deprotonované molekuly $[A-H]^-$.

3. Experimentální část

3.1. Přístroje

Pro měření byly použity hmotnostní spektrometry Reflex IV a UltrafleXtremeTM od firmy Bruker Daltonics (Bremen, Německo) a LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) byla realizována na přístroji Agilent 6890N-5975B MSD od firmy Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Vzorky, standardy a matrice byly váženy na vahách XS 105 DualRange od firmy Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko). Od stejného výrobce byly předvážky AG 204, na kterých byl odvažován silikagel pro nalévání TLC desek. Pro vizualizaci zón na TLC deskách byla použita UV lampa Camag (MuttENZ, Švýcarsko) s vlnovými délkami 254 a 366 nm a horkovzdušná pistole Einhell (Landau, Německo). Pro míchání ve vialkách byl použit vortex ZX3 od Velp Scientifica (Usmate, Itálie). Pro rychlejší rozpuštění vernixu byly vzorky míchány na třepačce T22 vyrobené firmou VD Lověna Praha (Praha, Česká republika). Matrice pro MALDI byly rozpouštěny za pomoci sonikátoru T 460 H od firmy Elma (Singen, Švýcarsko). Při izolaci lipidů byla rozpouštědla ze vzorků odpařována na rotační vakuové odparce 350 s vodní lázní 356H od firmy Unipan (Warszawa, Polsko). Deionizovaná voda byla připravena pomocí přístroje Milli Q system (Millipore, Milford, MA, USA).

3.2. Chemikálie

Hexan, chloroform, diethyl ether, aceton, toluen a ethanol v analytické čistotě byly pořízeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a/nebo Penta (Chrudim, Česká republika). Všechna rozpouštědla byla před použitím predestilována ve skleněné aparatuře. Chloroform byl stabilizován 1 % ethanolu. Methanol byl zakoupen od firmy LachNer (Neratovice, Česká republika).

2,6-Di-*terc*-butyl-4-methylfenol (BHT), acetonitril, Florisil[®] pro TLC a acetylchlorid byly pořízeny od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Síran hořečnatý, kyselina trifluoroctová, MTBE, chlorid sodný, kyselina sírová, ethylvanilin, PEG a polyethylenglykol sulfát (PEGS), primulin a rhodamin 6G byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Silikagel 60 G s 12 % sádry a silikagel bez sádry byly pořízeny od firmy Merck a uhličitan stříbrný od firmy Lachema (Brno, Česká republika).

Vysoce čisté lipidové standardy byly koupeny od firmy Sigma-Aldrich (skvalen – SQ, stearyl behenát), Larodan (Malmö, Švédsko; cholesterol – Chol, cholesteryl oleát, cholesteryl linoleát, tristearin, distearin, palmitolein), Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA; kyselina stearová) a Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA; fosfatidylcholin).

Matrice pro MALDI-TOF MS byly od firmy Fluka (DHB; 2-merkaptobenzothiazol – MBT; 7,7,8,8-tetrakvanoquinodimethan – TCNQ; 4NA; PA; dithranol – DIT; Proton-sponge[®] – PS, N,N,N',N'-tetramethyl-1,8-naftalendiamin) a Sigma-Aldrich (THAP, 9-nitroanthracen – 9NA). NaDHB a LiDHB byly syntetizovány, jak je popsáno v publikaci II.

3.3. Zpracování vernixu

3.3.1. Odběr vzorků

Vzorky vernixu byly odebrány s písemným informovaným souhlasem rodičů dítěte a se souhlasem Etické komise VFN. Odběr byl proveden tak, aby vzorek neobsahoval krev, a to okamžitě po porodu do skleněné vialky s teflonovým víčkem. Všechny vzorky vernixu byly ihned po odběru zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení byl každý vzorek zvážen a poté z něj byly vyizolovány lipidy. Takto odebrané vzorky byly použity pro práce popsané v publikacích I, III a IV.

Vzorky byly doprovázeny informacemi o dítěti, stavu dítěte a matky před a během porodu, průběhu porodu, místě odběru a stavu kůže dítěte při propuštění z porodnice. Tyto informace neobsahovaly žádné identifikační údaje dítěte ani matky. Aby byla zachována anonymita, vzorky byly označeny pouze číslem. Vzorek byl zahrnut do analýzy, pouze pokud byly spolu s ním dodány informace o datu narození, pohlaví, rase, gestačním věku, způsobu porodu a místě odběru. Pro případný další výzkum a statistické vyhodnocení byly dále zaznamenány údaje o četnosti gravidity, paritě, hmotnosti a délce dítěte, trofice, adaptaci dítěte po porodu, vrozených vývojových vadách, případné medikaci matky před porodem, množství plodové vody a případné hypoxii dítěte během porodu. Dále byla evidována běžná onemocnění u matky: gestační diabetes mellitus, gestační hypertenze, hepatopatie, koagulopatie, pozitivita na *Streptococcus Agalactiae* v porodních cestách matky, který je nejčastějším zdrojem sepse u novorozenců, a případná další onemocnění. Kompletní seznam informací sbíraných ke každému vzorku je uveden v **tabulce 3**.

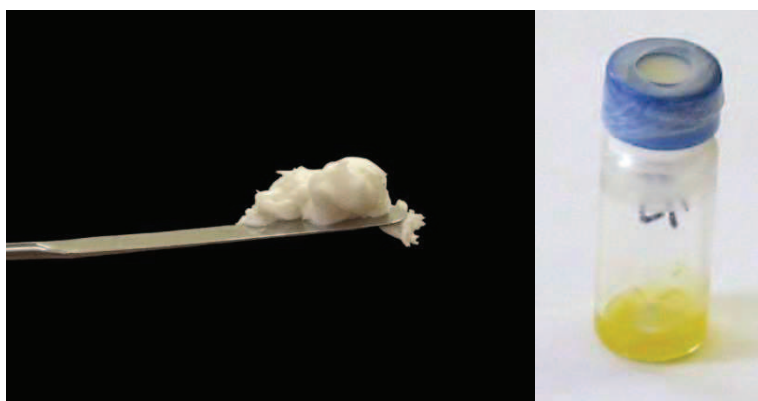
Tabulka 3 Seznam dat sbíraných spolu se vzorky a záznam jednoho ze vzorků.
Vysvětlení pojmů je uvedeno přímo v tabulce.

	Číslo vzorku	18
	Datum odběru (porodu)	28.4.2009
	Místo odběru	záda
	Rasa	bílá
	Stav kůže při propuštění	normální
	Jiné	silně zkalená plodová voda, tenký pupečník
perinatální anamnéza	Pohlaví	mužské
	Četnost gravidity (gravidita/parita)	II/I
	Gestační věk	40+2
	Hmotnost dítěte (g)	3360
	Délka (cm)	48
	Trofika (vztah gest. věku a hmotnosti dítěte)	eutrofický
	Porod	s.c. pro hrozící hypoxii
	Adaptace po porodu	dobrá
prenatální anamnéza	Vrozené vývojové vady	ne
	Léky/drogy	spinální anestezie
	Oligo-/polyhydramnion (množství plodové vody)	norma
	Perinatální hypoxie	mírná
onemocnění matky	Gestační diabetes mellitus	0
	Gestační hypertenze (eklampsie)	0
	Hepatopatie	0
	GBS - přítomnost Streptokoka Agalactiae	negativní
	Koagulopatie	0

3.3.2. Izolace lipidů vernixu

Vernix byl rozpuštěn ve 20 až 30 ml směsi chloroform/methanol 2:1 (v/v) s 0,05% BHT. Vzniklá suspenze byla přefiltrována na kolonce s extrahovanou vatou

a silikagelem (vrstva asi 0,5 cm), abychom se zbavili buněk a dalších kožních derivátů, které vernix obsahuje. Filtrací je odstraněna i většina proteinů, protože ty jsou z větší části v buňkách. Kolonka byla ještě promyta směsí chloroformu a methanolu. Protože vernix obsahuje 80 % vody, byl do filtrátu přidán jako sušidlo vyžíhaný síran hořečnatý. Po opětovné filtraci na kolonce byla směs rozpouštědel odpařena na vakuové odparce a izolované lipidy přeneseny do vialky s teflonovým septem. Malé množství rozpouštědla bylo odpařeno pod proudem argonu do konstantní hmotnosti a vzorek lipidů byl zvážen. Poté byly lipidy rozpuštěny opět ve směsi chloroform/methanol na koncentraci 100 mg/ml. Lipidy v roztoku byly uchovávány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na **obrázku 4** jsou fotografie vernixu před izolací a izolované lipidy před rozpuštěním. Lipidy izolované touto metodou byly použity pro analýzy v publikacích I, III a IV.



Autor fotografie vernixu: Josef Cvačka

Obrázek 4 Izolace lipidů vernixu caseosy. Vlevo vernix (množství odebrané z jednoho dítěte), vpravo izolované lipidy.

3.3.3. Extrakce lipidů vernixu

3.3.3.1. *Extrakce pomocí methyl-terc-butyletheru (MTBE)*

Vernix obou pohlaví byl smíchán v třecí misce v hmotnostním poměru 1:1. 200 mg vernixu bylo suspendováno v 1,5 ml methanolu za pomoci vortexu. Poté bylo přidáno 5 ml MTBE a suspenze byla míchána 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 1,25 ml vody a po 10 minutách stání byla suspenze 10 minut centrifugována při 1000g. Horní organická fáze byla odebrána a dolní reextrahována 2 ml směsi MTBE/methanol/voda 20:6:5. Po centrifugaci byla horní organická fáze smíchána s první a rozpouštědla byla odpařena na vakuovém centrifugačním koncentrátoru.

3.3.3.2. *Extrakce podle Folche*

200 mg směsi vernixů obou pohlaví bylo suspendováno v 1,5 ml methanolu pomocí vortexu. Byly přidány 3 ml chloroformu a suspenze byla míchána 1 hodinu na třepačce za laboratorní teploty. Po přidání 1,25 ml vody a 10 minutách stání byla suspenze 10 minut centrifugována při 1000g. Spodní organická fáze byla odebrána a zbylá vodná fáze byla reextrahována 2 ml směsi chloroform/methanol/voda 86:14:1. Po centrifugaci byla spodní organická fáze opět přidána k té první a rozpouštědla byla odpařena na vakuovém centrifugačním koncentrátoru.

3.3.3.3. *Extrakce bez centrifugy (Folch a MTBE)*

Při extrakci velkého množství vernixu není možné použít k oddělení fází centrifugu, proto byly obě metody upraveny. Po přidání vody a 10 minutách stání

byla celá směs přefiltrována přes extrahovanou vatu a malé množství silikagelu. Vata a silikagel pak byly zahrnuty do reextrakce.

3.3.3.4. *Extrakce velkého množství vernixu*

15 g vernixu obou pohlaví v hmotnostním poměru 1:1 bylo suspendováno v 337,5 ml směsi chloroform/methanol 2:1 v 1L kónické baňce. Suspenze byla 1 hodinu míchána na třepačce, poté bylo přidáno 93,75 ml vody. Po protřepání a 10 minutách stání byla suspenze přefiltrována přes extrahovanou vatu se silikagelem. Nejprve byla filtrována organická fáze a následně vodná, při jejíž filtraci byl použit přetlak vytvořený nad hladinou v kolonce proudem vzduchu pomocí silikonové hadičky a zábrusu na silnostěnné kolonce speciálně vyrobené pro tento účel.

K husté části suspenze s konzistencí krupičné kaše, kterou nelze přefiltrovat, byl přidán obsah kolonky po filtraci a horní vodná fáze filtrátu. Spodní organická fáze byla převedena do dvou 250ml baněk srdcovitého tvaru a nechána stát přes noc v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se oddělila zbylá vodná fáze. Poté byl extrakt z obou baněk odsát do jiných baněk srdcovitého tvaru a část rozpouštědel byla odpařena na rotační vakuové odparce při 200 mbar a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, přičemž byl extrakt převeden do jedné baňky.

Vodná fáze v kónické baňce byla reextrahována směsí chloroform/methanol/voda 86:14:1. 240 ml směsi byly vypláchnuty všechny použité baňky a vše bylo přidáno do kónické baňky s vodnou fází, protřepáno a necháno 10 minut stát. Do 56,25 ml vody pro reextrakci bylo přidáno 8,7 g NaCl tak, aby výsledná koncentrace NaCl ve vodné fázi byla 1 mol/l. Organická fáze byla zfiltrována na kolonce s extrahovanou vatou a silikagelem. Do vodné fáze bylo přidáno 150 ml reextrakční směsi a po protřepání a 10 minutách stání byla organická fáze zfiltrována a přidána k té z předchozí reextrakce.

Extrakt byl uložen přes noc v mrazáku a poté byla organická fáze odebrána a odpařena na odparce (200 mbar, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) téměř dosucha. Extrakt byl převeden do baňky s lipidy z první extrakce. Celý postup byl opakován ještě dvakrát s 15 g a

13,5 g vernixu, přičemž snížené množství vernixu nebylo při extrakci zohledněno. Celý extrakt byl zakoncentrován pomocí odparky a ponechán v mrazáku při teplotě -20 °C až do dalšího zpracování.

3.4. Separace lipidů vernixu

3.4.1. Příprava desek pro tenkovrstvou chromatografii

Skleněné desky pro tenkovrstvou chromatografii musely být pro separaci lipidů vernixu přizpůsobeny. Rozpětí polarit lipidů je poměrně široké a desky o běžných rozměrech (6,5 x 8 cm nebo komerčně dostupné 10 x 10 cm) pro jejich dostatečnou separaci nestačí. Byly vyzkoušeny také desky o rozměrech 20 x 20 cm, tyto desky však byly zbytečně velké, chromatografie byla pomalá a zóny se rozmývaly. Díky zdlouhavé separaci na dlouhých deskách hrozila také oxidace některých lipidů. Nakonec byly pro separace použity desky o rozměrech 9 x 12 cm a dvojí vyvíjení v mobilní fázi, aby bylo dosaženo lepší fokusace jednotlivých zón lipidů a tím lepšího rozdělení.

Separaci lipidů předcházela příprava TLC desek pro preparativní účely. Množství použitého silikagelu se sádrou bylo optimalizováno na 45 g silikagelu na 100 ml deionizované vody. Při tomto poměru bylo dosaženo optimální hustoty suspenze. Na hustotu má také podstatný vliv doba míchání silikagelu s vodou. Nejvhodnější doba míchání je 20 až 30 vteřin. Suspenze se musí míchat důkladně ale opatrně, aby se v suspenzi nevytvořily bublinky. K tomuto účelu byla použita Erlenmeyerova baňka o objemu 1 L.

Vlastní nalévání desek bylo prováděno na skleněném “prkně” s lištami podél jedné dlouhé a jedné krátké strany. Na “prkno” byly naskládány čisté navlhčené desky tak, aby mezi nimi nebyly mezery a aby pokryly co největší plochu “prkna”,

aby silikagel po nalití nestékal. Suspenze byla nalita do speciálního válce pro nalévání TLC desek a po jeho otočení byly tímto válcem rychlým, ale plynulým pohybem přejety připravené desky. Ihned po nalití desek je nutné “prkno“ s deskami na jedné straně na okamžik nadzdvihnout a jemně jím zatřást, aby se odstranily možné vlnky na povrchu silikagelu, které vznikly nerovnoměrným přejetím válce nebo nerovnostmi na hraně “prkna“, po které válec přejíždí. Skleněné “prkno“ a válec jsou na **obrázku 5**.



Obrázek 5 Skleněné “prkno“ a válec na nalévání TLC desek.

Takto nalité desky byly ponechány na “prkně“ asi 40 až 50 min, aby částečně oschly, a poté byly hrany každé desky opatrně otřeny čistým ubrouskem tak, aby po úplném uschnutí silikagelu nedocházelo k jeho odpadávání při manipulaci s deskami. Desky byly položeny na ták s filtračním papírem a ponechány přes noc, aby uschly. Pro úspěšné nalití desek bylo nezbytné, aby všechny desky měly stejnou tloušťku, aby jel válec rovnoměrně a aby silikagel nestékal z vyšších desek. Velice důležité

bylo docílit vhodné tloušťky vrstvy silikagelu na desce. Musela být co největší, ale ne taková, aby byla ovlivněna separace lipidů. Díky vysoké vrstvě silikagelu bylo možné rozdělit na jedné desce větší množství vzorku, takže pro získání optimálního množství nejméně zastoupených lipidových tříd stačily tři desky s vrstvou silikagelu vysokou přibližně 1 až 1,2 mm. Co nejmenší počet desek použitých pro separaci je podstatný pro rychlé zpracování vzorku tak, aby nedocházelo k oxidaci lipidů.

3.4.2. TLC separace lipidů

Každá deska byla před nanesením vzorku promyta nejprve směsí chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v) a poté čistým hexanem. Po úplném vyschnutí desky byl nanesen vzorek a po odpaření rozpouštědla z povrchu desky byla její spodní část ponořena do malého množství mobilní fáze. Byla použita mobilní fáze hexan/diethylether 93:7 (v/v). Deska byla v této mobilní fázi vyvinuta do tří čtvrtin a pak bylo vyvíjení přerušeno a deska byla vysušena proudem vzduchu. Suchá deska byla znovu vyvíjena v čerstvě nalité mobilní fázi o stejném složení, tentokrát až do konce desky.

Po uschnutí byly separované zóny vizualizovány. Pokud nebyla deska vyvíjena pro preparativní účely, byla vizualizace provedena koncentrovanou kyselinou sírovou s 0,05 % ethylvanilinu. Deska byla postříkána a pak byla kyselina spálena proudem vzduchu z horkovzdušné pistole.

Pro preparativní účely byly lipidy vizualizovány postříkáním roztokem 0,05% rhodaminu v ethanolu. Lipidové zóny byly osvětleny UV lampou a vyznačeny špachtlí. Poté byly seškrábány do skleněných kolonek s extrahovanou vatou a trochou silikagelu. Lipidy byly ze silikagelu obarveného rhodaminem vymyty přibližně 30 ml diethyletheru. Rozpouštědlo pak bylo odpařeno pod proudem argonu do konstantní hmotnosti. Poté byly lipidy zváženy a rozpuštěny v chloroformu na koncentraci 1 mg/ml. Roztoky lipidů byly uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lipidy separované touto metodou byly použity v publikacích I, III a IV.

3.4.3. Příprava kolonové chromatografie

3.4.3.1. Aktivace silikagelu

Silikagel byl vysypán na čistý plech, vhodný pro použití v sušárně, a sušen při 120 °C po 26 hodin s přestávkami. Po částečném zchladnutí po 1,5 h byl silikagel přesypán zpět do láhve a zvážen (875 g). Poté bylo přidáno 10 % vody (97 ml). Silikagel byl po několik týdnů promícháván a protřepáván, první týden denně, v dalších týdnech jen občas. Zábrus láhve byl promazán tukem na bázi cyklodextrinu a zátka překryta igelitem.

3.4.3.2. Příprava vzorku na kolonu

V prvním kroku byl změřen objem extraktu (86 ml) a poté 10 ml bylo odebráno, odpařeno do sucha a zváženo (0,61930 g). Hmotnost lipidů v celém extraktu tedy byla 4,7067 g. Do extraktu byl přidán silikagel v množství šestinásobku hmotnosti lipidů (28,24008 g). Poté byl vzorek odpařen do sucha na odparce (150 mbar, 28 °C).

3.4.3.3. Příprava kolony

Na fritu umyté a vysušené kolony o průměru 4,48 cm bylo položeno kolečko extrahovaného filtračního papíru. Kohout frity byl namazán cyklodextrinovým mazadlem. Připravený silikagel (320 g) byl smíchán s hexanem tak, aby byl hexan v přebytku. Suspenze byla evakuována pomocí vodní vývěvy. Do kolony bylo nalito malé množství hexanu (cca 100 ml), poté byla opatrně přidána i suspenze silikagelu. Silikagel byl usazen pomocí vibračního zařízení přiloženého k okraji kolony. Výsledná výška sloupce byla 41 cm. Na povrch silikagelu byl položen propíchaný

filtrační papír, na něj byl do roviny nasypán připravený lipidový vzorek a poté byl položen další propíchaný filtrační papír. Na filtrační papír byly nasypány přečištěné skleněné kuličky (asi 1,5 cm).

3.4.4. Kolonová chromatografie

Na koloně byla provedena kapalinová chromatografie s normální fází a gradientovou elucí. Jako stacionární fáze byl použit silikagel a jako mobilní fáze hexan a diethylether. Gradient mobilní fáze je uveden v **tabulce 4**.

Nejprve bylo na kolonu postupně nalito 300 ml hexanu a potom byla započata gradientová eluce. Frakce byly jímány hned po té, co byl na kolonu nanesen vzorek. Prvních 300 ml byly tzv. nulté frakce, ve kterých by neměly být ještě žádné lipidy. Další frakce byly jímány do dvaceti 100 ml baněk srdcovitého tvaru (po cca 80 ml) a pak do deseti 250 ml baněk stejného tvaru.

Po dokončení gradientové eluce byla kolona vymyta 1,6 L směsí chloroform methanol 2:1. Tyto frakce byly označeny římskými číslicemi. Třetí až osmá frakce po vložení směsí chloroform/methanol obsahovaly vodu vymytou ze silikagelu. Tato voda byla reextrahována výše popsaným způsobem a extrakt přidán do třetí frakce stejně jako organická část čtvrté a dalších frakcí.

Nulté frakce byly odpařeny na odparce (150 mbar, 30 °C, ne do sucha), otestovány na TLC desce a vyřazeny z dalšího zpracování. Všechny ostatní frakce byly odpařeny, převedeny do 12 ml centrifugačních zkumavek, odpařeny do sucha a zváženy. Organické části frakcí III až VIII byly smíchány, odpařeny a zváženy. Všechny frakce byly zředěny na koncentraci 1 mg/ml. Prvních 26 frakcí bylo rozpuštěno v hexanu a další v methanolu.

Tabulka 4 Složení gradientové mobilní fáze při kolonové chromatografii

diethylether (ml)	hexan (ml)	diethylether (ml)	hexan (ml)
0	200	28	172
2	198	32	168
4	196	36	164
6	194	40	160
8	192	50	150
10	190	60	140
12	188	70	130
16	184	80	120
20	180	90	110
24	176	100	100

3.5. Transesterifikace

Pro transesterifikaci byla použita metoda podle pana Dr. Stránského [93 – 95]. Ze skleněných trubiček o délce přibližně 15 cm a průměru 4 mm byly zatavením jednoho konce vyrobeny ampule. 100 μ l lipidového vzorku o koncentraci 10 mg/ml v hexanu bylo dávkováno do ampule. Hexan byl odpařen pod argonem. Bylo přidáno 250 μ l směsi methanol/chloroform 3:2 a 34 μ l acetylchloridu po kapkách, za chlazení. Poté byl konec ampule se vzorkem zmražen v suchém ledu a druhý konec ampule zataven. Uzavřená ampule se vzorkem byla zahřívána 30 min při 70 °C. Po zchlazení byla ampule otevřena a obsah zneutralizován uhličitanem stříbrným. Dále byl vzorek zcentrifugován a odebrán supernatant.

Takto připravené methylestery byly analyzovány pomocí GC-MS. Do plynového chromatografu byl dávkován 1 μ l vzorku při splitu 100:1 a průtoku 1 ml/min. Teplotní program byl nastaven takto: počáteční teplota 40 °C, poté zahřívání rychlostí 50 °C/min až na 140 °C a dále rychlostí 3 °C/min až na 320 °C. Tato teplota byla udržována po 20 minut. Tato metoda byla použita pro přípravu methylesterů v publikacích I a II.

3.6. MS analýza a vyhodnocení lipidů

3.6.1. Analýza frakcí pomocí ESI-Orbitrap MS

Jednotlivé frakce získané z kolonové chromatografie byly analyzovány na přístroji Orbitrap [96]. Vzorky byly zředěny methanolem na koncentraci 0,1 mg/ml. Jako mobilní fáze byla zvolena směs methanol/voda 90:10 s průtokem 100 μ l/min. Každý vzorek byl změřen třikrát. Tyto analýzy nebyly dokončeny z důvodu ukončení práce na ústavu.

3.6.2. Optimalizace matrice a analýza pomocí MALDI-TOF

MALDI matrice pro jednotlivé třídy lipidů vernixu byly optimalizovány pomocí standardů uvedených v **tabulce 5**. Standard diesterů diolů jako jediný není komerčně dostupný, proto byly použity diestery diolů vyizolované z vernixu. Roztoky standardů v chloroformu měly koncentraci 1 mg/ml. Otestováno bylo 13 matic. Jejich seznam, koncentrace a rozpouštědla jsou uvedeny v **tabulce 6**. Látky byly rozpuštěny podle doporučení v literatuře, případně byl připraven nasycený roztok, pokud nebyly dostupné informace o použité koncentraci.

Před použitím byla MALDI deska očištěna postupně chloroformem, methanolem a acetonem, 20 minut ultrazvukována ve směsi methanolu a vody 1:1 (v/v), opláchnuta čistým methanolem a ponechána na vzduchu, aby oschla. Každá matrice byla vyzkoušena na standardy lipidů identifikovaných ve vernixu pomocí TLC. Vzorek a matrice, každý o objemu 1 μ l, byly nanášeny třemi způsoby. Buď byla matrice překryta vzorkem, vzorek maticí, nebo byla smíchána matrice se

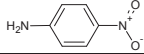
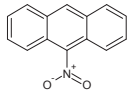
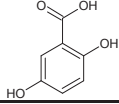
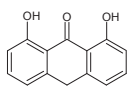

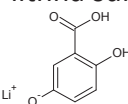
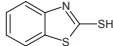
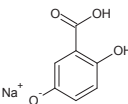

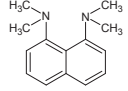
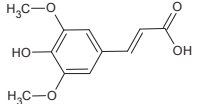
vzorkem před nanesením na desku. 1 μ l byl odměřován pomocí automatické pipety. Aby se zabránilo kontaminaci ftaláty, byly na plastové špičky automatické pipety přitaveny skleněné kapiláry. Nanesené vzorky a matrice uschly na vzduchu během několika sekund až minut. Před měřením byla deska s nanesenými vzorky uchovávána v exsikátoru. Metoda nanášení vzorku a matrice na desku je popsána v publikacích I a II.

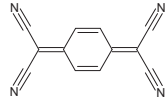
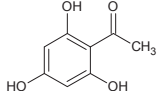
Analýza pomocí MALDI-TOF byla provedena v pozitivním i negativním modu. Přístroj byl kalibrován před každým měřením, pomocí PEG (s NaDHB v acetonu) v pozitivním modu a PEGS (s DHB v methanolu nebo PS v acetonu) v negativním modu. Z každého místa byla sbírána spektra 1000 laserových pulzů.

Tabulka 5 Standardy lipidů, jejich zkratky a metody, při kterých byly použity

zkratka	název (délka uhlíkového řetězce)	Mr	metody
Chol	cholesterol	386,7	TLC, MALDI
SQ	skvalen	410,7	TLC, MALDI
MG	palmitolein (C16:1)	328,5	TLC, MALDI
DG	distearin (C18:0/18:0(1-2;1-3))	625,0	TLC, MALDI
TG	tristearin (C18:0/18:0/18:0)	891,5	TLC, MALDI
WE	stearylbehenát (C22:0/18:0)	593,1	TLC, MALDI, WE/SE separace
WE:1	oleyloléát (C18:1/18:1)	532,5	WE/SE separace
WE:2	linoleyloléát (C18:1/18:2)	530,5	WE/SE separace
WE:3	linolenylstearát (C18:0/18:3)	530,5	WE/SE separace
SE	cholesterylstearát (C18:0)	653,1	TLC, MALDI, WE/SE separace
SE:1	cholesteryloleát (C18:1)	650,6	WE/SE separace
SE:2	cholesteryllinoléát (C18:2)	648,6	WE/SE separace
SE:3	cholesteryllinolenát (C18:3)	646,6	WE/SE separace
FFA	kyselina stearová (C18:0)	284,5	TLC, MALDI
FFA:1	kyselina olejová (C18:1)	282,5	MALDI
PL	fosfatidylcholin (C18:0)	789,1	TLC, MALDI
α -toko	α -tokoferol	430,7	TLC
ω -OH	kyselina ω -hydroxyeikosanová (C20:0)	330,5	TLC

Tabulka 6 Seznam látek vyzkoušených jako matrice, použítá rozpouštědla a molekulové hmotnosti těchto látek

	Matrice	Rozpouštědlo	M_{MI}
4NA	 4-nitroanilin	methanol	138,043
9NA	 9-nitroanthracen	acetone	223,063
DHB	 kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	methanol	154,027
DIT	 dithranol	chloroform	228,079
HPA	 kyselina 3-hydroxypikolinová	methanol	139,027
LiDHB	 lithná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové	acetone/chloroform 2:1	160,035
MBT	 2-merkaptobenzothiazol	methanol	166,986
NaDHB	 sodná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové	acetone	176,009
PA	 kyselina pikolinová	voda/acetonitril 2:1 + 0,1% TFA	123,032
PS	 N,N,N',N'-tetramethyl-1,8-naftalendiamin (proton sponge)	acetone	214,147
SA	 kyselina sinapová	methanol	224,068

	Matrice	Rozpouštědlo	M _{MI}
TCNQ	7,7,8,8-tetrakvanoquinodimethan 	toluen	204,044
THAP	2,4,6-trihydroxyacetofenon 	voda/acetonitril 1:1 + 0,1% TFA	168,042

Po optimalizaci podmínek pro použití jednotlivých látek jako matrice pomocí standardů lipidů byly výsledky aplikovány na lipidy vernixu a analytická metoda dále upravena. Tato optimalizace byla provedena za stejných podmínek měření jako se standardy. Poté byly změřeny separované a vyizolované lipidové třídy 20 vzorků vernixu, každý ve třech opakováních. Jednotlivé píky v hmotnostních spektrech byly identifikovány a ručně označeny tak, aby se do vyhodnocení nedostaly žádné píky z matrice a aby spektra byla navzájem porovnatelná. U každého spektra bylo odečteno pozadí.

Fragmentace byla provedena pomocí LIFT cely [97]. Při měření fragmentačních spekter bylo sbíráno 20 000 laserových pulzů. Fragmentační okno bylo nastaveno na nejužší možnou šířku. Pro následné statistické vyhodnocení byly absolutní hodnoty intenzit piků převedeny na relativní. Takto získaná a upravená data byla použita pro statistické zpracování výsledků v publikaci I.

3.6.3. Statistické vyhodnocení

Chemická diverzita a pohlavní specificita lipidových tříd vernixu byly studovány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a analýzy redundance (RDA)

s použitím statistického balíčku Canoco 4.5 (Biometrics, Plant Research). Tyto analýzy provedl RNDr. Robert Hanus, Ph.D.

Intenzity MALDI-TOF signálů pro jednotlivé lipidy byly převedeny na relativní proporce každé látky v rámci příslušné třídy lipidů. Diverzita jejich kvantitativního zastoupení pak byla zobrazena pomocí PCA jako faktorové skóre prvních dvou komponent pro každý subjekt.

V následujícím kroku byla tato relativní data analyzována pomocí RDA, v níž bylo pohlaví dítěte definováno jako kategoriální prediktor. RDA model pak byl podroben Monte Carlo permutačnímu testu (999 permutací) s cílem testovat statistickou významnost celkových rozdílů v chemických profilech mezi oběma pohlavími. S pomocí CanoDraw modulu bylo vybráno šest triacylglycerolů a šest voskových esterů, které byly nejvíce korelovány s RDA modelem a tedy nejvíce přispívají k rozdílům mezi pohlavími. Tyto vybrané látky byly dále fragmentovány a výsledná fragmentační spektra zpracována identickým způsobem, jako je popsáno výše pro intenzity jednotlivých lipidů.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Odběr vernixu a izolace lipidů

Při zpracování vzorků vernixu bylo posuzováno několik aspektů. Hlavním důvodem pro vyřazení vzorku byla kontaminace krví. Takto byla vyloučena téměř třetina vzorků. Další vzorky musely být vyřazeny kvůli neúplnosti doprovodných informací. Pro sérii jednotlivých vzorků a pro kolonovou chromatografii byly použity stejným dílem vzorky obou pohlaví. Způsob porodu byl spíše doplňkovou informací. Spontánní porod i císařský řez (s.c. – sectio caesarea) byly zastoupeny téměř rovnoměrně.

U místa odběru bylo důležité, aby vzorek nebyl odebrán z dlaní, chodidel a hlavy, kde je jiné množství mazových a potních žláz [26, 98]. Ze stejného důvodu byly použity pouze vzorky europoidní rasy. Gestační věk se ukázal být důležitým faktorem pro složení lipidů vernixu, což bylo zjištěno při vyhodnocení série dvaceti jednotlivých vzorků (viz dále). V **tabulce 7** jsou uvedeny zmíněné parametry pro tuto sérii. Vzhledem k variabilitě jednotlivých parametrů a omezenému počtu vzorků nebyly ostatní aspekty vzorku do této studie začleněny, byly však shromažďovány kvůli vyloučení jakýchkoli abnormalit a pro případné budoucí statistické vyhodnocení.

Výsledky izolací série jednotlivých vzorků jsou též uvedeny v **tabulce 7**. Hmotnost vzorku závisí na tom, kolik vernixu se podařilo z dítěte odebrat, vyizolovány pak byly lipidy z celého vzorku. Průměrný procentuální výtěžek v rámci série byl 10,2 %, jednotlivé vzorky se ale do jisté míry liší.

Tabulka 7 Série vzorků vernixu, jejich parametry a výsledky izolace lipidů. Každý vzorek je označen číslem, které odpovídá pořadovému číslu odběru. Gestační věk je vyjádřen počtem týdnů + počtem dnů. Hmotnosti vzorků a vyizolovaných lipidů jsou uvedeny v mg.

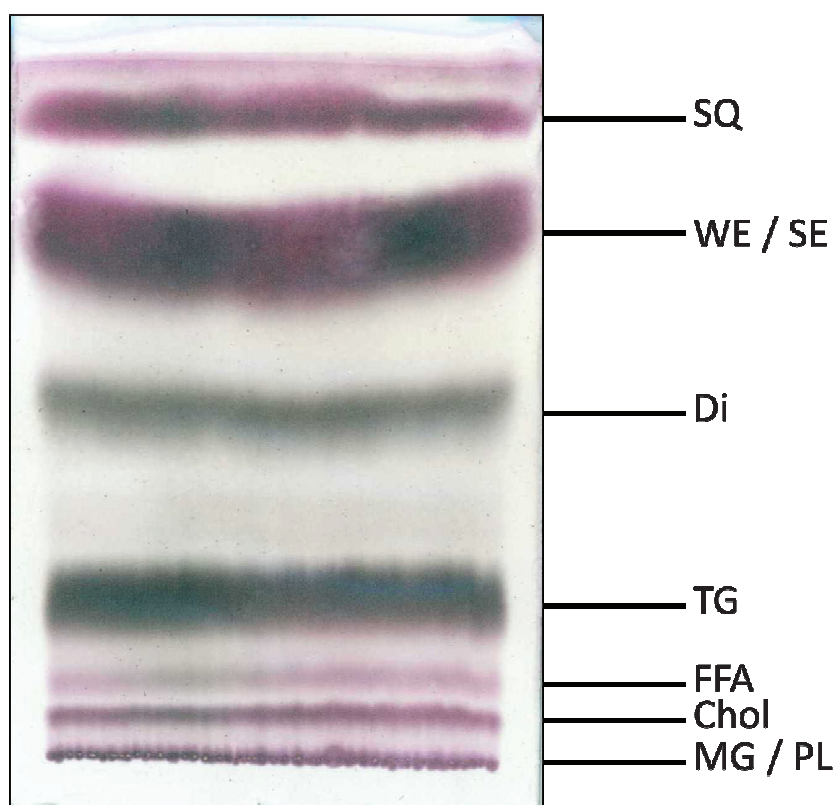
	pohlaví	gestační věk	způsob porodu	místo odběru	m vzorku	m lipidů	% lipidů
20	♀	41+5	s.c.	záda, stehno	1241,51	71,83	5,8
21	♀	39+3	s.c.	záda	2059,38	261,51	12,7
22	♂	40+6	spontánní	záda	1164,94	151,12	13,0
23	♀	41+1	spontánní	záda, hýždě	1265,03	149,27	11,8
30	♂	40+0	spontánní	třísla	875,47	105,90	12,1
37	♂	36+5	spontánní	záda	1071,94	121,01	11,3
42	♀	38+1	s.c.	záda	950,57	84,8	8,9
43	♂	38+0	spontánní	noha	901,59	82,06	9,1
44	♂	38+0	s.c.	ruka	295,84	24,78	8,4
45	♀	40+1	spontánní	záda	995,47	78,09	7,8
46	♀	41+2	spontánní	záda	426,06	28,30	6,6
47	♂	38+4	s.c.	noha	1197,32	115,02	9,6
48	♂	39+0	s.c.	záda	424,23	51,08	12,0
49	♀	41+2	spontánní	hýždě	1191,87	114,13	9,6
50	♂	40+0	s.c.	záda	1038,75	178,28	17,2
54	♂	40+3	s.c.	noha	1050,94	135,66	12,9
56	♂	39+5	spontánní	záda	1098,87	105,11	9,6
57	♀	40+0	spontánní	záda	361,13	42,17	11,7
58	♀	38+4	spontánní	záda	990,51	66,76	6,7
60	♀	41+2	spontánní	hýždě	604,24	41,72	6,9
52	♀	35+1	s.c.	záda	468,20	58,16	12,4

4.2. TLC separace lipidů

Lipidy vernixu byly separovány tenkovrstvou chromatografií. Po optimalizaci byly zvoleny desky o rozměrech 9x12 cm. Výsledkem optimalizace mobilní fáze byla směs hexanu a diethyletheru v objemovém poměru 93:7. Tímto způsobem bylo separováno a identifikováno sedm lipidových tříd. Pro identifikaci byly použity standardy a data z literatury. Jedinou lipidovou třídou, pro kterou se nepodařilo opatřit standard, byly diestery diolů, a proto mohly být identifikovány vylučovací metodou a porovnáním s údaji z literatury. Pro účely identifikace byla použita velká TLC deska (20x20 cm) a standardy všech lipidů uvedených v literatuře v souvislosti s vernixem. Tyto standardy jsou uvedeny v **tabulce 5** na straně 50. Pro další optimalizaci byly použity pouze standardy, které byly ve vernixu identifikovány. Dále byly separované a vyizolované lipidové zóny ověřeny pomocí hmotnostní spektrometrie.

Na **obrázku 6** je TLC deska separace lipidů. První zónu shora tvoří pouze skvalen (R_f 0,89 – 0,94), ve druhé byly identifikovány voskové estery a sterolestery (R_f 0,66 – 0,74), ve třetí diestery diolů (R_f 0,46 – 0,52) a v další triacylglyceroly (R_f 0,19 – 0,27). Mnohem méně intenzivní zóny polárních lipidů byly identifikovány jako volné mastné kyseliny (R_f 0,10 – 0,13) a cholesterol (R_f 0,06 – 0,08). Na startu zůstaly monoacylglyceroly a fosfolipidy (R_f 0,00 – 0,01).

Vzhledem k intenzitám separovaných zón byla pozornost nadále věnována méně polárním lipidům od voskových esterů po triacylglyceroly. Skvalen nebyl zahrnut do podrobnějšího zkoumání vzhledem k tomu, že se jedná o jedinou látku a nikoli o lipidovou třídu. Výše popsané metody zpracování vernixu byly dále použity v publikaci I, III a IV. Publikace III se zabývá skupinou triacylglycerolů a určováním polohy dvojných vazeb v nich obsažených. Publikace IV je zaměřena na skupinu diesterů diolů, které jsou v ní detailně popsány. V této práci se zároveň podařilo syntetizovat standard diesteru diolu.



Obrázek 6 TLC deska (9x12 cm) separace lipidů vernixu, SQ: skvalen; WE: voskové estery; SE: sterolestery; Di: diestery diolů; TG: triacylglyceroly; FFA: volné mastné kyseliny; Chol: cholesterol; MG: monoacylglyceroly; PL: fosfolipidy

Dále bylo nutné nalézt metodu pro separaci voskových esterů od sterolesterů. Přestože v literatuře je popsáno několik takových metod založených na oxidu nebo hydroxidu hořečnatém, použité stacionární fáze již dnes nejsou komerčně dostupné v požadované kvalitě [99, 100]. Po otestování těchto metod s využitím dostupných chemikálií nebylo dosaženo požadovaného rozdělení. Jako alternativa byl vyzkoušen florisil, stacionární fáze na bázi křemičitanu hořečnatého. Byly použity TLC desky 20x10 cm, které byly předem aktivovány v peci 1 hodinu při teplotě 120 °C. Složení mobilní fáze bylo zoptimalizováno na směs hexanu a diethyletheru v poměru 90:10 (v/v). Touto metodou se podařilo voskové estery od sterolesterů úplně oddělit.

Retenční faktor voskových esterů byl 0,54 – 0,68 a sterolesterů 0,32 – 0,48. Tyto výsledky jsou použity v publikaci I.

4.3. Transesterifikace

Během projektu, který předcházel výzkumu vernixu, byla optimalizována metoda transesterifikace podle Stránského. Při ní se podařilo přenést celé provedení z ručně zhotovovaných ampulí do vialek. Ampule byly použity, aby se zabránilo úniku esterů s velmi krátkým řetězcem při zahřívání. Výroba ampulí vyžaduje poměrně velkou zručnost, aby se omezil vznik mikropóru v místě zatavení, a zároveň rychlost při zatavování vzorku do ampule, aby nedošlo k odpaření vzorku. Provedení ve vialkách celou transesterifikaci značně zjednodušilo a porovnáním výsledků obou metod bylo prokázáno, že se kratší řetězce esterů (14 uhlíků) přes víčko při zahřívání neodpařují. Zároveň se usnadnila i neutralizace, protože ve vialce se vzorek lépe promíchává.

Tato metoda byla využita k ověření výsledků měřených na MALDI-TOF MS. Tato práce se zabývá voskovými estery a je popsána v publikaci II. Dále byly transesterifikovány i lipidy vernixu. Transesterifikaci lipidů série 20 vzorků, jejíž výsledky jsou uvedeny v publikaci I, provedla Mgr. Eva Háková po skončení mé práce na ústavu.

4.4. Analýza pomocí MALDI-TOF MS

4.4.1. Optimalizace maticí

V této části práce bylo testováno 13 látek jako matrice, 3 různé způsoby nanášení na MALDI desku, pozitivní i negativní mód měření a to vše pro všechny standardy lipidů identifikovaných ve vernixu. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v **tabulce 8**. Kyseliny 3-hydroxypikolinová, sinapová a dithranol nefungovaly jako matrice na žádný z lipidů, proto v přehledu výsledků nejsou uvedeny.

Matrice byly vyhodnoceny na základě intenzity signálu a případné přítomnosti interferenčních píků. Pro každou lipidovou třídu byla nalezena nejméně jedna vyhovující matrice. Na základě výsledků optimalizace se standardy byly vybrány matrice pro jednotlivé lipidové třídy.

Dále byly tyto matrice optimalizovány pro čtyři nejintenzivnější lipidové třídy izolované z vernixu: voskové estery (WE), sterolestery (SE), diestery diolů (Di) a triacylglyceroly (TG). Jako vyhovující matrice byla pro WE a Di určena matrice LiDHB a pro SE a TG vyhovovala matrice NaDHB.

Nejvhodnějším způsobem nanášení na MALDI desku je pro WE překrytí matrice vzorkem a pro SE, Di a TG smíchání vzorku a matrice před nanášením. Všechny čtyři lipidové třídy byly měřeny v pozitivním módu a byly u nich pozorovány sodné nebo lithné adukty v závislosti na použité matici.

Tabulka 8 Vyhodnocení optimalizace testovaných látek jako matrice. +++ vysoká kvalita signálu, žádná interference s matričními ionty; ++ dobrá kvalita signálu, možná interference s matričními ionty; + nízká kvalita signálu. x/M nanášení překrytím matrice vzorkem; M/x překrytí vzorku maticí; Mx smíchání matrice se vzorkem před nanesením.

Lipid	Matrice	Kvalita spektra	Nanášení	Mód	Adukt
SQ	DHB	++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	LiDHB	+++	x/M	poz.	[M + Li] ⁺
	PA	++	M/x	poz.	[M+matrice] ⁺
	TCNQ	+++	Mx	neg.	[M + Na] ⁻
SE	4NA	+	x/M	poz.	[M+matrice] ⁺
	DHB	+	x/M		[M + Na] ⁺
	NaDHB	++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	LiDHB	+++	x/M	poz.	[M + Li] ⁺
WE	4NA	+	x/M	poz.	[M+matrice] ⁺
	DHB	+	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	NaDHB	++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	LiDHB	+++	x/M	poz.	[M + Li] ⁺
CHol	DHB	++	M/x	neg.	[M] ⁻
TG	4NA	+	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	DHB	+++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	MBT	++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	NaDHB	+++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	PA	+++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	TCNQ	++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	THAP	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
DG	4NA	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	9NA	+	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	DHB	+++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	MBT	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	NaDHB	+++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	PA	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	TCNQ	+	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	THAP	++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
MG	DHB	+++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	NaDHB	+	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
FFA	NaDHB	++	x/M	neg.	[M] ⁻
	PA	+++	M/x	neg.	[M] ⁻
	PS	+++	M/x	neg.	[M] ⁻
	TCNQ	++	x/M	neg.	[M] ⁻
FFA:1	NaDHB	+	x/M	neg.	[M] ⁻
	PA	++	M/x	neg.	[M] ⁻
	PS	+++	x/M	neg.	[M] ⁻
	TCNQ	+	x/M	neg.	[M] ⁻

Lipid	Matrice	Kvalita spektra	Nanášení	Mód	Adukt
PL	DHB	++	Mx	poz.	[M + Na] ⁺
	MBT	+++	x/M	poz.	[M + Na] ⁺
	NaDHB	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	TCNQ	++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺
	THAP	+++	M/x	poz.	[M + Na] ⁺

4.4.2. MALDI spektra intaktních lipidů vernixu

Ve spektrech všech měřených lipidových tříd, kromě skvalenu, bylo pozorováno velké množství píků. Spektrum skvalenu obsahovalo podle očekávání pouze jediný signál. Nutno zdůraznit, že každý pík v MALDI spektru může reprezentovat několik různých lipidů o stejném elementárním složení, které není možno touto technikou od sebe rozlišit. Proto byl každý pík charakterizován počtem uhlíkových atomů a dvojných vazeb.

Ve frakci voskových esterů byly nalezeny řetězce o délce 26 až 46 uhlíků, které jsou až třikrát nenasycené. Nejvyšší signály odpovídají molekulám s jednou dvojnou vazbou. Řetězce mastných kyselin naměřených sterol esterů obsahují 14 až 32 uhlíků a až dvě dvojně vazby. Diestery diolů izolované z vernixu obsahují 46 až 64 uhlíků a až tři dvojně vazby. Ve frakci triacylglycerolů byly naměřeny molekuly s 39 až 69 uhlíky v mastných kyselinách, které jsou až čtyřikrát nenasycené. Nejintenzivnější jsou píky s jednou nebo dvěma dvojnými vazbami.

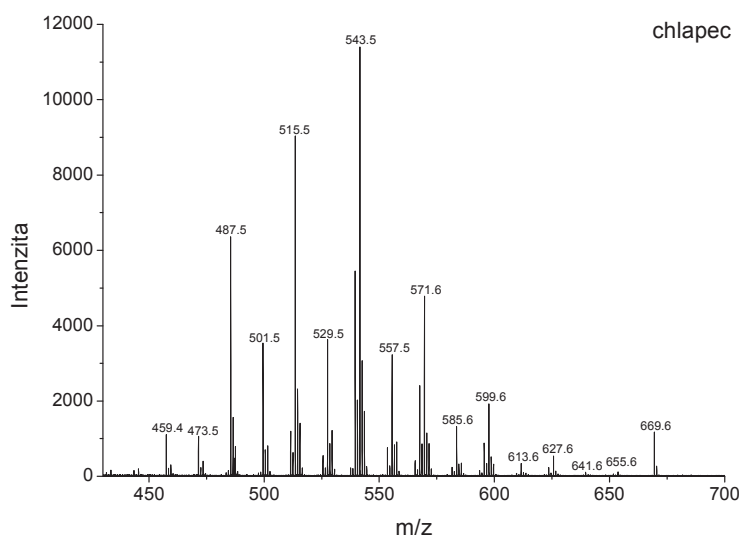
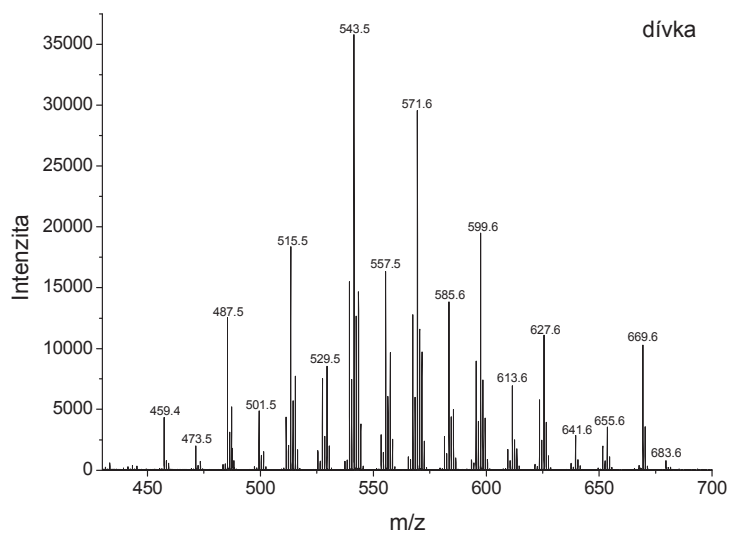
4.4.3. Rozdíly v intaktních lipidech

Spektra byla porovnávána kvalitativně i kvantitativně podle různých aspektů, jako gestační věk, pohlaví, místo odběru a další parametry. Nebyly nalezeny žádné

kvalitativní rozdíly. Kvantitativní rozdíly v lipidech byly pozorovány mezi dívkami a chlapci.

Dále bylo statisticky porovnáváno relativní kvantitativní zastoupení vybraných látek u čtyř blíže studovaných lipidových tříd vernixu s ohledem na pohlaví dítěte. K tomu byly použity metody PCA a RDA. U sterolesterů a diesterů diolů nebyly prokázány významné rozdíly v jejich kvantitativní distribuci. Tento závěr byl potvrzen i statisticky nevýznamným Monte Carlo permutačním testem v RDA analýze. Naopak rozdíly ve spektrech voskových esterů a triacylglycerolů bylo možné pozorovat pouhým okem, jak je vidět na **obrázku 7**.

Spektra voskových esterů a triacylglycerolů u dívek vykazovala mnohem vyšší intenzity píků delších řetězců mastných kyselin. U chlapců byly naopak více zastoupeny kratší řetězce. I následné PCA statistické vyhodnocení prokázalo markantní rozdíly v kvantitativním zastoupení těchto dvou skupin, u nichž byl pozorován jen nevýznamný překryv. Spektra voskových esterů a triacylglycerolů jsou uvedena v publikaci I spolu s grafickým vyjádřením výsledků PCA metody. Tyto výsledky byly dále potvrzeny analýzou redundance ($F = 6,9$; $p = 0,008$). Procentuální příspěvky jednotlivých voskových esterů, resp. triacylglycerolů k celkovému rozdílu jsou uvedeny v **tabulkách 9 a 10**.



Obrázek 7 MALDI-TOF spektrum voskových esterů vernixu dívky (nahore) a chlapce (dole). Intenzity signálů delších řetězců v pravé části spektra jsou zřetelně vyšší u dívky.

Tabulka 9 Výsledky analýzy redundance voskových esterů (WE) z vernixu caseosy pro vyhodnocení rozdílu v pohlaví. Procentuální příspěvky jednotlivých voskových esterů k celkové odlišnosti se standardní odchylkou (SD).

WE	♂	SD	♀	SD	WE	♂	SD	♀	SD
30:1	1,79 ± 0,50		1,44 ± 0,96		38:1	7,47 ± 1,24		8,97 ± 2,60	
30:0	0,32 ± 0,14		0,24 ± 0,13		38:0	1,78 ± 0,85		2,67 ± 1,50	
31:1	1,30 ± 0,52		1,30 ± 0,70		39:2	0,55 ± 0,19		0,90 ± 0,26	
31:0	0,48 ± 0,19		0,31 ± 0,17		39:1	2,95 ± 0,81		4,49 ± 1,39	
32:1	7,20 ± 1,95		3,98 ± 2,54		39:0	1,30 ± 0,63		1,73 ± 0,92	
32:0	0,91 ± 0,27		0,59 ± 0,33		40:2	1,80 ± 0,54		2,83 ± 0,81	
33:1	4,40 ± 1,18		2,39 ± 1,60		40:1	3,86 ± 1,36		6,10 ± 1,69	
33:0	0,81 ± 0,25		0,55 ± 0,21		40:0	0,89 ± 0,65		1,56 ± 1,30	
34:2	1,68 ± 0,37		1,30 ± 0,78		41:2	0,21 ± 0,08		0,54 ± 0,27	
34:1	10,34 ± 2,97		6,27 ± 3,26		41:1	1,27 ± 0,76		2,45 ± 1,00	
34:0	1,84 ± 0,43		1,78 ± 0,53		41:0	0,47 ± 0,49		0,78 ± 0,57	
35:2	0,72 ± 0,31		0,66 ± 0,37		42:2	0,76 ± 0,57		1,82 ± 0,87	
35:1	4,53 ± 1,29		3,43 ± 1,43		42:1	2,00 ± 1,42		3,72 ± 1,53	
35:0	1,95 ± 0,61		2,26 ± 0,57		42:0	0,36 ± 0,46		0,57 ± 0,47	
36:2	6,84 ± 1,32		4,66 ± 2,10		43:2	0,06 ± 0,04		0,20 ± 0,15	
36:1	13,32 ± 2,99		10,90 ± 2,44		43:1	0,58 ± 0,53		1,15 ± 0,66	
36:0	2,77 ± 0,90		3,42 ± 0,98		43:0	0,15 ± 0,26		0,21 ± 0,17	
37:2	1,40 ± 0,37		0,98 ± 0,36		44:2	0,25 ± 0,24		0,69 ± 0,42	
37:1	5,30 ± 0,89		5,57 ± 0,94		44:1	0,71 ± 0,72		1,37 ± 0,69	
37:0	1,92 ± 0,84		2,58 ± 0,87		44:0	0,08 ± 0,13		0,12 ± 0,11	
38:2	3,66 ± 0,59		3,66 ± 0,45						

Tabulka 10 Výsledky analýzy redundance triacylglycerolů (TG) z vermixu caseosy pro vyhodnocení rozdílu v pohlaví. Procentuální příspěvky jednotlivých triacylglycerolů k celkové odlišnosti se standardní odchylkou (SD).

TG	♂	SD	♀	SD	TG	♂	SD	♀	SD
39:0	0,23	± 0,06	0,21	± 0,05	52:4	0,24	± 0,12	0,23	± 0,04
40:0	0,32	± 0,10	0,26	± 0,09	52:3	0,82	± 0,64	0,88	± 0,15
41:1	0,29	± 0,08	0,27	± 0,06	52:2	1,67	± 1,17	2,74	± 0,94
41:0	0,54	± 0,14	0,42	± 0,19	52:1	1,18	± 0,43	2,70	± 0,56
42:2	0,16	± 0,05	0,18	± 0,05	52:0	0,53	± 0,16	0,79	± 0,19
42:1	0,59	± 0,16	0,48	± 0,21	53:3	0,21	± 0,05	0,32	± 0,08
42:0	1,70	± 0,23	0,74	± 0,41	53:2	0,35	± 0,06	0,65	± 0,20
43:2	0,22	± 0,06	0,22	± 0,06	53:1	0,45	± 0,06	0,75	± 0,17
43:1	1,10	± 0,21	0,84	± 0,39	53:0	0,39	± 0,09	0,58	± 0,14
43:0	1,79	± 0,28	1,24	± 0,59	54:4	0,21	± 0,18	0,20	± 0,04
44:2	0,50	± 0,15	0,43	± 0,18	54:3	0,37	± 0,37	0,45	± 0,13
44:1	2,56	± 0,23	1,76	± 0,83	54:2	0,42	± 0,21	0,68	± 0,16
44:0	3,60	± 0,34	2,10	± 0,70	54:1	0,53	± 0,12	0,80	± 0,17
45:2	0,80	± 0,19	0,64	± 0,29	54:0	0,51	± 0,16	0,74	± 0,20
45:1	3,67	± 0,31	2,61	± 0,96	55:2	0,18	± 0,04	0,26	± 0,07
45:0	3,79	± 0,64	2,76	± 0,61	55:1	0,39	± 0,06	0,59	± 0,15
46:3	0,24	± 0,07	0,21	± 0,07	55:0	0,48	± 0,13	0,75	± 0,22
46:2	2,50	± 0,30	1,47	± 0,62	56:2	0,23	± 0,05	0,30	± 0,09
46:1	6,29	± 0,77	4,34	± 1,13	56:1	0,56	± 0,14	0,83	± 0,19
46:0	4,75	± 0,77	3,50	± 0,47	56:0	0,59	± 0,24	0,85	± 0,31
47:3	0,28	± 0,09	0,24	± 0,08	57:2	0,17	± 0,04	0,23	± 0,05
47:2	2,23	± 0,30	1,67	± 0,62	57:1	0,40	± 0,08	0,66	± 0,18
47:1	6,70	± 1,40	4,73	± 0,79	57:0	0,43	± 0,12	0,66	± 0,22
47:0	4,16	± 0,87	3,41	± 0,37	58:2	0,20	± 0,05	0,28	± 0,08
48:3	0,76	± 0,20	0,57	± 0,24	58:1	0,45	± 0,17	0,79	± 0,23
48:2	3,91	± 0,40	2,90	± 0,78	58:0	0,39	± 0,16	0,60	± 0,24
48:1	7,33	± 1,10	6,57	± 0,89	59:2	0,13	± 0,03	0,21	± 0,06
48:0	3,69	± 0,56	3,52	± 0,51	59:1	0,27	± 0,07	0,52	± 0,17
49:3	0,51	± 0,14	0,46	± 0,17	59:0	0,22	± 0,07	0,39	± 0,13
49:2	2,39	± 0,29	2,28	± 0,46	60:2	0,15	± 0,04	0,24	± 0,08
49:1	4,36	± 0,55	5,11	± 0,74	60:1	0,26	± 0,12	0,48	± 0,19
49:0	1,98	± 0,33	2,21	± 0,36	60:0	0,21	± 0,09	0,33	± 0,12
50:4	0,19	± 0,05	0,18	± 0,05	61:2	0,10	± 0,03	0,15	± 0,05
50:3	1,00	± 0,24	0,88	± 0,22	61:1	0,15	± 0,04	0,29	± 0,11
50:2	3,18	± 0,56	3,72	± 0,62	61:0	0,13	± 0,03	0,21	± 0,08
50:1	4,24	± 0,91	6,41	± 2,38	62:2	0,10	± 0,03	0,19	± 0,08
50:0	1,40	± 0,26	1,93	± 0,48	62:1	0,15	± 0,06	0,31	± 0,12
51:3	0,45	± 0,11	0,53	± 0,10	62:0	0,13	± 0,05	0,19	± 0,08

TG	♂	SD	♀	SD	TG	♂	SD	♀	SD
51:2	1,17	± 0,16	1,92	± 0,34	63:1	0,10	± 0,03	0,20	± 0,08
51:1	1,40	± 0,15	2,45	± 0,63	64:2	0,08	± 0,03	0,17	± 0,07
51:0	0,61	± 0,12	0,90	± 0,21	64:1	0,11	± 0,04	0,20	± 0,09

4.4.4. Fragmentační spektra lipidů různých tříd

Dále byly zkoumány lipidové třídy vernixu, u nichž byl prokázán statisticky významný rozdíl v pohlaví. Jak již bylo řečeno výše, každý pík hmotnostního spektra může obsahovat více izomerů. Nebylo tedy jasné, zda výsledná rozdílnost plyne z odlišného kvalitativního nebo kvantitativního zastoupení jednotlivých lipidů. Pro získání detailnějších informací byla naměřena fragmentační spektra šesti voskových esterů (WE 32:1, WE 34:1, WE 36:2, WE 40:1, WE 41:1, WE 42:1) a šesti triacylglycerolů (TG 45:0, TG 45:1, TG 46:1, TG 52:1, TG 62:1, TG 64:1), které se nejvíce podílely na celkové odlišnosti. Tato spektra byla měřena pomocí MALDI-TOF/TOF MS. Píky byly identifikovány a spektra byla opět porovnána analýzou redundance.

U voskových esterů bylo ve fragmentačních spektrech pozorováno a identifikováno pouze pět signálů patřících lithiovaným mastným kyselinám (FA) těchto esterů ($[FA14:1+Li]^+$, $[FA15:0+Li]^+$, $[FA16:1+Li]^+$, $[FA17:1+Li]^+$, $[FA18:1+Li]^+$). Těchto pět signálů tvořilo více než 95 % celkové intenzity. Kvalitativně se spektra všech šesti voskových esterů u obou pohlaví nelišila. Významné kvantitativní rozdíly v pohlaví byly nalezeny pomocí analýzy redundance u všech fragmentovaných voskových esterů. Ve fragmentačních spektrech chlapců byl významně intenzivnější signál $[FA16:1+Li]^+$, kdežto u dívek to byl fragment o dva uhlíky delší $[FA18:1+Li]^+$.

Lipidová třída triacylglycerolů je o něco bohatší a fragmentační spektra měřené šestice se mezi sebou v rámci jednoho vzorku do jisté míry liší na rozdíl od voskových esterů, kde bylo identifikováno pět fragmentů stejných pro každý

z měřených voskových esterů. Fragmenty triacylglycerolů byly identifikovány jako neutrální ztráty mastných kyselin a jejich sodných solí. Tyto fragmenty se objevují v klastrech lišících se od sebe počtem uhlíků. Pro další vyhodnocení byl použit nejintenzivnější sodíkový fragment z každého klastru. Tyto fragmenty a jejich prekurzory jsou uvedeny v publikaci I. Ani zde nebyly pozorovány kvalitativní rozdíly mezi oběma pohlavími, ale, stejně jako u voskových esterů, byly prokázány významné rozdíly v zastoupení dominantních fragmentů triacylglycerolů.

4.4.5. Složení vernixu v závislosti na pohlaví

Výsledky série 20 vzorků potvrzují hypotézu, že se lipidy vernixu liší v závislosti na pohlaví dítěte. Tento fakt byl patrný jak z měření intaktních lipidů, tak i z fragmentačních spekter, kde byl pozorován statisticky významný rozdíl u voskových esterů a triacylglycerolů. Tento předpoklad byl dále potvrzen porovnáním transesterifikovaných mastných kyselin lipidového extraktu vernixu. Toto měření provedla Mgr. Eva Háková po ukončení mé práce na ústavu.

Biologické pozadí této odlišnosti je známé jen do určité míry. Produkce mazových žláz je řízena hormonálně, konkrétně sexuálními hormony, estrogenem a testosteronem. Studie na krysách prokázala schopnost estrogenu urychlovat produkci seba a testosteronu ji zpomalovat. Voskové estery a triacylglyceroly, u kterých byl prokázán rozdíl v pohlaví, pocházejí z mazových žláz [41, 101].

Do série porovnávaných vzorků nebyl zařazen vzorek mázku dívky, která se narodila předčasně ve 35. týdnu, tedy více než o měsíc dřív. Její vzorek byl ale zpracován a měřen spolu s touto sérií. Zatímco profilem voskových esterů spadla mezi v termínu narozené chlapečky, v triacylglycerolech se lišila od celé série.

Na základě uvedených skutečností lze usuzovat, že odlišnosti v lipidech vernixu jsou výsledkem rozdílné dynamiky prenatálního vývoje kůže, a to zejména její povrchové bariéry. Bylo by žádoucí rozšířit studium vernixu o sérii nedonošených dětí. Tento plán je ovšem velmi těžko proveditelný kvůli nedostatku

vhodných vzorků. Předčasně narozené děti na sobě mají vernixu jen velmi málo, nebo žádný nemají. Navíc ty které ho mají, jsou téměř vždy holčičky, u kterých je vernixu přirozeně více než u chlapečků. U dostupných vzorků by se ovšem mohla sledovat závislost lipidového složení vernixu na gestačním věku dítěte.

4.5. Zpracování velkého množství vernixu

4.5.1. Optimalizace extrakcí

Před provedením kolonové chromatografie velkého množství lipidů vernixu bylo potřeba najít nejvhodnější způsob extrakce s co největším výtěžkem. Izolace, která byla použita na jednotlivé vzorky, není vhodná pro použití ve velkém měřítku, neboť sušení vzorku síranem hořečnatým se používá u malého množství vzorku. Byly tedy testovány extrakce podle Folche a extrakce pomocí MTBE. Obě metody musely být pro vernix upraveny, jak je popsáno v experimentální části.

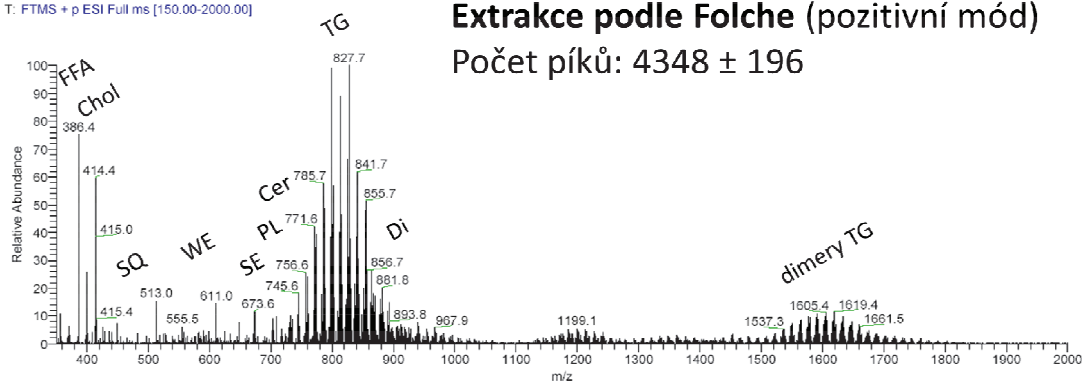
Výsledky byly porovnávány pomocí ESI-Orbitrap-MS a celkového množství vyextrahovaných lipidů. Měření na ESI-Orbitrap-MS bylo prováděno formou přímého nástřiku. Po softwarovém odstranění izotopů byla spektra porovnána na základě počtu píků. Vyhodnocení podle počtu píků neupřednostnilo žádnou z metod. Spektra a počty píků obou metod jsou na **obrázcích 8 a 9**.

Také výtěžky obou extrakcí se ukázaly být rovnocenné, jak je ukázáno v **tabulce 11**. Pro extrakci velkého množství lipidů vernixu byla nakonec zvolena Folchova metoda kvůli jednoduššímu technickému provedení.

Tabulka 11 Porovnání množství lipidů vyextrahovaných metodou podle Folche a pomocí MTBE.

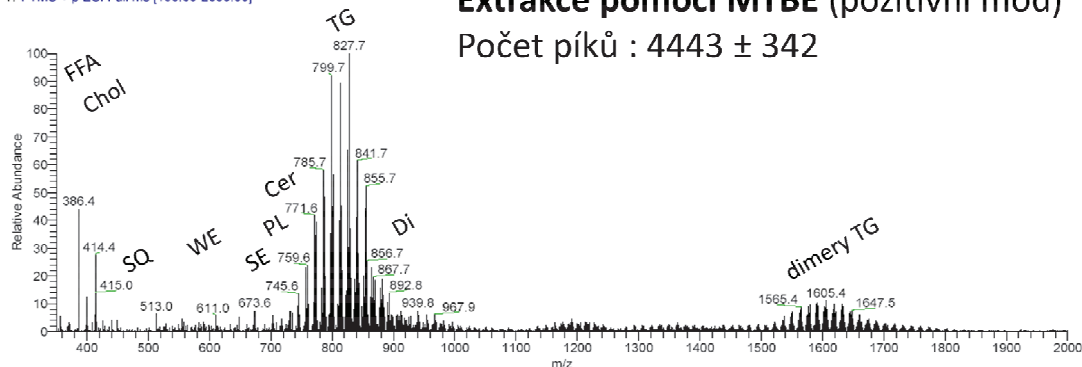
Folch	m (mg)	m (mg)	MTBE
F1	25,28	21,06	M1
F2	25,73	22,41	M2
F3	27,71	23,92	M3
F4	22,87	32,80	M4
F5	23,50	23,25	M5
průměr	25,02	24,69	průměr
SD	1,72	4,17	SD

FC1 #50-66 RT: 1.47-1.96 AV: 17 NL: 3.05E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Extrakce podle Folche (pozitivní mód)
Počet píků: 4348 ± 196

mc1 #55-68 RT: 1.62-2.01 AV: 14 NL: 6.54E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

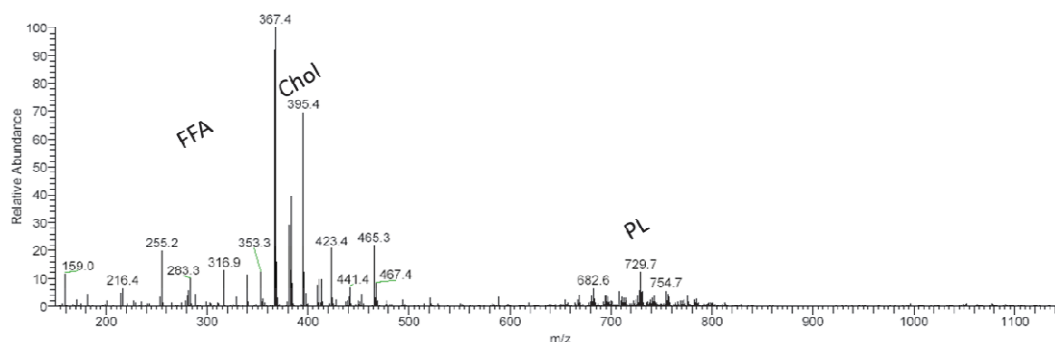


Extrakce pomocí MTBE (pozitivní mód)
Počet píků : 4443 ± 342

Obrázek 8 Hmotnostní spektra lipidů vernixu extrahovaných podle Folche a pomocí MTBE v pozitivním módu.

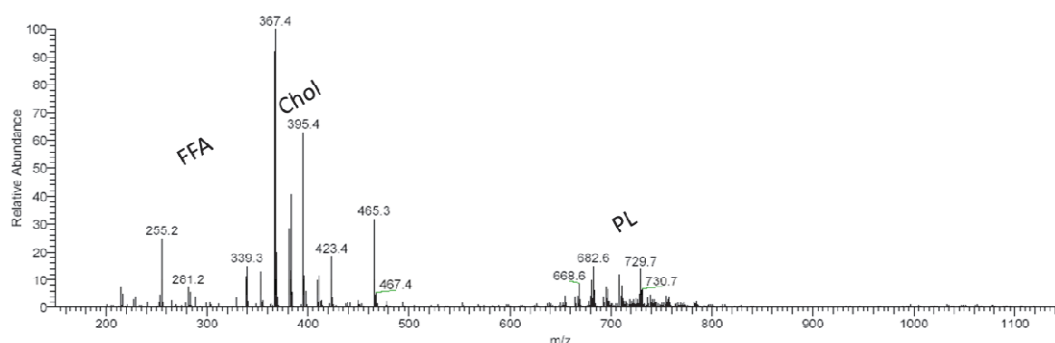
FE1 #24-35 RT: 0.68-1.00 AV: 12 NL: 2.66E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-2000.00]

Extrakce podle Folche (negativní mód)



me1 #24-34 RT: 0.68-0.97 AV: 11 NL: 3.47E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-2000.00]

Extrakce pomocí MTBE (negativní mód)



Obrázek 9 Hmotnostní spektra lipidů vernixu extrahovaných podle Folche a pomocí MTBE v negativním módu.

4.5.2. Kolonová chromatografie

Pro extrakci velkého množství lipidů bylo použito 43,5 g vernixu obou pohlaví v poměru 1:1. Tímto způsobem bylo získáno 4,7 g lipidů, které byly dále separovány na koloně se silikagelem. Celkem bylo najímáno 33 frakcí, z nichž poslední tři pocházejí z vymývání kolony směsí chloroform/methanol 2:1 po ukončení gradientu hexan/diethylether a jsou označeny římskými číslicemi. Množství lipidů v každé frakci je uvedeno v **tabulce 12**. Frakce 1 až 26 byly rozpuštěny

v hexanu na koncentraci 1 mg/ml. Ostatní frakce se nepodařilo rozpustit a byly ponechány stranou.

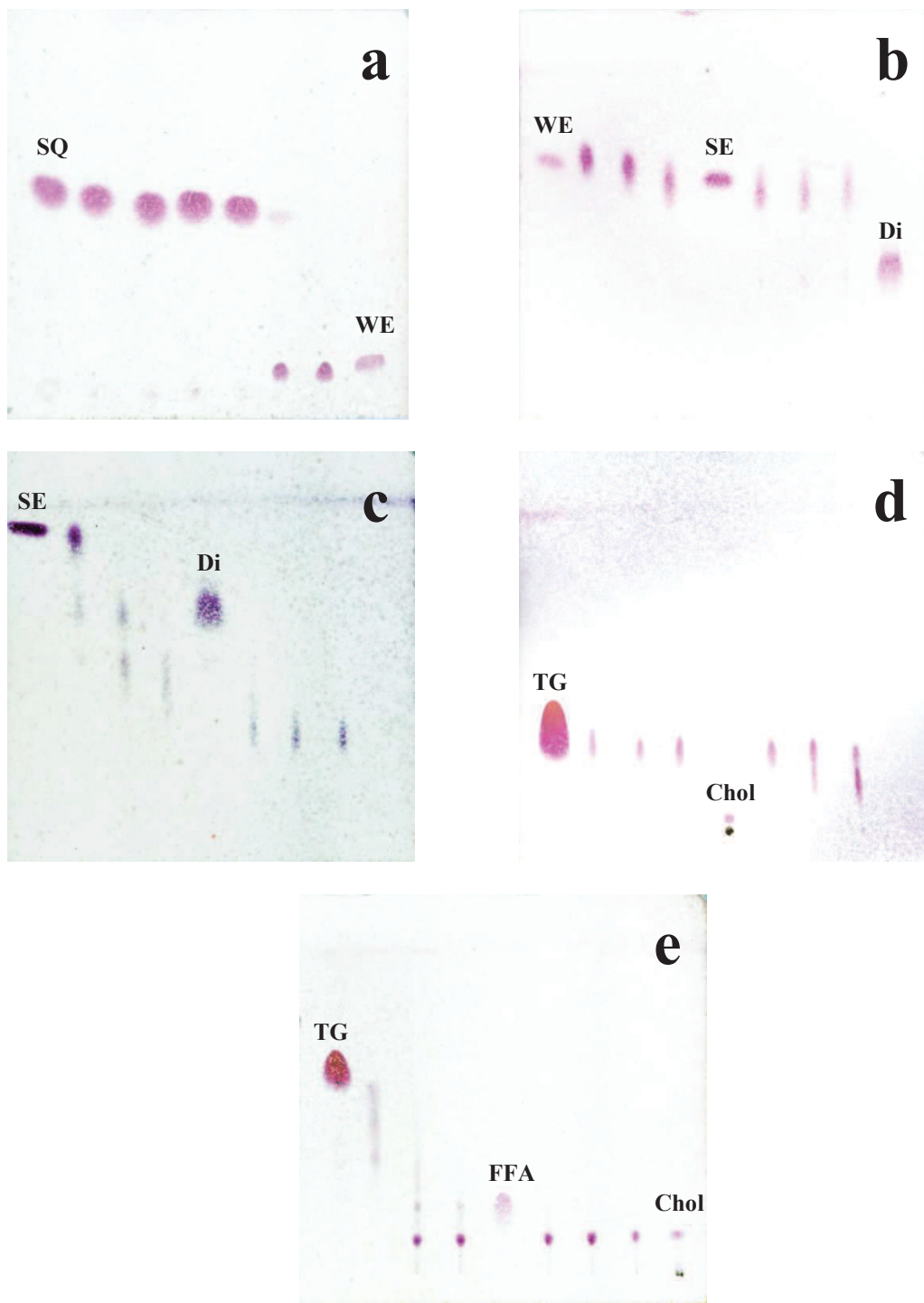
Tabulka 12 Množství lipidů v jednotlivých frakcích získaných separací na koloně. Římskými číslicemi jsou označeny frakce z vymývání kolony po ukončení gradientu.

frakce	m (mg)	frakce	m (mg)	frakce	m (mg)
1	22,71	12	22,35	23	173,78
2	192,50	13	10,91	24	150,05
3	53,60	14	35,20	25	32,78
4	10,40	15	114,84	26	4,20
5	8,39	16	111,63	27	2,19
6	108,26	17	268,69	28	2,74
7	388,90	18	177,62	29	4,16
8	477,87	19	108,68	30	2,21
9	590,51	20	32,38	I	3,43
10	588,50	21	40,35	II	15,21
11	75,64	22	69,80	III	232,32

V dalším kroku bylo 26 frakcí dále separováno na TLC deskách různými mobilními fázemi. Prvních 6 frakcí bylo separováno čistým hexanem. Pro 6. až 11. frakci byla použita směs hexan/diethylether 95:5, pro 11. až 21. frakci stejná směs v poměru 90:10 a pro 21. až 26. frakci stejná směs v poměru 80:20. Na desky byly kromě frakcí nanášeny i standardy předpokládaných lipidových tříd.

V prvních čtyřech frakcích byl identifikován skvalen. V páté frakci byl SQ spolu s WE a SE, které se od sebe na silikagelu nedělí. V 6. až 8. frakci byly nalezeny pouze WE a SE. Ve frakcích číslo 9 a 10 byly kromě WE a SE pozorovány i Di. V 11. frakci se objevily tři skvrny, z nichž jedna patří WE a SE, druhá Di a třetí

TAG. Ve 12. frakci jsou Di a TG. Frakce 13 až 19 obsahují pouze TG. Ve frakcích 20 a 21 byla nalezena kromě TG ještě další lipidová skupina, která nebyla identifikována. Frakce 22 obsahuje 4 lipidové skupiny, z nichž dvě byly identifikovány jako FFA a Chol. U 23. frakce byla kromě FFA a Chol nalezena pouze jedna neidentifikovaná lipidová skupina, která se shoduje s neznámou lipidovou skupinou v předchozí frakci. Ve frakci 24 až 26 byl pozorován cholesterol spolu s dalšími polárnějšími lipidy. TLC desky všech frakcí jsou ukázány na **obrázku 10**.



Obrázek 10 TLC desky 26 lipidových frakcí z kolonové chromatografie. Desky byly vyvinuty v čistém hexanu (a), ve směsi hexan/diethylether 95:5 (b), ve směsi hexan/diethylether 90:10 (c,d) a ve směsi hexan/diethylether 80:20 (e). Použité standardy jsou řádně označeny.

5. Závěr

Touto prací byl započat nový projekt, který se zabývá lipidomikou vernixu caseosy. V rámci projektu byla navázána spolupráce s porodnicí a získán souhlas etické komise s odběrem a zpracováním vzorků vernixu.

Během práce byla zoptimalizována metoda izolace lipidů z jednotlivých vzorků vernixu. Průměrný výtěžek takto získaných lipidů (10,2 %) odpovídá předpokládanému množství. Vyizolované lipidy se podařilo separovat pomocí tenkovrstvé chromatografie ve dvou krocích. V prvním kroku byl jako stacionární fáze použit silikagel. Ve druhém kroku byly separovány voskové estery a sterolestery pomocí florisilu. Optimalizace byla provedena také pro metodu transesterifikace lipidů, která byla zjednodušena. Estery byly měřeny pomocí GC-MS.

Dále byla optimalizována metoda detekce lipidů pomocí MALDI-TOF MS. Pro tuto techniku byly určeny vhodné matrice pro jednotlivé lipidové třídy identifikované ve vernixu, vhodný způsob nanášení vzorku a matrice a další podmínky měření.

Výsledky těchto optimalizací pak byly aplikovány na sérii 20 vzorků vernixu. Tato práce byla zaměřena na čtyři méně polární lipidové třídy: voskové estery, sterolestery, diestery diolů a triacylglyceroly. Výsledná spektra byla porovnána a u voskových esterů a triacylglycerolů byl nalezen rozdíl mezi spektry dívek a chlapců. Diverzita byla ověřena statistickým zpracováním dat a fragmentačním měřením na MALDI-TOF/TOF MS. Dále byly výsledky potvrzeny transesterifikací vernixu a jejich analýzou na GC-MS.

Dalším přístupem ve výzkumu vernixu caseosy byla extrakce a separace velkého množství lipidů ze směsi mnoha vzorků vernixu. V této části práce byly vyzkoušeny různé způsoby extrakce a na základě výtěžku extrakce, počtu píků v hmotnostním spektru a technického provedení metod byla určena extrakce podle

Folche jako nejvhodnější. Vyextrahované lipidy byly separovány pomocí kolonové chromatografie a získané frakce identifikovány pomocí tenkovrstvé chromatografie.

V této práci byly zavedeny a zoptimalizovány metody základního zpracování vzorků vernixu od odběru vzorku po měření jednotlivých lipidových tříd pomocí MALDI-TOF MS, a tím byly poskytnuty základy pro další výzkum tohoto unikátního a velmi důležitého přírodního materiálu.

6. Literatura

- [1] J. Kaerkkäinen, T. Nikkari, S. Ruponen, E. Haahti: Lipids of Vernix Caseosa, *J. Invest. Dermatol.* 44 (1965) 333 - 338.
- [2] D. T. Downing, R. S. Greene: Double Bond Positions in the Unsaturated Fatty Acids of Vernix Caseosa, *J. Invest. Dermatol.* 50(5) (1968) 380 - 386.
- [3] N. Nicolaides, H. C. Fu, G. R. Rice: The Skin Surface Lipids on Man Compared with Those of Eighteen Species of Animals, *J. Invest. Dermatol.* 73(1) (1979) 112 - 117.
- [4] R. Rissmann, H. W. W. Groenink, G. S. Gooris, M. H. M. Oudshoorn, W. E. Hennink, M. Ponc, J. A. Bouwstra: Temperature-Induced Changes in Structural and Physicochemical Properties of Vernix Caseosa, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 292 - 299.
- [5] R. Rissmann, G. Gooris, M. Ponc, J. Bouwstra: Long Periodicity Phase in Extracted Lipids of Vernix Caseosa Obtained with Equilibration at Physiological Temperature, *Chem. Phys. Lipids.* 158(1) (2009) 32 - 38.
- [6] W. L. Pickens, R. R. Warner, Y. L. Boissy, R. E. Boissy, S. B. Hoath: Characterization of Vernix Caseosa Water Content, Morphology, and Elemental Analysis, *J. Invest. Dermatol.* 115(5) (2000) 875 - 881.
- [7] G. Singh, G. Archana: Unraveling the Mystery of Vernix Caseosa, *Indian J. Dermatol.* 53(2) (2008) 54 - 60.
- [8] M. Tollin, G. Bergsson, Y. Kai-Larsen, J. Lengqvist, J. Sjövall, W. Griffiths, G. V. Skúladóttir, A. Haraldsson, H. Jörnvall, G. H. Gudmundsson, B. Agerberth: Vernix Caseosa as a Multi-Component Defence System Based on Polypeptides, Lipids and Their Interactions, *Cell Mol. Life Sci.* 62(19-20) (2005) 2390 - 2399.
- [9] T. Nikkari, P. H. Schreibman, E. H. Ahrens Jr.: In Vivo Studies of Sterol and Squalene Secretion by Human Skin, *J. Lipid Res.* 15(6) (1974) 563 - 573.
- [10] D. T. Downing, J. S. Strauss: Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin, *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 228 - 244.

- [11] K. De Paepe, A. Weerheim, E. Houben, D. Roseeuw, M. Ponc, V. Rogiers: Analysis of Epidermal Lipids of the Healthy Human Skin: Factors Affecting the Design of a Control Population, *Skin Pharmacol. Physiol.* 17 (2004) 23 - 30.
- [12] N. Nicolaides, J. M. Apon: Further Studies of the Saturated Methyl Branched Fatty Acids of Vernix Caseosa Lipid, *Lipids* 11(11) (1976) 781 - 790.
- [13] N. Nicolaides: The Structures of the Branched Fatty Acids in the Wax Esters of Vernix Caseosa, *Lipids* 6(12) (1971) 901 - 905.
- [14] M. E. Stewart, M. A. Quinn, D. T. Downing: Variability in the Fatty Acid Composition of Wax Esters from Vernix Caseosa and Its Possible Relation to Sebaceous Gland Activity, *J. Invest. Dermatol.* 78(4) (1982) 291 - 295.
- [15] M. Nazzaro-Porro, S. Passi, L. Boniforti, F. Belsito: Effects of Aging on Fatty Acids in Skin Surface Lipids, *J. Invest. Dermatol.* 73(1) (1979) 112 - 117.
- [16] C. A. Henderson, J. Taylor, W. J. Cunliffe: Sebum Excretion Rates in Mothers and Neonates, *Brit. J. Dermatol.* 142 (2000) 110 - 111.
- [17] J. Ågren, S. Zelenin, M. Håkansson, A.-C. Eklöf, A. Aperia, L. N. Nejsun, S. Nielsen, G. Sedin: Transepidermal Water Loss in Developing Rats: Role of Aquaporins in the Immature Skin, *Pediatr. Res.* 53(4) (2003) 558 - 565.
- [18] S. B. Hoath, H. I. Maibach: Neonatal Skin: Structure and Function, Marcel Dekker, Inc., New York (2003) 59 - 87.
- [19] M. R. Schneider, R. Paus: Sebocytes, Multifaceted Epithelial Cells: Lipid Production and Holocrine Secretion, *Int. J. Biochem. Cell B.* 42 (2010) 181 - 185.
- [20] K. Hanley, U. Rassner, Y. Jiang, D. Vansomphone, D. Crumrine, L. Komüves, P. M. Elias, K. R. Feingold, M. L. Williams: Hormonal Basis for the Gender Difference in Epidermal Barrier Formation in the Fetal Rat, *J. Clin. Invest.* 97(11) (1996) 2576 - 2584.
- [21] S. B. Hoath, W. L. Pickens, M. O. Visscher: The Biology of Vernix Caseosa, *Int. J. Cosmet. Sci.* 28(5) (2006) 319 - 333.
- [22] A. Tansirikongkol, S. B. Hoath, W. L. Pickens, M. O. Visscher, R. R. Wickett: Equilibrium Water Content in Native Vernix and Its Cellular Component, *J. Pharm. Sci.* 97(2) (2008) 985 - 994.

- [23] W. Youssef, R. R. Wickett, S. B. Hoath: Surface Free Energy Characterization of Vernix Caseosa. Potential Role in Waterproofing the Newborn Infant, *Skin Res. Technol.* 7(1) (2001) 10 - 17.
- [24] J. J. Leyden, G. L. Grove: Vernix Caseosa: A Natural Biofilm in Very Low Birthweight Infants, *Pediatr. Dermatol.* 18(4) (2001) 361 - 364.
- [25] A. Tansirikongkol, R. R. Wickett, M. O. Visscher, S. B. Hoath: Effect of Vernix Caseosa on the Penetration of Chymotryptic Enzyme: Potential Role in Epidermal Barrier Development, *Pediatr. Res.* 62(1) (2007) 49 - 53.
- [26] G. Yosipovitch, A. Maayan-Metzger, P. Merlob, L. Sirota: Skin Barrier Properties in Different Body Areas in Neonates, *Pediatrics* 106 (2000) 105 - 108.
- [27] V. M. Joglekar: Barrier Properties of Vernix Caseosa, *Arch. Dis. Child.* 55(10) (1980) 817 - 819.
- [28] N. Garcia Bartels, A. Mleczko, T. Schink, H. Proquitté, R.R. Wauer, U. Blume-Peytavi: Influence of Bathing or Washing on Skin Barrier Function in Newborns during the First Four Weeks of Life, *Skin Pharmacol.* 22 (2009) 248 - 257.
- [29] M. Zasloff: Vernix, the Newborn, and Innate Defense, *Pediatr. Res.* 53(2) (2003) 203 - 204.
- [30] M. J. Cork, D. A. Robinson, Y. Vasilopoulos, A. Ferguson, M. Moustafa, A. MacGowan, G. W. Duff, S. J. Ward, R. Tazi-Ahnini: New Perspectives on Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis: Gene-Environment Interactions, *J. Allergy Clin. Immun.* 118(1) (2006) 3 - 21.
- [31] R. Rissmann, M. H. Oudshoorn, E. Kocks, W. E. Hennink, M. Ponc, J. A. Bouwstra: Lanolin-Derived Lipid Mixtures Mimic Closely the Lipid Composition and Organization of Vernix Caseosa Lipids, *Biochim. Biophys. Acta.* 1778(10) (2008) 2350 - 2360.
- [32] M. I. Bautista, R. R. Wickett, M. O. Visscher, W. L. Pickens, S. B. Hoath: Characterization of Vernix Caseosa as a Natural Biofilm: Comparison to Standard Oil-Based Ointments, *Pediatr. Dermatol.* 17(4) (2000) 253 - 260.
- [33] A. J. Nopper, K. A. Horii, S. Sookdeo-Drost, T. H. Wang, A. J. Mancini, A. T. Lane: Topical Ointment Therapy Benefits Premature Infants, *J. Pediatr.* 128(5) (1996) 660 - 669.

- [34] A. Tansirikongkol, M. O. Visscher, R. R. Wickett: Water-Handling Properties of Vernix Caseosa and a Synthetic Analogue, *J. Cosmet. Sci.* 58 (2007) 651 - 662.
- [35] R. Rissmann, M. H. Oudshoorn, R. Zwier, M. Ponec, J. A. Bouwstra, W. E. Hennink: Mimicking Vernix Caseosa - Preparation and Characterization of Synthetic Biofilms, *Int. J. Pharm.* 372(1-2) (2009) 59 - 65.
- [36] R. Moraille, W. L. Pickens, M. O. Visscher, S. B. Hoath: A Novel Role for Vernix Caseosa as a Skin Cleanser, *Biol. Neonate.* 87(1) (2005) 8 - 14.
- [37] M. Tollin, T. Jägerbrink, A. Haraldsson, B. Agerberth, H. Jörnvall: Proteome Analysis of Vernix Caseosa, *Pediatr. Res.* 60(4) (2006) 430 - 434.
- [38] H. Yoshio, M. Tollin, G. H. Gudmundsson, H. Lagercrantz, H. Jörnvall, G. Marchini, B. Agerberth: Antimicrobial Polypeptides of Human Vernix Caseosa and Amniotic Fluid: Implications for Newborn Innate Defense, *Pediatr. Res.* 53(2) (2003) 211 - 216.
- [39] G. Marchini, S. Lindow, H. Brismar, B. Ståbi, V. Berggren, A. K. Ulfgrén, S. Lonne-Rahm, B. Agerberth, G. H. Gudmundsson: The Newborn Infant Is Protected by an Innate Antimicrobial Barrier: Peptide Antibiotics Are Present in the Skin and Vernix Caseosa, *Br. J. Dermatol.* 147(6) (2002) 1127 - 1134.
- [40] C. C. Zouboulis, J. M. Baron, M. Böhm, S. Kippenberger, H. Kurzen, J. Reichrath, A. Thielitz: Frontiers in Sebaceous Gland Biology and Pathology, *Exp. Dermatol.* 17(6) (2008) 542 - 551.
- [41] P. E. Pochi, J. S. Strauss: Endocrinologic Control of the Development and Activity of the Human Sebaceous Gland, *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 191 - 201.
- [42] M. N. Ansari, H. C. Fu, N. Nicolaides: Fatty Acids of the Alkane Diol Diesters of Vernix Caseosa, *Lipids* 5(2) (1970) 279 - 282.
- [43] P. H. Hoeger, V. Schreiner, I. A. Klaassen, C. C. Enzmann, K. Friedrichs, O. Bleck: Epidermal Barrier Lipids in Human Vernix Caseosa: Corresponding Ceramide Pattern in Vernix and Fetal Skin, *Br. J. Dermatol.* 146(2) (2002) 194 - 201.
- [44] K. J. Robson, M. E. Stewart, S. Michelsen, N. D. Lazo, D. T. Downing: 6-Hydroxy-4-Sphinganine in Human Epidermal Ceramides, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 2060 - 2068.

- [45] T. Nikkari: The Occurrence of Diester Waxes in Human Vernix Caseosa and in Hair Lipids of Common Laboratory Animals, *Comp. Biochem. Physiol.* 29(2) (1969) 795 - 803.
- [46] R. Rissmann, H. W. Groenink, A. M. Weerheim, S. B. Hoath, M. Ponc, J. A. Bouwstra: New Insights into Ultrastructure, Lipid Composition and Organization of Vernix Caseosa, *J. Invest. Dermatol.* 126(8) (2006) 1823 - 1833.
- [47] Oku H., Mimura K., Tokitsu Y., Onaga K., Iwasaki H., Chinen I.: Biased Distribution of the Branched-Chain Fatty Acids in Ceramides of Vernix Caseosa, *Lipids* 35(4) (2000) 373 -381.
- [48] T. A. Miettinen, T. Luukkainen: Gas-Liquid Chromatographic and Mass Spectrometric Studies on Sterols in Vernix Caseosa, Amniotic Fluid and Meconium, *Acta Chem. Scand.* 22(8) (1968) 2603 - 2612.
- [49] N. Nicolaidis, H. C. Fu, M. N. Ansari, G. R. Rice: The Fatty Acids of Wax Esters and Sterol Esters from Vernix Caseosa and from Human Skin Surface Lipid, *Lipids* 7(8) (1972) 506 - 517.
- [50] H. C. Fu, N. Nicolaidis: The Structure of Alkane Diols of Diesters in Vernix Caseosa Lipids, *Lipids* 4(2) (1969) 170 - 175.
- [51] S. Hauff, W. Vetter: Exploring the Fatty Acids of Vernix Caseosa in Form of Their Methyl Esters by Off-Line Coupling of Non-Aqueous Reversed phase High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8270 - 8278.
- [52] J. P. O'Grady, M. Prefontaine, D. E. Hoffman: Vernixuria: Another Sign of Uterine Rupture, *J. Perinatol.* 23(4) (2003) 351 - 352.
- [53] B. C. Hopman, J. D. Wargo, S. C. Werch: Cytology of Vernix Caseosa Cells, *Obstet. Gynecol.* 10(6) (1957) 656 - 659.
- [54] V. Narendran, R. R. Wickett, W. L. Pickens, S. B. Hoath: Interaction Between Pulmonary Surfactant and Vernix: A Potential Mechanism for Induction of Amniotic Fluid Turbidity, *Pediatr. Res.* 48(1) (2000) 120 - 124.
- [55] P. Malpas: Contamination of Caesarean Wounds by Vernix Caseosa, *Br. Med. J.* 2(4682) (1950) 763.
- [56] A. Mahmoud, S. Silapaswan, K. Lin, D. Penney: Vernix Caseosa: An Unusual Cause of Post-Cesarean Section Peritonitis, *Am. Surg.* 63(5) (1997) 382 - 385.

- [57] D. Selo-Ojeme: Vernix Caseosa Peritonitis, *J. Obstet. Gynaecol.* 27(7) 2007 660 - 663.
- [58] D. Selo-Ojeme, P. Donkor, D. Francis: Vernix Caseosa Peritonitis: An Unusual and Rare Complication of Caesarean Section, *J. Obstet. Gynaecol.* 27(2) (2007) 190 - 191.
- [59] O. A. Stuart, A. R. Morris, R. J. Baber: Vernix Caseosa Peritonitis – No Longer Rare or Innocent: a Case Series, *J. Med. Case Reports.* 3 (2009) 60.
- [60] B. Cummings, H. M. Scarth, H. T. Tran, V. M. Walley: Vernix Caseosa Peritonitis Presenting Post Partum as Acute Cholecystitis, *Can. J. Surg.* 44(4) (2001) 298 - 300.
- [61] Z. Vodrážka: *Biochemie. 2. Živý systém jako chemický stroj*, Academia, Praha (1992) 135 s.
- [62] E. Fahy, S. Subramaniam, H. Brown, C. Glass, J. A. Merrill, R. Murphy, C. Raetz, D. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. Vannieuwenhze, S. White, J. Witztum, E. A. Dennis: A comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 839 - 861.
- [63] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens: Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods, *J. Food Compos. Anal.* 14 (2001) 93 - 100.
- [64] F. Shahidi: Extraction and Measurement of Total Lipids, *Curr. P. Food Anal. Chem.* (2001) D1.1.1 - D1.1.11.
- [65] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley: A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *J. Biol. Chem.* 226(1) (1957) 497 - 509.
- [66] A. Y. Taha, A. H. Metherel, K. D. Stark: Comparative Analysis of Standardised and Common Modifications of Methods for Lipid Extraction for the Determination of Fatty Acids, *Food Chem.* 134 (2012) 427 - 433.
- [67] E. G. Bligh, W. J. Dyer: A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can. J. Biochem. Phys.* 37(8) (1959) 911 - 917.
- [68] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke: Lipid Extraction by 'Methyl-tert-butyl Ether for High-Throughput Lipidomics, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1137 - 1146.

- [69] J. C. Touchstone: Thin-Layer Chromatographic Procedures for Lipid Separation, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 671(1-2) (1995) 169 - 195.
- [70] T. White, S. Bursten, D. Federighi, R. A. Lewis, E. Nudelman: High-Resolution Separation and Quantification of Neutral Lipid and Phospholipid Species in Mammalian Cells and Sera by Multi-One-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *Anal. Biochem.* 258(1) (1998) 109 - 117.
- [71] H. W. Gardner: Preparative Isolation of Monogalactosyl and Digalactosyl Diglycerides by Thin-Layer Chromatography, *J. Lipid Res.* 9(1) (1968) 139 - 141.
- [72] J. Šajbidor, M. Čertík, J. Grego: Lipid Analysis of Baker's Yeast, *J. Chromatogr. A* 665(1) (1994) 191 - 195.
- [73] K. Aitzetmüller, J. Koch: Liquid Chromatographic Analysis of Sebum Lipids and Other Lipids of Medical Interest, *J. Chromatogr.* 145(2) (1978) 195 - 202.
- [74] E. De Hoffmann, V. Stroobant: *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, John Wiley and Sons, Chichester (2007) 502 s.
- [75] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić: *MALDI MS. A practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley-WCH Verlag, Weinheim (2007) 345s.
- [76] H. J. Griesser, P. Kingshott, S. L. McArthur, K. M. McLean, G. R. Kinsel, R. B. Timmons: Surface-MALDI Mass Spectrometry in Biomaterials Research, *Biomaterials* 25(20) (2004) 4861 - 4875.
- [77] S. N. Jackson, H. Y. Wang, A. S. Woods: Direct Profiling of Lipid Distribution in Brain Tissue Using MALDI-TOFMS, *Anal. Chem.* 77(14) (2005) 4523 - 4527.
- [78] J. Schiller, R. Süß, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Lessig, M. Müller, M. Petković, H. Spalteholz, O. Zschörnig, K. Arnold: Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in Lipid and Phospholipid Research, *Prog. Lipid Res.* 43(5) (2004) 449 - 488.
- [79] R. C. Murphy, J. Fiedler, J. Hevko: Analysis of Nonvolatile Lipids by Mass Spectrometry, *Chem. Rev.* 101(2) (2001) 479 - 526.
- [80] B. Fuchs, J. Schiller: Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Lipidomics, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 111(1) (2009) 83 - 98.

- [81] H. Hidaka, N. Hanyu, M. Sugano, K. Kawasaki, K. Yamauchi, T. Katsuyama: Analysis of Human Serum Lipoprotein Lipid Composition Using MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 37(3) (2007) 213 - 221.
- [82] S. Benard, J. Arnhold, M. Lehnert, J. Schiller, K. Arnold: Experiments Towards Quantification of Saturated and Polyunsaturated Diacylglycerols by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Chem. Phys. Lipids* 100(1-2) (1999) 115 - 125.
- [83] J. Schiller, J. Arnhold, S. Benard, M. Müller, S. Reichl, K. Arnold: Lipid Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry: A Methodological Approach, *Anal. Biochem.* 267(1) (1999) 46 - 56.
- [84] J. Schiller, R. Süß, M. Petković, K. Arnold: Triacylglycerol Analysis of Vegetable Oils by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry and ³¹P NMR Spectroscopy, *J. Food Lipids* 9(3) (2002) 185 - 200.
- [85] J. D. Sheffer, K. K. Murray: Infrared Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Using OH, NH and CH Vibrational Absorption, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12(22) (1998) 1685 - 1690.
- [86] B. Fuchs, R. Süß, J. Schiller: An Update of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Lipid Research, *Prog. Lipid Res.* 49(4) (2010) 450 - 475.
- [87] G. Stübiger, O. Belgacem: Analysis of Lipids Using 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as a Matrix for MALDI Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 79(8) (2007) 3206 - 3213.
- [88] J. Schiller, R. Süß, B. Fuchs, M. Müller, O. Zschornig, K. Arnold: MALDI-TOF MS in Lipidomics, *Front. Biosci.* 12 (2007) 2568 - 2579.
- [89] E. Astigarraga, G. Barreda-Gómez, L. Lombardero, O. Fresnedo, F. Castaño, M. T. Giralt, B. Ochoa, R. Rodríguez-Puertas, J. A. Fernández: Profiling and Imaging of Lipids on Brain and Liver Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using 2-Mercaptobenzothiazole as a Matrix, *Anal. Chem.* 80(23) (2008) 9105 - 9114.
- [90] S. Trimpin, A. C. Grimsdale, H. J. Räder, K. Müllen: Characterization of an Insoluble Poly(9,9-diphenyl-2,7-fluorene) by Solvent-Free Sample Preparation for MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (15) (2002) 3777 - 3782.

- [91] H. Cheng, G. Sun, K. Yang, R. W. Gross, X. Han: Selective Desorption/Ionization of Sulfatides by MALDI-MS Facilitated Using 9-Aminoacridine as Matrix, *J. Lipid Res.* 51(6) (2010) 1599 - 1609.
- [92] B. Fuchs, J. Schiller: Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Apolar Compounds, *Curr. Org. Chem.* 13 (2009) 1664 - 1681.
- [93] K. Stránský, T. Jursík: Simple Quantitative Transesterification of Lipids. 1. Introduction, *Fett-Lipid* 98(2) (1996) 65 - 71.
- [94] K. Stránský, T. Jursík: Simple Quantitative Transesterification of Lipids. 2. Applications, *Fett-Lipid* 98(2) (1996) 71 - 77.
- [95] S. Thurnhofer, W. Vetter: Application of Ethyl Esters and d3-Methyl Esters as Internal Standards for the Gas Chromatographic Quantification of Transesterified Fatty Acid Methyl Esters in Food, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3209 - 3214.
- [96] M. Fitzgerald, R. C. Murphy: Electrospray Mass Spectrometry of Human Hair Wax Esters, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 1231 - 1246.
- [97] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle: A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal. Bioanal. Chem* 376 (2003) 952 - 965.
- [98] J. Bensouilah, P. Buck: *Aromadermatology. Aromatherapy in the treatment and Care of Common Skin Conditions*, Radcliffe Publishing, Oxford (2006) 1 - 11.
- [99] M. E. Stewart, D. T. Downing: Separation of Wax Esters from Steryl Esters by Chromatography on Magnesium Hydroxide, *Lipids* 16(5) (1981) 355 - 359.
- [100] N. Nicolaides: Magnesium Oxide as an Adsorbent for the Chromatographic Separation of Molecules According to their Degree of Flatness, e.g. The Separation of Wax Esters from Sterol Esters, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 717 - 720.
- [101] K. R. Smith, D. M. Thiboutot: Sebaceous Gland Lipids: Friend or Foe?, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 271 - 281.

7. Seznam publikací a plakátových sdělení

Publikace

1. V. Vrkoslav, **R. Míková**, J. Cvačka: Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 44 (2009) 101 - 110.
2. **R. Míková**, V. Vrkoslav, R. Hanus, E. Háková, Z. Hábová, A. Doležal, R. Plavka, P. Coufal, J. Cvačka: Newborn boys and girls differ in the lipid composition of vernix caseosa, *PLOS ONE* 9(6) (2014) e107847.
3. E. Háková, V. Vrkoslav, **R. Míková**, K. Schwarzová-Pecková, Z. Bosáková, J. Cvačka: Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5175 - 5188.
4. L. Šubčíková, M. Hoskovec, V. Vrkoslav, T. Čmelíková, E. Háková, **R. Míková**, P. Coufal, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Analysis of 1,2-diol diesters in vernix caseosa by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1378 (2015) 8 - 18.
5. J. Škrha Jr., J. Šoupal, M. Kalousová, **R. Míková**, M. Prázný, J. Škrha: Soluble receptor for advance glycation end-products (sRAGE) relates to oxidative stress index in patients with diabetes, *Diabetologia* 57 (2014) S529.

6. J. Škrha Jr., J. Šoupal, M. Kalousová, **R. Míková**, M. Prázný, J. Škrha: Soluble receptor for advanced glycation endproducts is related to oxidative stress in patients with diabetes, *Diabetes* 63 (2014) A136.

Přednášky

1. **R. Míková**: Methodology of lipid analysis of vernix caseosa using matrix assisted laser desorption ionization coupled with time of flight detection mass spectrometry, The 7th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry', Praha, Česká republika, 29. - 30. 9. 2011.
2. **R. Míková**, V. Vrkoslav, R. Hanus, F. Kaftan, J. Rejšek, T. Čmelíková, P. Horká, M. Zábranská, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Lipidomická analýza novorozeneckého mázku, Czech Lipidomic Conference, Znojmo, Česká republika, 25. - 27. 6. 2012.

Plakátová sdělení

1. J. Cvačka, V. Vrkoslav, K. Urbanová, M. Háková, N. Červenková, **R. Míková**, I. Valterová: Hmotnostní spektrometrie v analýze voskových esterů; 14.česko-slovenská spektroskopická konference, Litomyšl, Česká republika, 31. 5. - 3. 6. 2010.
2. **R. Míková**, V. Vrkoslav, P. Horká, M. Zábranská, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Vernix caseosa lipid extraction: Comparison of methods; 10th Euro Fed Lipid Congress, Krakow, Polsko, 23. - 26. 9. 2012.
3. **R. Míková**, V. Vrkoslav, A. Doležal, R. Plavka, Z. Hábová, J. Cvačka: Analýza lipidů novorozeneckého mázku hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF; 1. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Pardubice, Česká republika, 28. - 29. 6. 2011.

4. **R. Míková**, V. Vrkoslav, P. Horká, M. Zábranská, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Porovnání extrakčních metod lipidů vernix caseosa; Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové, Česká republika, 17. - 19. 10. 2012.
5. J. Cvačka, V. Vrkoslav, L. Šubčíková, M. Hoskovec, **R. Míková**: HPLC/APCI-MS3 of 1,2-diol diesters in vernix caseosa; International Mass Spectrometry Conference, Ženeva, Švýcarsko, 24. - 29. 8. 2014.
6. J. Cvačka, L. Šubčíková, V. Vrkoslav, M. Hoskovec, **R. Míková**, T. Čmelíková: Analysis of 1,2-diol diesters in vernix caseosa by high performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, Tenerife, Španělsko, 6. - 9. 10. 2013.
7. **R. Míková**, H. Malínská, J. Škrha: Optimization of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone determination by high performance liquid chromatography; Euromedlab, Paříž, Francie, 21. - 25. 6. 2015.
8. **R. Míková**, H. Malínská, J. Škrha: Optimalizace metody stanovení glyoxalu, methylglyoxalu a 3-deoxyglukosonu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie; 51. diabetologické dny, Luhačovice, Česká republika, 16. - 18. 4. 2015.
9. **R. Míková**, H. Malínská, J. Škrha: Optimization of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone determination by high performance liquid chromatography; 6th Czech - French Vltava Chemistry meeting, Brno, Česká republika, 27. - 28. 8. 2015.


8. Příložené publikace

- I. **R. Míková**, V. Vrkoslav, R. Hanus, E. Háková, Z. Hábová, A. Doležal, R. Plavka, P. Coufal, J. Cvačka: Newborn boys and girls differ in the lipid composition of vernix caseosa, PLOS ONE 9(6) (2014) e107847.
- II. V. Vrkoslav, **R. Míková**, J. Cvačka: Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry, J. Mass. Spectrom. 44 (2009) 101 - 110.
- III. E. Háková, V. Vrkoslav, **R. Míková**, K. Schwarzová-Pecková, Z. Bosáková, J. Cvačka: Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 5175 - 5188.
- IV. L. Šubčíková, M. Hoskovec, V. Vrkoslav, T. Čmelíková, E. Háková, **R. Míková**, P. Coufal, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Analysis of 1,2-diol diesters in vernix caseosa by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1378 (2015) 8 - 18.

Prohlášení o spoluautorství

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Radka Míková podílela na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách:

- I. R. Míková, V. Vrkoslav, R. Hanus, E. Háková, Z. Hábová, A. Doležal, R. Plavka, P. Coufal, J. Cvačka: Newborn boys and girls differ in the lipid composition of vernix caseosa, PLOS ONE 9(6) (2014) e107847. (podíl 80 %)
- II. V. Vrkoslav, R. Míková, J. Cvačka: Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry, J. Mass. Spectrom. 44 (2009) 101 - 110. (podíl 15 %)
- III. E. Háková, V. Vrkoslav, R. Míková, K. Schwarzová-Pecková, Z. Bosáková, J. Cvačka: Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 5175 - 5188. (podíl 15 %)
- IV. L. Šubčíková, M. Hoskovec, V. Vrkoslav, T. Čmelíková, E. Háková, R. Míková, P. Coufal, A. Doležal, R. Plavka, J. Cvačka: Analysis of 1,2-diol diesters in vernix caseosa by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1378 (2015) 8 - 18. (podíl 15 %)



.....
Doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.



.....
RNDr. Vladimír Vrkoslav, Ph.D.



Newborn Boys and Girls Differ in the Lipid Composition of Vernix Caseosa

Radka Míková^{1,2,3}, Vladimír Vrkoslav¹, Robert Hanus¹, Eva Háková^{1,2}, Zuzana Hábová⁴, Antonín Doležal⁴, Richard Plavka⁴, Pavel Coufal², Josef Cvačka^{1*}

1 Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, **2** Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **3** 3rd Internal Department, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **4** Department of Obstetrics and Gynaecology, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Vernix caseosa protects the skin of a human fetus during the last trimester of pregnancy and of a newborn after the delivery. Besides its cellular and proteinaceous components, an important constituent and functional agent is a complex lipid fraction, implicated in a multitude of salubrious effects of vernix caseosa. Little is known about how the chemical composition of vernix caseosa lipids is affected by various biological characteristics of the baby, such as the gestational age, birth weight, and, last but not least, the gender of the newborn. This study reports on the chemical variability of lipids contained in the vernix caseosa of twenty newborn girls and boys and shows that the quantitative patterns of the lipids are sex-specific. The specificity of lipids was investigated at the level of fatty acids in the total lipid extracts and intact lipids of several neutral lipid classes. Hydrocarbons, wax esters, cholesteryl esters, diol diesters and triacylglycerols were isolated using optimized semipreparative thin-layer chromatography, and the molecular species within each class were characterized using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Statistical evaluation revealed significant quantitative sex-related differences in the lipid composition of vernix caseosa among the newborns, pronounced in the two lipid classes associated with the activity of sebaceous glands. Higher proportions of wax esters and triacylglycerols with longer hydrocarbon chains were observed in newborn girls.

Citation: Míková R, Vrkoslav V, Hanus R, Háková E, Hábová Z, et al. (2014) Newborn Boys and Girls Differ in the Lipid Composition of Vernix Caseosa. PLoS ONE 9(6): e99173. doi:10.1371/journal.pone.0099173

Editor: Claude Wicker-Thomas, Cnrs France

Received: November 4, 2013; **Accepted:** May 12, 2014; **Published:** June 9, 2014

Copyright: © 2014 Míková et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding for this project was provided by Czech Science Foundation (Project No. 206/12/0750), Academy of Sciences of the Czech Republic (Project RVO 61388963), Charles University in Prague (Project SVV), research projects MSM 0021620857 and 5302-28002PVK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cvacka@uochb.cas.cz

Introduction

Vernix caseosa (VC) is a white creamy substance which coats the skin of a human fetus and of a newborn [1] and which is produced during the third trimester of gestation [2]. In utero, it serves as a waterproofing film and modulator of transepidermal water flux [3], facilitates the final stages of the skin and gastrointestinal system development and protects the skin from some of the agents present in amniotic fluid [4]. After the birth, it acts as an antibacterial shield [5,6] and helps the neonate to adapt to the dry environment [7]. Very low birth-weight preterm infants lack VC and are susceptible to invasive infections because of insufficient formation of the stratum corneum [8,9]. The skin of prematurely born babies suffers from excessive water loss, resulting in dangerous dehydration and heat loss [10,11]. VC also shows a remarkable ability to enhance wound healing, which promises new therapies for patients with altered skin integrity after burn injuries or skin diseases. Because a therapeutic use of native VC from mature newborns is impossible, clinically relevant artificial substitutes of VC are to be developed [12,13].

VC is a complex biofilm composed of water in hydrated corneocytes (80%), surrounded by a matrix of lipids (10%) and proteins (10%) [1,2]. The lipid fraction is extremely rich and not

yet fully characterized despite the efforts of numerous researchers [14–19]. The most abundant lipid classes (wax esters – WE, cholesteryl esters – CE, diol diesters – DD and triacylglycerols – TG) are known, but they are characterized typically only with respect to their fatty acids (FA) composition, investigated from hydrolyzed lipid fractions.

Virtually nothing is known about the chemical variability of VC lipids depending on the gestational age and health conditions, the changes in the chemical composition during fetal development or the possible diagnostic value of VC components. All this information is of importance for current neonatology and medicine in general. Sex-related aspects of the early skin development are not well understood either. Certain differences between VC lipids of newborn boys and girls were reported in early eighties [15,20] using analytical methodology available at that time and a limited number of samples. The data relied either on semi-quantitation of lipid classes separated by thin layer chromatography (TLC) or lipid hydrolysis followed by analysis of fatty acid methyl esters (FAME). The structures of intact lipids involved in sex-related differences have not been disclosed. Recent advances in analytical instrumentation, namely in mass spectrom-

etry, allow us to have a closer look at the chemistry of vernix caseosa and the human skin ontogeny from a different perspective.

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI MS) is a powerful tool in protein and peptide analytics, increasingly utilized also in lipidomics [21–24]. The method allows intact lipids to be detected without previous modification and may yield quantitative results [25]. Modern MALDI MS setups also make it possible to fragment selected peaks, e.g., by tandem time-of-flight (TOF/TOF) instrumentation and thus to obtain more detailed structural information [22–26].

In this paper, we investigate sex-related differences in the lipid composition of VC in twenty newborn boys and girls at the level of FAME and intact, non-hydrolyzed lipids using MALDI MS. Since the cutaneous barrier formation and sebaceous gland activity are controlled by sex hormones [27–29], we test a hypothesis that the composition of VC lipids is gender-related. For this purpose, we have developed a method for a detailed characterization of intact lipids in VC. The lipids were isolated, separated into neutral lipid classes and the molecular species within the lipid classes were analyzed using MALDI-TOF MS and MALDI-TOF/TOF MS. The resulting data were statistically evaluated with respect to the sex specificity.

Materials and Methods

Chemicals

Analytical-grade hexane, chloroform, diethyl ether, acetone and ethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) or Penta (Chrudim, Czech Republic) and distilled in glass before use. Chloroform was stabilized with 1% of ethanol. Gradient-grade methanol was bought from LachNer (Neratovice, Czech Republic). 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), Florisil® for TLC and acetyl chloride were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Magnesium sulfate (p.a.), polyethylene glycols (PEG, reagent-grade), primuline and rhodamine 6G were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Silica gel 60 G with gypsum (12%) was obtained from Merck and silver carbonate was from Lachema (Brno, Czech Republic). Deionized water was manufactured by the Milli Q system (Millipore, Milford, MA, USA). Lipid standards (99% purity) were bought from Sigma-Aldrich (squalene - SQ, stearyl behenate), Larodan (Malmö, Sweden; cholesterol - Chol, tristearin, distearin and palmitolein), Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA; stearic acid) and Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA; phosphatidylcholine). MALDI-TOF MS matrices were supplied by Fluka (2,5-dihydroxybenzoic acid - DHB; 2-mercaptobenzothiazole - MBT; 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane - TCNQ; 4-nitroaniline - 4NA; picolinic acid - PA) and Sigma-Aldrich (2,4,6-trihydroxyacetophenone - THAP). The sodium salt of 2,5-dihydroxybenzoic acid (NaDHB) and the lithium salt of 2,5-dihydroxybenzoic acid (LiDHB) were synthesized and prepared as described previously [26].

Sample collecting

Healthy male (10) and female (10) subjects (Table S1) delivered at full term were included in this study. VC samples (1–2 g) were collected immediately after the delivery into glass vials and stored at -25°C . The exact location of sampling (back, buttocks, groins, legs, arms) varied depending on the VC layer thickness. Blood-contaminated samples were discarded. The samples were collected with written informed parental consent and the work was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital, Prague (910/09 S-IV); the study was performed according to the Declaration of Helsinki.

Isolation of lipids and their TLC separation

The VC samples were suspended in 50 ml of chloroform:methanol 2:1 (V/V) with 0.05% BHT. The suspension was cleared of epithelial cells by filtration through a column containing purified cotton-wool and silica gel (60–120 μm , ca 0.2 g). Anhydrous MgSO_4 (ca 5 g) was added to absorb water, and the suspension was filtered again. The solvents were removed by a rotary evaporator (35°C , 170 mbar) and a stream of argon. The isolated lipids were stored in glass vials at -25°C .

The lipids (ca 20 mg) were separated on 9×12 cm glass TLC plates coated with silica gel using hexane:diethyl ether (93:7, V/V) as a mobile phase. Each plate was developed twice to focus the zones (in the first step to $3/4$ of the plate height and then, after air-drying, to the top). The zones were visualized under UV light after being sprayed with rhodamine 6G (0.05% in ethanol); an example of the thin layer chromatogram is shown in Figure S1. The zones corresponding to particular lipid fractions (classes) were identified using standards and published data [19] as follows: SQ (R_f 0.89–0.94), WE + CE in one zone (R_f 0.66–0.74), DD (R_f 0.46–0.52), TG (R_f 0.19–0.27), free fatty acids - FA (R_f 0.10–0.13), Chol (R_f 0.06–0.08) and highly polar lipids (R_f 0.00–0.01). Only neutral lipids (SQ, WE, CE, DD and TG) were further isolated and analyzed in this study. Each zone was scratched off into a column with purified cotton-wool and silica gel; neutral lipids were eluted using diethyl ether. The solvent was evaporated under a stream of argon; the separated lipids were dissolved in chloroform:methanol 2:1 (V/V, 1 mg/ml) and stored at -25°C .

Due to their similar polarities, WE did not separate from CE on silica gel sorbents; their separation required magnesium-based materials to be used [30,31]. Therefore, we separated WE (R_f 0.54–0.68) from CE (R_f 0.32–0.48) using 20×10 cm glass TLC plates coated with Florisil (activated magnesium silicate) with a hexane:diethyl ether (90:10, V/V) mobile phase [32]. The plates were activated at 120°C for 1 h before the separation. The zones were visualized using primuline in methanol:water 1:1 (V/V) under UV radiation (366 nm). WE and CE were extracted from the plates as described above.

Transesterification and GC/MS of FAME

Total lipid extracts of VC were transesterified using a method described by Stránský and Jursík [33]. Briefly, lipids were dissolved in chloroform:methanol (2:3, v/v) in a small glass ampoule. After adding acetyl chloride, the ampoule was sealed and placed in a water bath at 70°C . After 60 min the ampoule was opened, the reaction mixture was neutralized with silver carbonate and injected onto GC column. FAME were analyzed using a 7890N gas chromatograph (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a 5975C quadrupole mass spectrometer and equipped with a fused silica capillary column DB-wax (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm , J&W 122-7032). The carrier gas was helium at 1.5 mL/min. The injector was held at 250°C and operated with a split ratio of 1:20; 2 μL of sample solution (chloroform:methanol (2:3, v/v)) was injected. The temperature program: 140°C (0 min), then $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250°C (50 min); total run time was 72 min. 70 eV EI mass spectra were recorded in the mass range of 25–600 u; 3 min solvent delay was used. Temperatures of the transfer line, ion source and quadrupole were 250°C , 230°C and 150°C , respectively. The chromatographic peaks representing FAME were identified based on the presence of m/z 74 and m/z 87 in their mass spectra. FAME were relatively quantified from their peak areas integrated in the total ion current chromatograms.

MALDI MS

MALDI-TOF MS measurements were performed on a Reflex IV (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) operated in the reflectron mode with an acceleration voltage of 20 kV and an extraction pulse of 200 ns. A nitrogen UV laser (337.1 nm, a 4 ns pulse of 300 μ J, a maximum frequency of 20 Hz) was utilized for desorption and ionization. Matrix ions were suppressed below m/z 200. The mass spectra were externally calibrated using PEG oligomers. The MS spectra were averaged from 1,000 laser shots collected at various places across the spot. Fragmentation was performed using ultrafleXtreme equipped with smartbeam laser (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). A MS/MS LIFT method for small molecules mode with an ion source and LIFT acceleration voltage set to 7.5 kV and 19 kV, respectively was utilized for the fragmentation. Precursor ions were selected by ion selector mass window ± 1 Da. The spectra were averaged from at least 20,000 shots. The data were collected and processed using FlexAnalysis 3.0 or 3.3 (Bruker Daltonik GmbH).

The choice of the matrix is crucial for successful MALDI MS. Therefore, a study was undertaken to select suitable matrices for lipid classes studied in this work. Because of the neutral character of the analytes lacking easily ionizable groups, matrices permitting ionization via metal-ion attachment were needed. The matrices were selected based on 1/their ability to ionize the analytes at low laser fluencies, 2/the absence of analyte-fragment ions in the spectra, 3/the simplicity of the isotope clusters, and 4/the low interference of the matrix background ions with analyte signals. The investigated matrices were prepared as saturated solutions in the solvents specified in Table S2 and co-deposited with the samples on the MALDI plate (MTP 387-position ground steel target; Bruker Daltonik GmbH) by mixing the sample with the matrix before application (CE, DD, TG) or by covering the matrix with the sample (WE).

In agreement with previous findings [26], LiDHB, providing $[M+Li]^+$ adducts, proved to be the most suitable matrix for SQ and WE. The same matrix appeared to work well also for CE and DD; LiDHB was found to be more suitable for CE than the previously suggested DHB [22,34,35]. To the best of our knowledge, DD have not been previously analyzed by MALDI MS. NaDHB ionized easily TG giving $[M+Na]^+$ molecular adducts, similarly like DHB, MBT and THAP, suggested by other authors [36–38]. The overview of performance of the matrices is given in Table S2.

For further data processing, the intensities of the MALDI MS peaks corresponding to molecular adduct were converted into relative percentages. As only lipids of the same lipid class were ionized during the MALDI MS analysis, the signal suppression by other components was considered negligible. The peak intensities were not corrected by any response factors.

Data treatment

The chemical diversity and sex-specificity of the VC samples were evaluated using principal component analysis (PCA) and redundancy analysis (RDA) performed in the Canoco 4.5 package (Biometrics, Plant Research). The intensities of the MALDI-TOF MS responses for particular lipids within each lipid class were converted into relative percentages and the diversity of their quantitative patterns visualized using PCA. Subsequently, RDA analyses of standardized variables with sex as a categorical predictor and a Monte Carlo permutation test (unrestricted permutations, $n=999$) were performed in order to test the significance of the differences between the relative patterns in the two sexes. Six selected TG and six selected WE with an important contribution to the differences between the two sexes

were further fragmented and the relative intensities of their dominant fragments treated using the same approach. The relative proportions of 167 FAME obtained from the hydrolyzed VC lipids were arcsine transformed and subjected to PCA and RDA as described above. The differences corresponding to a p -value below 0.05 are reported as significant for the RDA and Monte Carlo permutation tests.

Results and Discussion

GC/MS of VC fatty acids

Using a set of samples of 20 newborn subjects we investigated variability of VC lipids at the fatty acids level. We detected 167 distinct FAME species, mostly with saturated and branched chains, which is in agreement with recent report [39] showing 133 FAME in VC. FAME contained 11–31 carbons and exceptionally up to 4 double bonds (Table S3). Representative chromatograms are shown in Figure 1. When carefully inspecting chromatograms and peak lists, minor differences between boy and girl data were noticed. Visualization by means of PCA (Figure 2) using the first two principal components clearly showed that the samples were separated into two groups according to the sex of newborns. A redundancy analysis confirmed that the patterns of the relative abundances of FAME were significantly different between the male and female samples ($F = 3.2$; $p = 0.002$). The contributions of individual FAME to the observed overall differences are listed in the Table S3 as percent fits of each compound with the predicted RDA model with sex as categorical predictor. The sex specificity of the FAME composition consisted in both qualitative and quantitative differences in relative abundances. Among the FAME fitting the best the RDA model, monoenic or saturated species with typically more than 20 carbons occurred, but some middle-chain FAME with 14–19 carbons were also involved in sex differentiation (Figure 3 and Table S3). The most important species in this respect were FAME 21:1 (peak No. 116) and FAME 22:1 (peak No. 123) detected in non-negligible quantities only in the girl and boy samples, respectively. Nevertheless, the sex-related differences could not have been reduced to a list of only a few important species, the differences in quantitative patterns being complex. Encouraging results with hydrolyzed total lipid extracts showing differences between male and female subjects prompted us to study the chemical composition of intact lipids in boy and girl samples.

MALDI MS of intact VC lipids

All lipid fractions obtained from VC samples provided rich MALDI spectra with series of peaks. The spectra of the SQ zone were an exception, as only a single signal of squalene was present. It is important to note that in general the peaks in the spectra could represent mixtures of lipid species having the same elemental composition. Like in all direct MS approaches (without chromatographic separation), the isomeric species cannot be distinguished by mass. Therefore, each peak was characterized by the total number of carbons and double bonds in the chains. An inspection of the mass spectra did not reveal any qualitative gender-related differences in the lipid composition of the studied fractions.

In the WE fraction (Figure 4 and Table S4), we observed wax esters with 26–46 carbons and up to three unsaturations; the most prominent peaks corresponded to molecules with one double bond in the chains. The CE fraction contained a series of cholesteryl esters with 14–32 carbons in the FA chain and between zero and two double bonds. In the DD fraction, we detected diol diesters with 46–64 carbon atoms, containing up to three unsaturations.

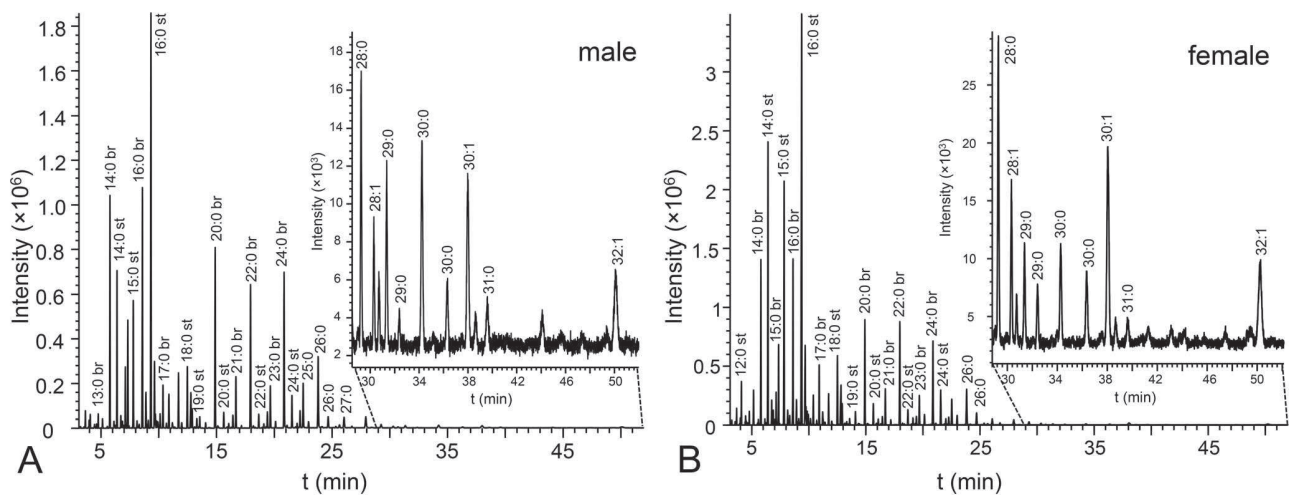


Figure 1. Chromatograms of the total lipid FAME. Characteristic reconstructed chromatogram (m/z 74) of FAME obtained by transesterification of vernix caseosa total lipid extract of a newborn boy (A) and girl (B). doi:10.1371/journal.pone.0099173.g001

TG with 39–69 carbons in the FA chains and with up to four double bonds were detected in the TG fraction (Figure 5 and Table S5). Dominant peaks represented molecules with either one or two unsaturations.

Sex-related differences in intact lipids

Quantitative patterns of the relative intensities of particular compounds in each studied class (except for SQ) were compared using PCA and RDA with sex as a categorical predictor. The quantitative diversities within the DD and CE fractions were broadly overlapping in the two sexes and no significant gender-

related differences could have been proved using RDA and Monte Carlo permutation tests.

On the contrary, even a simple visual inspection of the mass spectra of WE and TG fractions made it possible to discriminate between the spectra of boys and girls (Figures 4 and 5). In both classes, the compounds with a higher carbon number seemed to be over-represented in female samples while shorter carbon chains were relatively more abundant in the spectra of males. When visualized by means of PCA, depicted in Figure 6 as the first two principal components of the WE and TG samples, the two sexes were separated into two slightly overlapping groups. A redundancy analysis confirmed that the pattern of the relative abundances of WE was significantly different between the male and female

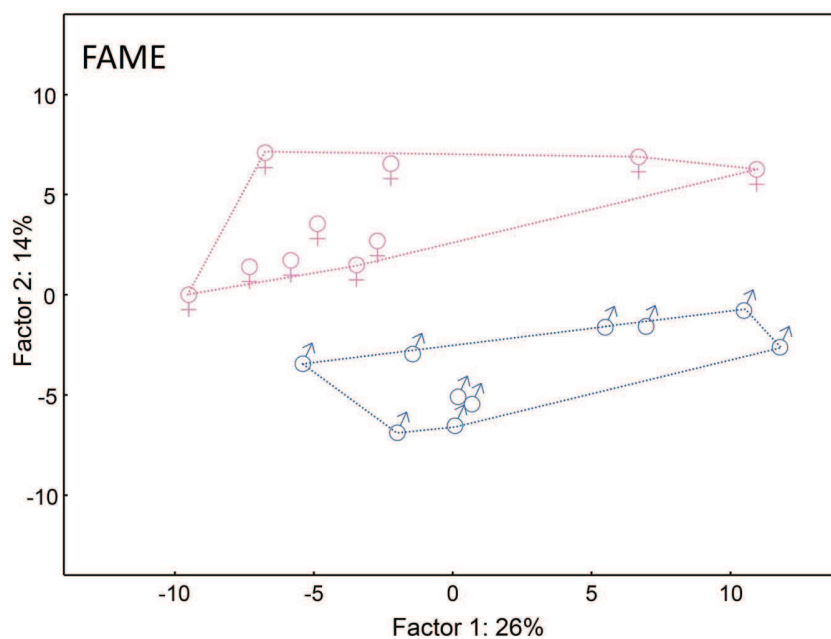


Figure 2. Quantitative pattern of vernix caseosa fatty acids in newborn boys (♂) and girls (♀). Graphic representation of the first two components of PCA calculated from the relative intensities of fatty acid methyl esters obtained from hydrolyzed vernix caseosa lipids. doi:10.1371/journal.pone.0099173.g002

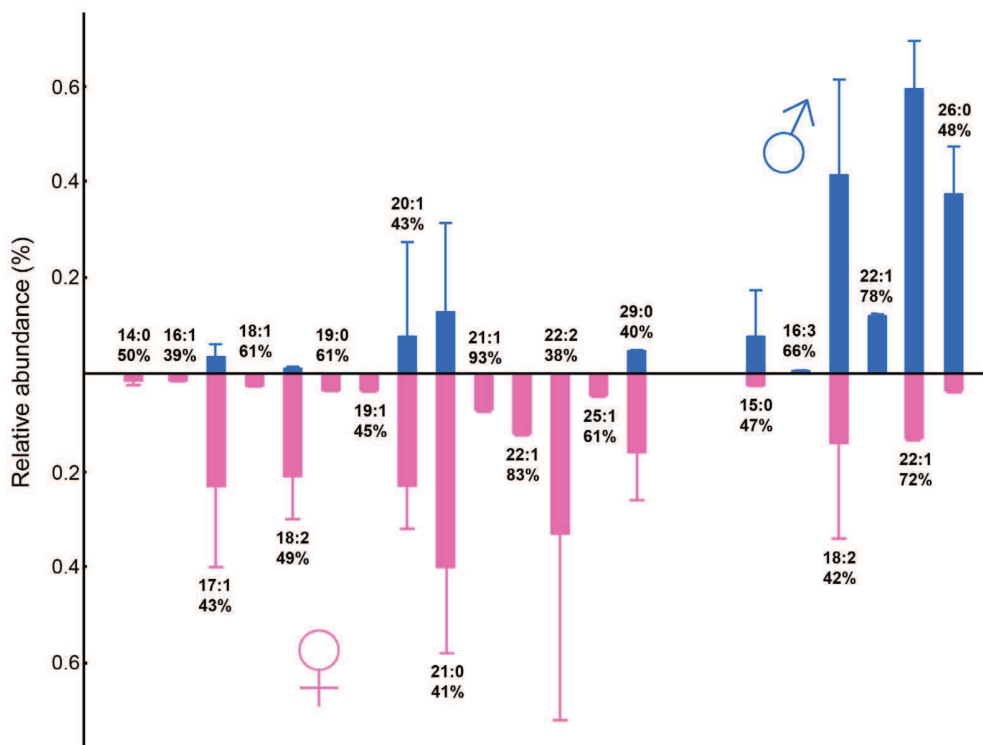


Figure 3. Comparison of relative abundances of fatty acid methyl esters from hydrolyzed vernix caseosa lipids obtained from newborn boys and girls. Relative abundances were calculated from peak areas in gas chromatograms (mean \pm SD). Twenty compounds contributing the most to the sex-related differences are shown. The percentages below the peak assignments indicate the percent fit of individual variables with the model predictions of RDA with sex standing as categorical predictor.
doi:10.1371/journal.pone.0099173.g003

samples ($F = 6.9$; $p = 0.008$). The contributions of individual WE to the observed overall differences are listed in the Table S4 as percent fits of each compound with the predicted RDA model with sex as categorical predictor. The WE with higher chain lengths proved to be relatively over-represented in females, and vice versa, the short-chain WE were relatively more abundant in males. Similar conclusions were drawn for TG. The overall pattern of

relative intensities differed significantly between males and females ($F = 8.8$; $p = 0.002$). Higher chain lengths were relatively more abundant in females while the relative proportions of TG were shifted towards shorter chain lengths in males, as shown in the Table S5.

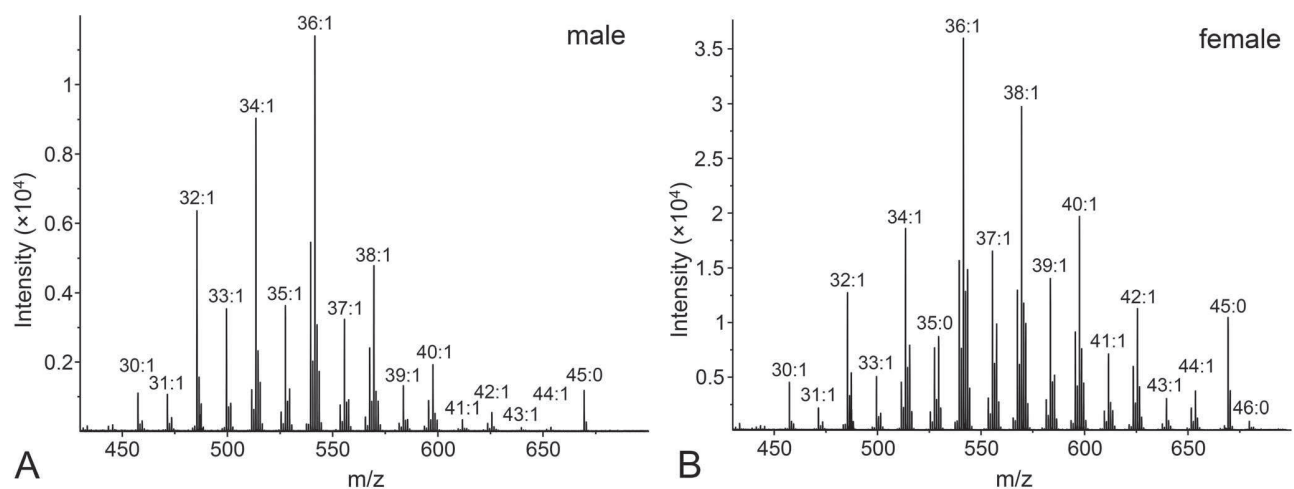


Figure 4. Mass spectra of the wax esters. Characteristic MALDI spectrum of the wax esters isolated from the vernix caseosa of a newborn boy (A) and girl (B). A LiDHB matrix was used and the signals correspond to molecular adducts with lithium ions $[M+Li]^+$.
doi:10.1371/journal.pone.0099173.g004

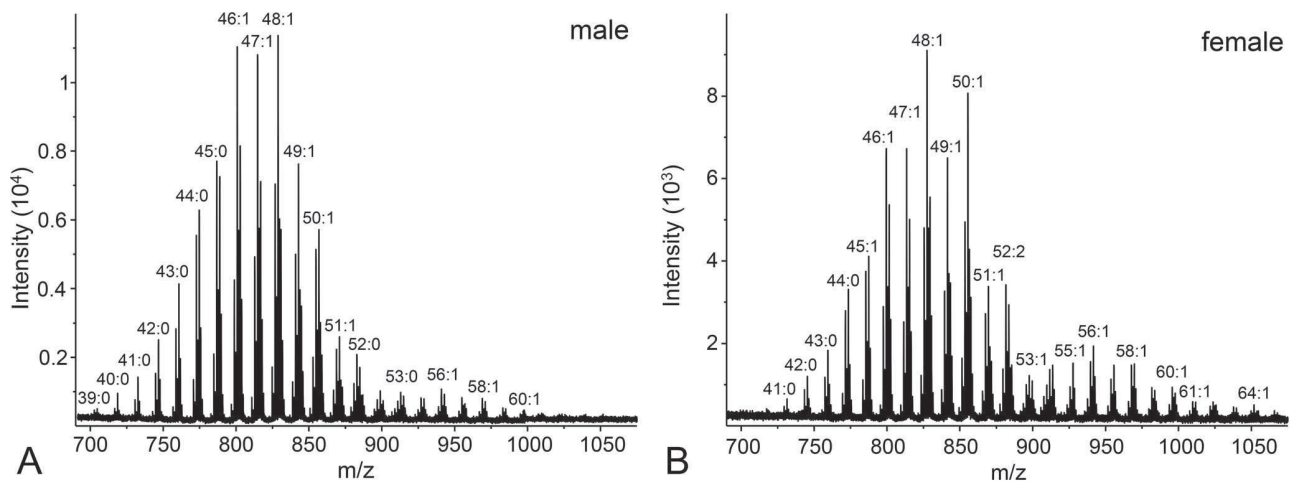


Figure 5. Mass spectra of the triacylglycerols. Characteristic MALDI spectrum of the triacylglycerols isolated from the vernix caseosa of a newborn boy (A) and girl (B). A NaDHB matrix was used and the signals correspond to molecular adducts with sodium ions $[M+Na]^+$. doi:10.1371/journal.pone.0099173.g005

Fragmentation spectra of WE and TG

In light of these results, as several isomers can be found at the same m/z values, a question has arisen as to whether the observed differences in the WE and TG relative intensities reflect qualitative differences in the constituents of these WE and TG in boys and girls or rather quantitative differences in their production or selective sex-dependent incorporation of particular FA. To answer this question, we further fragmented twelve peaks from those most significantly contributing to the sex-specificity of TG and WE profiles and studied their identity and relative intensities of fragments in all samples using MALDI-TOF/TOF MS. Subsequently, the sex-specificity in the relative proportions of particular fragments in each fragmented compound was once again tested by means of RDA.

In the case of WE, the fragmentation spectra showed lithiated fatty acids originating from the acid parts of esters [26]. The spectra were qualitatively identical in all of the six peaks (WE 32:1, WE 34:1, WE 36:2, WE 40:1, WE 41:1, WE 42:1) and both sexes; the spectra were dominated by five signals representing over 95%

of the total intensity, i.e. $[FA\ 14:1+Li]^+$, $[FA\ 15:0+Li]^+$, $[FA\ 16:1+Li]^+$, $[FA\ 17:1+Li]^+$ and $[FA\ 18:1+Li]^+$. On the other hand, a RDA revealed significant gender-related differences in the relative intensities of these five fragments in all six fragmented peaks. Among the fatty acids contributing the most to the sex-related differences, the relative intensities of the fragments $[FA\ 16:1+Li]^+$ and $[FA\ 18:1+Li]^+$ were systematically over-represented in male and female subjects, respectively, with 37–75% fit with the predicted model for $[FA\ 16:1+Li]^+$ and 36–74% fit for $[FA\ 18:1+Li]^+$.

The fragmentation spectra of the six TG peaks (sodium adducts of TG 45:0, TG 45:1, TG 46:1, TG 52:1, TG 62:1, TG 64:1) showed signals consistent with neutral loss of fatty acids and fatty acid sodium salts. The fragments appeared in clusters differing from each other by the number of carbons. The most intense peak of each cluster corresponding to neutral loss of fatty acid sodium salt (Table 1) has been chosen for further study. There were no qualitative differences in the dominant fragments between the two sexes. However, like for WE, we detected significant differences

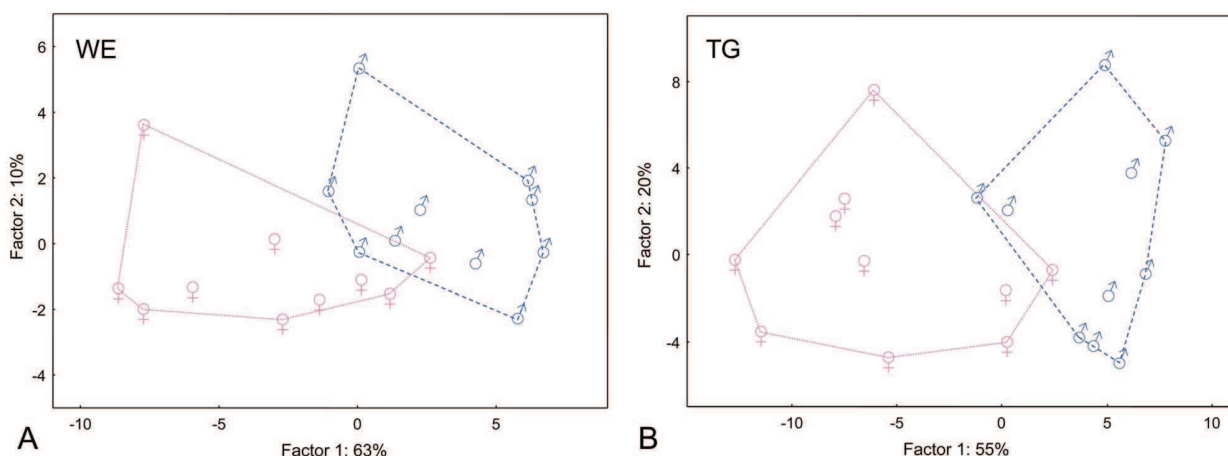


Figure 6. Quantitative pattern of vernix caseosa lipids in newborn boys and girls. Graphic representation of the first two components of PCA calculated from the relative intensities of the wax esters (A) and triacylglycerols (B) isolated from the vernix caseosa of newborn boys (♂) and girls (♀). doi:10.1371/journal.pone.0099173.g006

Table 1. MALDI-TOF/TOF data for VC triacylglycerols.

Precursor [M+Na] ⁺	Main fragments (<i>m/z</i>)	Neutral loss (RCOONa)
TG 45:1 (<i>m/z</i> 785.7)	481, 495, 509, 521, 535, 549, 563	FA 18:1, FA 17:1, FA 16:1, FA 15:0, FA 14:0, FA 13:0, FA 12:0
TG 45:0 (<i>m/z</i> 787.7)	481, 495, 509, 523, 537, 551, 565	FA 18:0, FA 17:0, FA 16:0, FA 15:0, FA 14:0, FA 13:0, FA 12:0
TG 46:1 (<i>m/z</i> 799.7)	495, 509, 523, 535, 549, 563, 577	FA 18:1, FA 17:1, FA 16:1, FA 15:0, FA 14:0, FA 13:0, FA 12:0
TG 52:1 (<i>m/z</i> 883.8)	495, 509, 523, 535, 549, 563, 577	FA 24:1, FA 23:1, FA 22:1, FA 21:0, FA 20:0, FA 19:0, FA 18:0
TG 62:1 (<i>m/z</i> 1023.9)	523, 549, 577, 605, 717, 745, 773	FA 32:1, FA 30:0, FA 28:0, FA 26:0, FA 18:0, FA 16:0, FA 14:0
TG 64:1 (<i>m/z</i> 1051.8)	523, 551, 577, 605, 745, 773, 801	FA 34:1, FA 32:1, FA 30:0, FA 28:0, FA 18:0, FA 16:0, FA 14:0

doi:10.1371/journal.pone.0099173.t001

between males and females in the relative proportions of the dominant fragments of the six fragmented TG.

Sex-specificity of VC lipid composition

Our results strongly support the hypothesis that the composition of VC lipids is gender-related. We showed statistically significant differences between male and female samples both at the level of fatty acids in the total lipid extracts and at the level of intact lipids in two lipid classes. At the current stage of our knowledge, we can only hypothesize the biological aspects underlying these differences. First, the differences in VC chemistry may result from differential temporal dynamics in the skin development in boys and girls controlled by steroid hormones; previous studies in rats have documented that the formation of the cutaneous barrier is accelerated by estrogen and delayed by testosterone [40]. VC of human male fetuses was previously shown to contain more sebum than that of female fetuses, which has a higher proportion of epidermal lipids [15]. We found the differences in WE and TG, i.e., lipid classes that are of sebaceous origin [1]. Therefore, the observed sex-related differences are likely associated with the activities of sebaceous glands in the skin of the fetus. Interestingly, when we analyzed VC obtained from a girl prematurely born in the 35th week, the lipid profiles greatly differed from those of full-term girls and were rather similar to that of full-term boys. This accidental observation further supports the hypothesis of differential dynamics in VC production between the two sexes. Alternatively, permanent and fixed differences in the chemistry of the storage pool of FA, shifted towards longer carbon chains in some lipid classes in females, can account for the observed sex specificity of VC lipids.

The quest for an unambiguous verification of these hypotheses prompts further studies aiming at dynamics in VC production and composition involving newborn males and females of varied gestational age. Because of extreme complexity of VC lipids, lipidomics approaches based on cutting edge analytical chemistry are desirable.

References

- Hoath SB, Pickens WL, Visscher MO (2006) The biology of vernix caseosa. *Int J Cosmetic Sci* 28:319–333.
- Singh G, Archana G (2008) Unraveling the mystery of vernix caseosa. *Indian J Dermatol* 53:54–60.
- Youssef W, Wickett RR, Hoath SB (2001) Surface free energy characterization of vernix caseosa. Potential role in waterproofing the newborn infant. *Skin Res Technol* 7:10–17.
- Tansirikongkol A, Wickett RR, Visscher MO, Hoath SB (2007) Effect of Vernix Caseosa on the Penetration of Chymotryptic Enzyme: Potential Role in Epidermal Barrier Development. *Pediatr Res* 62:49–53.
- Yoshio H, Tollin M, Gudmundsson GH, Lagercrantz H, Jornvall H, et al. (2003) Antimicrobial Polypeptides of Human Vernix Caseosa and Amniotic Fluid: Implications for Newborn Innate Defense. *Pediatr Res* 53:211–216.
- Tollin M, Bergsson G, Kai-Larsen Y, Lengqvist J, Sjövall J, et al. (2005) Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cell Mol Life Sci* 62:2390–2399.
- Visscher MO, Narendran V, Pickens WL, LaRuffa AA, Meinzen-Derr J, et al. (2005) Vernix caseosa in neonatal adaptation. *J Perinatol* 25:440–446.
- Bautista MI, Wickett RR, Visscher MO, Pickens WL, Hoath SB (2000) Characterisation of Vernix Caseosa as a Natural Biofilm: Comparison to Standard Oil-Based Ointments. *Pediatr Dermatol* 17:253–260.

Conclusions

In the present study, we show that the quantitative pattern of lipids contained in the vernix caseosa of full-term newborns is sex-specific, namely because of the higher proportions of wax esters and triacylglycerols with longer hydrocarbon chains in newborn girls. These results pave the way to further investigations of the vernix caseosa, aiming at both structural and dynamic patterns of the lipid constituents and biological determinants underlying these patterns.

Supporting Information

Figure S1 Image of semipreparative thin layer silica gel plate with separated zones of vernix caseosa lipids. (PDF)

Table S1 List of subjects, their basic biological characteristics and sampled body parts. (PDF)

Table S2 Suitability of the MALDI matrices for neutral lipids of vernix caseosa. (PDF)

Table S3 Relative peak areas of fatty acid methyl esters. (PDF)

Table S4 Relative intensities of wax esters in vernix caseosa of newborn boys and girls. (PDF)

Table S5 Relative intensities of triacylglycerols in vernix caseosa of newborn boys and girls calculated from MALDI spectra (mean \pm SD). (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM VV RH AD JC. Performed the experiments: RM EH VV. Analyzed the data: RM EH VV RH PC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ZH RP AD. Wrote the paper: RM VV RH PC ZH RP JC.

9. Nopper AJ, Horii KA, Sookdeo-Drost S, Wang TH, Mancini AJ, et al. (1996) Topical ointment therapy benefits premature infants. *J Pediatr* 128:660–669.
10. Tansirikongkol A, Visscher MO, Wickert RR (2007) Water-handling properties of vernix caseosa and a synthetic analogue. *J Cosmet Sci* 58:651–662.
11. Ågren J, Zelenin S, Håkansson M, Eklöf AC, Aperia A, et al. (2003) Transepidermal Water Loss in Developing Rats: Role of Aquaporins in the Immature Skin. *Pediatr Res* 53:558–565.
12. Rissmann R, Oudshoorn MH, Kocks E, Hennink WE, Ponc M, et al. (2008) Lanolin-derived lipid mixtures mimic closely the lipid composition and organization of vernix caseosa lipids. *Biochim Biophys Acta* 1778:2350–2360.
13. Rissmann R, Oudshoorn MH, Zwier R, Ponc M, Bouwstra JA, et al. (2009) Mimicking vernix caseosa—Preparation and characterization of synthetic biofilms. *Int J Pharm* 372:59–65.
14. Kärkkäinen J, Nikkari T, Ruponen S, Hahti E (1965) Lipids of vernix caseosa. *J Invest Dermatol* 44:333–338.
15. Nazzaro-Porto M, Passi S, Boniforti L, Belsito F (1979) Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids. *J Invest Dermatol* 73:112–117.
16. Rissmann R, Gooris G, Ponc M, Bouwstra J (2009) Long periodicity phase in extracted lipids of vernix caseosa obtained with equilibration at physiological temperature. *Chem Phys Lipids* 158:32–38.
17. Ansari MN, Fu HC, Nicolaides N (1970) Fatty acids of the alkane diol diesters of vernix caseosa. *Lipids* 5:279–282.
18. Nicolaides N, Apon JM, Wong DH (1976) Further studies of the saturated methyl branched fatty acids of vernix caseosa lipid. *Lipids* 11:781–790.
19. Rissmann R, Groenink HW, Weerheim AM, Hoath SB, Ponc M, et al. (2006) New Insights into Ultrastructure, Lipid Composition and Organization of Vernix caseosa. *J Invest Dermatol* 126:1823–1833.
20. Stewart ME, Quinn MA, Downing DT (1982) Variability in the fatty-acid composition of wax esters from vernix-caseosa and its possible relation to sebaceous gland activity. *J Invest Dermatol* 78:291–295.
21. Schiller J, Süß R, Fuchs B, Müller M, Zschornig O, et al. (2007) MALDI-TOF MS in lipidomics. *Front Biosci* 12:2568–2579.
22. Fuchs B, Schiller J (2009) Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111:83–98.
23. Schiller J, Süß R, Arnold J, Fuchs B, Lessig J, et al. (2004) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* 43:449–488.
24. Murphy RC, Fiedler J, Hevko J (2001) Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chem Rev* 101:479–526.
25. Asbury GR, Al-Saad K, Siems WF, Hamman RM, Hill HH (1999) Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 10:983–991.
26. Vrkošlav V, Míková R, Cvačka J (2009) Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 44:101–110.
27. Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, Kippenberger S, Kurzen H, et al. (2008) Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* 17:542–551.
28. Pochi PE, Strauss JS (1974) Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. *J Invest Dermatol* 62:191–201.
29. Smith KR, Thiboutot DM (2008) Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res* 49:271–281.
30. Stewart ME, Downing DT (1981) Separation of Wax Esters from Steryl Esters by Chromatography on Magnesium Hydroxide. *Lipids* 16:355–359.
31. Nicolaides N (1970) Magnesium Oxide as an Adsorbent for the Chromatographic Separation of Molecules According to their Degree of Flatness, e.g. the Separation of Wax Esters from Sterol Esters. *J Chromatogr Sci* 8:717–720.
32. Carrol KK (1961) Separation of lipid classes by chromatography on florasil. *J Lipid Res* 2:135–141.
33. Stránský K, Jursík T (1996) Simple Quantitative Transesterification of Lipids. Introduction. *Fett/Lipid* 98:65–71.
34. Hidaka H, Hanyu N, Sugano M, Kawasaki K, Yamauchi K, et al. (2007) Analysis of Human Serum Lipoprotein Lipid Composition Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Ann Clin Lab Sci* 37:213–221.
35. Zschörnig O, Pietsch M, Süß R, Schiller J, Gütschow M (2005) Cholesterol esterase action on human high density lipoproteins and inhibition studies: detection by MALDI-TOF MS. *J Lipid Res* 46:803–811.
36. Astigarraga E, Barreda-Gómez G, Lombardero L, Fresnedo O, Castaño F, et al. (2008) Profiling and Imaging of Lipids on Brain and Liver Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using 2-Mercapto-benzothiazole as a Matrix. *Anal Chem* 80:9105–9114.
37. Fuchs B, Süß R, Schiller J (2010) An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res* 49:450–475.
38. Stübiger G, Belgacem O (2007) Analysis of Lipids Using 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as a Matrix for MALDI Mass Spectrometry. *Anal Chem* 79:3206–3213.
39. Hauff S, Vetter W (2010) Exploring the fatty acids of vernix caseosa in form of their methyl esters by off-line coupling of non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217: 8270–8278.
40. Hanley K, Rassner U, Jiang Y, Vansomphone D, Crumrine D, et al. (1996) Hormonal Basis for the Gender Difference in Epidermal Barrier Formation in the Fetal Rat. *J Clin Invest* 97:2576–2584.

Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry

Vladimír Vrkoslav, Radka Míková and Josef Cvačka*



The applicability of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to the analysis of wax esters (WEs) was investigated. A series of metal salts of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) was synthesized and tested as possible matrices. Alkali metal (Li, Na, K, Rb, Cs) and transition metal (Cu, Ag) salts were studied. The matrix properties were evaluated, including solubility in organic solvents, threshold laser power that should be applied for successful desorption/ionization of WEs, the nature of the matrix ions and the mass range occupied by them, and the complexity of the isotope clusters for individual metals. Lithium salt of dihydroxybenzoic acid (LiDHB) performed the best and matrices with purified lithium isotopes ($^6\text{LiDHB}$ or $^7\text{LiDHB}$) were recommended for WEs. Three sample preparation procedures were compared: (1) mixing the sample and matrix in a glass vial and deposition of the mixture on a MALDI plate (Mix), (2) deposition of sample followed by deposition of matrix (Sa/Ma), and (3) deposition of matrix followed by deposition of sample (Ma/Sa). Morphology of the samples was studied by scanning electron microscopy. The best sample preparation technique was Ma/Sa with the optimum sample to matrix molar ratio 1 : 100. Detection limit was in the low picomolar range. The relative response of WEs decreased with their molecular weight, and minor differences between signals of saturated and monounsaturated WEs were observed. MALDI spectra of WEs showed molecular adducts with lithium $[\text{M} + \text{Li}]^+$. Fragments observed in postsource decay (PSD) spectra were related to the acidic part of WEs $[\text{RCOOH} + \text{Li}]^+$ and they were used for structure assignment. MALDI with LiDHB was used for several samples of natural origin, including insect and plant WEs. A good agreement with GC/MS data was achieved. Moreover, MALDI allowed higher WEs to be analyzed, up to 64 carbon atoms in *Ginkgo biloba* leaves extract. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: cuticular waxes; lipids; MALDI matrices; post source decay; wax esters

Introduction

Wax esters (WEs) are an important class of lipids consisting of long-chain fatty alcohols esterified with long-chain fatty acids (FAs). They are the main constituents of waxes, the commercial products of natural or synthetic origin used in large quantities in cosmetics, polishes, lubricants, surface coating, and many other applications. Almost all organisms biosynthesize WEs.^[1] They are important storage lipids in some prokaryotes, e.g. strains of *Acinetobacter* produce and store enormous amounts of WEs under nitrogen-limiting conditions.^[2] WEs in plants are found in epicuticular layer that restricts nonstomatal water loss, protects against ultra-violet (UV) radiation, and reduces water retention on the surface.^[3] Plant waxes (e.g. oil from seeds of jojoba or wax from leaves of the carnauba palm) are important industrial raw materials. Insects are protected against desiccation, wear, and microbial penetration by cuticular waxy layer.^[4] Some insect waxes are used commercially, e.g. Chinese wax produced by certain scale insects in China, India, and Japan, or beeswax secreted by young worker bees of the genus *Apis*. WEs are also important components of oil produced by the uropygial gland of birds.^[5] In terrestrial mammals, they are mostly associated with the skin. Lanolin from wool-bearing animals has been used since very ancient times. In humans, WEs are found in sebum produced by sebaceous glands that protect and waterproof hair and skin. Sebaceous glands are involved in skin problems such as acne or seborrhea.^[6] Earwax (cerumen) plays an important role in the human ear canal, assisting in cleaning, lubrication, and protection against bacteria.^[7,8] A special kind of sebaceous glands is the

meibomian gland at the rim of the eyelids. WEs in the meibomian gland secretion are important in eye protection and prevention of dry eyes or blepharitis.^[9,10]

Natural WEs are mixtures where individual molecular species differ in chain length and number of double bonds in both acidic and alcoholic parts of the molecule. Reliable analytical methods are necessary for thorough characterization of the mixtures. WEs are usually analyzed by GC often with MS detection.^[11–13] However, low volatility of long-chain WEs does not allow them to be directly separated by GC. WEs are then hydrolyzed and the reaction mixtures are injected onto a GC column.^[14–16] Overall composition of FAs and alcohols is obtained, but information about structures of the original WEs is lost. Moreover, such procedures are laborious, time consuming, and require larger amounts of samples. High-temperature GC is a more appropriate technique for WEs analysis.^[17,18] A limited number of papers has been published on high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC/MS) analysis of WEs. WEs from hair^[19] and human meibum^[20] were analyzed by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI), respectively. Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS)

* Correspondence to: Josef Cvačka, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague, Czech Republic. E-mail: cvacka@uochb.cas.cz

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague, Czech Republic

and APCI^[21] or ESI with Ag⁺ cationization (coordination ion spray MS)^[22] were used for analysis of jojoba oil. Lithium adducts of WEs were generated in ESI source to characterize waxes from ivy leaves.^[23]

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) is a powerful technique which becomes increasingly important also for the analysis of compounds of low polarity, i.e. neutral lipids or hydrocarbon polymers.^[24–35] Protonation of low or nonpolar compounds is not favored, but they can be ionized using various metal ions. MALDI-MS is often used for profiling and analysis of triacylglycerol (TAG) mixtures.^[26–29] TAGs are easily ionized with alkali metal ions even if there is no metal salt added.^[26] The most frequent matrix for TAGs is 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB). Other compounds, e.g. 2,4,6-trihydroxy-acetophenone^[28] or α -cyano-4-hydroxycinnamic acid^[29] was used as well. MALDI of entirely nonpolar hydrocarbons (HCs) or HC polymers is considerably more challenging. The use of silver ions for cationization of HCs was demonstrated in 1996^[30] and adopted in several other papers.^[31–33] Later, a convenient method utilizing lithium cationization was introduced.^[34] The matrix and the cationization reagent were combined in one compound, lithium 2,5-dihydroxybenzoate (LiDHB). The method was applied for the analysis of an insect's cuticular HCs.^[35] LiDHB was found to provide lithium adducts also with other nonpolar lipids, including WEs.^[34]

The present study was undertaken to explore the utility of MALDI-TOF for analysis of WEs and their mixtures. The objectives were (1) to test DHB and various DHB metal salts as possible matrices/cationization agents for WEs, (2) to optimize sample preparation procedure, (3) to learn about the morphology of sample/matrix deposits, and (4) to report on the performance and applications of the method.

Experimental

Abbreviations and nomenclature of WEs

In this work, a simple abbreviated nomenclature for an unambiguous naming of WEs was adopted.^[11] The first part of the abbreviations refers to the alcoholic segment of the molecule, whereas the second part indicates fatty acid. Thus, for instance, an abbreviation 18:0–22:0 is used for octadecyl docosanoate (stearyl behenate), 22:0–18:0 is used for docosanoyl octadecanoate (behenyl stearate), and 22:0–18:1n-9 is used for docosanoyl (9Z)-octadecenoate (behenyl oleate).

Chemicals

Standards of WEs (purity 99%) were purchased from Nu-Chek-Prep (Elysian, MN, USA) or Sigma-Aldrich. Polyethylene glycols (PEGs) (PEG 400, PEG 600, PEG 1000), DHB, and metal salts (reagent or analytical grade) were from Sigma-Aldrich, Fluka, or Lachema (Brno, Czech Republic). Solvents used for sample and matrix preparation (chloroform, diethyl ether, hexane, acetone, and methanol) were distilled in glass from analytical-grade solvents. Deionized water purified in a Milli-Q system (Millipore) was used for synthesis of matrices.

Matrices

Matrices – metal salts of DHB – were synthesized by neutralization of DHB dissolved in water with hydroxides (⁶LiOH, ⁷LiOH, RbOH),

carbonates (Li₂CO₃, Cs₂CO₃), bicarbonates (NaHCO₃, KHCO₃), or basic carbonate (CuCO₃ · Cu(OH)₂). Reaction conditions for synthesis of LiDHB were as follows: DHB (0.50 g; Fluka, Product No. 37550) was dissolved in water (10 ml) at 40 °C and the stoichiometric amount of Li₂CO₃ (0.12 g; Lachema Brno, reagent grade) was added. The pH of the reaction mixture had to be kept in acidic or neutral range to prevent formation of colored oxidized products. The volume of the solvent was slowly reduced to 1 ml by evaporation on a hot plate and the reaction mixture was cooled in a refrigerator (4 °C). Crystallization was initiated by scratching the walls of the vessel with a glass rod. White, needle-like small crystals were separated by filtration and washed with 1 ml of CHCl₃. The crystals were placed in a desiccator for 36 h to remove residual water. Other DHB salts were prepared in an analogous way except silver 2,5-dihydroxybenzoate which was precipitated from aqueous solutions of DHB and AgNO₃. The photosensitive product was quickly separated and air-dried in the dark. Preparation of copper (II) 2,5-dihydroxybenzoate required heating the reaction mixture to a temperature close to the boiling point for 3 h. The matrices crystallized from water solutions as hydrates. The number of molecules of water of crystallization was determined by classical elemental analysis using 2400 Series II CHNS/O Analyzer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). The matrices were abbreviated as follows: lithium 2,5-dihydroxybenzoate tetrahydrate as ⁶LiDHB, ⁷LiDHB, LiDHB; sodium 2,5-dihydroxybenzoate pentahydrate as NaDHB; potassium 2,5-dihydroxybenzoate dihydrate as KDHB; rubidium 2,5-dihydroxybenzoate dihydrate as RbDHB; cesium 2,5-dihydroxybenzoate hemihydrate as CsDHB; copper (II) 2,5-dihydroxybenzoate tetrahydrate as Cu(DHB)₂; and silver 2,5-dihydroxybenzoate hemihydrate as AgDHB.

WEs samples

Samples of WEs were isolated from the wings of the gray flesh fly *Neobellieria bullata*, the leaves of the maidenhair tree *Ginkgo biloba* and virgin beeswax. Wings of *N. bullata* flies (180 indiv.) were carefully separated and extracted three times with CHCl₃ (2 ml). *G. biloba* leaves (5 nos.) were extracted three times with 10 ml of CHCl₃ and the combined extracts were dried with anhydrous MgSO₄. Honeycomb beeswax (10 mg) was dissolved in 100 μ l of CHCl₃. Crude extracts of all samples were evaporated almost to dryness and separated on precleaned glass thin layer chromatography (TLC) plates (36 mm × 76 mm) coated with Adsorbosil-plus [Applied Science Labs; layer thickness 0.2 mm with gypsum (12%)] using hexane : diethylether (93 : 7, v/v) mobile phase. TLC zones were visualized by spraying with rhodamine 6G solution (0.05% in ethanol) and inspected under UV light (254 nm). WE standards (22:0–18:1n-9, 22:0–20:0) got eluted with $R_F = 0.75$. The areas corresponding to $R_F = 0.70–0.80$ were scraped off the plates and extracted with 8 ml of freshly distilled diethyl ether. Solvent was evaporated off under a stream of argon. Residues were weighed, dissolved in CHCl₃ to a concentration of 2.5 mg/ml, and stored in sealed glass vials at –18 °C. Plastic equipment was avoided during all manipulations with the samples and solvents to prevent possible contamination. Transesterification of WEs was performed according to a published method.^[36]

MALDI mass spectrometry

MALDI-TOF experiments were performed on Reflex IV (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) operated in the reflectron

mode with the acceleration voltage of 20 kV and 200 ns extraction pulse. Desorption and ionization were achieved using a nitrogen UV laser (337.1 nm, 4 ns pulse of 300 μ J, maximum frequency 20 Hz, adjustable laser power 0–100%). Matrix ions were suppressed below m/z 300 with the exception of fragmentation and matrix ions studies. Data were collected and analyzed using FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Spectra were averaged from 400 to 1000 laser shots. Postsource decay (PSD) spectra were recorded by stepping the reflectron voltage and stitching spectra together in the individual segments (200 laser shots for each segment). Precursors were selected using an ion selector with 20 mass units window. Before use, the MALDI plates (MTP 387-position ground steel target; Bruker Daltonik) were thoroughly cleaned by sonication in methanol : water (1 : 1 v/v) and CHCl_3 , rinsed with CHCl_3 , and air-dried. Samples dissolved in CHCl_3 were spotted on the target using three techniques as follows:

1. Mix technique: Sample (0.8 μ l) and matrix (0.8 μ l) were mixed together in a small glass vial. The mixture was spotted on the MALDI plate and allowed to evaporate.
2. Sa/Ma technique: Sample (0.8 μ l) was spotted on the MALDI plate. The solvent was left to dry. Matrix (0.8 μ l) was applied on the top of the sample and allowed to evaporate.
3. Ma/Sa technique: Matrix (0.8 μ l) was spotted on the MALDI plate. The solvent was left to dry. Sample (0.8 μ l) was applied on the top of the matrix and allowed to evaporate.

The mass spectra were externally calibrated using a mixture of PEG 400, 600, and 1000. For thorough method evaluation, the instrument was set in 'auto' mode and the spectra were averaged from 1000 laser shots (10 \times 100 shots). At least 15 measurements were performed in parallel for reliable statistical data evaluation.

Scanning electron microscopy

The morphology of MALDI samples was examined by scanning electron microscopy (SEM) using JSM-6380LV instrument (JEOL, Japan). The samples were deposited on small, round stainless steel plates (diameter 35 mm, thickness 2 mm) and sputtered with gold. The roughness of the plate surface was modified by abrasive powder (Al_2O_3 , 1000 grit, Carborundum Electrite, Czech Republic) to obtain a surface of morphology similar to Bruker's ground steel MALDI plate. SEM images were taken using acceleration voltage 10–15 kV and spot size 52–38.

Gas chromatography/mass spectrometry

GC/MS analyses were performed on a 6890N gas chromatograph coupled to a 5975B mass spectrometer, equipped with EI and quadrupole analyzer (Agilent Technologies). WEs (1 μ l, 0.25 mg/ml in CHCl_3) were injected manually in splitless mode. The injector temperature was 260 $^\circ\text{C}$. An HP5-MS fused silica capillary column (30 m \times 250 μm ; film thickness 0.25 μm ; Agilent Technologies) was used for separations. The carrier gas was helium at a constant flow rate 2.5 ml/min. Temperature program: 60 $^\circ\text{C}$ (2 min), then 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 260 $^\circ\text{C}$, then 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 320 $^\circ\text{C}$ (70 min). Mass spectra were recorded from m/z 25 to 900; EI source temperature was 230 $^\circ\text{C}$. Trans-esterified mixtures of WEs were analyzed using the same instrument. The temperature program: 40 $^\circ\text{C}$ (0 min), 50 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 140 $^\circ\text{C}$, then 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 320 $^\circ\text{C}$ (20 min); the carrier gas flow rate was 1 ml/min. Fatty acid methyl esters (FAMES) and alcohols were identified based on their mass spectra and/or co-injection with standards.

Results and Discussion

Evaluation of matrices

Matrix ions

Alkali metal (Li, Na, K, Rb, Cs) and transition metal (Cu, Ag) salts of DHB were examined to learn about the nature of matrix ions and to determine mass ranges occupied by them. Matrices were dissolved in MeOH/ H_2O (1 : 1, v/v) at a concentration of 10 mg/ml and deposited (0.8 μ l) on a stainless steel target. For the insoluble AgDHB, a suspension in MeOH/ H_2O was used. When irradiated with a laser pulse, the matrices offered complex mixtures of ions. Several common features were found for all matrices. All matrices provided singly charged metal ion $[\text{Metal}]^+$. In addition, metal ion clusters $[\text{Metal}_n]^+$ were observed, where n typically equaled 2 for alkali metals and reached up to 5 for silver. Singly charged metal adducts of DHB ($[\text{DHB} + \text{Metal}]^+$) were found in all matrices with the exception of RbDHB and CsDHB. Metals also readily replaced hydrogens in –OH groups, forming series of $[\text{DHB} - \text{H} + 2\text{Metal}]^+$, $[\text{DHB} - 2\text{H} + 3\text{Metal}]^+$, and $[\text{DHB} - 3\text{H} + 4\text{Metal}]^+$ ions. Ions formed after neutral loss of water from $[\text{DHB} + \text{Metal}]^+$ were observed in matrices with Li, Cu, and Ag. Silver and copper matrices also provided adducts of two DHB molecules, $[\text{2DHB} + \text{Metal}]^+$ and ions after loss of water from these species ($[\text{2DHB} - \text{H}_2\text{O} + \text{Metal}]^+$). Besides the ions described here, other ions with so far unknown structures have also been detected, particularly in the case of RbDHB and CsDHB. Very complex mixtures of ions were generated from all matrices in a very short period after irradiation.^[35]

These ions were not studied in detail as they disappeared quickly and did not interfere with the MALDI analysis. From the practical point of view it was important to know mass ranges which are free of matrix ions. Interestingly, m/z ranges occupied by the matrix ions increased with the size (atomic number) of the metal cation (Table 1). The MALDI spectra of all 2,5-dihydroxybenzoates considered in this study are available in Supporting Information.

Applicability of matrices for WEs

A solution of 16:0–18:1n-9 in CHCl_3 (2.5 mg/ml, 0.8 μ l) was mixed with matrix (10 mg/ml, 0.8 μ l) and spotted on the target plate. Solvent mixtures for each matrix were optimized to ensure

Table 1. Properties of the matrices

Matrix	Matrix ions ^a	Solvent ^b acetone/ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$
DHB	0–420	2 : 1 : 0
⁶ LiDHB, ⁷ LiDHB, LiDHB	0–200	2 : 1 : 0
NaDHB	0–250	5 : 3 : 1
KDHB	0–310	5 : 3 : 2
$\text{Cu}(\text{DHB})_2$	0–380	2 : 1 : 0
RbDHB	0–550	5 : 3 : 3 ^c
AgDHB	0–650	– ^d
CsDHB	0–750	5 : 3 : 2

^a Mass range, where matrix cluster ions occur.

^b Optimized composition of solvent for dissolution of matrix (10 mg/ml).

^c Saturated solution.

^d AgDHB is insoluble. Suspension in MeOH/ H_2O (1 : 1) was used.

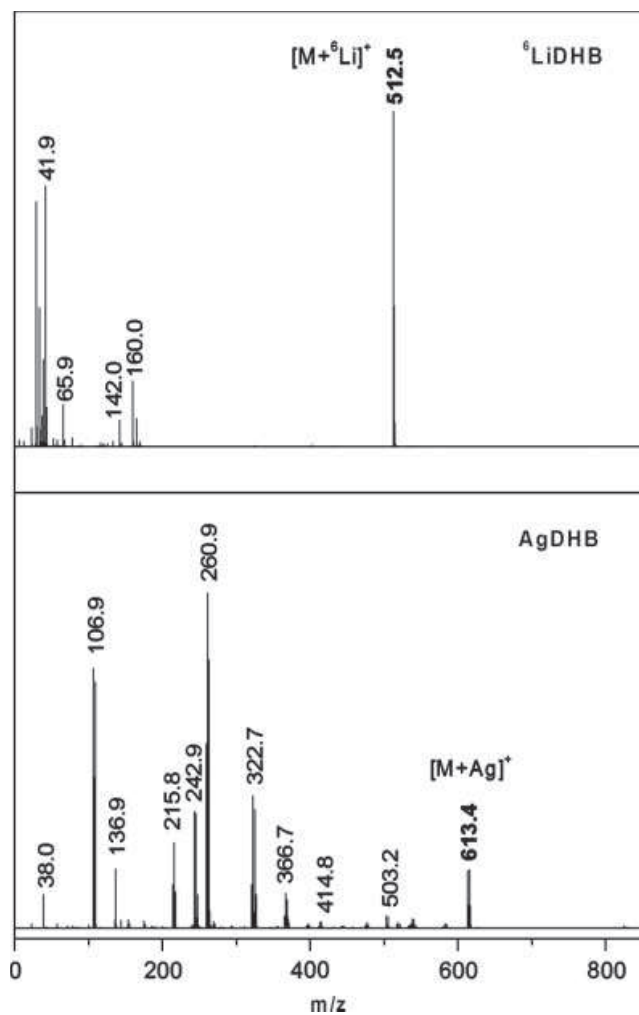


Figure 1. MALDI spectra of 16:0–18:1n-9 (FW 506.9) measured in ${}^6\text{LiDHB}$ (a) and AgDHB (b) matrix.

sufficient solubility and miscibility with the sample dissolved in CHCl_3 (Table 1). AgDHB was used as suspension in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$. Except for CsDHB , all 2,5-dihydroxybenzoates provided molecular adduct $[\text{M} + \text{Metal}]^+$ with the expected isotope cluster (Supporting Information). In the case of DHB, only sodium adducts were detected but no protonated molecular ions. MALDI spectra of 16:0–18:1n-9 in ${}^6\text{LiDHB}$ and AgDHB matrices are shown in Fig. 1. The relative values of threshold laser power that needs to be applied for successful desorption/ionization of WEs were compared. The lowest relative laser power (100% - laser attenuation) was required for ionization from AgDHB (25%). $\text{Cu}(\text{DHB})_2$ and all matrices with lithium needed 40%. NaDHB and DHB containing traces of sodium required relative laser power of 50%. The ionization was, however, more efficient with NaDHB and also fewer matrix cluster ions were formed when compared with DHB . Considerably higher laser powers were required for ionization from KDHB (70%). Besides the expected adduct $[\text{M} + \text{K}]^+$, the spectra also showed chromium adduct $[\text{M} + \text{Cr}]^+$. A likely source of chromium was stainless steel MALDI target which was exposed after quick ablation of sample. When chromium (III) chloride was intentionally added, the intensity of $[\text{M} + \text{Cr}]^+$ increased. Threshold laser power of 70% was needed for RbDHB , but only a weak signal of $[\text{M} + \text{Rb}]^+$ was observed for unsaturated WEs. Saturated WEs

did not provide any molecular adducts with Rb . CsDHB was useless for MALDI of WEs, as no molecular adducts with Cs were detected.

The complexity of the isotope clusters is also an important parameter to be considered, particularly concerning mixture analysis. Sodium and cesium were the only monoisotopic elements among the tested metals. Other elements exist in nature as mixtures of two or more isotopes, e.g. ${}^{107}\text{Ag}/{}^{109}\text{Ag}$ (51.35/48.65), ${}^{63}\text{Cu}/{}^{65}\text{Cu}$ (69.09/30.91), or ${}^{39}\text{K}/{}^{40}\text{K}/{}^{41}\text{K}$ (93.08/0.01/6.91). The most abundant isotopes differ by two mass units, which is the same difference as in a pair of unsaturated and saturated WE. In consequence, interpreting the spectra is troublesome. Natural lithium is a mixture of two isotopes differing by one mass unit, ${}^6\text{Li}$ (7.52%) and ${}^7\text{Li}$ (92.48%). When used for cationization, MALDI spectra are more easily interpreted. However, matrices with purified lithium isotopes (${}^6\text{LiDHB}$, ${}^7\text{LiDHB}$) offer the most straightforward spectra interpretation. They combine good ionization properties of lithium and the advantages of a monoisotopic element.

Taken together, lithium-based DHB matrices performed best for analysis of WEs. They facilitated efficient cationization of WEs at relatively low laser powers. Purified lithium isotopes did not complicate isotopic patterns of molecular adducts, which enabled straightforward assignment of the molecular weights. Matrix clusters did not interfere with WE signals in the mass range starting from m/z 200. The matrices were soluble in solvents of low polarity, thus ensuring a good mixing with samples. For the next experiment ${}^6\text{LiDHB}$ was selected, but similar results can be expected for ${}^7\text{LiDHB}$.

MALDI of WEs with ${}^6\text{LiDHB}$ matrix

Morphology of the sample deposits

Sample preparation is a crucial step, which affects signal intensity and reproducibility to a great extent. Three protocols (Mix, Sa/Ma , and Ma/Sa ; see Experimental Section for details) were thoroughly tested using a mixture of saturated WEs (16:0–16:0, 18:0–18:0, 20:0–20:0, 22:0–22:0; 2.5 mg/ml in CHCl_3) and ${}^6\text{LiDHB}$ (10 mg/ml in acetone/ CHCl_3 , 2:1, v/v).

A drop of matrix solution (0.8 μl) was left to dry on a stainless steel target. The solvent quickly evaporated. SEM revealed thin crystals adhering to the plate (Fig. 2(a)). The crystals were evenly distributed across the spot, although those on the rim were larger. The overall appearance of the spot changed when WEs were added. The morphology of the deposits was highly dependent on the sample preparation protocol. In general, matrix crystals were bladed or formed as rosettes. They appeared to be covered by a waxy film (Fig. 2(b)). Crystal sizes differed substantially with the sample preparation (Fig. 3). The largest crystals or cluster of crystals were observed for the Mix procedure. Their dimensions were at least 100 μm and reached up to 500 μm in some samples. Large crystals were probably formed because of the substantial time available for their development. Upon deposition on the target, a thin crust of wax was quickly formed on the drop surface thus preventing rapid evaporation of solvent. Similar to the Mix technique, large crystals ($\sim 100 \mu\text{m}$) were formed also in Sa/Ma protocol. The solvent used for matrix dissolution (acetone/chloroform 2:1) dissolved WEs, at least partially. A waxy crust was formed enabling large crystals to be developed. By contrast, the crystals in Ma/Sa technique were formed rapidly, as no barrier hampered the quick evaporation of the solvent. Subsequent deposition of WEs in CHCl_3 did

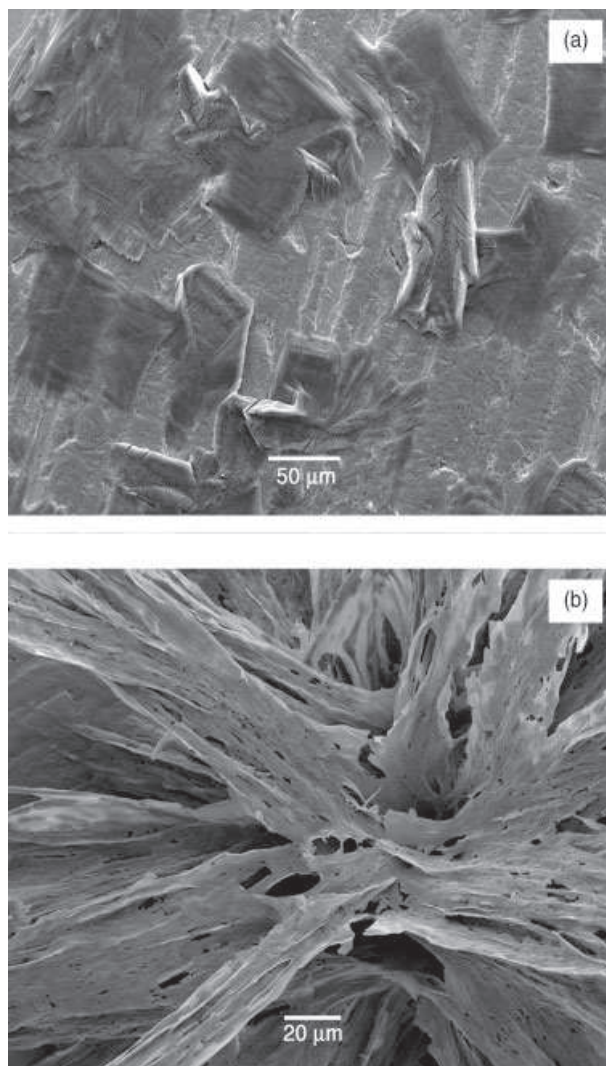


Figure 2. SEM image of $^6\text{LiDHB}$ crystallized on a stainless steel target from CHCl_3 [(a) magnification of 300 \times] and a detail of a large group of $^6\text{LiDHB}$ crystals in the sample of saturated WEs (16:0–16:0, 18:0–18:0, 20:0–20:0, 22:0–22:0) prepared by Sa/Ma technique [(b) magnification of 600 \times].

not affect them, because $^6\text{LiDHB}$ is poorly soluble in CHCl_3 . Small crystals up to 10 μm were formed. The Ma/Sa technique provided morphologically the most uniform samples for MALDI analysis.

Evaluation of the sample preparation protocols

The mass spectra of samples prepared by the above-mentioned sample preparation protocols were compared. The instrument was operated in 'auto' mode which ensured unbiased measurement of data. For each protocol, 30 spectra (averaged from 10 \times 100 shots) were recorded from several distinct spots. The results for 18:0–18:0 are given in Table 2. The Mix technique provided signal of the lowest intensity, which is partially explained by the loss of sample when transferred from a small glass vial to the MALDI plate. Note that direct mixing of sample and matrix on the MALDI target is not possible because of very fast evaporation of organic solvents. The lithium molecular adducts were detected only in $\sim 1/3$ of all measurements.

Table 2. Statistical evaluation of lithium adduct of 18:0–18:0 (m/z 542.6) obtained using various sample preparation techniques^a

Spotting technique	Signal intensity (a.u.)	Relative standard deviation (RSD)(%)	Spectra without signal (%)
Mix	4800	162	30
Sa/Ma	15 600	63	3
Ma/Sa	25 400	48	3

^a All data calculated from 30 MALDI spectra, each spectrum summed from 10 \times 100 shots.

Their intensities were poorly reproducible, obviously because of the strong tendency to 'sweet spot' formation. The Sa/Ma procedure gave more intense and reproducible signals. The best values were obtained for Ma/Sa technique, offering the most intense signal, best reproducibility, and low percentage of spectra without any signal. The spectral quality correlated well with the morphology of the samples. Ma/Sa sample preparation procedure was previously shown to work well also for other lipid classes, including TAGs.^[26]

The thickness of the matrix layer is another important parameter in Ma/Sa method affecting spectral quality. It can be modified using solvents with different properties. Surface tension and volatility affect spread of the drop (spot diameter, crystal size) and speed of evaporation (crystal size). Three solvents were used for preparation of matrix solution (10 mg/ml): (1) methanol, (2) acetone/chloroform (2:1, v/v), and (3) methanol/water (1:1, v/v). Methanolic solution of $^6\text{LiDHB}$ spreads over a large area leaving only a very thin layer of fine crystals. The sample was consumed rapidly and the signal also faded away quickly. Addition of water (1:1) resulted in a thick layer of large crystals concentrated on a very small area (2 mm^2). Deposits of an optimal thickness and size were formed from acetone/chloroform (2:1) mixture. The matrix solution remained in a single well on the MALDI plate (10 mm^2) and small crystals were formed. The relative intensity of $[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$ prepared by Ma/Sa with various matrix solvents decreased in the order: acetone/chloroform (100%) > methanol (42%) > methanol/water (33%).

Analytical figures of merit

An optimum ratio between sample and matrix was determined for Ma/Sa protocol. Matrix solution (0.8 μl , 10 mg/ml) was spotted on the MALDI plate and the solvent was left to dry. A mixture of WEs (16:0–16:0, 18:0–18:0, 20:0–20:0, 22:0–22:0) dissolved in CHCl_3 (0.8 μl) was applied on the top of the matrix deposit. Concentrations of WEs were 0.031, 0.063, 0.125, 0.250, and 0.500 mg/ml, which corresponded to ~ 35 –850 pmol of each WE in the spot. Intensity of the signal was averaged from 400 spectra. The maximum signal was achieved for sample concentration of 0.250 mg/ml, which corresponded to the matrix/sample molar ratio 100:1. Detection limits ($S/N = 3$) ranged from 1 pmol (16:0–16:0) to 3 pmol (22:0–22:0).

Relative responses of WEs differing in chain length and number of double bonds were compared. MALDI spectra of equimolar mixtures of saturated WEs (16:0–16:0, 18:0–18:0, 20:0–20:0, 22:0–22:0) were recorded. The averaged relative intensities of $[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$ were as follows: 16:0–16:0 (100%), 18:0–18:0 (70%), 20:0–20:0 (46%), 22:0–22:0 (40%). Apparently,

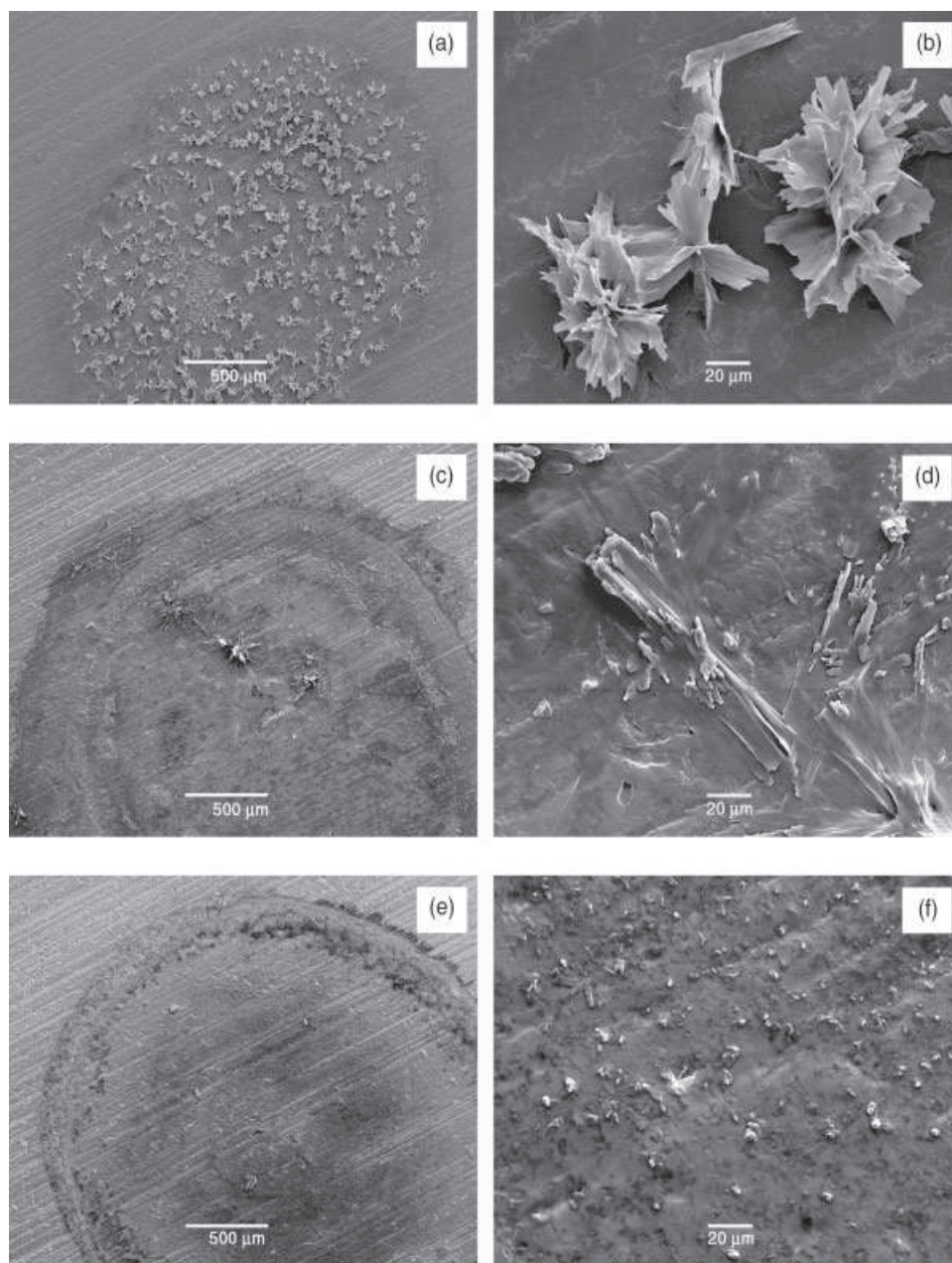


Figure 3. SEM images of samples prepared by Mix (a,b), Sa/Ma (c,d), and Ma/Sa (e,f) technique using $^6\text{LiDHB}$ matrix and mixture of saturated WEs (16:0–16:0, 18:0–18:0, 20:0–20:0, 22:0–22:0). Magnification of 45 \times (left column) and 600 \times (right column).

the response decreased with the molecular weight. Similar observations have already been described for TAGs.^[26] In the next experiment, an equimolar mixture of saturated (20:0–20:0) and unsaturated (22:0–18:1n-9) WE was repeatedly analyzed. The monounsaturated WE provided a signal higher by 10% on average than the saturated one. The results showed that the chain length and number of double bonds affect the ion intensities. WEs with shorter chains and/or double bonds were preferentially ionized.

MALDI spectra of WEs

MALDI spectra of WE standards (RCOOR') showed molecular adducts with lithium [$\text{M} + ^6\text{Li}^+$] (Fig. 4(a)). After an increase of

the laser power (50%), low intensity ions appeared at lower m/z values. They were identified as lithiated FAs ($[\text{RCOOH} + ^6\text{Li}]^+$, $[\text{RCOO}^6\text{Li} + ^6\text{Li}]^+$) and alcohols ($[\text{R}'\text{OH} + ^6\text{Li}]^+$, $[\text{R}'\text{O}^6\text{Li} + ^6\text{Li}]^+$). To exclude the possibility that FAs and alcohols were already present in the standards, the experiment was repeated with WEs purified by TLC. The same ions were detected, which could be explained by the hydrolysis of WEs caused by traces of water of crystallization from $^6\text{LiDHB}$. To prove the hypothesis, a sample was prepared using matrix dissolved in water. The same fragments were observed, but their intensities increased several times. In addition, standards of FAs and alcohols provided MALDI spectra with the same type of ions: octadecanoic acid provided m/z 290.3 ($[\text{RCOOH} + ^6\text{Li}]^+$) and m/z 295.4 ($[\text{RCOO}^6\text{Li} + ^6\text{Li}]^+$); octadecanol gave m/z 276.3 ($[\text{R}'\text{OH} + ^6\text{Li}]^+$) and

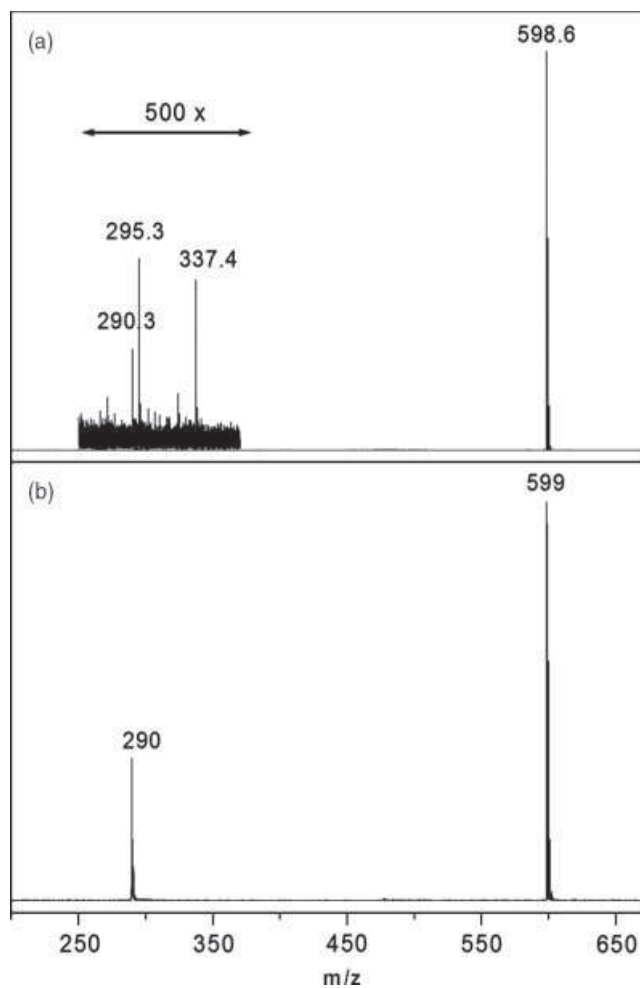


Figure 4. MALDI (a) and PSD (b) spectrum of 22:0-18:0 (FW 593.0). The sample was prepared using Ma/Sa technique with $^6\text{LiDHB}$ matrix.

281.4 ($[\text{R}'\text{O}^6\text{Li} + ^6\text{Li}]^+$). Lipid hydrolysis under MALDI conditions was previously reported by Harvey.^[37] Fragmentation of WEs was further studied by PSD. The only fragment in the spectrum of 22:0-18:0 (m/z 290) was identified as lithium adduct of stearic acid (Fig. 4(b)). Both saturated and unsaturated WEs provided $[\text{RCOOH} + ^6\text{Li}]^+$ fragments. They were presumably formed by elimination of alkene from $[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$. Ions of the same structure ($[\text{RCOOH} + \text{Li}]^+$) were the only fragments observed in ESI-MS/MS spectra of lithium adduct of WEs.^[23] Analogous fragments, $[\text{RCOOH} + \text{H}]^+$ are known from CI^[38] or APCI-MS/MS^[20] spectra of WEs. When ionized with silver ions, WEs provided $[\text{RCOOH} + \text{Ag}]^+$ under collision induced dissociation (CID) conditions.^[22]

Analysis of natural WE mixtures

WEs isolated from plant and insect samples were analyzed by MALDI-TOF. The mass spectrum of epicuticular WEs from *G. biloba* leaves is given in Fig. 5(a). It shows many WE molecular species with 30-64 carbon atoms. Most of them were saturated and contained an even number of carbons. WEs with odd number of carbons either in acidic or alcoholic part of the molecule were detected at considerably lower levels. Unsaturated WEs appeared

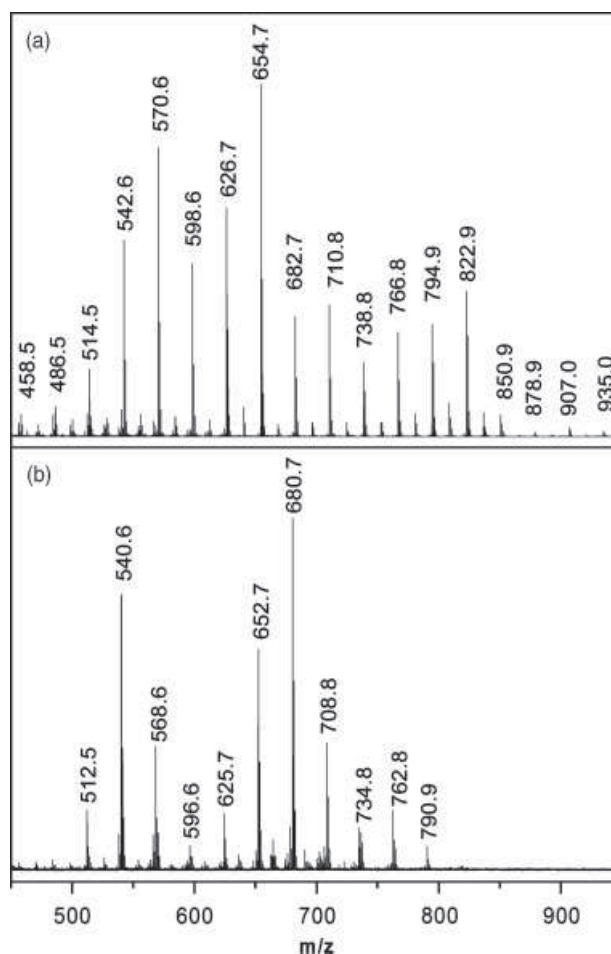


Figure 5. MALDI spectrum of epicuticular WEs from *Ginkgo biloba* leaves (a) and cuticular WEs isolated from wings of flesh fly *Neobellieria bullata* (b). The samples were prepared using Ma/Sa technique with $^6\text{LiDHB}$ matrix.

mostly below m/z 650. MALDI-TOF with $^6\text{LiDHB}$ matrix detected WEs almost up to m/z 950. When the same mixture was analyzed by GC/MS, the peak eluted last consisted of 52 carbons (m/z 760.8) and its retention time was 108.8 min. *G. biloba* sample was also trans-esterified and the resulting mixture of FAMES and alcohols was analyzed by GC/MS. The compounds with the longest chains were geddic acid (tetratriacontanoic, C34) and melissyl alcohol (triacontanol, C30). When combined, they gave WE with molecular weight of 929, which corresponded well with the signal in MALDI spectrum at m/z 935 ($[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$). The epicuticular waxes from carnauba palm (*Copernicia cerifera*) were studied previously.^[34] The elemental composition of lithium adducts of WEs was confirmed from the spectra internally calibrated with PEGs. Another example of natural WE mixture is shown in Fig. 5(b). WEs with 34-54 carbon atoms were isolated from the wings of gray flesh fly *N. bullata*. Unlike *G. biloba* WEs, most of them were unsaturated with 1-2 double bonds. The structure of WEs from beeswax was studied by PSD. Both saturated and unsaturated WEs with 40-52 carbon atoms were detected (Fig. 6(a)). Figure 6(b) shows a PSD spectrum (No.1) of $[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$ at m/z 598.6. The fragment at m/z 262 is lithium adduct of palmitic acid. The alcoholic part of the WE was calculated from the mass difference between $[\text{M} + ^6\text{Li}]^+$ and $[\text{RCOOH} + ^6\text{Li}]^+$. The structure of this particular WE was thus determined to be 24:0-16:0. PSD spectrum no.

Table 3. WEs identified in beeswax

WE	MALDI-TOF MS				GC/MS	
	$[M + {}^6\text{Li}]^+$ (<i>m/z</i>)	$[\text{RCOOH} + {}^6\text{Li}]^+$ (<i>m/z</i>)	FA	Alcohol ^a	<i>t_R</i> (min)	<i>M</i> ⁺ (<i>m/z</i>)
24:0–16:0	598.6	262	16:0	24:0	49.4	592.6
24:0–18:1	624.6 ^c	–	–	–	53.3	618.6
26:0–16:0	626.6	262	16:0	26:0	53.8	620.6
26:0–18:1	652.7 ^c	–	–	–	58.9	646.7
28:0–16:0	654.7	262	16:0	28:0	59.5	648.7
28:0–18:1	680.7	288	18:1	28:0	66.5	674.7
30:0–16:0	682.7	262	16:0	30:0	67.2	676.7
30:0–18:1	708.7	288	18:1	30:0	77.2	702.7
32:0–16:0	710.7	262	16:0	32:0	78.0	704.7
32:0–18:1	736.8	288	18:1	32:0	92.0	730.8
34:0–18:1 ^b	764.8 ^c	–	–	–	–	–

^a Calculated from difference between $[\text{RCOOH} + {}^6\text{Li}]^+$ and $[M + {}^6\text{Li}]^+$.

^b Expected composition.

^c Too low intensity for PSD.

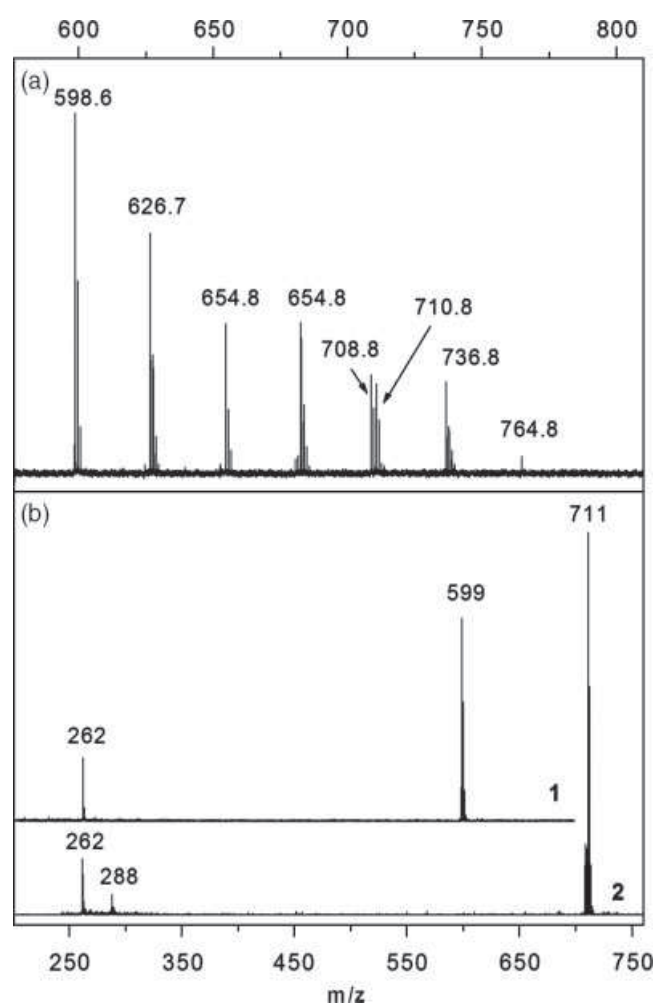


Figure 6. MALDI spectrum of WEs isolated from beeswax (a) and PSD spectra of *m/z* 599 (spectrum no. 1) and 711 (spectrum no. 2). The samples were prepared using Ma/Sa technique with ⁶LiDHB matrix.

2 in Fig. 6(b) shows simultaneous fragmentation of two ions at *m/z* 708.8 and 710.8. The fragments at *m/z* 262 and 288 were associated with palmitic and oleic acids, and the corresponding alcohols were triacontanol and dotriacontanol, respectively. Note that it is the only possibility, as the reversed combination, i.e. *m/z* 288 related to 710.8 did not provide any meaningful result. In the beeswax sample all unsaturated WEs contained oleic acid, whereas saturated molecular species were composed of palmitic acid. MALDI spectra correlated well with ours (Table 3) and previously published^[14] GC/MS data.

Conclusions

In conclusion, lithium salt of DHB performed the best among the matrices tested for WEs. The samples for MALDI analysis were best prepared by Ma/Sa technique (deposition of matrix, solvent evaporation, and deposition of WE sample). This sample preparation ensured formation of small crystals evenly distributed across the spot with minimum tendency to 'sweet spots' formation. The best signal was obtained for sample to matrix molar ratio 1:100 and the detection limit was in the low picomolar range. The interpretation of spectra was simplified when matrices with purified isotopes (⁶LiDHB or ⁷LiDHB) were used. PSD spectra of lithium adducts provided structure-related fragments that were used for identification of components in natural WE mixtures.

MALDI-MS has a potential to become a routine analytical tool for WE analysis. It suits well for rapid WE mixtures profiling and for detailed structural analysis of individual molecular species. Sample preparation is fast and easy, as matrix and cationization reagent are combined in a single substance. When compared with GC/MS, MALDI-MS offers analysis of WEs with higher molecular weights. The usefulness of the newly developed method was demonstrated in several samples of natural origin.

Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Academy of Sciences of the Czech Republic for financial support (Project No. AV0Z40550506-I058 and Research project Z4 055 0506). The authors are indebted to Dr Karel Stránský for WE standards, Mrs Jarmila Titzenthalerová for insect samples, Mr Vladimír Vrkoslav for raw beeswax, Mrs Lucie Holasová for elemental analysis, and Dr Jan Šobotník and Mr Miroslav Hyliš for help with SEM.

References

- [1] P. E. Kolattukudy (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier: Oxford, **1976**.
- [2] T. Ishige, A. Tani, K. Takabe, K. Kawasaki, Y. Sakai, N. Kato. Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 1192, DOI: 10.1128/AEM.68.3.1192-1195.2002.
- [3] L. Kunst, A. L. Samuels. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 51, DOI: 10.1016/S0163-7827(02)00045-0.
- [4] R. J. Hamilton (ed.). *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Oily Press: Dundee, **1995**.
- [5] M. H. A. Dekker, T. Piersma, J. S. S. Damsté. Molecular analysis of intact preen waxes of *Calidris canutus* (Aves : Scolopacidae) by gas chromatography/mass spectrometry. *Lipids* **2000**, *35*, 533, DOI: 10.1007/s11745-000-553-7.
- [6] K. R. Smith, D. M. Thiboutot. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 271, DOI: 10.1194/jlr.R700015-JLR200.
- [7] J. T. Bortz, P. W. Wertz, D. T. Downing. Composition of cerumen lipids. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1990**, *23*, 845.
- [8] T. J. Chai, T. C. Chai. Bactericidal activity of cerumen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1980**, *18*, 638.
- [9] A. J. Bron, J. M. Tiffany, S. M. Gouveia, N. Yokoi, L. W. Voon. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* **2004**, *78*, 347, DOI: 10.1016/j.exer.2003.09.019.
- [10] J. P. McCulley, W. E. Shine. The lipid layer of tears: dependent on meibomian gland function. *Experimental Eye Research* **2004**, *78*, 361, DOI: 10.1016/S0014-4835(03)00203-3.
- [11] K. Stránský, M. Zarevúcka, I. Valterová, Z. Wimmer. Gas chromatographic retention data of wax esters. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128*, 208, DOI: 10.1016/j.chroma.2006.06.035.
- [12] D. W. Griffiths, G. W. Robertson, T. Shepherd, A. N. E. Brich, S. C. Gordon, J. A. T. Woodford. Comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 111, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00250-8.
- [13] S. Patel, D. R. Nelson, A. G. Gibbs. Chemical and physical analyses of wax ester properties. *Journal of Insect Science* **2001**, *1.4*, 7, available online: insectscience.org/1.4.
- [14] K. Stránský, M. Streibl, V. Kubelka. On natural waxes. XIX. Complex esters of the wax of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1971** *36*, 2281.
- [15] T. C. S. Kanya, L. J. Rao, M. C. S. Sastry. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1552, DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.008.
- [16] T. A. Isbell, K. D. Carlson, T. P. Abbott, B. S. Phillips, S. M. Erhan, R. Kleiman. Isolation and characterization of wax esters in meadowfoam oil. *Industrial Crops and Products* **1996**, *5*, 239, DOI: 10.1016/0926-6690(96)89456-8.
- [17] L. Wang, S. Ando, Y. Ishida, H. Ohtani, S. Tsuge, T. Nakayama. Quantitative and discriminative analysis of carnauba waxes by reactive pyrolysis-GC in the presence of organic alkali using a vertical microfurnace pyrolyzer. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2001**, *58-59*, 525, DOI: 10.1016/S0165-2370(00)00155-8.
- [18] R. Aichholz, E. Lorbeer. Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry II: high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2000**, *883*, 75, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00386-1.
- [19] M. Fitzgerald, R. C. Murphy. Electrospray mass spectrometry of human hair wax esters. *Journal of Lipid Research* **2007**, *48*, 1231, DOI: 10.1194/jlr.D700002-JLR200.
- [20] I. A. Butovich, E. Uchiyama, J. P. McCulley. Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation. *Journal of Lipid Research* **2007**, *48*, 2220, DOI: 10.1194/jlr.M700237-JLR200.
- [21] A. Tada, Z. L. Jin, N. Sugimoto, K. Sato, T. Zmayaki, K. Tanamoto. Analysis of the constituents in jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **2005**, *46*, 198.
- [22] A. Medvedovici, K. Lazou, A. d'Oosterlinck, Y. N. Zhao, P. Sandra. Analysis of jojoba oil by LC-coordination ion spray-MS (LC-CIS-MS). *Journal of Separation Science* **2002**, *25*, 173, DOI: 10.1002/1615-9314(20020201)25:3<173::AID-JSSC173>3.0.CO;2-K.
- [23] S. Santos, L. Schreiber, J. Graca. Cuticular waxes from ivy leaves (*Hedera helix* L.): analysis of high-molecular-weight esters. *Phytochemical Analysis* **2007**, *18*, 60, DOI: 10.1002/pca.952.
- [24] R. Chen, T. Yalcin, W. E. Wallace, C. M. Guttman, L. Li. Laser desorption ionization and MALDI time-of-flight mass spectrometry for low molecular mass polyethylene analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12*, 1186, DOI: 10.1016/S1044-0305(01)00308-7.
- [25] A. M. Belu, J. M. DeSimone, R. W. Linton, G. W. Lange, R. M. Friedman. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for polymer characterization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, *7*, 11, DOI: 10.1016/1044-0305(95)00589-7.
- [26] G. R. Asbury, K. Al-Saad, W. F. Siems, R. M. Hannan, H. H. Hill. Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 983, DOI: 10.1016/S1044-0305(99)00063-X.
- [27] G. Picariello, R. Sacchi, F. Addeo. One-step characterization of triacylglycerols from animal fat by MALDI-TOF MS. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2007**, *109*, 511, DOI: 10.1002/ejlt.200600255.
- [28] G. Stubiger, O. Belgacem. Analysis of lipids using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix for MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 3206, DOI: 10.1021/ac062236c.
- [29] F. O. Ayorinde, Q. L. Keith, L. W. Wan. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of cod liver oil and the effect of analyte/matrix concentration on signal intensities. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1762.
- [30] G. Kuhn, S. Weidner, U. Just, G. Hohner. Characterization of technical waxes – Comparison of chromatographic techniques and matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1996**, *732*, 111, DOI: 10.1016/0021-9673(95)01255-9.
- [31] T. K. Dutta, S. Harayama. Time-of-flight mass spectrometric analysis of high-molecular-weight alkanes in crude oil by silver nitrate chemical ionization after laser desorption. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 864, DOI: 10.1021/ac0009797.
- [32] J. K. Pruns, J. P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, U. Hintze, W. A. König. Characterization of low molecular weight hydrocarbon oligomers by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a solvent-free sample preparation method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 208, DOI: 10.1002/rcm.568.
- [33] J. K. Pruns, C. Rapp, U. Hintze, K. P. Wittern, W. A. König. Characterization of paraffin oils and petrolatum using LDI-TOF MS and principle component analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105*, 275, DOI: 10.1002/ejlt.200390056.
- [34] J. Cvačka, A. Svatoš. Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2,5-dihydroxybenzoate matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2203, DOI: 10.1002/rcm.1178.
- [35] J. Cvačka, P. Jiroš, J. Šobotník, R. Hanus, A. Svatoš. Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser

- desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Chemical Ecology* **2006**, *32*, 409, DOI: 10.1007/s10886-005-9008-5.
- [36] K. Stransky, T. Jursik. Simple quantitative transesterification of lipids. 1. Introduction. *Fett/Lipid* **1996**, *98*, 65, DOI: 10.1002/lipi.19960980206.
- [37] D. J. Harvey. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of phospholipids. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 1333, DOI: 10.1002/jms.1190300918.
- [38] R. D. Plattner, G. F. Spencer. Chemical ionization mass spectrometry of wax esters. *Lipids* **1983**, *18*, 68.

Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry

Eva Háková · Vladimír Vrkoslav · Radka Míková ·
Karolina Schwarzová-Pecková · Zuzana Bosáková ·
Josef Cvačka

Received: 12 December 2014 / Revised: 28 January 2015 / Accepted: 5 February 2015 / Published online: 21 February 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract A method for localizing double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was developed. The technique was based on collision-induced dissociation or pulsed Q collision-induced dissociation of the $C_3H_5N^{+}$ adducts ($[M + 55]^{+}$) formed in the presence of acetonitrile in the APCI source. The spectra were investigated using a large series of standards obtained from commercial sources and prepared by randomization. The fragmentation spectra made it possible to determine (i) the total number of carbons and double bonds in the molecule, (ii) the number of carbons and double bonds in acyls, (iii) the acyl in the *sn*-2 position on the glycerol backbone, and (iv) the double-bond positions in acyls. The double-bond positions were determined based on two types of fragments (alpha and omega ions) formed by cleavages of C–C bonds vinylic to the original double bond. The composition of the acyls and their positions on glycerol were established from

the masses and intensities of the ions formed by the elimination of fatty acids from the $[M + 55]^{+}$ precursor. The method was applied for the analysis of triacylglycerols in olive oil and vernix caseosa.

Keywords Double bond · Gas-phase chemistry · Lipidomics · Olive oil · Vernix caseosa

Introduction

Triacylglycerols (TGs) are the main storage lipids in animal and plant tissues and consequently they are the major fat in the human diet [1]. The TG molecules contain a glycerol backbone, to which three fatty acids are esterified; the variety of fatty acids distributed among the *sn*-1, *sn*-2, and *sn*-3 positions of glycerol often makes TG mixtures very rich. The structure of TGs affects their physico-chemical properties and metabolic fates. Therefore, analytical tools which make it possible to elucidate their molecular structures are of great importance for various branches of life science and industry.

A complete structural characterization of TGs in their mixtures is not an easy task. The molecular species of TGs typically need to be separated from each other before elucidating their structures. Chromatographic separations are mostly carried out in various systems based on (U)HPLC in reversed-phase [2–5], silver-ion [4, 6, 7], and chiral [8] modes. Because of entirely different separation mechanisms, they can be combined in 2D systems [9, 10]. Retention parameters are useful for TG characterization, especially when standards are available for comparison [11]. However, the structures of TGs are usually deduced from their mass spectra. Various methods are

Published in the topical collection *Lipidomics* with guest editor Michal Holčápek.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-015-8537-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Háková · R. Míková · K. Schwarzová-Pecková · Z. Bosáková
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles
University in Prague, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague
2, Czech Republic

E. Háková · V. Vrkoslav · R. Míková · J. Cvačka (✉)
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry v.v.i., Academy of
Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague
6, Czech Republic
e-mail: Cvacka@uochb.cas.cz

used for ionizing TGs, including electrospray ionization (ESI) [5, 12–14], atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [2–4, 6, 7, 15], atmospheric pressure photoionization (APPI) [16], matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) [17–19], desorption electrospray ionization (DESI) or desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI) [20], fast atom bombardment (FAB) [21], electron ionization (EI) [22], chemical ionization (CI), and field desorption (FD) [23]. Ionization methods permitting on-line coupling with liquid chromatography are more convenient and often indispensable for complex TG mixtures. The first-stage mass spectra usually provide information on molecular weight, i.e., the total number of carbons and double bonds in TG molecules. Depending on the ionization used, the spectra may already contain fragments useful for the structure elucidation, for instance ions formed by a neutral loss of fatty acids. In other cases, collision-induced dissociation (CID) of the molecular adducts or ions is used for the structure elucidation.

To date, several mass spectrometry-based strategies have been demonstrated for the localization of double bonds in TGs [12, 18, 21, 24–30]. In principle, a double bond can be localized either by direct fragmentation of unsaturated chains utilizing charge-remote fragmentation (CRF) channels, or by charge- or radical-driven fragmentations of specific products formed by reactions at the site of a double bond. The CRF of TGs can be achieved using high-energy CID on double-focusing or four-sector mass spectrometers and tandem time-of-flight instruments [18, 21]. Molecular adducts with ammonium ions or sodium ions generated by ESI, FAB, or MALDI and activated at several keV provide a series of CRF ions by the elimination of C_nH_{2n+1} and C_nH_{2n+2} from the precursor ions. The double bond in the chain becomes evident from the irregularities of the CRF-ion intensities. The CRF can also be achieved using low-energy CID in triple quads and ion traps utilizing lithium adducts of TGs [12, 27]. In the fundamentally different approaches, TGs are chemically derivatized on the double bond to create products that provide fragments indicating the original position of the double bond. Such reactions are preferably performed in the gas phase. A reaction with ozone introduced into an electrospray ion source (OzESI-MS) has been used for an on-line analysis of unsaturated TGs [24]. Ozone-induced fragments bearing an aldehyde and an α -methoxyhydroperoxide group enabled the localization of a double bond. The method was later modified and the reaction was carried out in an ion-trap analyzer with mass-selected precursors (OzID) [26], which was also effective for the identification of double-bond positions in polyunsaturated TGs [28]. Radical-driven fragmentations promote intrachain cleavages, which can also be used for localizing double bonds in TGs. This approach has recently been demonstrated using bifunctional reagents containing a lipid-adducting group and a photocaged radical initiator such as 4-iodoaniline [30]. The reagent is noncovalently attached to a TG molecule; the

adduct is isolated in an ion trap and irradiated by a UV laser. The nascent radical unmasked by photodissociation presumably adds to the double bond of TG. Subsequent CID of the product gives rise to radical-directed dissociation of the unsaturated acyl chains.

The double bonds in lipids can also be localized using gas-phase chemistry of acetonitrile. These approaches are potentially advantageous and convenient for TGs, because acetonitrile is commonly used in mobile phases for HPLC separations and the reactions can be performed directly in the APCI sources. Common mass spectrometers without any modification can be used for this purpose. The acetonitrile gas-phase reactions were initially utilized for the localization of double bonds in CI mass spectrometry [31–43]. The lipids reacted with (1-methylenimino)-1-ethenylum ($C_3H_4N^+$) generated by an ion-molecule reaction between $C_2H_2N^+$ and neutral acetonitrile [32, 44]. The $[M + C_3H_4N]^+$ covalent adduct formed by a [2+2]cycloaddition reaction provided fragments indicative for the position of a double bond [35]. The method was mostly applied for fatty acid methyl esters (FAMEs), including methylene-interrupted and non-methylene-interrupted polyunsaturated FAMEs [35–43]. This approach has also been adapted for APCI and applied for monoene- and diene-containing TGs [25]. Similarly to CI, the $C_3H_4N^+$ ions reacted with unsaturated TGs, yielding $[M + 54]^+$ covalent adducts. The CID of $[M + 54]^+$ in a triple-quadrupole linear ion trap provided ions corresponding to cleavage either vinylic or allylic to the site of the double bond. Other acetonitrile-related adducts, namely $[M + 40]^+$, $[M + 81]^+$, and $[M + 95]^+$, were formed as well, and these ions were also useful for the localization of double bonds. We have previously demonstrated the use of APCI and acetonitrile gas-phase chemistry for the localization of double bonds in various unsaturated neutral lipids [29, 45, 46]. For the investigated lipids, we have observed the formation of radical cations $[M + 55]^{+•}$ ($[M + C_3H_5N]^{+•}$) rather than $[M + 54]^+$ ($[M + C_3H_4N]^+$), described for TGs [25]. When fragmented by CID, the $[M + 55]^{+•}$ provided useful diagnostic fragments for the localization of double bonds [29, 45, 46]. Moreover, the ion-source conditions were fully compatible with the high flow rates of solvents typically used for HPLC/APCI-MS.

Here, we discuss the advantages and limitations of the localization of double bonds in TGs using ion-trap CID and pulsed Q collision-induced dissociation (PQD) of $[M + 55]^{+•}$ formed in the presence of acetonitrile. The CID and PQD fragmentation spectra were measured for a large series of TG standards differing by the number, position, and geometry of double bonds to investigate the usefulness of this approach. The spectra obtained in this way were compiled into an annotated library with 125 entries. The existing methods for the analysis of TGs based on HPLC/APCI-MS have been modified by adding a fragmentation step to obtain additional information on the double-bond position. The practicability of

these methods was demonstrated for olive oil and unsaturated TGs from vernix caseosa.

Material and methods

Chemicals and reagents

MS grade acetonitrile and propan-2-ol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as received. The other solvents (chloroform, hexane, diethyl ether; all from Penta, Czech Republic) were distilled in glass from analytical-grade solvents. Sodium methoxide and Rhodamine 6G were from Sigma Aldrich; 4',5'-dichlorofluorescein was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). The TG standards (purity: 99 %) were obtained from Nu-Chek-Prep (Elysian, MN, USA) and their standard solutions were prepared in chloroform (20 µg/mL).

Synthesis of TGs by randomization

The randomization (interesterification) procedure [7] was downscaled as follows: two standards of TGs (5 mg of each) and sodium methoxide (5 mg) were weighed into a dry glass ampoule. Hexane (200 µL) dried over molecular sieves (4 Å, pellets 3.2 mm, Sigma Aldrich, USA) was added, the ampoule was sealed and heated in a water bath at 80 °C for 30 min. Randomized TGs were isolated by semi-preparative thin-layer chromatography (TLC) on glass plates (36 mm × 76 mm) coated with 0.2 mm of Adsorbosil-Plus (Applied Science Labs; with gypsum (12 %)) using hexane/diethyl ether (80:20, v/v) mobile phase. TLC zones were made visible by spraying Rhodamine 6G solution (0.05 % in ethanol). A zone corresponding to TGs ($R_f=0.45-0.55$) was scraped off the plate and extracted with freshly distilled diethyl ether. The solvent was evaporated to dryness under nitrogen stream. The randomized TGs were reconstituted in chloroform (300–500 µg/mL).

Samples of natural TGs

Olive oil (extra virgin, Frantoio Larocca, Italy) was dissolved in acetonitrile/propan-2-ol/hexane (1:1:1, v/v/v) at a concentration of 10 mg/mL and used without any further purification. Vernix caseosa was obtained from a healthy female subject delivered at full term. The sample was collected with a written informed parental consent and the work was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital, Prague (910/09S-IV). Vernix caseosa (1 g) was suspended in 50 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v) with 0.05 % of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol. The suspension was filtered, treated with anhydrous MgSO₄ to eliminate water, and filtered again. The solvents were removed by a rotary evaporator and the total lipid extract (20 mg) was separated on 90 mm ×

120 mm glass TLC plates coated with a 0.2 mm layer of silica gel 60 G (Merck, Darmstadt, Germany) using hexane:diethyl ether (93:7, v/v) as a mobile phase. The plate was developed twice to focus the zones (in the first step to 3/4 of the plate height and then, after air-drying, to the top). The zone corresponding to TGs ($R_f=0.19-0.27$; identical with R_f of triolein) was scraped off into a column with purified cotton-wool. Lipids were eluted with diethyl ether and the solvent was evaporated under a stream of argon. Vernix caseosa TGs were further separated using argentation TLC to obtain a fraction of unsaturated TGs. Argentation TLC was performed on glass plates (36 mm × 76 mm) coated with a 0.2 mm layer of silica gel with 10 % of silver nitrate (Sigma) and 12 % of gypsum. The mobile phase consisted of chloroform:methanol (99:1, v/v). The zone of unsaturated TGs ($R_f=0.35-0.83$) visualized under UV light after the plates were sprayed with 4',5'-dichlorofluorescein (0.1 % in methanol) was scraped off the plates and extracted with chloroform. The solvent was evaporated and TGs were reconstituted in chloroform at a concentration of 3.0 mg/mL.

APCI-MS and HPLC/APCI-MS

The experiments were performed using a system consisting of a Rheos Allegro UHPLC pump, an Accela autosampler with an integrated column oven and a LCQ Fleet ion-trap mass spectrometer equipped with an APCI source; the system was controlled by Xcalibur software (all provided by Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). For direct infusion experiments, TGs dissolved in chloroform (20 µg/mL for commercial standards; 300–500 µg/mL for randomized TGs) were delivered by a syringe pump (a flow rate of 20 µL/min) to a low-dead-volume T-piece, where they were mixed with the mobile phase (acetonitrile, 0.5 mL/min). The APCI vaporizer and heated capillary temperatures were set to 250 and 180 °C, respectively. Nitrogen served both as the sheath and auxiliary gas at a flow rate of 60 and 45 arbitrary units, respectively. The MS spectra of the positively charged ions were recorded from 250 to 1050 *m/z*. The precursors were selected with an isolation width of 0.4–2.4 Da and fragmented using CID or PQD; the mass spectra were averaged from 2–10-min records. The TG mixtures were separated using Nova-Pak C18 columns (300+150 mm × 3.9 mm, particle size: 4 µm; Waters, Milford, MA, USA) with a C18 pre-column (4 mm × 2 mm, Phenomenex, USA) at 30 °C. The gradient program for olive oil: 0 min: 100 % acetonitrile; 106 min: 31 % acetonitrile/69 % propan-2-ol; 109 min: 100 % acetonitrile [47]; the mobile-phase flow rate was 0.8 mL/min and the injected volume of the sample was 10 µL. The gradient program for vernix caseosa TGs: 0 min: 100 % acetonitrile, 0.8 mL/min; 99 min: 34 % acetonitrile/66 % propan-2-ol, 0.8 mL/min; 114.5 min: 24 % acetonitrile/76 % propan-2-ol, 0.55 mL/min; 142 min: 5 % acetonitrile/95 % propan-2-ol, 0.3 mL/min.

min; 165 min: 5 % acetonitrile/95 % propan-2-ol, 0.3 mL/min; the injected volume of the sample was 25 μ L. The flow rate of the mobile phase had to be lowered in the course of the analysis to avoid excessive column back pressure at high concentrations of propan-2-ol. The CID MS² spectra of $[M + 55]^{++}$ were collected using data-dependent analysis with an isolation width of 2 Da and a normalized collision energy of 33–34 %. The masses of the acetonitrile adducts for fragmentation were calculated as higher partners of the base peaks (m/z of $[M + H]^+ + 54$ Da).

The nomenclature and notation of fragment ions

The TGs in this work are abbreviated as “TG” followed by three fatty acyls expressed as the number of carbon atoms: the number of double bonds. The fatty acyls are separated either by an underscore character (when their positions are not known or when they are distributed randomly) or by a slash (when the positions are proven) [48]. The positions of the double bonds are given in the $n-x$ nomenclature. Unless stated otherwise, *cis* double-bond geometry and methylene-interrupted double bonds in polyunsaturated chains are assumed. Thus, for instance, “TG 18:1($n-9$)/16:0/16:0” indicates 1-oleoyl-2,3-dipalmitoyl-glycerol or 1-olein-2,3-dipalmitin. The fragments of $[M + 55]^{++}$ originated by the cleavages of the C–C bonds next to the double bond are labeled as “ α ” if they contain ester moieties, or “ ω ” if they carry the terminal-carbon end and do not include an ester group. If needed, “ α ” and “ ω ” fragments have been specified with a subscript indicating a double bond within a chain and/or by a superscript indicating the chain within a TG. For instance, $\alpha_{n-6}^{18:2}$ refers to an α fragment corresponding to an $n-6$ double bond on an 18:2 acyl in a TG. The ECN stands for the equivalent carbon number (ECN = CN - 2DB, where CN and DB are the total numbers of the carbon atoms and double bonds, respectively).

Results and discussion

The preparation of TGs with randomized acyls

The offer of commercially available TG standards is limited mostly to monoacid TGs having the same acyls in all three glycerol positions. In order to study the mass spectra of structurally diverse TGs occurring in nature, we prepared a set of standards using chemical interesterification, also called randomization [49]. This process causes fatty-acid redistribution within and among TG molecules according to the laws of probability. The randomization reactions were performed with two monoacid TGs (AAA, BBB) having up to six double bonds in acyls. This made it possible to obtain mixtures of TGs combining two fatty acyls. Besides the reactants (AAA,

BBB), two new signals appeared in the APCI spectra of the randomized samples: the first one for regioisomers with one “A” chain and two “B” chains (ABB, BBA, BAB) and the second representing regioisomers with two “A” chains and one “B” chain (BAA, AAB, ABA). The randomized TGs were used for MS² experiments directly, without their chromatographic separation. In compliance with the nomenclature used in this work, the randomized standards were abbreviated with underscore separators (i.e., TG A_B_B or TG B_A_A).

The formation of $[M + 55]^{++}$ ions

As already discussed in our previous work [29], direct infusion of unsaturated TGs into the APCI source in the presence of acetonitrile promoted the formation of acetonitrile-related adducts. For instance, 1,2-palmitin-3-olein (TG 16:0/16:0/18:1($n-9$)) provided a spectrum shown in Fig. 1a. The acetonitrile-related adducts were observed at m/z 871.6 ($[M + 39]^+$), m/z 874.0 ($[M + 41]^{++}$; likely with a contribution of $[M + 42]^+$, as the mass was slightly shifted), m/z 887.4 ($[M + 55]^{++}$), m/z 913.5 ($[M + 81]^+$) and m/z 927.4 ($[M + 95]^+$). The relative intensity of the acetonitrile-related adducts varied depending on the TG structure as well as the settings of the ion source. For instance, the $[M + 41]^{++}$ ion (not useful for the localization of double bonds in TGs) was highly abundant in the spectra of TGs with monounsaturated chains and low for polyunsaturated TGs. Lowering the acetonitrile flow rate significantly decreased the formation of this ion. Concerning the $[M + 55]^{++}$, monounsaturated TGs provided somewhat more abundant signals than the polyunsaturated species and the ion intensity was not significantly dependent on the acetonitrile flow rate. The intensities of $[M + 55]^{++}$ were rather low, typically 1–5 % with regard to $[M + H]^+$. Our attempts to increase the signal intensity by changing the ion-source parameters were successful only partially; higher $[M + 55]^{++}$ signals were achieved at lower vaporizer temperature with the optimum around 250 °C. Despite the relatively low abundance of $[M + 55]^{++}$, the quality of the MS/MS spectra was generally good.

The other peaks in the spectrum shown in Fig. 1a corresponded to a protonated molecule (m/z 833.4) and diacylglycerol fragments originated after the loss of oleic acid (m/z 551.4) and palmitic acid (m/z 577.4).

MS² of $[M + 55]^{++}$: TGs with monounsaturated chains

The MS² spectra of the $[M + 55]^{++}$ ions were investigated for a large series of TGs obtained from commercial sources or prepared by randomization reactions. The resonance excitation CID mass spectrum of 1,2-palmitin-3-olein is shown in Fig. 1b. The spectrum basepeak at m/z 774.4 was an α fragment formed by the cleavage of the C–C bond vinylic to the original double bond. A neutral loss of palmitic acid from the precursor yielded m/z 631.5 ($[M + 55-FA_{16:0}]^{++}$). Note that a

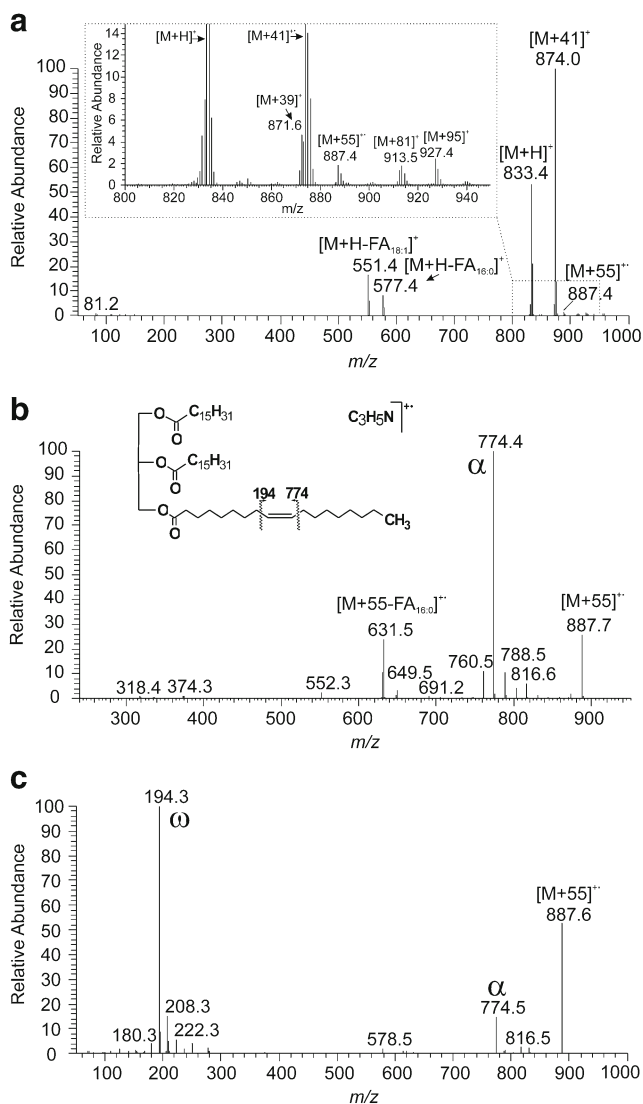


Fig. 1 The full-scan APCI mass spectrum (**a**), the APCI CID MS² spectrum of the [M + 55]⁺⁺ adduct (**b**) and the APCI PQD MS² spectrum of the [M + 55]⁺⁺ adduct (**c**) of TG 16:0/16:0/18:1(*n*-9) (1,2-palmitin-3-olein). The standard solution (20 μg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectra averaged from 0.5-, 2.0-, and 4.0-min records, respectively)

neutral loss of oleic acid was not observed, obviously because oleyl was covalently modified with C₃H₅N⁺⁺. The diagnostic fragment formed by a cleavage of the C–C bond on the opposite side of the original double bond (ω fragment) was not detected because of the low-mass cut-off of the ion trap. This problem can be circumvented with PQD, which activates ions at high *Q* values and collects fragments at low *Q* values, resulting in spectra similar to CID containing also low *m/z* fragments. PQD also helps to access higher-energy dissociation channels. The main drawback of PQD is less effective ion fragmentation relative to CID, which results in spectra of lower overall intensities. A PQD spectrum of 1,2-palmitin-3-olein

is shown in Fig. 1c; both diagnostic fragments were detected (α at *m/z* 774.5 and ω at *m/z* 194.3). The spectra also showed smaller peaks accompanying the α and ω fragments (14 Da difference; $\pm(\text{CH}_2)_n$) created by less probable cleavages of the more distant C–C bonds with regard to the double bond. Although PQD provided both diagnostic fragments and the CID only one, both types of activation afforded spectra allowing for an unambiguous assignment of the double bond to the *n*-9 position on the 18:1 chain. A regioisomer 1,3-dipalmitin-2-olein (TG 16:0/18:1(*n*-9)/16:0) provided very similar spectra, with slightly modified ion abundances (Spectrum S7). The spectra of other TGs with one monounsaturated acyl (see more examples in the [Electronic Supplementary Material \(ESM\)](#)) provided analogous spectra, facilitating straightforward localization of the double bond.

The MS² spectra of TGs with two or three identical mono-unsaturated chains were found to be analogous to the previously discussed ones. The covalent attachment of C₃H₅N⁺⁺ occurred randomly on one of the unsaturated chains and the remaining chains stayed unmodified. For instance, CID of 1, 3-olein-2-palmitin (TG 18:1(*n*-9)/16:0/18:1(*n*-9)), see Fig. 2a, provided mainly an α ion at *m/z* 800.5 and fragments consistent with the neutral loss of palmitic acid (*m/z* 657.2; [M + 55-FA_{16:0}]⁺⁺) and oleic acid (*m/z* 631.5; [M + 55-FA_{18:1}]⁺⁺). The CID of triolein (TG 18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)) provided an α fragment at *m/z* 826.5 and [M + 55-FA_{18:1}]⁺⁺ at *m/z* 657.6 (Fig. 2b). The PQD MS² spectrum of triolein (Fig. 2c) showed also an ω fragment at *m/z* 194.3 and relatively high abundant ions at *m/z* 318.4 and *m/z* 332.5. These fragments, which are not straightforward to rationalize, were also present as small peaks in the CID spectrum (Fig. 2b). We speculate that these fragments did not originate from a precursor with just one double bond modified with C₃H₅N⁺⁺ but rather from a cross-linked precursor, where C₃H₅N⁺⁺ bridges two double bonds on neighboring chains. The fragments might be rationalized by C–C bond cleavages at the positions which are vinylic to the site of the former double bonds on both chains (*m/z* 332.5) and cleavages yielding a product that is one methylene group shorter (*m/z* 318.4). Hence, the masses of these even electron products containing a nitrogen atom but no oxygen must depend on the positions of double bonds. This was indeed observed in the spectra of other monoacid TGs containing C18:1 acyls with different double-bond positions. The above-mentioned fragments were shifted by 56 Da (4 methylene units) towards lower *m/z* values in trivaccenin (TG 18:1(*n*-7)/18:1(*n*-7)/18:1(*n*-7)), see Spectrum S32, and by 84 Da (6 methylene units) towards higher *m/z* values in tripetroselinin (TG 18:1(*n*-12)/18:1(*n*-12)/18:1(*n*-12)), see Spectrum S28. No shifts of the fragment masses were observed in the spectrum of trielaidin (TG 18:1(*n*-9 *t*)/18:1(*n*-9 *t*)/18:1(*n*-9 *t*)), see Spectrum S31, which has double bonds at the same positions as triolein, but their geometry is *trans*. Unfortunately, we were not able to record MS³ spectra

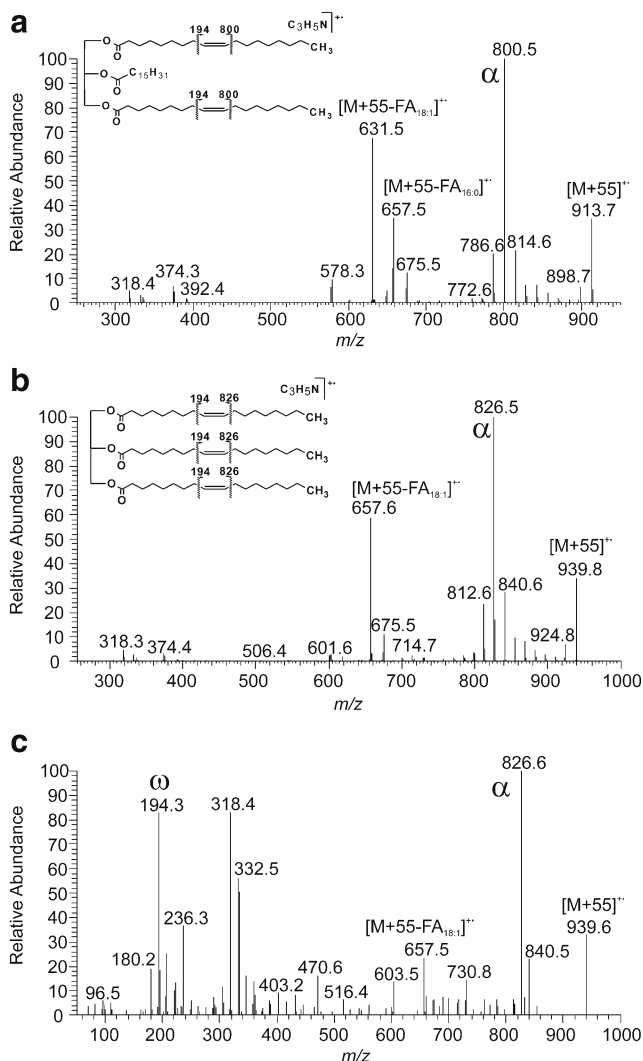


Fig. 2 The APCI CID MS² spectrum of the [M + 55]⁺⁺ adduct of TG 18:1(*n*-9)/16:0/18:1(*n*-9) (1,3-olein-2-palmitin) (a) and 18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9) (triolein) (b). The APCI P/QD MS² spectrum of the [M + 55]⁺⁺ adduct of TG 18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9) (triolein) (c). The standard solution (20 μg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectra averaged from a 2-min record)

and reliably measure the exact masses to confirm our hypothesis further.

The fragmentation spectra were noticeably different for TGs with the double bond located at the chain terminus (*n*-1 position). In the CID spectrum of triundecenoin (TG 11:1(*n*-1)/11:1(*n*-1)/11:1(*n*-1)) (Fig. 3a), the most abundant fragment at *m/z* 630.5 corresponded to the loss of methyl radical. The P/QD spectrum (Fig. 3b) showed *m/z* 96.2 as a basepeak, indicating C-C bond cleavage at a position that is allylic to the site of the former double bond. Analogous diagnostic fragments ([M + 55-CH₃]⁺⁺ and *m/z* 96) were also found in the randomized TGs with one or two 10*Z*-undecenoyls (Spectra S1, S11, S107, and S111).

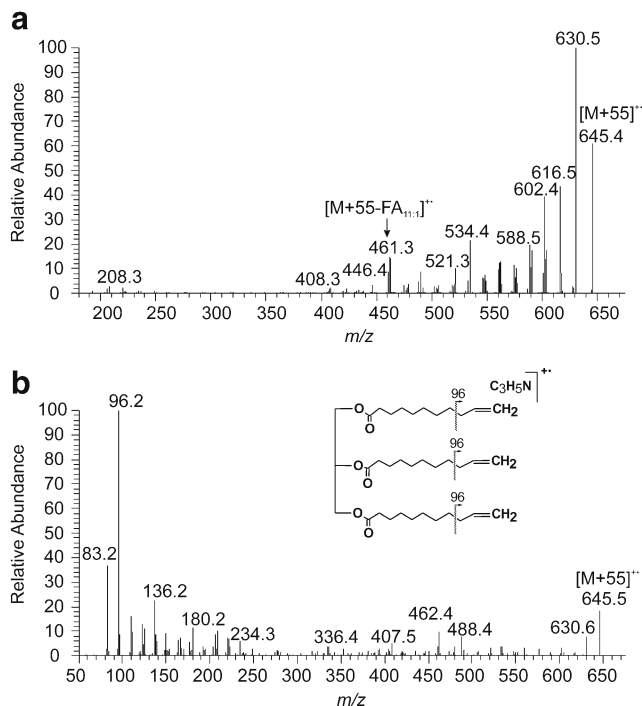


Fig. 3 The APCI CID (a) and P/QD (b) MS² spectra of the [M + 55]⁺⁺ adduct of TG 11:1(*n*-1)/11:1(*n*-1)/11:1(*n*-1) (triundecenoin). The standard solution (20 μg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectra averaged from 3- and 5-min records, respectively)

As regards the double-bond geometry, no significant differences between fragmentation spectra were observed. The ion abundances were similar for the *cis* and *trans* isomers, see Spectra S2/S3 and S4/S5.

In all TGs with one or more identical monounsaturated chains, the diagnostic fragments reliably and unambiguously indicated the position of double bond(s). However, TGs can consist of two or three monounsaturated chains with different positions of the double bond. For such TGs, the MS² spectra did not allow the assignment of the double-bond position to a particular chain. In principle, MS³ spectra can be used in these cases. In dioleinpalmitein (TG 18:1(*n*-9)_18:1(*n*-9)_16:1(*n*-7)), for instance, two α ions were recorded: α_{*n*-7} at *m/z* 826.4 and α_{*n*-9} at *m/z* 798.6 (Fig. 4a). We, of course, know that the palmitoleyl has an *n*-7 double bond and the oleyl an *n*-9 double bond, but one cannot say that from the spectrum. Supposedly, MS³ of the α ions should show a neutral loss of 18:1 acid (if we fragment an ion derivatized on the 16:1 chain) or a loss of both 16:1 and 18:1 acids (if we fragment an ion derivatized on the 18:1 chain). This is indeed true; the fragmentation of α_{*n*-9} gives [α_{*n*-9}-FA_{18:1}]⁺ (*m/z* 516.5) and [α_{*n*-9}-FA_{16:1}]⁺ (*m/z* 544.5) (Fig. 4b), whereas the fragmentation of α_{*n*-7} gives mostly [α_{*n*-7}-FA_{18:1}]⁺ (*m/z* 544.5) (Fig. 4c). Therefore, an *n*-7 double bond must be in a 16:1 chain, whereas an *n*-9 double bond in an 18:1 chain. However, this approach was found to be somewhat limited by low specificity. In the MS³ spectrum of α_{*n*-7}, we also detected a small but

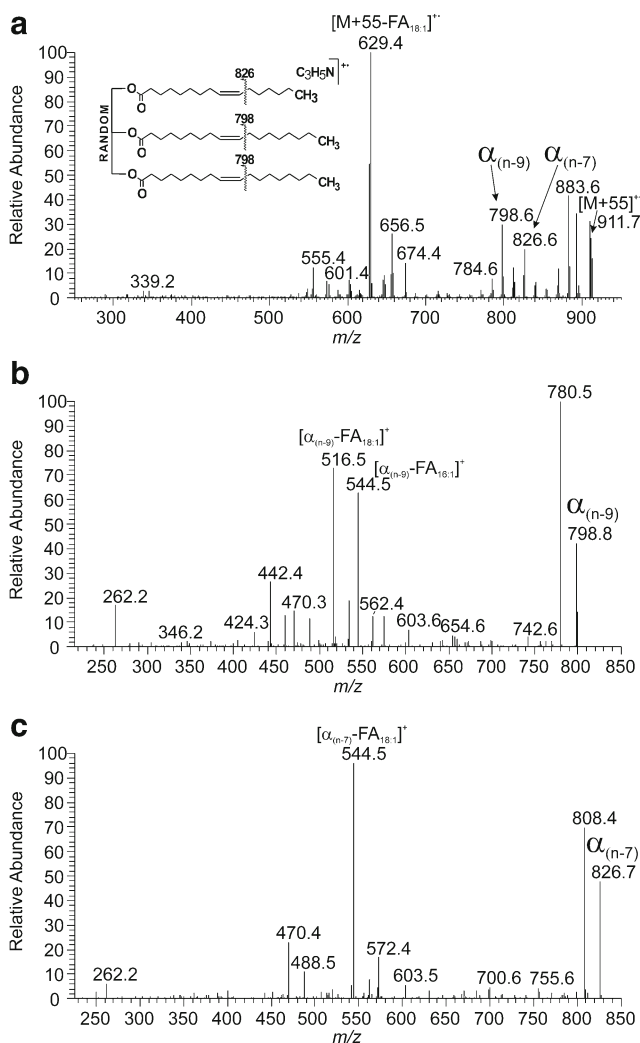


Fig. 4 The APCI CID MS² spectrum of the $[M + 55]^{++}$ adduct of TG 18:1(*n*-9)_{18:1}(*n*-9)_{16:1}(*n*-7) (**a**), the MS³ spectrum of α ions corresponding to the *n*-9 double bond (911.9 \rightarrow 798.6) (**b**) and the MS³ spectrum of α ions corresponding to the *n*-7 double bond (911.9 \rightarrow 826.5) (**c**). The standard solution (20 μ g/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μ L/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectra averaged from a 2-min record)

significant peak $[\alpha_{n-7}\text{-FA}_{16:1}]^+$ (m/z 572.4), which in theory should not be formed. The presence of this peak can be explained by (i) the co-isolation of an α -like ion derivatized on the 18:1 chain but cleaved in a propenyl C–C bond or (ii) the scrambling or migration of the $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^{++}$ modification. The MS³ spectra of $[M + 55\text{-FA}]^{++}$ also provided fragments indicating the double-bond positions (analogous to α fragments; the loss of hydrocarbon radical), but at unusably low intensities.

MS² of $[M + 55]^{++}$: TGs with di- and polyunsaturated chains

With the increasing number of double bonds in acyls, the fragmentation spectra of $[M + 55]^{++}$ become more complex. The covalent adduct formation took place on each double bond of

the chains, which increased the structural variability of the $[M + 55]^{++}$ precursors. Upon fragmentation, each double bond-site provided specific fragments (cleavages vinylic (or allylic) to the site of the double bond), together with unspecific fragments (cleavages on more distant C–C bonds from the site of the double bond). Consequently, the diagnostic ions became less pronounced and somewhat hidden among other fragments. We have noticed that the efficiency of adduct formation (or cleavage) depends on the double-bond position. Thus, for instance, the spectrum of distearin-linolein (TG 18:0_{18:0}_{18:2}(*n*-6)) showed a significantly more abundant α -ion corresponding to the *n*-6 double bond (α_{n-6} at m/z 866.5) when compared to the α -ion corresponding to the *n*-9 double bond (α_{n-9} at m/z 826.6) (Fig. 5a). It can be explained by the easier accessibility of the double bonds closer to the chain termini and/or by electronic effects. The same trend was also observed for other TGs with polyunsaturated chains, see for instance distearin- α -linolenin (TG 18:0_{18:0}_{18:3}(*n*-3)), Spectrum S21. For all three identical polyunsaturated acyl chains, the diagnostic fragments were easier to distinguish among other ions, like in the case of trilinolein (TG 18:2(*n*-6)/18:2(*n*-6)/18:2(*n*-6)), see Fig. 5b. Although the intensities of α and ω ions generally decreased with the distance of the double bond from the unsaturated chain terminus, some TGs showed enhanced intensities of α ions corresponding to the second (or third) double bond counting from the chain terminus (see for instance tri- α -linolenin, Spectrum S87). The most polyunsaturated TG investigated in this work was tridocosahexaenoin (TG 22:6(*n*-3)/22:6(*n*-3)/22:6(*n*-3)), Fig. 5c. Even in this compound, the α -ions corresponding to all double bonds were relatively easily recognizable. We can conclude that the localization of double bonds in TGs with one or more identical di- and polyunsaturated chains can be achieved. At least, the double bonds close to chain termini provided signals reliably indicating their positions.

The spectra of TGs with all the acyls unsaturated and/or polyunsaturated in various positions were challenging to interpret. The intensities of diagnostic ions indicating double bonds closer to glycerol in polyunsaturated chains were significantly suppressed. The spectra usually clearly showed only diagnostic ions corresponding to a double bond in the monounsaturated chain(s) and the outermost double bond in polyunsaturated chain(s). For instance, in the CID spectrum of dipetroselinin-linolelaidin (TG 18:1(*n*-12)_{18:1}(*n*-12)_{18:2}(*n*-6 t)), Fig. 6a, the double bond on the monounsaturated petroselinyl chain provided easily distinguishable $\alpha_{n-12}^{18:1}$ at m/z 782.6, similarly to the *n*-6 double bond in the diunsaturated linolelaidinyl chain ($\alpha_{n-6}^{18:2}$ at m/z 866.7). The $\alpha_{n-9}^{18:2}$ ion reflecting the *n*-9 double bond in the linolelaidinyl chain was detected at m/z 826.6, but its intensity did not exceed the surrounding ions. The polyunsaturated chains frequently contain double bonds on the same positions counting from the chain termini (“*n*-3” or “*n*-6” fatty chains). In these cases, the diagnostic fragments had the same mass and their intensities were enhanced. For

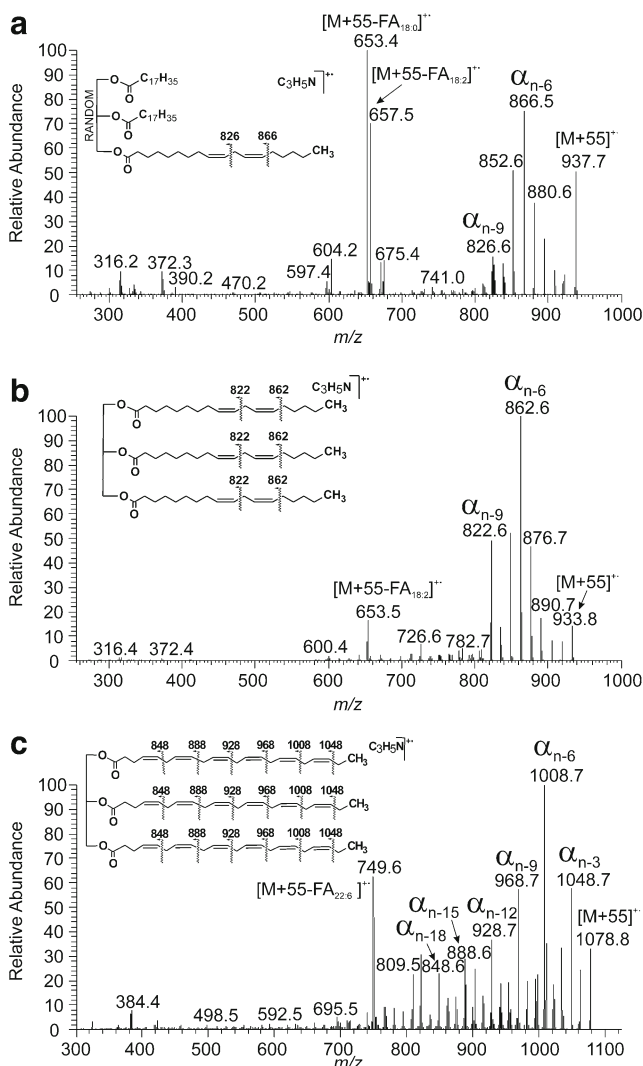


Fig. 5 The APCI CID MS² spectra of the [M + 55]⁺ adduct of distearin-linolein (TG 18:0_18:0_18:2(*n*-6)) (a), trilinolein (TG 18:2(*n*-6)/18:2(*n*-6)/18:2(*n*-6)) (b) and tridocosahexaenoin (TG 22:6(*n*-3)/22:6(*n*-3)/22:6(*n*-3)) (c). The standard solution (20 μg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectra averaged from 4-, 2-, and 2-min records, respectively)

instance, the α fragments in di-α-linolenin-docosahexaenoin (TG 18:3(*n*-3)_18:3(*n*-3)_22:6(*n*-3)) were for all chains at the same *m/z* values (α_{*n*-3}^{22:6} and α_{*n*-3}^{18:3} at *m/z* 948.7; α_{*n*-6}^{22:6} and α_{*n*-6}^{18:3} at *m/z* 908.7; α_{*n*-9}^{22:6} and α_{*n*-9}^{18:3} at *m/z* 868.7), see Fig. 6b. The remaining (inner) double bonds on docosahexaenoyls provided small α fragments almost indistinguishable from the background.

Fragment intensity ratio in regioisomers

The intensities of the diacylglycerol fragments in the APCI mass spectra of TGs ([M + H-RCOOH]⁺) are known to indicate acyl positions on the glycerol [50]. The elimination of

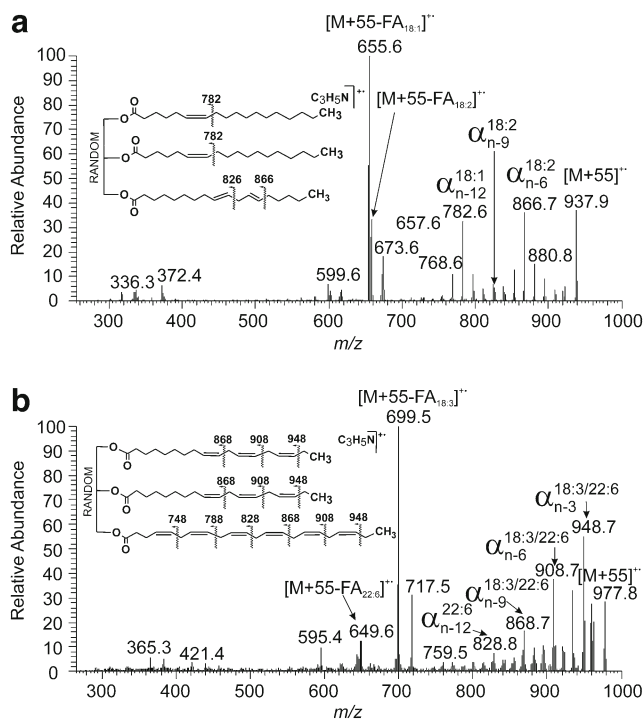


Fig. 6 The APCI CID MS² spectra of the [M + 55]⁺ adduct of dipetroselinin-linolelaidin (TG 18:1(*n*-12)_18:1(*n*-12)_18:2(*n*-6 t)) (a) and di-α-linolenin-docosahexaenoin (TG 18:3(*n*-3)_18:3(*n*-3)_22:6(*n*-3)) (b). The standard solution (20 μg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 μL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectrum averaged from a 5-min record)

fatty acids from the *sn*-1 and *sn*-3 positions is more likely and equally favored, whereas the fatty acid in the *sn*-2 position is less probable to cleave (the corresponding fragment is the least intense). Therefore, one can distinguish the acyl in the *sn*-2 position from those attached to the *sn*-1/*sn*-3 positions by comparing the fragment intensities. It is important to note that the fragment intensities are also affected by the chain-length and the degree of unsaturation of the cleaving fatty acid, which can lead to an incorrect assignment of the chain positions in some cases [51, 52]. Our results have indicated that the elimination of fatty acid in *sn*-2 position is less probable also in the case of the CID of [M + 55]⁺. Hence, the intensities of the [M + 55-FA]⁺ fragments could be useful for the acyl-position assignment like the intensities of the [M + H-FA]⁺ ions in the APCI full-scan mass spectra. However, the intensities of [M + 55-FA]⁺ cannot be used exactly in the same way as the intensities of [M + H-FA]⁺, because the acyl with the double bond modification is not cleaved. To test the hypothesis, the MS² spectra of [M + 55]⁺ were repeatedly measured for TG regioisomers and the ratios of the fragments were calculated (Table 1). Figure 7 shows zoomed spectral regions with fragments of 1-arachidin-2-olein-3-palmitin (TG 20:0/18:1(*n*-9)/16:0; AOP) and 1-palmitin-2-arachidin-3-olein (TG 16:0/20:0/18:1(*n*-9); PAO) regioisomers. The oleyl chain

Table 1 The ratio of the $[M + 55\text{-FA}]^{++}$ -fragment intensities in the CID MS² spectra of isomeric TGs

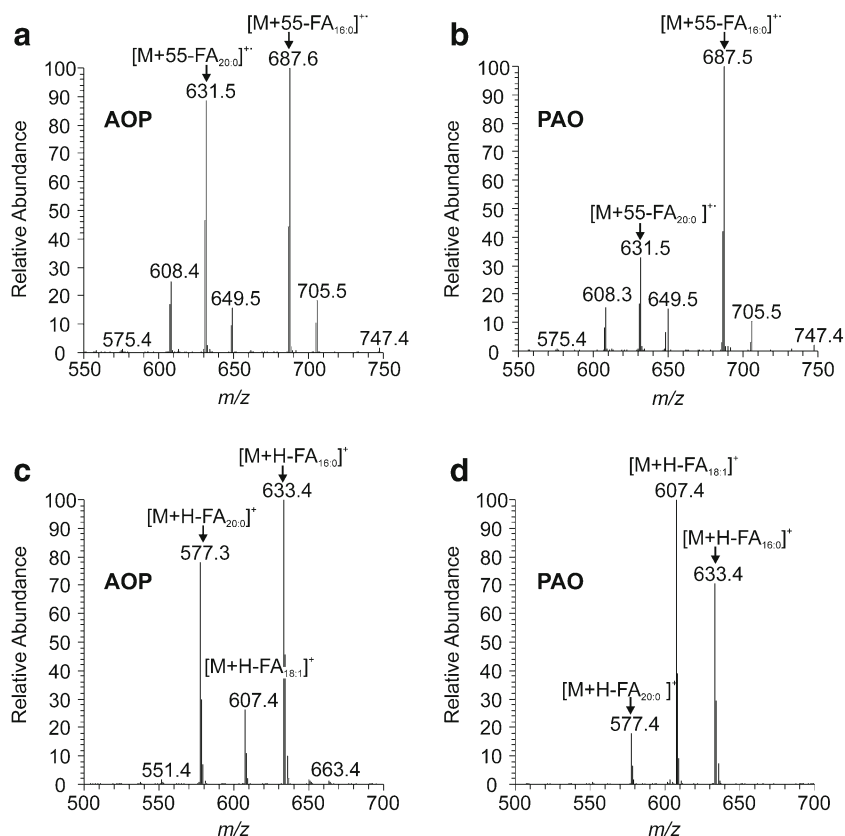
TG	Fragment no. 1	Fragment no. 2	Fragment intensity ratio Fig. 1/Fig. 2 ^a
TG 18:1(<i>n</i> -9)/16:0/18:1(<i>n</i> -9)	$[M + 55\text{-FA}_{18:1}]^{++}$	$[M + 55\text{-FA}_{16:0}]^{++}$	1.7±0.1
TG 18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9)/16:0			0.4±0.0
TG 20:0/18:1(<i>n</i> -9)/16:0	$[M + 55\text{-FA}_{20:0}]^{++}$	$[M + 55\text{-FA}_{16:0}]^{++}$	0.8±0.0
TG 16:0/20:0/18:1(<i>n</i> -9)			0.3±0.0
TG 18:1(<i>n</i> -9)/18:2(<i>n</i> -6)/18:1(<i>n</i> -9)	$[M + 55\text{-FA}_{18:2}]^{++}$	$[M + 55\text{-FA}_{18:1}]^{++}$	0.2±0.0
TG 18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9)/18:2(<i>n</i> -6)			0.4±0.0

^a The values have been averaged from five measurements (2-min records)

was modified with $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^{++}$. Therefore, only the two saturated acyls were cleaved off as neutral fatty acids (or ketenes as minor peaks). In the case of the regioisomer with both saturated chains in the outer positions (AOP), the intensity of $[M + 55\text{-FA}_{20:0}]^{++}$ and $[M + 55\text{-FA}_{16:0}]^{++}$ was roughly the same (Fig. 7a), whereas the isomer with arachidyl in the middle (PAO) eliminated arachidic acid less efficiently (Fig. 7b). In the full-scan APCI spectra of these regioisomers, the fragment intensities reflected the acyl positions as expected; the fragments corresponding to the acyl in the *sn*-2 position provided the peaks of the lowest intensities (Fig. 7c, d). Interestingly, the peak intensity ratio $[M + 55\text{-FA}_{20:0}]^{++}/[M + 55\text{-FA}_{16:0}]^{++}$ (Table 1) was exactly the same as the $[M + \text{H-FA}_{20:0}]^+/[M + \text{H-FA}_{16:0}]^+$ ratio calculated from the full-scan APCI spectrum

(the intensity ratio $[M + \text{H-FA}_{20:0}]^+/[M + \text{H-FA}_{16:0}]^+$ was 0.8 for AOP and 0.3 for PAO). In a regioisomeric pair 1,3-diolein-2-palmitin (TG 18:1(*n*-9)/16:0/18:1(*n*-9); OPO) and 1,2-diolein-3-palmitin (TG 18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)/16:0; OOP), Spectra S17 and S18, one of two oleyls was modified with $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^{++}$, likely with similar probability. Again, the neutral loss from the *sn*-2 position was less efficient as the ratio $[M + 55\text{-FA}_{18:1}]^{++}/[M + 55\text{-FA}_{16:0}]^{++}$ was significantly higher for OPO with both oleyls in the outer positions on glycerol (Table 1). Not surprisingly, the corresponding fragment intensity ratio was also significantly higher for OPO in the full-scan APCI spectra (the intensity ratio $[M + \text{H-FA}_{18:1}]^+/[M + \text{H-FA}_{16:0}]^+$ was 7.7 for OPO and 1.7 for OOP). The position of acyls on the glycerol backbone was also possible to follow in

Fig. 7 The zoomed regions of the APCI CID MS² spectra of the $[M + 55]^{++}$ adduct of 1-arachidin-2-olein-3-palmitin (TG 20:0/18:1(*n*-9)/16:0) (a) and 1-palmitin-2-arachidin-3-olein (TG 16:0/20:0/18:1(*n*-9)) (b). The zoomed regions of the APCI full-scan spectra of 1-arachidin-2-olein-3-palmitin (TG 20:0/18:1(*n*-9)/16:0) (c) and 1-palmitin-2-arachidin-3-olein (TG 16:0/20:0/18:1(*n*-9)) (d). The standard solution (20 µg/mL in chloroform) delivered by a syringe pump (20 µL/min) was mixed in a T-piece with acetonitrile (0.5 mL/min) and infused into the ion source (the spectrum averaged from a 2-min record)



the CID spectra of polyunsaturated TGs like in 1,2-olein-3-linolein (TG 18:1(*n*-9)/18:1(*n*-9)/18:2(*n*-6); OOL) and 1,3-olein-2-linolein (TG 18:1(*n*-9)/18:2(*n*-6)/18:1(*n*-9); OLO) (Spectra S42 and S43). However, as the probability of the C₃H₅N⁺⁺ adduct formation might be different for individual double bonds in various (poly)unsaturated chains, the fragment-ion ratios should be interpreted with caution. In this particular example, the neutral loss of linoleic acid was more efficient in the case of OOL (Table 1), which is again in agreement with the less efficient neutral loss from the *sn*-2 position.

Applications

The applicability of HPLC/APCI-MS² with [M + 55]⁺⁺ fragmentation in the ion trap for the comprehensive structural characterization of TGs in mixtures was assessed using olive oil and unsaturated TGs isolated from vernix caseosa. The TG molecular species were resolved using a proven method based on Nova-Pak C18 columns and an acetonitrile/propan-2-ol gradient [47, 19, 53]. There was no need to modify the separation conditions as acetonitrile in the mobile phase afforded the formation of the [M + 55]⁺⁺ adducts. The full-scan spectra provided molecular adducts and fragments useful for deducing the total number of carbons and double bonds in TG acyls [54]. The same information was possible to extract also from

the CID spectra of [M + 55]⁺⁺. The masses of the precursors determined the total number of carbons and double bonds. The fatty-acid neutral loss ions ([M + 55-FA]⁺⁺) were used for the determination of the number of carbon atoms and double bonds in acyls and the relative proportions of these ions reflected the positions of acyl on the glycerol backbone, like in case of [M + H-FA]⁺ in the full-scan spectra. Moreover, the CID MS/MS spectra provided information on the double-bond positions.

Table 2 shows the results on the olive oil sample obtained by the interpretation of the CID spectra of [M + 55]⁺⁺ only; the full-scan data were not used. For comparison purposes, the data were also interpreted in a classical way using the full-scan APCI spectra; the results summarized in the ESM (Table S1; Fig. S1) were in excellent agreement with a previously published report [47]. The interpretation of the CID spectra of [M + 55]⁺⁺ allowed us to gain information on double-bond positions in 20 TGs. Those were the most abundant TGs in the sample (93 % of the sample based on the peak areas); the spectra were interpretable even for TGs with the relative peak areas as low as 0.1 % in some cases. In the interpretation procedure, we focused on α ions labeled relative to the precursor ([M + 55]⁺⁺) mass. The α ions thus appeared at -29 Da, -43 Da, -57 Da, -71 Da, -85 Da, -99 Da, -113 Da etc., and indicated double bonds in the positions

Table 2 The unsaturated TGs identified in olive oil using CID of [M + 55]⁺⁺

R _t [min]	[M + 55] ⁺⁺	Fatty acid (neutral loss)	Double-bond position	TG ^a	ECN
65.0	933.5	18:2	<i>n</i> -6, <i>n</i> -9	18:2(<i>n</i> -6,9)/18:2(<i>n</i> -6,9)/18:2(<i>n</i> -6,9) ^b	42
65.8	933.5		<i>n</i> -9, <i>n</i> -6, <i>n</i> -3	18:1(<i>n</i> -9)_18:3(<i>n</i> -3,6,9)_18:2(<i>n</i> -6,9) ^c	42
71.2	935.8	18:1, 18:2	<i>n</i> -9, <i>n</i> -6	18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9)_18:2(<i>n</i> -6,9) ^b	44
71.7	909.8	16:1, 18:1, 18:2	<i>n</i> -9, <i>n</i> -7, <i>n</i> -6	16:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9)	44
71.9	935.6	18:1, 18:3	<i>n</i> -9, <i>n</i> -3	18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)_18:3(<i>n</i> -3,6,9)	44
72.6	909.5	16:0, 18:2	<i>n</i> -9, <i>n</i> -6	16:0_18:2(<i>n</i> -6,9)_18:2(<i>n</i> -6,9) ^b	44
73.4	909.6	16:0, 18:1, 18:3	<i>n</i> -9, <i>n</i> -3	16:0_18:1(<i>n</i> -9)_18:3(<i>n</i> -3,6,9)	44
77.0	937.7	18:1, 18:2	<i>n</i> -9, <i>n</i> -6	18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9)	46
77.6	911.6	16:1, 18:1	<i>n</i> -9, <i>n</i> -7	16:1(<i>n</i> -7)_18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)	46
78.5	911.6	16:0, 18:1, 18:2	<i>n</i> -9, <i>n</i> -7	16:0_18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9)	46
80.3	925.8	17:1, 18:1	<i>n</i> -9, <i>n</i> -8	17:1(<i>n</i> -8)_18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)	47
81.8	899.9	17:1	<i>n</i> -9, <i>n</i> -8	16:0_17:1(<i>n</i> -8)_18:1(<i>n</i> -9)	47
82.7	939.6	18:1	<i>n</i> -9	18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9) ^b	48
83.9	939.9		<i>n</i> -9, <i>n</i> -6	18:0_18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9) ^c	48
84.3	913.5	16:0, 18:1	<i>n</i> -9	16:0_18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9) ^b	48
87.9	967.7	18:1, 20:1	<i>n</i> -9	18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)_20:1(<i>n</i> -9) ^b	50
89.1	967.7	18:1, 20:0	<i>n</i> -9	18:1(<i>n</i> -9)_18:2(<i>n</i> -6,9)_20:0	50
89.7	941.7		<i>n</i> -9	18:0_18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9) ^c	50
94.6	969.7	18:1, 20:0	<i>n</i> -9	18:1(<i>n</i> -9)_18:1(<i>n</i> -9)_20:0 ^b	52

^a The most likely structures of TGs identified from the spectra

^b Unambiguously identified

^c The missing information on acyl composition has been taken from the full-scan spectrum

double bonds in acyls (masses of the $[M + 55\text{-FA}]^{+}$ fragments), (iii) the acyl in the *sn*-2 position on the glycerol backbone (the intensity ratios of the $[M + 55\text{-FA}]^{+}$ fragments), and (iv) the double-bond positions in acyls (the masses of the α and ω ions). The $[M + 55]^{+}$ ions were generated under the common conditions used for the separation of TGs on classical HPLC columns, i.e., in the mobile phases containing acetonitrile and submilliliter per minute flow rates. Therefore, it is not difficult to adapt the existing HPLC/APCI-MS methods for the localization of double bonds. The fragmentation of $[M + 55]^{+}$ was achieved in the ion trap using either CID or PQD. Although PQD afforded for each double bond two diagnostic ions and CID only one, the CID was preferred because of its higher sensitivity. Although the fragmentation spectra of $[M + 55]^{+}$ usually provide all information for characterizing TG structures, such spectra are better to be used for double-bond localization only; all the other information is more easily accessible from the full-scan spectra. The MS^2 spectra of $[M + 55]^{+}$ generally contained diagnostic peaks for all (or most) of the double bonds in the molecule. Yet in the case of unknowns, the interpretation was not always straightforward. The MS^2 spectra contained cumulative information on all double bonds in all three acyls, which complicated or even hindered a correct assignment of particular signals. This limitation would likely have been solved by the use of MS^3 , but the sensitivity was an issue. Despite the limitations discussed above, the method is an easy way of determining double bonds in TGs, which has been demonstrated with a large set of standards and also for natural samples.

Acknowledgments This work was financially supported by the Czech Science Foundation (Project No. P206/12/0750), the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO 61388963) and Charles University in Prague (Project SVV). The authors thank Dr. Miroslav Lisa for advices with the randomization synthesis.

References

- Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (2007) The lipid handbook 3 edn. CRC, Boca Raton
- Holčapek M, Jandera P, Fischer J, Prokeš B (1999) Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *J Chromatogr A* 858(1):13–31
- Fauconnot L, Hau J, Aeschlimann JM, Fay LB, Dionisi F (2004) Quantitative analysis of triacylglycerol regioisomers in fats and oils using reversed-phase high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18(2):218–224. doi:10.1002/rcm.1317
- Cvačka J, Hovorka O, Jiroš P, Kindl J, Stránský K, Valterová I (2006) Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods. *J Chromatogr A* 1101(1–2):226–237. doi:10.1016/j.chroma.2005.10.001
- Sandra K, Pereira AD, Vanhoenacker G, David F, Sandra P (2010) Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217(25):4087–4099. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.039
- Laakso P, Voutilainen P (1996) Analysis of triacylglycerols by silver-ion high-performance liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* 31(12):1311–1322. doi:10.1007/bf02587918
- Lisa M, Velínská H, Holčapek M (2009) Regioisomeric characterization of triacylglycerols using silver-ion HPLC/MS and randomization synthesis of standards. *Anal Chem* 81(10):3903–3910. doi:10.1021/ac900150j
- Lisa M, Holčapek M (2013) Characterization of triacylglycerol enantiomers using chiral HPLC/APCI-MS and synthesis of enantiomeric triacylglycerols. *Anal Chem* 85(3):1852–1859. doi:10.1021/ac303237a
- Dugo P, Kumm T, Crupi ML, Cotroneo A, Mondello L (2006) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *J Chromatogr A* 1112(1–2):269–275. doi:10.1016/j.chroma.2005.10.070
- van der Klift EJC, Vivo-Truyols G, Claassen FW, van Holthoorn FL, van Beek TA (2008) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet, evaporative light scattering and mass spectrometric detection of triacylglycerols in corn oil. *J Chromatogr A* 1178(1–2):43–55. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.039
- Perrin JL, Naudet M (1983) Identification and determination of triglycerides in natural fats by high-performance liquid-chromatography. *Revue Francaise Des Corps Gras* 30(7–8):279–285
- Hsu FF, Turk J (1999) Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(7):587–599. doi:10.1016/s1044-0305(99)00035-5
- Holčapek M, Jandera P, Zderadička P, Hrubá L (2003) Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010(2):195–215. doi:10.1016/s0021-9673(03)01030-6
- Han XL, Gross RW (2003) Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* 44(6):1071–1079. doi:10.1194/jlr.R300004-JLR200
- Byrdwell WC (2001) Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 36(4):327–346. doi:10.1007/s11745-001-0725-5
- Cai SS, Syage JA (2006) Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Anal Chem* 78(4):1191–1199. doi:10.1021/ac0515834
- Asbury GR, Al-Saad K, Siems WF, Hannan RM, Hill HH (1999) Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(10):983–991. doi:10.1016/s1044-0305(99)00063-x
- Pittenauer E, Allmaier G (2009) The renaissance of high-energy CID for structural elucidation of complex lipids: MALDI-TOF/RTOF-MS of alkali cationized triacylglycerols. *J Am Soc Mass Spectrom* 20(6):1037–1047. doi:10.1016/j.jasms.2009.01.009
- Kofroňová E, Cvačka J, Vrkoslav V, Hanus R, Jiroš P, Kindl J, Hovorka O, Valterová I (2009) A comparison of HPLC/APCI-MS and MALDI-MS for characterising triacylglycerols in insects: species-specific composition of lipids in the fat bodies of bumblebee males. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Life Sci* 877(30):3878–3884. doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.040
- Suni NM, Aalto H, Kauppila TJ, Kotiaho T, Kostianen R (2012) Analysis of lipids with desorption atmospheric pressure

- photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS). *J Mass Spectrom* 47(5):611–619. doi:10.1002/jms.2992
21. Cheng CF, Gross ML (1998) Complete structural elucidation of triacylglycerols by tandem sector mass spectrometry. *Anal Chem* 70(20):4417–4426. doi:10.1021/ac9805192
 22. Lauer WM, Aasen AJ, Graff G, Holman RT (1970) Mass spectrometry of lipids. 5. Mass spectrometry of triglycerides. 1. Structural effects. *Lipids* 5(11):861–868. doi:10.1007/bf02531117
 23. Games DE (1978) Soft ionization mass-spectral methods for lipid analysis. *Chem Phys Lipids* 21(4):389–402. doi:10.1016/0009-3084(78)90048-8
 24. Thomas MC, Mitchell TW, Harman DG, Deeley JM, Murphy RC, Blanksby SJ (2007) Elucidation of double bond position in unsaturated lipids by ozone electro-spray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 79(13):5013–5022. doi:10.1021/ac0702185
 25. Xu Y, Brenna JT (2007) Atmospheric pressure covalent adduct chemical ionization tandem mass spectrometry for double bond localization in monoene- and diene-containing triacylglycerols. *Anal Chem* 79(6):2525–2536. doi:10.1021/ac062055a
 26. Thomas MC, Mitchell TW, Harman DG, Deeley JM, Nealon JR, Blanksby SJ (2008) Ozone-induced dissociation: elucidation of double bond position within mass-selected lipid ions. *Anal Chem* 80(1):303–311. doi:10.1021/ac7017684
 27. Hsu F-F, Turk J (2010) Electrospray ionization multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry for structural elucidation of triacylglycerols: assignment of fatty acyl groups on the glycerol backbone and location of double bonds. *J Am Soc Mass Spectrom* 21(4):657–669. doi:10.1016/j.jasms.2010.01.007
 28. Brown SHJ, Mitchell TW, Blanksby SJ (2011) Analysis of unsaturated lipids by ozone-induced dissociation. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipids* 1811(11):807–817. doi:10.1016/j.bbalip.2011.04.015
 29. Vrkošlav V, Háková M, Pecková K, Urbanová K, Cvačka J (2011) Localization of double bonds in wax esters by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts. *Anal Chem* 83(8):2978–2986. doi:10.1021/ac1030682
 30. Pham HT, Ly T, Trevitt AJ, Mitchell TW, Blanksby SJ (2012) Differentiation of complex lipid isomers by radical-directed dissociation mass spectrometry. *Anal Chem* 84(17):7525–7532. doi:10.1021/ac301652a
 31. Moneti G, Pieraccini G, Dani F, Turillazzi S, Favretto D, Traldi P (1997) Ion-molecule reactions of ionic species from acetonitrile with unsaturated hydrocarbons for the identification of the double-bond position using an ion trap. *J Mass Spectrom* 32(12):1371–1373. doi:10.1002/(sici)1096-9888(199712)32:12<1371::aid-jms588>3.0.co;2-e
 32. Moneti G, Pieraccini G, Favretto D, Traldi P (1998) Acetonitrile in chemical ionization of monounsaturated hydrocarbons: a C-13 and H-2 labeling study. *J Mass Spectrom* 33(11):1148–1149. doi:10.1002/(sici)1096-9888(199811)33:11<1148::aid-jms707>3.0.co;2-y
 33. Moneti G, Pieraccini G, Favretto D, Traldi P (1999) Reactions of ionic species from acetonitrile with long-chain saturated and unsaturated alcohols. *J Mass Spectrom* 34(12):1354–1360. doi:10.1002/(sici)1096-9888(199912)34:12<1354::aid-jms894>3.0.co;2-1
 34. Oldham NJ, Svatoš A (1999) Determination of the double bond position in functionalized monoenes by chemical ionization ion-trap mass spectrometry using acetonitrile as a reagent gas. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13(5):331–336. doi:10.1002/(sici)1097-0231(19990315)13:5<331::aid-rcm487>3.3.co;2-1
 35. Van Pelt CK, Carpenter BK, Brenna JT (1999) Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(12):1253–1262
 36. Van Pelt CK, Brenna JT (1999) Acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry to locate double bonds in polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Anal Chem* 71(10):1981–1989. doi:10.1021/ac981387f
 37. Van Pelt CK, Huang MC, Tschanz CL, Brenna JT (1999) An octaene fatty acid, 4,7,10,13,16,19,22,25-octacosaoctanoic acid (28: 8*n*-3), found in marine oils. *J Lipid Res* 40(8):1501–1505
 38. Michaud AL, Diau GY, Abril R, Brenna JT (2002) Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methyl esters using acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 307(2):348–360. doi:10.1016/s0003-2697(02)00037-4
 39. Michaud AL, Yurawecz MP, Delmonte P, Corl BA, Bauman DE, Brenna JT (2003) Identification and characterization of conjugated fatty acid methyl esters of mixed double bond geometry by acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75(18):4925–4930. doi:10.1021/ac034221+
 40. Michaud AL, Lawrence P, Adlof R, Brenna JT (2005) On the formation of conjugated linoleic acid diagnostic ions with acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(3):363–368. doi:10.1002/rcm.1797
 41. Lawrence P, Brenna JT (2006) Acetonitrile covalent adduct chemical ionization mass spectrometry for double bond localization in non-methylene-interrupted polyene fatty acid methyl esters. *Anal Chem* 78(4):1312–1317. doi:10.1021/ac0516584
 42. Gomez-Cortes P, Tyburczy C, Brenna JT, Juarez M, Angel de la Fuente M (2009) Characterization of *cis*-9 *trans*-11 *trans*-15 C18:3 in milk fat by GC and covalent adduct chemical ionization tandem MS. *J Lipid Res* 50(12):2412–2420. doi:10.1194/jlr.M800662-JLR200
 43. Alves SP, Tyburczy C, Lawrence P, Bessa RJB, Brenna JT (2011) Acetonitrile covalent adduct chemical ionization tandem mass spectrometry of non-methylene-interrupted pentaene fatty acid methyl esters. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25(14):1933–1941. doi:10.1002/rcm.5065
 44. Oldham NJ (1999) Ion/molecule reactions provide new evidence for the structure and origin of C₃H₄N⁺ from acetonitrile chemical ionization plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13(16):1694–1698. doi:10.1002/(sici)1097-0231(19990830)13:16<1694::aid-rcm702>3.0.co;2-1
 45. Vrkošlav V, Cvačka J (2012) Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1259:244–250. doi:10.1016/j.chroma.2012.04.055
 46. Šubčíková L, Hoskovec M, Vrkošlav V, Čmelíková T, Háková E, Míková R, Coufal P, Doležal A, Plavka R, Cvačka J (2015) Analysis of 1,2-diol diesters in vermix caseosa by high-performance liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1378:8–18. doi:10.1016/j.chroma.2014.11.075
 47. Lísa M, Holčápek M, Boháč M (2009) Statistical evaluation of triacylglycerol composition in plant oils based on high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry data. *J Agric Food Chem* 57(15):6888–6898. doi:10.1021/jf901189u
 48. Liebisch G, Vizcaino JA, Koefeler H, Troetzmueller M, Griffiths WJ, Schmitz G, Spener F, Wakelam MJO (2013) Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *J Lipid Res* 54(6):1523–1530. doi:10.1194/jlr.M033506
 49. Rousseau D, Marangoni AG (2002) In: Akoh CC, Min DB (eds) *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, 2nd edn. CRC, New York

50. Mottram HR, Evershed RP (1996) Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Tetrahedron Lett* 37(47):8593–8596. doi:[10.1016/0040-4039\(96\)01964-8](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01964-8)
51. Laakso P (2002) Mass spectrometry of triacylglycerols. *Eur J Lipid Sci Technol* 104(1):43–49. doi:[10.1002/1438-9312\(200201104:1<43::AID-EJLT43>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200201104:1<43::AID-EJLT43>3.0.CO;2-J)
52. Baiocchi C, Medana C, Dal Bello F, Giancotti V, Aigotti R, Gastaldi D (2015) Analysis of regioisomers of polyunsaturated triacylglycerols in marine matrices by HPLC/HRMS. *Food Chem* 166:551–560. doi:[10.1016/j.foodchem.2014.06.067](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.067)
53. Kofroňová E, Cvačka J, Jiroš P, Sýkora D, Valterová I (2009) Analysis of insect triacylglycerols using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:519–525. doi:[10.1002/ejlt.200800228](https://doi.org/10.1002/ejlt.200800228)
54. Cvačka J, Krafková E, Jiroš P, Valterová I (2006) Computer-assisted interpretation of atmospheric pressure chemical ionization mass spectra of triacylglycerols. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(23):3586–3594. doi:[10.1002/rem.2770](https://doi.org/10.1002/rem.2770)
55. Rissmann R, Groenink HWW, Weerheim AM, Hoath SB, Ponc M, Bouwstra JA (2006) New insights into ultrastructure, lipid composition and organization of vernix caseosa. *J Invest Dermatol* 126(8):1823–1833. doi:[10.1038/sj.jid.5700305](https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700305)



Analysis of 1,2-diol diesters in vernix caseosa by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry



Lenka Šubčíková^a, Michal Hoskovec^b, Vladimír Vrkoslav^b, Tereza Čmelíková^c,
Eva Háková^{a,b}, Radka Míková^{a,b}, Pavel Coufal^a, Antonín Doležal^d, Richard Plavka^d,
Josef Cvačka^{b,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030/8, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

^c Joachim Barrande Grammar School, Talichova 824, CZ-266 01 Beroun, Czech Republic

^d Department of Obstetrics and Gynaecology, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Apolinářská 18, CZ-128 00 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2014

Received in revised form 4 November 2014

Accepted 27 November 2014

Available online 4 December 2014

Keywords:

Skin lipids

Neutral lipids

Lipidomics

Mass spectrometry

Double-bond position

ABSTRACT

Fatty acid diesters of long-chain 1,2-diols (1,2-DDE), or type II wax diesters, were analyzed in the vernix caseosa of a newborn girl. 1,2-DDE were isolated from the total lipid extract by the semipreparative TLC using plates coated with silica gel. Chromatographic separation of the 1,2-DDE molecular species was achieved on the non-aqueous reversed-phase HPLC with two Nova-Pak C18 columns connected in series (a total length of 45 cm) and using an acetonitrile–ethyl acetate gradient. 1,2-DDE eluted from the column in the order of their equivalent chain number. The analytes were detected as ammonium adducts by an ion-trap mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure chemical ionization source. Their structures were elucidated using tandem mass spectrometry with MS, MS² and MS³ steps in a data-dependent mode. More than two thousand molecular species of 1,2-DDE were identified in 141 chromatographic peaks. The most abundant 1,2-DDE were monounsaturated lipids consisting of a C22 diol and a C18:1 fatty acid together with C16:0, C14:0 or C15:0 fatty acids. The positions of double bonds were characterized by the fragmentation of [M+C₃H₅N]⁺ formed in the ion source.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fatty acid diesters of long-chain 1,2-diols (1,2-DDE), or type II wax diesters, are condensation products of two fatty acid molecules with a long-chain 1,2-diol. These lipids are widely associated with the skin of mammals; they are frequently found in sebum, a species-specific mixture of relatively neutral lipids synthesized de novo by sebaceous glands [1]. The first reports on 1,2-DDE appeared in the literature in the 1960s [2–5], about a decade after the structural characterization of 1,2-diols in wool wax [6,7]. Since then, 1,2-DDE have been identified in the skin surface lipids of many mammalian species. 1,2-DDE have been detected in the skin of rodents such as the mouse, rat, guinea pig, golden Syrian hamster or gerbil [2,5,8–10], as an abundant lipid class forming 14–61% of the

total lipids. The ventral gland secretion of a male dwarf hamster was found to contain 1,2-diols and their monopentanoates [11]. An analysis of the rat 1,2-DDE has shown that 1,2-diols (having the chiral center on carbon 2) exist in the D form [12]. Further experiments with the lipase hydrolysis of 1,2-DDE from the golden Syrian hamster and the mouse have revealed that fatty acids in the positions 1 and 2 are not distributed randomly [13]. Canine skin lipids were reported to comprise 32% of the 1,2-DDE constituting branched diols esterified with long-chain fatty acid and isovaleric acid [14]. The skin of cows was found to produce 8% of diol diesters [15]. In primates, 1,2-DDE formed 21% of the skin lipids of the baboon [8]. Two types of 1,2-DDE were found in the skin lipids of the macaque: the less abundant type (17%) with two long-chain fatty acids and the second type (40%) with short branched-chain acids (mostly isovaleric acid) in the position 1 of the diol [16]. Concerning the human species, 1,2-DDE are almost missing in the adult skin [17], but they are produced in the early stages of skin development. 1,2-DDE are present in vernix caseosa,

* Corresponding author. Tel.: +420 220183303; fax: +420 220183583.
E-mail address: cvacka@uochb.cas.cz (J. Cvačka).

a uniquely human proteolipid film coating the skin of the fetus in the last trimester of pregnancy and protecting the embryonic skin from amniotic water. Vernix caseosa has remarkable hydration, waterproofing, anti-infective, antioxidant and wound-healing properties [18]. 1,2-DDE constitute 3–9% of the total lipids in vernix caseosa [3,19]. Although vernix caseosa diols have been found to be mostly methyl-branched (*iso*, *anteiso*) and saturated straight-chain 1,2-diols with 20–25 carbons [3,4], shorter chains (C14–C19) have been detected as well [5]. Fatty acyls have been identified as saturated straight-chain or methyl-branched (*iso*, *anteiso*) and unsaturated straight-chain, mostly monoenic. The most abundant saturated chains appeared to contain 16 carbons (both straight and *iso*-methyl branched chains) and the predominant unsaturated acids were C18:1*n*-7 and C18:1*n*-9 [19]. The biosynthesis of human 1,2-DDE was found to involve catalysis by acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase DGAT1, an enzyme highly expressed in the skin [20]. 1,2-DDE are rare in other biotas. They have been reported in uropygial (preen) gland secretions of some birds [21–23], where isomeric 2,3-DDE are usually found. In the plant kingdom, long-chain 1,2-diols have been discovered in the skin wax of apples [24] and, together with their monoacetates, in the cuticular wax of Mexican aster petals [25]. Alkane-1,2-diol-based glycolipids have been found in hot spring microbial mats [26,27].

1,2-Diols and 1,2-DDE are utilized in cosmetic and pharmaceutical products. Non-esterified 1,2-diols are frequently used as skin and hair conditioning agents, viscosity- and foam-increasing agents [28–30]. They have bacteriostatic activities against a broad range of strains, which makes them useful as a treatment of skin diseases caused by bacteria, such as acne [31–33], and they are also suggested as prophylaxis and/or treatment of fungal skin infections [34]. Recently, 1,2-diols have been patented as antispasmodics to relieve the spasms associated with pain [35], and they can also serve for controlling underarm and foot odor [31]. Esters of 1,2-diols are used less frequently. Monoesters of 1,2-diols can be used for the treatment of acne or seborrheic dermatitis [36]. 1,2-DDE have been suggested as edible fat with substantially fewer calories than commonly used triacylglycerols [37]. Mixtures of mono- and diesters of propane-1,2-diol are utilized as emulsifiers and aerating agents for bakery products (food additive E477).

Taking into account the large variability of the fatty acids biosynthesized by the mammal skin, the total number of 1,2-DDE might be enormous. The theoretical number of the 1,2-DDE that can be formed from N diols and n fatty acids equals $N \times n^2$. We have reported previously that vernix caseosa lipids contain at least 167 different fatty acids [38], which, even for a low number of diols, gives 10^4 – 10^5 possible combinations. The complexity of 1,2-DDE thus compares with extremely rich mixtures of triacylglycerols (where the number of theoretically formed species equals n^3). Not surprisingly, a comprehensive characterization of 1,2-DDE mixtures at the level of intact molecular species has not been published so far. 1,2-DDE with very short-chain diols were earlier analyzed by electron ionization MS [39], but the method is not applicable for mixtures and lipids with long-chain diols. Previously published methods for skin 1,2-DDE mostly relied on saponification or transesterification, i.e. procedures that release fatty acids and alcohols. Fatty acids and diols released from 1,2-DDE were investigated using GC, often preceded by various chemical derivatizations including the formation of trimethylsilyl, acetyl, isopropylidene or acetonide derivatives, hydrogenation or oxidation [4,19,40]. Although these approaches have enabled the structural characterization of fatty-acid and diol building blocks, the structures of intact 1,2-DDE have not been disclosed yet.

In this work, we analyzed the 1,2-DDE of vernix caseosa using non-aqueous reversed-phase HPLC/APCI-tandem MS. The method was carefully optimized to achieve good chromatographic resolution and obtain reliable information on the molecular species

structure. More than 2000 molecular species have been identified and their retention behavior has been studied.

2. Experimental

2.1. Sample collection

The vernix caseosa sample (1.0 g) was collected from the skin of a full-term healthy female neonate immediately after spontaneous vaginal delivery and stored at -25°C in an amber glass vial. The sample was collected with informed parental consent and the work was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital, Prague (910/09 S-IV); the study was performed according to the Declaration of Helsinki.

2.2. The isolation of 1,2-DDE

The sample was suspended in 50 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v) with 0.05% of butylated hydroxytoluene (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol; an antioxidant). The suspension was cleared of epithelial cells by filtration through a column containing purified cotton wool and silica gel (60–120 μm , ca 0.2 g). Anhydrous magnesium sulfate (ca 5 g) was added to absorb water, and the suspension was filtered again. The solvents were removed by a rotary evaporator (35°C , 170 mbar) and a stream of argon, yielding 78 mg of the total lipid extract. The extract (ca 20 mg) was separated on $9\text{ cm} \times 12\text{ cm}$ glass TLC plates coated with silica gel using hexane:diethyl ether (93:7, v/v) as a mobile phase. Each plate was developed twice to focus the zones (in the first step to $3/4$ of the plate height and then, after air-drying, to the top). The zones were visualized under UV light after being sprayed with rhodamine 6G (0.05% in ethanol). The zone corresponding to 1,2-DDE ($R_f = 0.46$ – 0.52) was scraped off the plate into a small glass column with purified cotton wool and silica gel; lipids were eluted with diethyl ether. The solvent was evaporated under a stream of argon; the residues were dissolved in chloroform:methanol (2:1, v/v; 10 mg/mL) and stored at -25°C in the dark. Prior to HPLC analysis, the sample was diluted by acetonitrile:chloroform (10:9, v/v) to a concentration of 1 mg/mL (compound identification) or concentrated to a concentration of 25 mg/mL (the localization of double bonds).

2.3. Chemical synthesis of standards

Fatty acid chloride (or an equimolar mixture of fatty acid chlorides) was added dropwise to a stirred solution of alkane-1,2-diol in 10 mL of anhydrous pyridine at 0°C . After stirring for 72 h at ambient temperature, the mixture was diluted with diethyl ether (100 mL), washed with 10% hydrochloric acid ($2 \times 100\text{ mL}$), a saturated solution of sodium hydrogen carbonate ($2 \times 100\text{ mL}$), brine (100 mL), and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated in vacuo and the oily residue was purified by flash chromatography (150 g of Merck Kiesegel 60; the mobile phase hexane:ethyl acetate (95:5, v/v)) to give 1,2-DDE. The reactant weights and the reaction yields are specified in the Supplementary Information.

2.4. Chemicals

Acetonitrile, ethyl acetate and methanol (purity: for MS, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as received; the other solvents (chloroform, hexane, dichloromethane; all from Penta, Czech Republic) were distilled in glass from analytical-grade solvents. Ammonium formate (Fluka, Buchs, Switzerland), magnesium sulfate (Sigma–Aldrich), rhodamine 6G (Sigma–Aldrich) and

butylated hydroxytoluene (Fluka) were of reagent grade and used as purchased.

2.5. HPLC/APCI-MS

The liquid chromatograph consisted of a Rheos 2200 quaternary gradient pump (Flux Instruments, Reinach, Switzerland), a PAL HTS autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland), a DeltaChrom CTC 100 column oven (Watrex, Prague, Czech Republic) and an LTQ Orbitrap XL hybrid FT mass spectrometer equipped with an Ion Max source with an APCI probe installed (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA); the system was controlled by Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Two Nova-Pak C18 stainless-steel columns connected in series (150 and 300 mm × 3.9 mm, particle size: 4 μm; Waters, Milford, MA, USA) were used at a column temperature of 30 °C. The mobile phase flow rate was 0.7 mL/min. The autosampler injected 10 μL of the sample and the injection system was washed with chloroform/acetonitrile (1:1, v/v). The mobile phase was mixed from acetonitrile (A) and ethyl acetate (B). The linear gradient program was as follows: 0 min: 70% of A and 30% of B; 100 min: 100% of B; 130 min: 100% of B. Ammonium formate (50 mM solution in 2-propanol/water 9:1, v/v; 9 μL/min) was added to the effluent. The APCI vaporizer and heated capillary temperatures were set to 270 °C and 170 °C, respectively; the corona discharge current was 7 μA. Nitrogen served both as the sheath and auxiliary gas at a flow rate of 32 and 17 arbitrary units, respectively. The MS method encompassed eight scan events for a linear ion trap: (1) the full scan in the 400–1500 *m/z* range; (2) CID MS/MS of the *N*th most intense ion from the parent mass list with a normalized collision energy of 28–30% and isolation with 2 Da; (3–8) CID MS³ from the first to sixth most abundant fragments recorded in the previous event using a normalized collision energy of 32% and isolation with 2 Da. The same sample was analyzed six times; the *N* in the second scan event was gradually increased from *N*=1 (the MS/MS of the most intense ion from the parent mass list in the MS spectrum) to *N*=6 (the MS/MS of the sixth most intense ion from the parent mass list in the MS spectrum). The parent mass list was calculated for [M+NH₄]⁺ ions of all possible 1,2-DDE with the total number of carbons and double bonds in the range of 49–91 and 0–4, respectively. Two additional HPLC runs were used to localize the positions of double bonds using [M+C₃H₅N]⁺ formed in the APCI source [41] under the same separation conditions as described above. In both runs, the MS method consisted of two scan events; the first scan event was the full scan in the 400–1500 *m/z* range and the second scan was either ion-trap CID of the most intense [M+C₃H₅N]⁺ ion from the parent mass list with the normalized collision energy of 29–33% and isolation with 2 Da or quadrupole HCD of the most intense [M+C₃H₅N]⁺ ion from the parent mass list with the normalized collision energy of 18–21% and isolation with 2 Da. The isolation width of 2 Da used throughout this work enabled us to achieve high signal intensity while maintaining monoisotopic precursor selection. The parent mass list was built for mono- and diunsaturated 1,2-DDE. 1,2-DDE standards dissolved in the mobile phase were also directly infused into the mobile phase flow via a T-piece using a syringe pump of the instrument. The exact masses were recorded by the Orbitrap at a resolution of 100,000. The HPLC/MS³ data were interpreted manually.

2.6. The 1,2-DDE abbreviations and nomenclature

An abbreviated nomenclature for 1,2-DDE was used in this work. The aliphatic chains were expressed by the number of carbons and the number of double bonds. The position of the double bond (or a group of *m* ethylene-interrupted double bonds) was indicated as *n*-*x*, where *x* is the distance from the terminal end of the hydrocarbon

chain. Unless stated otherwise, the *cis* double-bond geometry was assumed. The abbreviation first specifies 1,2-diol and then fatty acid chains. For instance, the abbreviation 10:0//18:1*n*-9/16:0 is used for 2-(palmitoyloxy)decyl oleate or 2-(hexadecanoyloxy)decyl (*Z*)-octadec-9-enoate. The underscore character between fatty acids (10:0//18:1*n*-9.16:0) indicates that the positions of the fatty acids are not known [42]. The ECN stands for the equivalent carbon number (ECN=CN–2DB, where CN and DB are the total numbers of the carbon atoms and double bonds, respectively). The diagnostic fragments indicating the position of a double bond in the MS/MS spectra were labeled either α (for the fragments containing a diester moiety) or ω (for the fragments carrying the terminal-carbon end).

3. Results and discussion

3.1. The mass spectra of 1,2-DDE

The APCI mass spectra of 1,2-DDE were studied using standards prepared synthetically. The full-scan APCI mass spectra showed signals of protonated molecules, partially overlapping with radical cations [M]^{•+}. The addition of ammonium formate promoted the creation of ammonium adducts. A full-scan mass spectrum of 16:0//18:1*n*-9/18:1*n*-9 (Fig. 1A) showed mostly [M+NH₄]⁺ at *m/z* 804.6 (the spectrum base peak) and less abundant signals of [M+H]⁺ at *m/z* 787.1, [M+C₃H₅N]^{•+} [41,43] at *m/z* 841.8 and an [M+H–FA]⁺ fragment at *m/z* 505.5. Collision-induced dissociation of the ammonium adducts in the ion trap (MS/MS) provided signals consistent with a neutral loss of ammonia ([M+NH₄–NH₃]⁺, i.e. [M+H]⁺) and fatty acids ([M+H–FA₁]⁺, [M+H–FA₂]⁺). In the case of monoacid 16:0//18:1*n*-9/18:1*n*-9, these ions appeared at *m/z* 804.4 ([M+NH₄]⁺), *m/z* 787.7 ([M+H]⁺) and *m/z* 505.5 ([M+H–FA_{18:1}]⁺), see Fig. 1B. In the case of diacid 10:0//16:0.18:1*n*-9, two signals corresponding to a neutral loss of fatty acids were detected at *m/z* 395.4 and *m/z* 421.4 (Fig. 2A). Further fragmentation of [M+H–FA]⁺ ions (i.e. MS³) allowed us to detect fragments related to the second fatty acids and thus complete the information on the number of carbons and double bonds in diol and fatty acid chains. MS³ spectra showed a loss of a doubly dehydrated diol, i.e. alkadiene in the case of 1,2-DDE with a saturated diol chain. The second fatty acid appeared as a protonated molecule [FA+H]⁺ accompanied by its dehydration products [FA+H–H₂O]⁺ and [FA+H–2H₂O]⁺. These ions for 16:0//18:1*n*-9/18:1*n*-9 were detected at *m/z* 283.2, *m/z* 265.3 and *m/z* 247.3, respectively (Fig. 1C). The MS³ spectrum base peaks were [FA+H]⁺ for saturated FA (Fig. 2B), whereas, in the case of monounsaturated FA, the most abundant ions were typically [FA+H–H₂O]⁺ (Fig. 2C). For a general fragmentation scheme of 1,2-DDE, see Fig. 3. The MS² of [M+C₃H₅N]^{•+} made it possible to establish the position of the double bond based on two fragments corresponding to the cleavage of the C–C bonds next to the site of the double bond. The covalent adducts [M+C₃H₅N]^{•+} can be generated by gas-phase reactions in the APCI sources in the presence of acetonitrile, and we have shown that these ions are useful for the localization of double bonds in various lipids [41,43]. The CID fragmentation of *m/z* 841.8 ([M+C₃H₅N]^{•+} of 16:0//18:1*n*-9/18:1*n*-9) in the ion trap gave a prominent fragment *m/z* 728.7 (α-ion), which can be rationalized by the loss of octane radical, and indicated the *n*-9 position of the double bond (Fig. 4A). The CID spectra also contained satellite fragments resulting from the cleavages of the C–C bonds more distant from the site of the double bond (mostly ±14 Da, *m/z* 714.6 and *m/z* 742.7) [41,43]. A cleavage from the opposite side of the double bond (the ω-ion at *m/z* 194, the elimination of C₄₂H₇₉O₄^{•+}) was not observed due to a low mass cutoff of the ion trap. The CID spectrum showed also fragments not related to the double-bond position, e.g. the relatively abundant neutral loss of fatty acid ([M+C₃H₅N–FA]^{•+}) at *m/z* 559.5. In contrast, the quadrupole HCD

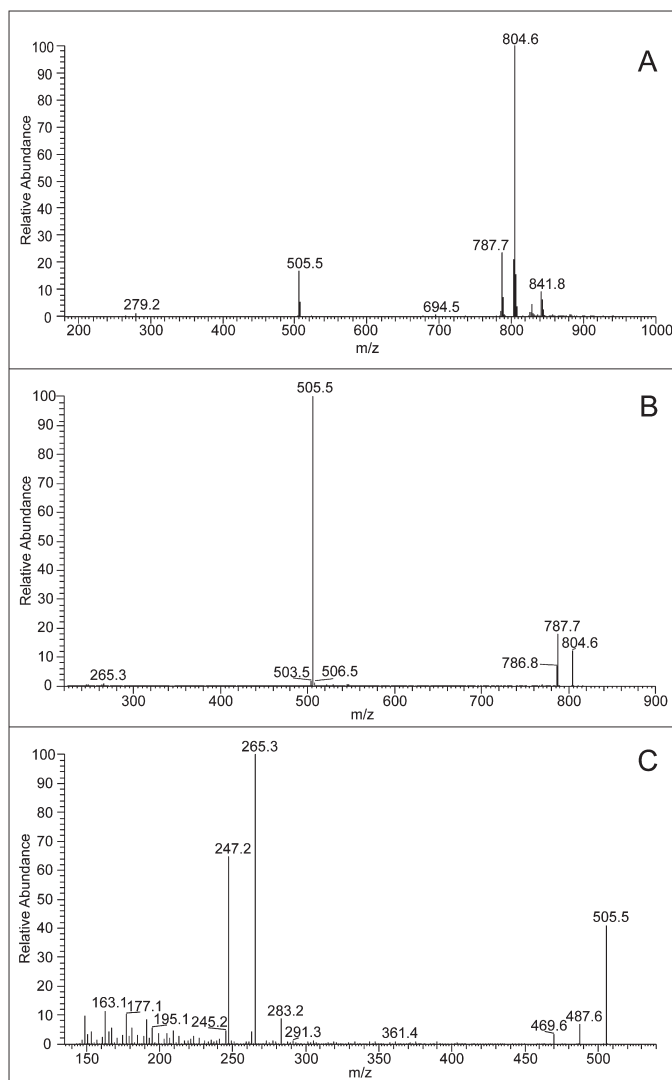


Fig. 1. The APCI mass spectra of 16:0//18:1n-9/18:1n-9; the full-scan MS (A), the ion-trap CID MS² of m/z 804.6 (the fragmentation of $[M+NH_4]^+$) (B), and the ion-trap CID MS³ of m/z 505.5 (the fragmentation of $[M+H-FA_{18:1}]^+$) (C).

spectra were less complicated, showing only ω and α diagnostic fragments accompanied by small satellite ions at +14 Da (Fig. 4B). The difference between the appearance of the CID and HCD spectra was presumably caused by different collision energies and the activation time scales. Whereas HCD is a beam-type collision dissociation imparting one or two higher-energy collisions, the ion trap CID slowly heats the precursor with many low-energy collisions, which causes extensive isomerization of the precursor. The lack of 1,2-DDE standards with a double bond in the diol chain did not make it possible to investigate whether MS³ spectra are useful for distinguishing between isomers whose double bond is located either in diol or fatty acid chains. The elemental composition of all ions discussed in this chapter was confirmed by an exact mass measurement on an Orbitrap mass analyzer (Table S1 in the Supplementary Information).

3.2. The optimization of chromatographic separation

In order to achieve a good separation of the extremely rich mixture of 1,2-DDE, a thoroughly optimized HPLC method was required. The unavailability of 1,2-diols with appropriate chain lengths made it impossible to synthesize standards with the same

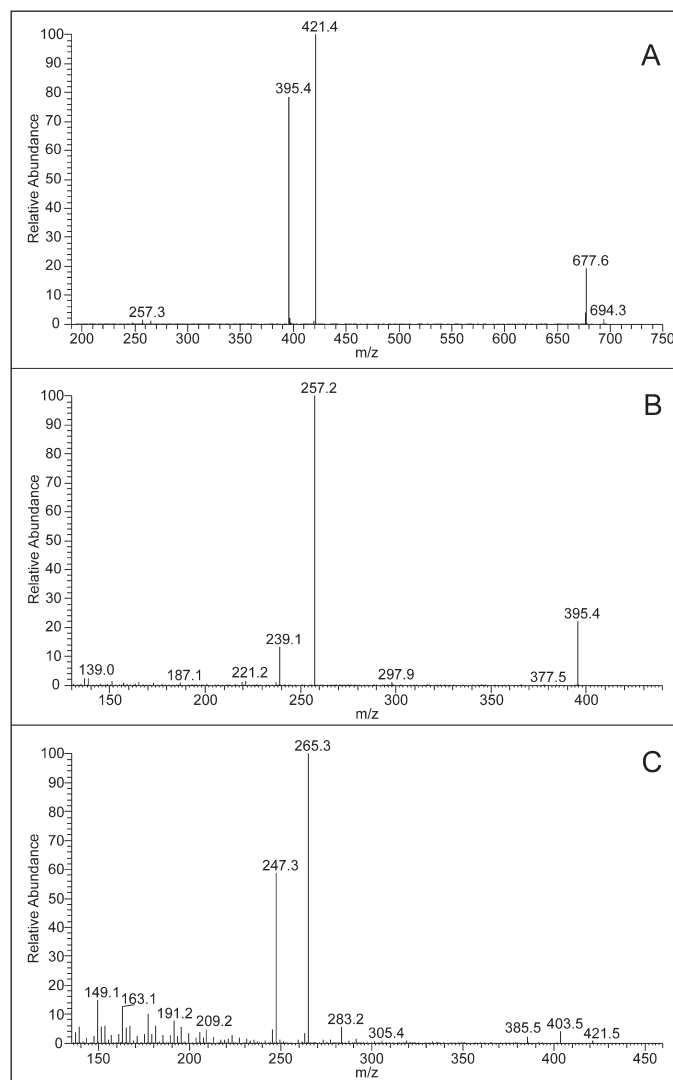


Fig. 2. The APCI mass spectra of 10:0//16:0.18:1n-9; the ion-trap CID MS² of m/z 694.3 (the fragmentation of $[M+NH_4]^+$) (A), the ion-trap CID MS² of m/z 395.4 (the fragmentation of $[M+H-FA_{18:1}]^+$) (B), and the ion-trap CID MS³ of m/z 421.5 (the fragmentation of $[M+H-FA_{16:0}]^+$) (C).

chain length as in the sample. Therefore, the separation conditions were optimized directly with the 1,2-DDE isolated from vernix caseosa. Based on experience with other neutral lipids such as triacylglycerols, wax esters or fatty acid methyl esters [43–45], a non-aqueous reversed-phase system with a NovaPak C18 column with a total column length of 45 cm was selected. The quality of separation in terms of peak-to-peak resolution and peak shape was investigated in binary solvent systems containing methanol, acetonitrile, propan-2-ol, ethyl acetate or toluene. Good peak-to-peak resolutions were achieved in systems combining acetonitrile and either 2-propanol or ethyl acetate. The use of 2-propanol was limited because of its high viscosity causing excessive column back pressure. Similar chromatographic systems with acetonitrile replaced with methanol provided a notably lower chromatographic resolution. Acetonitrile/toluene appeared to be an inappropriate solvent system for the separation of 1,2-DDE because of poor chromatographic resolution and significant signal suppression. The highest separation efficiency was achieved using a linear increase of ethyl acetate in acetonitrile for 100 min (Fig. 5A). The molecular species of 1,2-DDE eluted between 62 and 101 min. The peak width at its half maximum measured in the chromatograms reconstructed for $[M+NH_4]^+$ was typically 0.4 min.

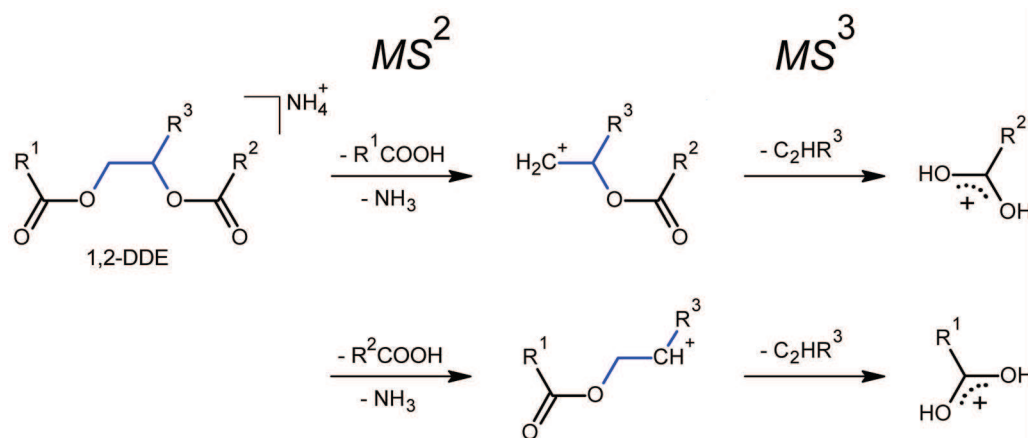


Fig. 3. The general scheme of 1,2-DDE fragmentation. Collision activation of the ammonium adduct (MS^2) promotes a neutral loss of ammonia and fatty acid from the position 1 or 2 of the diol. In the next step (MS^3), the neutral molecule of hydrocarbon (a former aliphatic chain of 1,2-diol) is cleaved, yielding protonated fatty acid. The R^1 , R^2 , R^3 are aliphatic chains.

This separation method was also tested with a mixture of 1,2-DDE standards with shorter chains (Fig. 5B). The chromatogram showed good separation of 1,2-DDE differing by ECN and a variable degree of separation of the molecular species with the same ECN. In the group of standards with $\text{ECN}=42$, the isomers differing just by the position of double bonds (10:0//18:1n-7/18:1n-7, 10:0//18:1n-9/18:1n-9 and 10:0//18:1n-12/18:1n-12) were separated from each other (peaks no. 1, 2 and 3). Saturated 10:0//16:0/16:0 eluted with the highest and distinct retention time (peak no. 5), whereas 10:0//18:1n-9/16:0 (peak no. 4) co-eluted with 10:0//18:1n-12/18:1n-12. Baseline separation was reached for the 1,2-DDE differing by ECN values, i.e. for 10:0//18:0/18:0 (peak no. 6, $\text{ECN}=46$) and 16:0//18:1n-9/18:1n-9 (peak no. 7, $\text{ECN}=48$).

3.3. Analysis of 1,2-DDE from vernix caseosa

As vernix caseosa contains many lipid classes, we first verified the structure of isolated lipids using high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry. Within the above-mentioned elution range, the masses were consistent with the ammonium adducts of 1,2-DDE (of the elemental compositions $\text{C}_n\text{H}_{(2n+x)}\text{O}_4\text{N}$, where $x=2, 0, -2$ or -4 depending on the number

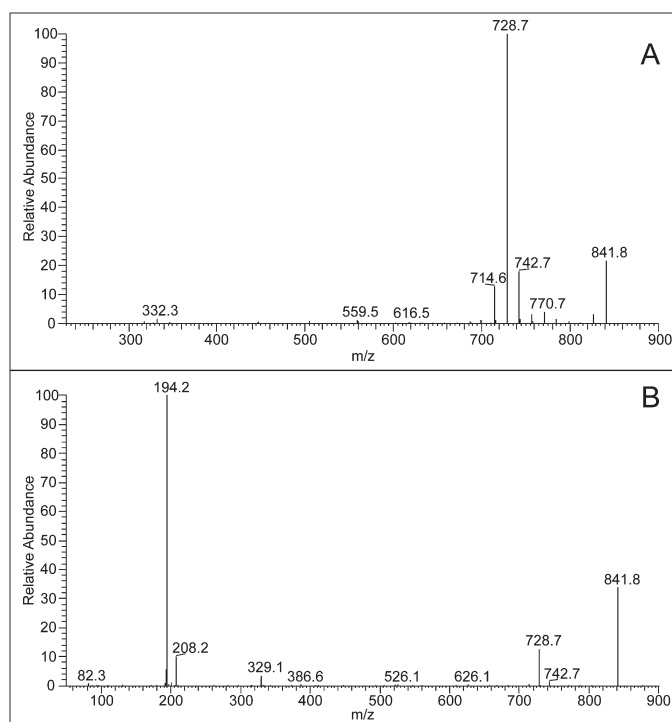


Fig. 4. The APCI MS^2 of the $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ adduct of 16:0//18:1n-9/18:1n-9 (the fragmentation of $[\text{M}+\text{C}_3\text{H}_5\text{N}]^+*$ at m/z 841.8); the ion-trap CID spectrum (A) and the quadrupole HCD spectrum (B).

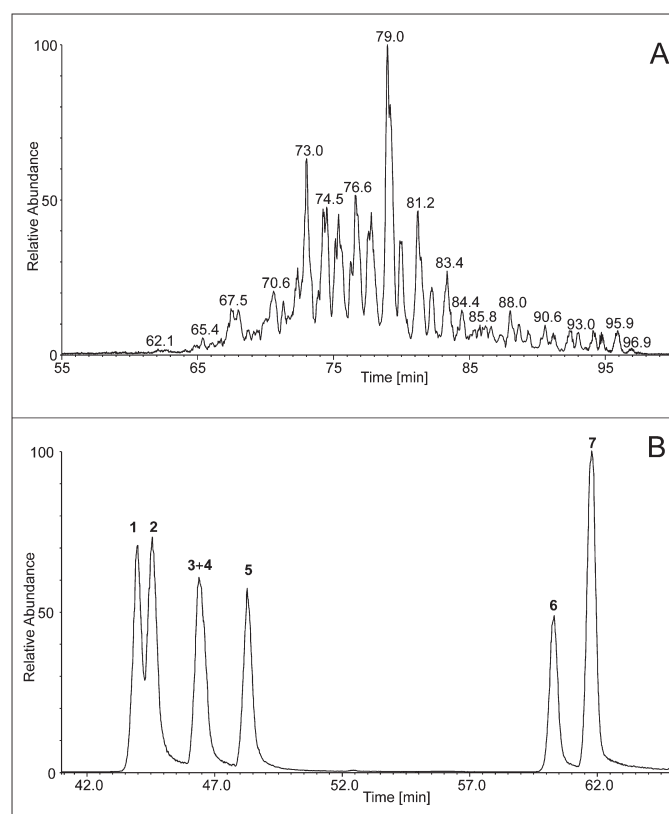


Fig. 5. The base-peak chromatograms (m/z 400–1500) of 1,2-DDE isolated from vernix caseosa (1 mg/mL; A) and 1,2-DDE standards (ca. 0.1 mg/mL each; B). The mobile-phase gradient: 0 min: 70% of acetonitrile and 30% of ethyl acetate; 100 min: 100% of ethyl acetate; 130 min: 100% of ethyl acetate. The peak identity: 10:0//18:1n-7/18:1n-7 (1), 10:0//18:1n-9/18:1n-9 (2), 10:0//18:1n-12/18:1n-12 (3), 10:0//18:1n-9/16:0 (4), 10:0//16:0/16:0 (5), 10:0//18:0/18:0 (6), 16:0//18:1n-9/18:1n-9 (7).

of double bonds). The MS/MS spectra were analogous to those of synthetically prepared standards. They showed the elimination of ammonia and fatty acids (of the elemental compositions $C_nH_{(2n-y)}O_2$, where $y=1, 3, 5$ or 7 depending on the number of double bonds). The typical mass errors were in the range of 0.5–1.5 ppm. These data together with the fact that the R_F on silica TLC matched the R_F of the synthetic standards of 1,2-DDE strongly indicated that the lipids were indeed 1,2-DDE. Although the isolation procedure (two-step TLC) was carefully optimized, the method selectivity appeared to be insufficient for the complete removal of unwanted lipids. The sample was found to be contaminated by an unknown lipid class exhibiting polarity very similar to 1,2-DDE. In our reversed-phase chromatographic system, these lipids eluted mostly at higher retention times and did not interfere with the analysis of 1,2-DDE (Supplementary Fig. S1). High-resolution mass spectra showed that the molecular species of this unknown lipid class contained four oxygen atoms and a sterol part. The molecular weights were considerably larger than those of 1,2-DDE and exhibited the maximum signals around m/z 1100. These lipids were not further explored.

As regards 1,2-DDE, the chromatographic data showed a high number of peaks partially overlapping in the base peak trace (Fig. 5A). The chromatograms reconstructed for m/z values of particular ammonium adducts typically showed several peaks. The compounds represented by these peaks had the same total number of carbons and double bonds, i.e. the ECN value. Saturated 1,2-DDE provided three or four peaks (Fig. 6A), with the second peak in the distribution being the most abundant and the fourth one of very low intensity. The separated peaks likely represented groups of molecular species differing in the number of methyl branches. Based on the analogy with wax esters [45], we speculate that the most retained species contained straight chains and each additional methyl branch shortened the retention time. Unfortunately, no standards of methyl-branched 1,2-DDE were available to prove this hypothesis. The MS² spectra taken across the peaks differed by the intensity of the fragments, which indicated different distributions of the chain lengths (Fig. S2). Monounsaturated 1,2-DDE showed up to three peaks in their reconstructed chromatograms (Fig. 6B). When compared to saturated 1,2-DDE, the peaks tended to be broader and less resolved. The explanation might be a combined effect of various positions of the double bond, *cis-trans* isomerism and chain branching. We hypothesize that the peak broadening was caused by retention time variations of the species with a different double-bond position. The observed separation of the peaks was likely caused by methyl branching or *cis-trans* isomerism rather than by the double-bond position, as the MS data showed a similar distribution of double-bond positions in the separated peaks (Table 1). Note that the double bond might be present either in a diol chain or fatty acyls. Since the number of separated peaks of monounsaturated 1,2-DDE was lower (by one) than in the case of saturated species, we speculate that the monounsaturated chains were not branched, whereas the remaining saturated chains were branched like the chains in fully saturated 1,2-DDE. The chromatographic resolution of the peaks representing doubly unsaturated 1,2-DDE (Fig. 6C) was even worse than in previous cases. The peak broadening was likely caused by an increased number of variations of double-bond positions. Double bonds could be located either in the diol chain and one fatty acyl, or in both fatty acyls, or all the double bonds could be present in a single chain, either diol or acyl. Moreover, the double bonds could be found in various positions within the chains. Like in less unsaturated 1,2-DDE, the MS² spectra revealed differences in the intensities of the fragments (Fig. S2) indicating variabilities in chain distribution. 1,2-DDE with three double bonds were detected only in trace concentrations. In general, 1,2-DDE eluted from the column in the order of increasing chain length as shown in Fig. S3. When recalculated to ECN values

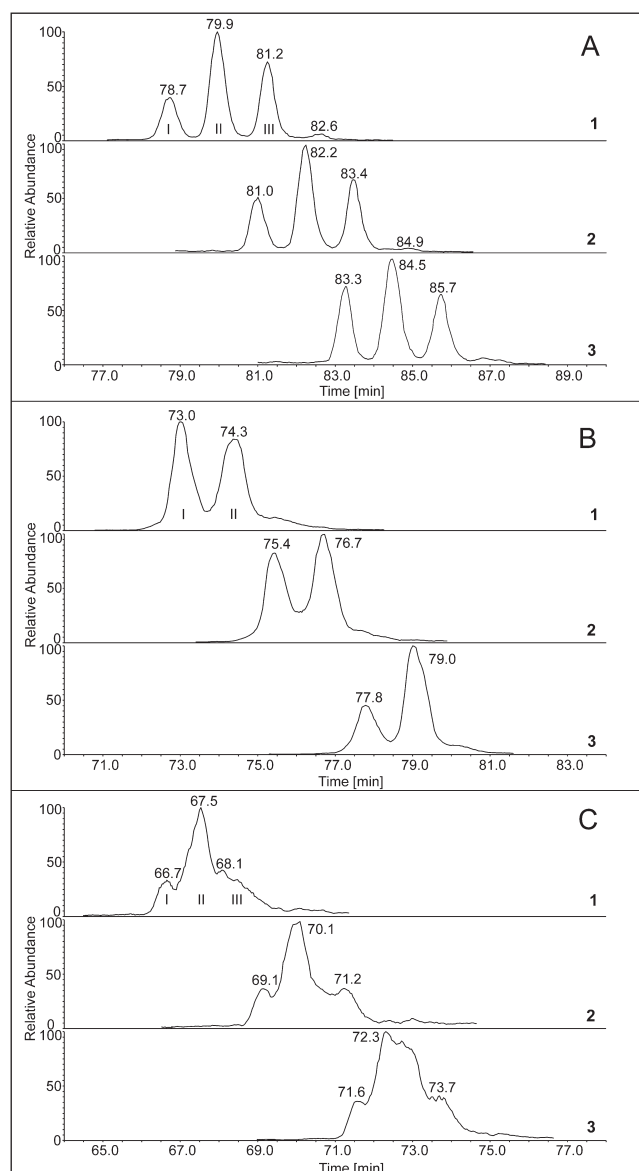


Fig. 6. The chromatograms of vernix caseosa 1,2-DDE reconstructed for selected saturated (A), monounsaturated (B) and diunsaturated (C) species: C56:0 (A1); C57:0 (A2); C58:0 (A3); C56:1 (B1); C57:1 (B2); C58:1 (B3); C56:2 (C1); C57:2 (C2); C58:2 (C3). The experimental conditions were the same as in Fig. 5.

and plotted against retention time, all molecular species appeared on a band almost linearly rising with the retention time (Fig. 7). Such behavior indicates the validity of the ECN concept assuming the same effect of a double bond as that of the shortening of the chain by two methylene groups. The ECN concept is valid for reversed-phase separations of many lipid classes including triacylglycerols, wax esters, fatty acid methyl esters or glyceroglycolipids [45–47] and used as an independent criterion for the validation of the structures assigned from LC/MS data.

The APCI-tandem MS detection with data-dependent scanning was used to identify the molecular species of 1,2-DDE. Because of the finite speed of the MS analyzer, the sample had to be re-measured several times to obtain good-quality spectra also for minor components. The total number of carbons and double bonds was deduced from the full-scan spectra showing the $[M+NH_4]^+$ of 1,2-DDE. The ammonium adducts were fragmented in the MS² step. The first fatty acid (attached either to the carbon 1 or 2 of the diol) was cleaved off (neutral loss) and the fragment was subjected to

Table 1
The 1,2-DDE identified in vernix caseosa.^a

t_R (min)	m/z of $[M+NH_4]^+$	Peak area %	CN:DB	ECN	Identification ^a	Double-bond position ^b
61.73	804.4	0.04	52:2	48	–	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5
62.52	778.4	0.02	50:1	48	–	–
62.59	804.4	0.22	52:2	48	20:0//16:1.16:1 [+6]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5
63.15	778.4	0.18	50:1	48	20:0//16:1.14:0 [+12]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5
63.54	804.4	0.10	52:2	48	22:1//16:1.14:0 [+4]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -6, <i>n</i> -5, <i>n</i> -9, <i>n</i> -10
63.76	752.4	0.06	48:0	48	–	N/A
63.98	844.5	0.07	55:3	49	–	–
64.53	778.4	0.06	50:1	48	20:0//16:1.14:0 [+4]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5, <i>n</i> -10, <i>n</i> -9
64.57	818.4	0.10	53:2	49	17:0//16:1.20:1 22:1//16:1.15:0 [+9]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -6, <i>n</i> -5
64.57	844.5	0.12	55:3	49	27:0//18:2.10:1 [+1]	–
64.98	752.4	0.05	48:0	48	–	N/A
65.13	792.4	0.05	51:1	49	22:1//14:0.15:0 [+9]	–
65.22	818.4	0.30	53:2	49	21:0//16:1.16:1 [+15]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -6, <i>n</i> -5
65.85	792.4	0.24	51:1	49	20:0//16:1.15:0 21:0//16:1.14:0 [+19]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5
66.40	752.4	0.02	48:0	48	–	N/A
66.41	792.4	0.11	51:1	49	21:0//16:1.14:0 [+13]	–
66.43	766.4	0.20	49:0	49	20:0//14:0.15:0 [+10]	N/A
66.45	818.4	0.11	53:2	49	20:0//18:2.15:0 [+8]	–
66.45	858.6	0.35	56:3	50	24:1//16:1.16:1 [+8]	–
66.99	832.5	0.35	54:2	50	22:1//14:0.18:1 [+10]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5, <i>n</i> -9
67.11	792.4	0.15	51:1	49	20:0//16:1.15:0 21:0//16:1.14:0 [+10]	–
67.24	858.6	0.30	56:3	50	22:1//18:2.16:0 [+8]	–
67.70	858.6	0.11	56:3	50	21:3//16:0.19:0 [+6]	–
67.72	832.5	1.35	54:2	50	22:0//16:1.16:1 [+39]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5, <i>n</i> -9, <i>n</i> -10
67.75	766.4	0.17	49:0	49	20:0//14:0.15:0 [+10]	N/A
67.77	806.5	0.08	52:1	50	–	–
68.41	806.5	1.38	52:1	50	20:0//14:0.18:1 [+41]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5
68.59	832.5	0.55	54:2	50	20:0//18:2.16:0 [+22]	–
68.95	872.6	0.16	57:3	51	23:0//16:1.18:2 [+5]	–
69.08	766.4	0.05	49:0	49	–	N/A
69.15	780.5	0.56	50:0	50	22:0//14:0.14:0 [+12]	N/A
69.65	846.5	0.37	55:2	51	24:1//15:0.16:1 [+20]	–
69.71	872.6	0.20	57:3	51	29:0//10:1.18:2	–
69.82	806.5	1.13	52:1	50	20:0//14:0.18:1 20:0//16:1.16:0 [+31]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5
70.28	846.5	1.43	55:2	51	21:0//18:1.16:1 [+40]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -6, <i>n</i> -10
70.29	820.5	0.13	53:1	51	–	–
70.42	780.5	0.58	50:0	50	20:0//14:0.16:0 [+18]	N/A
70.43	766.4	0.01	49:0	49	–	N/A
70.96	820.5	2.24	53:1	51	21:0//14:0.18:1 [+57]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -10, <i>n</i> -5, <i>n</i> -8, <i>n</i> -6
71.07	806.5	0.15	52:1	50	20:0//16:1.16:0 [+7]	–
71.07	846.5	0.54	55:2	51	21:0//18:2.16:0 [+17]	–
71.33	886.6	0.63	58:3	52	24:1//16:1.18:1 [+23]	–
71.70	794.4	1.03	51:0	51	22:0//14:0.15:0 [+19]	N/A
71.80	780.5	0.21	50:0	50	20:0//14:0.16:0 [+6]	N/A
71.88	886.6	0.43	58:3	52	28:3//16:0.14:0 [+7]	–
71.98	860.6	0.71	56:2	52	24:1//18:1.14:0 [+15]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -5
72.13	806.5	0.04	52:1	50	–	–
72.24	820.5	1.36	53:1	51	21:0//14:0.18:1 [+42]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5, <i>n</i> -6, <i>n</i> -10
72.69	860.6	2.49	56:2	52	22:0//16:1.18:1 [+51]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5
72.94	820.5	0.24	53:1	51	21:0//16:1.16:0 [+15]	–
72.97	834.5	0.20	54:1	52	22:0//18:1.14:0 [+12]	–
73.09	794.4	1.16	51:0	51	22:0//15:0.14:0 [+21]	N/A
73.23	780.5	0.04	50:0	50	–	N/A
73.24	860.6	1.62	56:2	52	22:1//18:1.16:0 [+23]	–
73.42	834.5	4.62	54:1	52	22:0//14:0.18:1 [+45]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -8, <i>n</i> -5, <i>n</i> -6, <i>n</i> -10
74.02	860.6	0.64	56:2	52	22:0//18:2.16:0 [+34]	–
74.26	808.5	1.11	52:0	52	22:0//14:0.16:0 [+20]	N/A
74.31	794.4	0.24	51:0	51	21:0//14:0.16:0 [+9]	N/A
74.31	874.6	0.34	57:2	53	24:1//18:1.15:0 [+7]	–
74.86	834.5	2.72	54:1	52	20:0//16:0.18:1 [+57]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5, <i>n</i> -10, <i>n</i> -8, <i>n</i> -6, <i>n</i> -11
75.14	874.6	1.58	57:2	53	23:0//16:1.18:1 [+24]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -8, <i>n</i> -11
75.60	808.5	2.01	52:0	52	22:0//16:0.14:0 [+20]	N/A
75.79	848.5	4.36	55:1	53	22:0//18:1.15:0 [+60]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -8, <i>n</i> -10, <i>n</i> -5, <i>n</i> -6
75.80	794.4	0.04	51:0	51	–	N/A
75.87	834.5	0.60	54:1	52	22:0//16:0.16:1 [+26]	–
76.43	874.6	0.42	57:2	53	23:1//18:1.16:0 [+18]	–
76.66	888.6	0.37	58:2	54	24:1//18:1.16:0 [+2]	–
76.69	822.5	1.21	53:0	53	22:0//16:0.15:0 [+25]	N/A
76.89	808.5	0.82	52:0	52	20:0//16:0.16:0 [+13]	N/A
77.11	848.5	4.33	55:1	53	21:0//16:0.18:1 [+52]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -8, <i>n</i> -10, <i>n</i> -5, <i>n</i> -6
77.34	888.6	0.95	58:2	54	22:0//18:1.18:1 [+12]	–
77.89	888.6	1.79	58:2	54	24:1//18:1.16:0 [+60]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -5, <i>n</i> -10
77.96	822.5	2.44	53:0	53	22:0//16:0.15:0 [+28]	N/A
78.03	848.5	0.24	55:1	53	21:0//16:0.18:1 [+15]	–
78.09	862.6	3.43	56:1	54	22:0//16:0.18:1 [+50]	<i>n</i> -7, <i>n</i> -9, <i>n</i> -8, <i>n</i> -5, <i>n</i> -10
78.19	808.5	0.11	52:0	52	–	N/A

Table 1 (Continued)

79.07	836.5	0.93	54:0	54	22:0//16:0.16:0 [+22]	N/A
79.29	822.5	0.91	53:0	53	21:0//16:0.16:0 [+20]	N/A
79.38	862.6	7.36	56:1	54	22:0//16:0.18:1 [+38]	<i>n-7, n-9, n-10, n-8, n-5, n-6</i>
79.48	902.7	1.06	59:2	55	23:0//18:1.18:1 [+29]	–
80.32	876.6	2.12	57:1	55	23:0//16:0.18:1 [+37]	<i>n-7, n-9, n-8, n-10, n-5</i>
80.33	836.5	2.25	54:0	54	22:0//16:0.16:0 [+28]	N/A
80.49	822.5	0.03	53:0	53	–	N/A
80.54	862.6	0.37	56:1	54	22:0//16:0.18:1 [+22]	–
81.28	916.5	0.11	60:2	56	24:0//18:1.18:1 [+15]	–
81.32	850.6	0.68	55:0	55	23:0//16:0.16:0 [+23]	N/A
81.54	876.6	3.99	57:1	55	23:0//16:0.18:1 [+31]	<i>n-7, n-9, n-8, n-10, n-5, n-6</i>
81.60	836.5	1.43	54:0	54	22:0//16:0.16:0 [+16]	N/A
82.58	890.6	1.48	58:1	56	22:0//16:0.20:1 [+38]	<i>n-7, n-9, n-5, n-11</i>
82.59	850.6	1.43	55:0	55	23:0//16:0.16:0 [+26]	N/A
82.71	876.6	0.15	57:1	55	23:0//16:0.18:1 [+11]	–
82.89	836.5	0.11	54:0	54	22:0//16:0.16:0	N/A
83.39	930.7	0.17	61:2	57	19:0//18:1.24:1 [+1]	–
83.55	864.6	0.30	56:0	56	24:0//16:0.16:0 [+17]	N/A
83.57	890.6	1.46	58:1	56	22:0//16:0.20:1 [+34]	<i>n-7, n-9, n-10, n-5</i>
83.77	850.6	0.56	55:0	55	23:0//16:0.16:0 [+14]	N/A
84.00	930.7	0.10	61:2	57	–	–
84.66	904.7	0.77	59:1	57	23:0//16:0.20:1 [+29]	<i>n-7, n-9</i>
84.79	864.6	0.86	56:0	56	23:0//16:0.17:0 24:0//16:0.16:0 [+25]	N/A
84.81	890.6	0.28	58:1	56	24:0//16:0.18:1 [+7]	–
85.06	850.6	0.05	55:0	55	–	N/A
85.29	944.7	0.38	62:2	58	24:1//18:1.20:0 [+2]	–
85.55	904.7	0.67	59:1	57	23:0//20:1.16:0 [+11]	<i>n-7, n-9</i>
85.68	878.6	0.49	57:0	57	22:0//14:0.21:0 [+23]	N/A
85.99	864.6	0.54	56:0	56	22:0//16:0.18:0 24:0//16:0.16:0 [+16]	N/A
86.31	918.7	0.21	60:1	58	24:1//20:0.16:0 [+2]	–
86.71	918.7	0.45	60:1	58	22:0//16:1.22:0 [+19]	<i>n-7, n-9, n-10, n-5</i>
86.86	878.6	0.56	57:0	57	24:0//16:0.17:0 [+20]	N/A
87.22	864.6	0.05	56:0	56	–	N/A
87.44	918.7	0.42	60:1	58	24:1//20:0.16:0 [+11]	<i>n-7, n-5, n-9</i>
87.62	892.7	0.50	58:0	58	22:0//14:0.22:0 [+14]	N/A
88.07	932.6	0.10	61:1	59	–	–
88.15	878.6	0.22	57:0	57	23:0//16:0.18:0 [+12]	N/A
88.70	932.6	0.32	61:1	59	23:0//16:1.22:0 [+14]	<i>n-7, n-5, n-9</i>
88.99	892.7	0.65	58:0	58	22:0//16:0.20:0 [+25]	N/A
89.27	932.6	0.16	61:1	59	24:1//16:0.21:0 [+2]	<i>n-7, n-5, n-6, n-9, n-10</i>
89.55	906.7	0.43	59:0	59	21:0//14:0.24:0 [+17]	N/A
89.97	946.7	0.13	62:1	60	24:1//14:0.24:0 [+4]	<i>n-7, n-5</i>
90.17	892.7	0.18	58:0	58	22:0//16:0.20:0 [+6]	N/A
90.60	946.7	0.41	62:1	60	22:0//16:1.24:0 [+25]	<i>n-7, n-5, n-9</i>
90.78	906.7	0.55	59:0	59	23:0//16:0.20:0 [+17]	N/A
91.15	946.7	0.19	62:1	60	23:1//16:0.23:0 [+3]	<i>n-7, n-5, n-9</i>
91.40	920.7	0.46	60:0	60	22:0//14:0.24:0 [+15]	N/A
91.80	906.7	0.04	59:0	59	20:0//16:0.23:0 [+1]	N/A
92.83	920.7	0.39	60:0	60	22:0//16:0.22:0 [+17]	N/A
93.26	934.6	0.41	61:0	61	22:0//14:0.25:0 [+16]	N/A
93.86	920.7	0.09	60:0	60	22:0//16:0.22:0	N/A
94.37	934.6	0.52	61:0	61	22:0//16:0.23:0 [+17]	N/A
94.96	948.7	0.37	62:0	62	22:0//15:0.25:0 23:0//15:0.24:0 [+11]	N/A
95.45	934.6	0.08	61:0	61	–	N/A
96.10	948.7	0.50	62:0	62	22:0//16:0.24:0 [+16]	N/A
96.67	962.7	0.25	63:0	63	22:0//15:0.26:0 [+10]	N/A
97.21	948.7	0.08	62:0	62	–	N/A
97.80	962.7	0.40	63:0	63	22:0//16:0.25:0 [+9]	N/A
98.19	976.7	0.20	64:0	64	–	N/A
98.77	962.7	0.06	63:0	63	–	N/A
99.30	976.7	0.30	64:0	64	22:0//16:0.26:0 [+8]	N/A
99.78	990.7	0.12	65:0	65	–	N/A
100.30	976.7	0.05	64:0	64	–	N/A
100.86	990.7	0.09	65:0	65	–	N/A
101.70	990.7	0.03	65:0	65	–	N/A

* A full version of this table can be found in the Supplementary Information (Table S2).

^a The numbers in brackets indicate the number of additional identified 1,2-DDE; see the Supplementary Information (Table S2) for their structures.

^b Based on the MS/MS of $[M+C_3H_5N]^+$; the double-bond positions are listed in the order of the corresponding peak intensities. The double bond positions identified from the ion trap CID spectra (based on the α -ions) are given as unformatted text and the double-bond positions identified from the quadrupole HCD spectra (based on the ω -ions) are displayed in italics; the double-bond positions identified in both types of spectra are bolded.

another fragmentation reaction. The MS³ spectra showed the elimination of diols (a neutral loss of diene) and the resulting fragments were protonated second fatty acids accompanied by their dehydration products ($[FA+H-H_2O]^+$ and $[FA+H-2H_2O]^+$) in the case of unsaturated species. By manual interpretation of the data, we

identified 2250 molecular species of 1,2-DDE in 141 chromatographic peaks. Although the separation conditions were optimized very carefully, the chromatographic peaks still represented mixtures with up to 61 identified molecular species of 1,2-DDE (with the same number of carbon atoms and double bonds, but differently

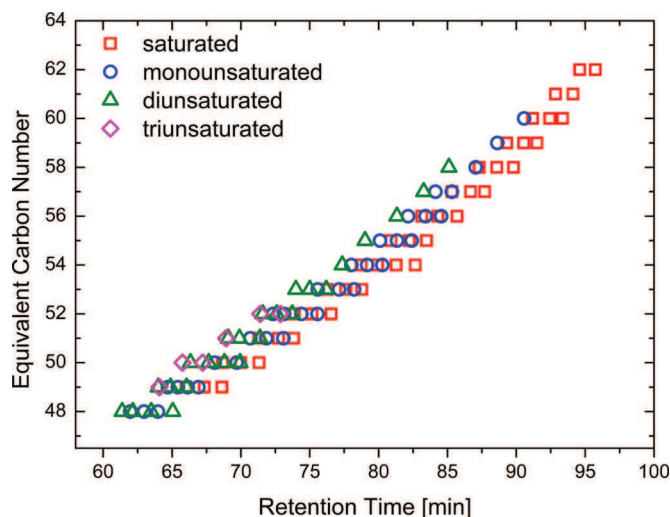


Fig. 7. The plot of calculated ECN values vs. retention times for 1,2-DDE identified in the vernix caseosa sample.

distributed among the chains). A short summary of the identified lipids is given in Table 1; for the full version with all 2250 species, please refer to the Supplementary Information (Table S2).

The molecular species of 1,2-DDE could not be quantified because of extensive co-elution and unavailability of standards. As lipid response factors depend on the number of double bonds and chain length [48], it was possible to make only a rough estimate of the real proportions based on relative peak areas. The peak areas used for the calculations were integrated in the full-scan chromatograms reconstructed for $[M+NH_4]^+$. In this way, we found that the peak area of all saturated 1,2-DDE corresponded to 30% of the total integrated signal. Monounsaturated, diunsaturated and triunsaturated lipids accounted for 49%, 18% and 3%, respectively. As the direct quantitative evaluation of the distribution of diol and acid chains among the identified 1,2-DDE species was not possible because of coelutions, we used a different approach based on counting their relative frequency of occurrence. Obviously, this way of counting systematically underestimated the most abundant chains and overestimated the least abundant ones. Nevertheless, it allowed us to identify the most abundant chains occurring in 1,2-DDE. The plots of the relative frequency of occurrence are shown in

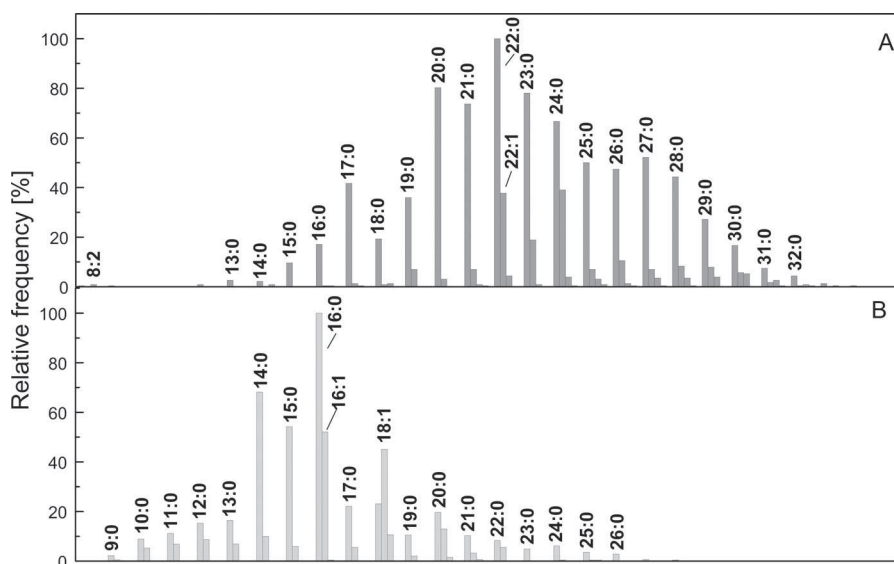


Fig. 8. The relative frequencies of occurrence for 1,2-diols (A) and fatty acids (B) in 1,2-DDE identified in the vernix caseosa sample.

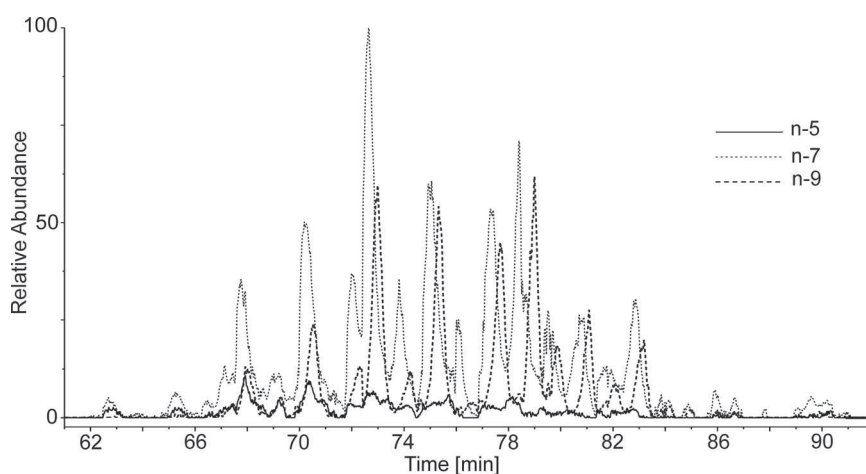


Fig. 9. The overlay plot of the chromatograms of vernix caseosa 1,2-DDE reconstructed for molecular species with the double bond in the positions $n-5$ (m/z 138.13; solid line), $n-7$ (m/z 166.16; dotted line) and $n-9$ (m/z 194.19; dashed line). Based on quadrupole HCD MS/MS data, the experimental conditions were the same as in Fig. 5 (the sample concentration was 50 mg/mL).

Fig. 8A (diols) and Fig. 8B (fatty acids). Diol chains appeared to be mostly saturated with 8–34 carbons and the distribution of their chain length had a maximum around C22:0 (Fig. 8A). Monounsaturated diols were also present, particularly C24:1, C22:1 and C23:1; diunsaturated diols were infrequent. The results were in agreement with literature data. In the total lipids of vernix caseosa, Nikkari [5] reported mostly saturated and branched C14–C26 diols; almost 95% of them contained 20–24 carbons, with C22 being by far the most abundant. These diols were also identified four years earlier by Kärkkäinen et al. [3]. Fu and Nicolaides [4] analyzed the diol diester fraction and found C20–C25 1,2-diols, mostly *iso*- and *anteiso*-branched. Our results confirmed these observations and additionally showed the presence of both shorter-chain (C8–C13) and longer-chain (C27–C34) 1,2-diols. As regards fatty acyls, we detected chains with 8–32 carbons, roughly in the same range as in the case of 1,2-diols. However, the most frequently occurring fatty acyl chains were noticeably shorter than those of 1,2-diols (Fig. 8B). The most frequently occurring acyls were saturated C14–C16 together with monounsaturated C16:1 and C18:1. The most significant doubly unsaturated acyl was C18:2. These results were in agreement with the report of Ansari et al. [19], who found straight-chain, *iso*- and *anteiso*-branched saturated acids and straight-chain monoenoic acids with 12–36 carbons. The most abundant acyls appeared to be C16:0 and C18 n -7, C18 n -9. Similar results were obtained earlier by Kärkkäinen et al. [3], who also showed the presence of C18:2 and C18:3. As regards the molecular species of 1,2-DDE in the vernix caseosa sample, their ECN values ranged between 48 and 65 with the maximum around 54–56 (Fig. S4). The most abundant 1,2-DDE were monounsaturated species combining a C22 diol and a C18:1 fatty acid together with a C16:0, C14:0 or C15:0 fatty acid (Table 1 and Table S2). The position of double bonds in the unsaturated chains was deduced from the MS² spectra of the [M+C₃H₅N]⁺ formed in the APCI source. Both ion-trap CID and quadrupole HCD data revealed double bonds in several positions within the chain in the chromatographically separated peaks. It is important to note that, without the separation of the molecular species, the double bond could not be assigned to individual 1,2-DDE. Neither was it possible to distinguish between the double bond in the acid and the diol chain. Ion-trap CID appeared to provide good-quality spectra even for low abundant compounds, but the interpretation was complicated by the presence of satellite fragments formed by cleavages of other neighboring bonds. Therefore, strict rules regarding ion abundances were applied to distinguish between signals of diagnostic fragments (α -ions) and their satellites to avoid false positive results. Consequently, the less frequently occurring double-bond positions were possibly undetected. The interpretation of the quadrupole HCD spectra was much more straightforward, as the formation of satellites was significantly lower. Unfortunately, very low abundant 1,2-DDE provided spectra of poor quality, likely because of ion-beam losses during the transfer of the precursors to the HCD cell and the products to the Orbitrap via C-trap. Nevertheless, both fragmentation techniques allowed for the localization of double bonds in moderately and highly abundant peaks of 1,2-DDE. The data showed that double bonds were located mostly in n -7 and n -9, less frequently in n -5 and other positions (Table 1 and Table S2). The quadrupole HCD data allowed us to make reconstructed chromatograms for each double-bond position. The overlay plot (Fig. 9) shows that the peak maxima were shifted, i.e. the retention times depended on the position of double bond. The retention times of n -9 peaks were typically higher than those of n -7, which was also consistent with the relative retention of 10:0//18:1 n -7/18:1 n -7 and 10:0//18:1 n -9/18:1 n -9 (see Fig. 5). The observed variations in the retention times caused by the double-bond positions also explain the broadening of the chromatographic peaks of unsaturated 1,2-DDE. Based on the integration of the peak area in the reconstructed chromatograms, the

relative proportions of the chains with different double-bond positions appeared to be as follows: n -7 (61%), n -9 (30%), n -5 (8%) and n -11 (2%). The double-bond positions determined here were in agreement with the structure of the 1,2-DDE fatty acyls reported previously. The most abundant unsaturated fatty acyls in the 1,2-DDE fraction identified by Ansari et al. [19] appeared to be C18:1 n -7, C18:1 n -9, C16:1 n -7, C18:1 n -10, C16:1 n -5, C16:1 n -10 and C20:1 n -7; fatty acyls unsaturated in other positions were detected as well. As regards 1,2-diols, to the best of our knowledge no information about the positions of double bonds in their chains has been published so far.

4. Conclusions

Using HPLC/APCI–tandem MS, we detected more than 2000 molecular species of 1,2-DDE. The actual number of distinct 1,2-DDE in vernix caseosa is probably much higher taking into account chains with various positions of double bonds and/or methyl branching as well as regioisomers not distinguished by our method. 1,2-DDE detected in this work contained 72 diols and 62 fatty acids differing in the number of carbons and double bonds. Theoretically, one could combine them into 276,768 different 1,2-DDE. As the number of detected lipids was about two orders of magnitude lower than it could theoretically be, we assume that the human skin in its early stages of development synthesizes 1,2-DDE non-randomly, preferring only certain combinations. The number of detected 1,2-DDE is still astonishing, especially when considering that 1,2-DDE constitute only a small part of vernix caseosa lipids and many other classes, likely with a similar degree of complexity, are biosynthesized as well. This work also points out the limitations of the current separation technology. Nowadays, one can hardly imagine a separation system, even multidimensional, capable of separating thousands of structurally similar molecular species, particularly lipids associated with the skin of mammals. A comprehensive characterization of the molecular species in the skin lipodome is a challenging task for scientists.

Acknowledgements

Financial support from the Czech Science Foundation (Project No P206/12/0750), the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO 61388963) and Charles University in Prague (Project SVV) is hereby acknowledged with appreciation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.075>.

References

- [1] C.C. Zouboulis, J.M. Baron, M. Bohm, S. Kippenberger, H. Kurzen, J. Reichrath, A. Thielitz, Frontiers in sebaceous gland biology and pathology, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 542–551.
- [2] T. Nikkari, Composition and secretion of the skin surface lipids of the rat; effects of dietary lipids and hormones, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 17 (1965) 1–140.
- [3] J. Kärkkäinen, T. Nikkari, S. Ruponen, E. Haahti, Lipids of vernix caseosa, *J. Invest. Dermatol.* 44 (1965) 333–338.
- [4] H.C. Fu, N. Nicolaides, The structure of alkane diols of diesters in vernix caseosa lipids, *Lipids* 4 (1969) 170–175.
- [5] T. Nikkari, The occurrence of diester waxes in human vernix caseosa and in hair lipids of common laboratory animals, *Comp. Biochem. Physiol.* 29 (1969) 795–803.
- [6] D.H.S. Horn, F.W. Hougen, Wool wax. 4. The constitution of the aliphatic diols, *J. Chem. Soc.* (1953) 3533–3538.
- [7] L.F. Fieser, W.-Y. Huang, B.K. Bhattacharyya, Cholesterol and companions. X. The diol fraction, *J. Org. Chem.* 22 (1957) 1380–1384.
- [8] N. Nicolaides, H.C. Fu, M.N.A. Ansari, Diester waxes in surface lipids of animal skin, *Lipids* 5 (1970) 299–307.

- [9] P.C. Schmid, Y. Wedmid, H.H.O. Schmid, 15-Methyl-1,2-hexadecanediol, a major constituent of hamster surface wax, *Lipids* 13 (1978) 825–827.
- [10] D. Yeung, S. Nacht, R.E. Cover, The composition of the skin surface lipids of the gerbil, *Biochim. Biophys. Acta* 663 (1981) 524–535.
- [11] B.V. Burger, D. Smit, H.S.C. Spies, C. Schmidt, U. Schmidt, A.Y. Telitsina, G.R. Grierson, Mammalian exocrine secretions XV. Constituents of secretion of ventral gland of male dwarf hamster, *Phodopus sungorus sungorus*, *J. Chem. Ecol.* 27 (2001) 1259–1276.
- [12] P.C. Bandi, H.H.O. Schmid, Configurational analysis of long-chain alkanediols, *Chem. Phys. Lipids* 17 (1976) 267–274.
- [13] P.C. Schmid, H.H.O. Schmid, Lipase hydrolysis of mammalian long-chain 1,2-alkanediol diesters. Nonrandom distribution of fatty acids, *J. Lipid Res.* 19 (1978) 894–898.
- [14] D.M. Sharaf, S.J. Clark, D.T. Downing, Skin surface lipids of the dog, *Lipids* 12 (1977) 786–790.
- [15] D.T. Downing, J.S. Lindholm, Skin surface lipids of the cow, *Comp. Biochem. Physiol. B* 73 (1982) 327–330.
- [16] T. Nishimaki-Mogami, K. Minegishi, A. Takahashi, Y. Kawasaki, Y. Kurokawa, M. Uchiyama, Characterization of skin-surface lipids from the monkey (*Macaca fascicularis*), *Lipids* 23 (1988) 869–877.
- [17] T. Nikkari, Comparative chemistry of sebum, *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 257–267.
- [18] K.A. Haubrich, Role of vernix caseosa in the neonate: potential application in the adult population, *AACN Clin. Issues* 14 (2003) 457–464.
- [19] M.N.A. Ansari, H.C. Fu, N. Nicolaidis, Fatty acids of the alkane diol diesters of vernix-caseosa, *Lipids* 5 (1970) 279–282.
- [20] C.-L.E. Yen, M. Monetti, B.J. Burri, R.V. Farese Jr., The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1502–1511.
- [21] K. Saito, M. Gamo, Distribution of diol waxes in preen glands of some birds. 3. The occurrence of 1,2-diols, *Comp. Biochem. Physiol.* 45 (1973) 603–611.
- [22] P.E. Kolattukudy, Structure and cell-free synthesis of alkane-1,2-diols of the uropygial gland of white crowned sparrow *Zonotrichia leucophrys*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 1376–1383.
- [23] J.S.S. Damsté, M. Dekker, B.E. van Dongen, S. Schouten, T. Piersma, Structural identification of the diester preen-gland waxes of the red knot (*Calidris canutus*), *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 381–384.
- [24] M.S. Dodova-Anghelova, C.P. Ivanov, On the composition and structure of diols from the skin wax of some apple varieties, *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* 22 (1969) 1039–1042.
- [25] C. Buschhaus, C. Peng, R. Jetter, Very-long-chain 1,2- and 1,3-bifunctional compounds from the cuticular wax of *Cosmos bipinnatus* petals, *Phytochemistry* 91 (2013) 249–256.
- [26] R. Wait, L. Carreto, M.F. Nobre, A.M. Ferreira, M.S. DaCosta, Characterization of novel long-chain 1,2-diols in *Thermus* species and demonstration that *Thermus* strains contain both glycerol-linked and diol-linked glycolipids, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6154–6162.
- [27] M.T.J. van der Meer, S. Schouten, S. Hanada, E.C. Hopmans, D.J.S. Sinninghe, D.M. Ward, Alkane-1,2-diol-based glycosides and fatty glycosides and wax esters in *Roseiflexus castenholzii* and hot spring microbial mats, *Arch. Microbiol.* 178 (2002) 229–237.
- [28] W. Johnson Jr., W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D. Liebler, J.G. Marks Jr., R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics, *Int. J. Toxicol.* 31 (2012) 1475–1685.
- [29] S. Behrens, A. Bleckmann, R. Kroepke, U. Meiring, J. Nielsen, Cosmetic O/W emulsion comprising 1,2-hexanediol, Patent US8084507 B2 (December 27, 2011).
- [30] J. Nielsen, A. Bleckmann, H. Argembeaux, M. Detert, S. Ruppert, H. Albrecht, J. Küther, A. Aechtner, S. Thompson, M. Köhler, Cosmetic preparation in the form of an oil-in-water emulsion containing 1,2-alkanediol(s), Patent EP1942864 A1 (July 16, 2008).
- [31] G. Schmaus, S. Lange, H. Joppe, Synergistic mixtures of 1,2-alkane diols, U.S. Patent US20050222276 A1 (October 6, 2005).
- [32] D. Greff, Cosmetic, dermatopharmaceutical or veterinary compositions for disinfecting human or animal skin, US patent 6123953 A (September 26, 2000).
- [33] A. Kobayashi, F. Okada, H. Okamoto, Antiseptic bactericides and cosmetics, drugs and foods containing the antiseptic bactericides, Patent WO2004028520 A1 (April 8, 2004).
- [34] S. Lange, G. Schmaus, Use of c10-c14-alkane-1,2-diols in the preparation of a composition for the prophylaxis and/or treatment of dermatophyte infections, Patent WO2008046796 A3 (June 12, 2008).
- [35] P.S. Shah, Antispasmodic 1,2-diols and 1,2,3-triols, Patent WO2013181084 A1 (December 5, 2013).
- [36] D. Redoules, S. Daunes-Marion, M.-F. Aries, Polyunsaturated fatty acid and diol ester as an anti-acne agent, U.S. Patent US8623916 B2 (January 7, 2014).
- [37] J.W. Finley, L.P. Klemann, A. Scimone, Long chain diol diesters as low calorie fat mimetics, U.S. Patent US5008126 A (April 16, 1991).
- [38] R. Míková, V. Vrkošlav, R. Hanus, E. Háková, Z. Hábová, A. Doležal, R. Plavka, P. Coufal, J. Cvačka, Newborn Boys, Girls differ in the lipid composition of vernix caseosa, *PLOS ONE* 9 (2014) e99173.
- [39] W.J. Baumann, J. Seufert, H.W. Hayes, R.T. Holman, Mass spectrometric analysis of long-chain esters of diols, *J. Lipid Res.* 10 (1969) 703–709.
- [40] D.T. Downing, Fatty acid composition of vernix caseosa, *Aust. J. Chem.* 16 (1963) 679–682.
- [41] V. Vrkošlav, M. Háková, K. Pecková, K. Urbanová, J. Cvačka, Localization of double bonds in wax esters by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2978–2980.
- [42] G. Liebisch, J.A. Vizcaino, H. Kofeler, M. Trotzmuller, W.J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M.J.O. Wakelam, Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1523–1530.
- [43] V. Vrkošlav, J. Cvačka, Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 244–250.
- [44] E. Kofroňová, J. Cvačka, V. Vrkošlav, R. Hanus, P. Jiroš, J. Kindl, O. Hovorka, I. Valterová, A comparison of HPLC/APCI-MS and MALDI-MS for characterising triacylglycerols in insects: species-specific composition of lipids in the fat bodies of bumblebee males, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3878–3884.
- [45] V. Vrkošlav, K. Urbanová, J. Cvačka, Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4184–4194.
- [46] B. Nikolova-Damyanova, Reversed phase HPLC: general principles and application to fatty acids and triacylglycerols, in: W.W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology – Four*, The Oily Press, Ayr, Scotland, 1997, pp. 193–251.
- [47] M. Záborská, V. Vrkošlav, J. Sobotníková, J. Cvačka, Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with accurate mass measurement, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 601–607.
- [48] M. Holčapek, M. Lísa, P. Jandera, N. Kabátová, Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1315–1333.