

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace metody přípravy a zpracování vzorku suché kapky krve  
pro stanovení mastných kyselin

Bc. Kristýna Štanclová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Štanclová**  
Osobní číslo: **C15630**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Optimalizace metody přípravy a zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení mastných kyselin**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Suchá kapka krve: výhody a nevýhody, využití v klinické analýze

Příprava vzorku suché kapky krve, možnosti použití interního standardu, možnosti skladování a stabilita analytů, vliv matrice (především hematokritu)

Možnosti extrakce analytů ze suché kapky krve (zaměření na mastné kyseliny)

Analytické možnosti stanovení mastných kyselin

Experimentální část:

Příprava vzorku suché kapky krve a její optimalizace

Zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení mastných kyselin a optimalizace postupu

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Lenka Andrlová**

Katedra biologických a biochemických věd

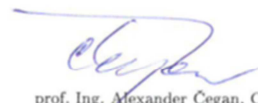
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně. Všechny literární a odborné zdroje, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu na konci této práce.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Kristýna Štanclová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a konzultance Mgr. Lence Andrlové za její ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala po celou dobu zpracování této práce. Dále poděkování patří mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia. Také bych ráda poděkovala Univerzitě Pardubice za poskytnuté vzdělání.

## **ANOTACE**

Tato práce je věnována optimalizaci metody přípravy a zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení vybraných mastných kyselin. Jsou zde shrnuty informace jak o suché kapce krve, tak i mastných kyselinách a možnostech jejich analýzy. Mastné kyseliny byly nejdříve derivatizovány na methylestery a poté analyzovány metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

suchá kapka krve, mastné kyseliny, plynový chromatograf, optimalizace

## **TITLE**

Optimization of dried blood spot sample preparation and handling in analysis of fatty acids

## **ANNOTATION**

This work is focused on optimization of dried blood spot sample preparation and handling in analysis of fatty acids. There is summarized information about both dried blood spot and the possibilities of fatty acids analysis. Fatty acids were derivatized to methyl esters fatty acids and then analyzed by gas chromatography with flame ionization detector.

## **KEYWORDS**

dried blood spot, fatty acids, gas chromatography, optimization

# OBSAH

ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1 Suchá kapka krve .....	13
1.1.1 Historie.....	13
1.1.2 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve .....	14
1.1.3 Využití v klinické chemii.....	14
1.1.4 Odběr vzorku .....	15
1.1.5 Vnitřní standard .....	15
1.1.6 Stabilita a skladování .....	17
1.1.7 Vliv matrice .....	19
1.1.8 Vliv hematokritu .....	21
1.1.9 Extrakce a derivatizace .....	23
1.2 Mastné kyseliny .....	24
1.2.1 Názvosloví mastných kyselin .....	26
1.2.2 Rozdělení mastných kyselin .....	26
1.2.3 Lipoperoxidace .....	27
1.3 Metody stanovení mastných kyselin .....	29
1.3.1 Derivatizace .....	29
1.3.2 Elektromigrační metody .....	31
1.3.3 Kapalinová chromatografie.....	32
1.3.4 Plynová chromatografie .....	33
2 CÍL PRÁCE .....	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
3.1 Materiál .....	36
3.1.1 Chemikálie .....	36
3.1.2 Pracovní roztoky .....	38

3.1.3	Pomůcky a přístroje .....	39
3.1.4	Vzorky .....	40
3.2	Stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.....	40
3.2.1	Příprava vzorků.....	40
3.2.2	Podmínky analýzy plynovou chromatografií.....	41
3.2.3	Analytické parametry metody.....	42
3.2.4	Zpracování výsledků.....	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	44
5	ZÁVĚR .....	50
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	51
7	PŘÍLOHY .....	61



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 <i>Schéma pěti možných způsobů aplikace IS</i> .....	17
Obrázek 2 <i>Struktura celulosy</i> .....	20
Obrázek 3 <i>Schéma možných způsobů extrakce</i> .....	24
Obrázek 4 <i>Mechanismus lipidové peroxidace</i> .....	28
Obrázek 5 <i>Reakční mechanismus BHT</i> .....	29
Obrázek 6 <i>Vliv pozice terčíku</i> .....	46
Obrázek 7 <i>Optimalizace teploty derivatizace</i> .....	47
Obrázek 8 <i>Volba organického rozpouštědla</i> .....	48
Tabulka 1 <i>Přesnost metody pro stanovení MK</i> .....	49

## SEZNAM ZKRATEK

2D	dvourozměrná (z angl. two dimensional)
ACP	protein přenášeující acyl (z angl. acyl carrier protein)
BGE	základní elektrolyt (z angl. background electrolyte)
BHT	butylhydroxytoluen
CE	kapilární elektroforéza (z angl. capillary electrophoresis)
CMV	cytomegalovirus
DBS	suchá kapa krve (z angl. dried blood spot)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	dithiothreitol
ECD	detektor elektronového záchytu (z angl. electron capture detector)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EIS	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
FABP	vazebný protein pro mastné kyseliny (z angl. fatty acid binding protein)
FAME	methylestery mastných kyselin (z angl. fatty acid methyl esters)
FID	plamenově ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
FTIR	detektor s Fourierovou transformací (z angl. Fourier-transformation infrared spectroscopy)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GSH	gluthathion
HCT	hematokrit (z angl. hematocrit)
HCV	virus hepatitidy C (z lat. hepatitis C virus)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (z angl. hydrophilic interaction liquid chromatography)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. human immunodeficiency virus)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
HPTLC	vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě (z angl. high-performance thin layer chromatography)
HSV	lidský herpetický virus (z lat. herpes simplex virus)

HTLV	lidský T-lymfotropní virus (z angl. human T-lymphotropic virus),
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (z angl. long chain fatty acids)
LDL	lipoproteinů o nízké hustotě (z angl. low-density lipoprotein)
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection).
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (z angl. medium chain fatty acids)
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl- <i>tert</i> -butylether
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (z angl. monounsaturated fatty acids)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
NPD	dusík-fosforový detektor (z angl. nitrogen-phosphorus detector)
NS	novorozenecký screening
PCI-IS	post-kolonová infuzní IS metoda (z angl. post-column infused-internal standard)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acids)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
Rf	odezvodový faktor (z angl. response factor)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RT-PCR	reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce (z angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SFA	nasyčené mastné kyseliny (z angl. saturated fatty acids)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. short chain fatty acids)
UV	ultrafialová (z angl. ultraviolet)
UV/Vis	ultrafialová/viditelná (z angl. ultraviolet/visible)
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (z angl. very long chain fatty acids)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)

## ÚVOD

Myšlenka odběru plné krve na filtrační papír, známa jako technika suché kapky krve (DBS, z angl. dried blood spot) vznikla na počátku 60. let 20. století. V současnosti se stále používá jako standardní vzorkovací metoda v programu novorozeneckého screeningu po celém světě. Ve srovnání s konvenčním způsobem odběru vzorku krve nabízí mnoho výhod, jako například jednoduchý a méně invazivní odběr, pro který postačí velmi malé množství krve. Díky unikátním vlastnostem tohoto typu vzorku se také snižuje riziko přenosu infekce. Tyto a mnohé další výhody jsou zodpovědné za stále rostoucí zájem o DBS techniku i v jiných oborech. Zejména studie zahrnující velký počet vzorků tuto metodu popularizují. Technika DBS si s vývojem nových citlivých analytických metod našla uplatnění také v oblasti terapeutického monitorování léčiv, diagnostice infekčních onemocnění či v metabolomice. Do budoucna by mohla být využita jako alternativa ke klasickému odběru krve, či monitorování metabolismu pacientů s různými onemocněními (např. *diabetes mellitus*).

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Suchá kapka krve

### 1.1.1 Historie

První použití vzorku krve odebraného na papírové celulózové karty je připisováno Ivaru Christianu Bangovi (1869-1918), který je považován za otce moderní klinické mikroanalýzy. V roce 1913 změřil hladinu glukosy v eluátu DBS a později Kjeldahlovou metodou otestoval stejný typ vzorku na přítomnost dusíku [1, 2]. Následně tento způsob odběru vzorku použilo ve svých studiích několik vědců, ale až v roce 1963 jej proslavil profesor Robert Guthrie z Univerzity v Buffalu ve státě New York, který vyvinul mikrobiologickou metodu stanovení fenylalaninu v DBS. Takzvaný Guthrieho test je založen na kompetitivní inhibici. Terčík DBS je umístěn na povrch agaru obsahující bakterie *Bacillus subtilis* a inhibitor  $\beta$ -2-thienylalanin, který zabraňuje bakteriálnímu růstu. V přítomnosti velkého množství fenylalaninu dochází k překonání inhibice, což umožňuje růst bakterií. Po inkubaci se hodnotí průměry růstových zón, které jsou přímo úměrné koncentraci fenylalaninu ve vzorku. Díky jednoduchosti, spolehlivosti a nižším nákladům této metody, se v roce 1965 začala používat pro screening fenylketonurie u novorozenců a během několika let se rozšířila do celého světa [3-5]. Přestože se vyšetření novorozeneckého screeningu (NS) dnes provádí už na jiném principu, je DBS stále standardním vzorkem pro včasné odhalení vrozených metabolických poruch u novorozenců. Od roku 1975 se NS fenylketonurie začal provádět i v České republice [6].

Poprvé byla hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) v rámci DBS techniky použita v roce 1976 pro kvantifikaci volných mastných kyselin. O deset let později našla MS ve spojení s plynovou chromatografií (GC, z angl. gas chromatography) uplatnění v analýze malých těkavých molekul [2, 7, 8]. V genomice našla DBS technika klinický potenciál v roce 1987, kdy mikroextrakcí DNA byla odhalena genetická mutace cystické fibrózy [9]. V druhé polovině 90. let 20. století se ve velké míře rozvíjely ionizační techniky, např. ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. electrospray ionization), a kapalinová chromatografie (LC, z angl. liquid chromatography) spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS), což s sebou přineslo významný technologický pokrok ve zpracování vzorku DBS a stanovení celé řady látek [7]. V roce 1993 byly poprvé ve vzorcích DBS stanoveny radioimunoanalytickou metodou narkotika [9].

### 1.1.2 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve

Hlavní výhodou DBS v porovnání s klasickým vzorkem plné krve, plazmy či séra je méně invazivní a bezbolestný odběr vzorku, což je vhodné zejména pro novorozence, děti nebo starší osoby. Zatímco při klasickém odběru krve ze žíly je vyžadováno kolem 5 ml plné krve, pro odběr vzorku DBS postačí velmi malé množství (10-20  $\mu$ l). Vzhledem k jednoduchosti provedení mohou být odběry realizovány prakticky kdekoli, např. v práci, domácnosti pacienta, a to i osobou, která není lékařsky školená. Díky tomu, že řada analytů obsažených v krvi, např. hormony, enzymy, léčiva, jsou v DBS při pokojové teplotě stabilní i po dobu několika týdnů, není nutné během skladování a transportu použít chladicí zařízení, což výrazně snižuje finanční náklady. Na rozdíl od plné krve nebo plazmy jsou vzorky DBS biologicky méně nebezpečné, neboť při sušení dochází k poškození kapsidy virů, např. cytomegaloviru (CMV), viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, z angl. human immunodeficiency virus), viru hepatitidy C (HCV, z lat. *hepatitis C virus*), lidského T-lymfotropního viru (HTLV, z angl. human T-lymphotropic virus), což snižuje riziko přenosu infekce při manipulaci se vzorkem. Z tohoto důvodu mohou být vzorky zaslány do laboratoře i běžnou poštou [2, 9-15]. Ze vzorku DBS může být analyzováno více než 50 analytů [11].

Nicméně, tato technika má také několik nevýhod, které musí být zváženy. Jednou z nich je vliv hematokritu, jehož hodnota ovlivňuje viskozitu krve a může způsobit její nehomogenní šíření ve filtračním papíru. Problémem také může být nestabilita některých analytů či jejich příliš nízká koncentrace. Proto jsou pro stanovení některých analytů ve vzorcích DBS vyžadovány dostatečně citlivé analytické metody. V této oblasti má tak významnou úlohu MS kombinovaná s LC nebo GC. Na druhou stranu malé množství vzorku minimalizuje množství chemikálií a šetří životní prostředí [9-15].

### 1.1.3 Využití v klinické chemii

Vzhledem k širokému spektru analytů s různými vlastnostmi a koncentracemi v různých biologických vzorcích je pro komplexní diagnostiku využívána řada analytických metod, např. GC, MS a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. high-performance liquid chromatography). Nejpoužívanější je HPLC s fluorimetrickou, MS nebo MS/MS detekcí, která využívá například uspořádání trojitého kvadrupólu. Tyto techniky přinesly nové možnosti v řadě oborů [7-10, 16]. V posledních letech popularita DBS neustále roste a může být použita pro detekci různých analytů, např. nukleových kyselin, proteinů, lipidů,

aminokyselin, terapeutických látek nebo stopových prvků [9]. Své hlavní uplatnění našla u NS pro diagnostiku dědičných poruch metabolismu a endokrinního systému, např. fenylketonurie, cystické fibrózy, hypotyreózy a kongenitální adrenální hyperplazie. V současné době se použití této techniky stalo alternativou při odběru vzorku a rozšířilo se i do dalších oborů, jako je např. terapeutické monitorování léčiv, genomika, metabolomika, epidemiologie a toxikologie. V oblasti mikrobiologie a virologie se DBS technika využívá např. u kvantitativní polymerázové řetězové reakci (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction) a reverzně-transkripční polymerázové řetězové reakci (RT-PCR, z angl. reverse transcription polymerase chain reaction), které požadují méně než 20 µl vzorku. Z DBS je možné také detegovat genetické mutace, které jsou zodpovědné za onemocnění, jako jsou cystická fibróza, syndrom fragilního X chromosomu, spinální muskulární atrofie, rakovina a talasemie. V oblasti terapeutického monitorování léčiv a toxikologii je DBS využívána k monitorování širokého spektra léčiv, např. antipyretik, antitusik, antimalarik nebo narkotik [2, 9, 10, 16-18].

#### **1.1.4 Odběr vzorku**

Před vlastním odběrem je potřeba, aby kůže na prstu, ušním lalůčku nebo na patičce novorozence byla dobře omytá a prokrvená. Místo odběru se očistí alkoholem a nechá se uschnout. Proveďte se drobná incize automatickou lancetou nebo sterilní jehlou do hloubky přibližně 2 mm. První kapka krve se otře sterilním tampónem. Jakmile se vytvoří další dostatečně velká kapka krve, lehce se přiloží filtrační papír screeningové kartičky a podrží se tak dlouho, dokud není viditelně nasáklý z obou stran krví. Prst, ušní lalůček nebo patička se nesmí mačkat, aby nedošlo k příměsi tkáňového moku. Důležité je, aby každý vyznačený kruh byl nasáknut pouze z jedné kapky krve. Kartička nesmí být nasáknuta plnou krví opakovaně. Poté se DBS karta nechá zaschnout v horizontální poloze při pokojové teplotě minimálně 3-4 hodiny. Nesmí se sušit na přímém slunci nebo při jiném zdroji tepla. Je nutné, aby se filtračního papírku nedotýkalo, aby nedošlo ke kontaminaci. Po zaschnutí se DBS kartička překryje krycím papírkem [19-21].

#### **1.1.5 Vnitřní standard**

Vnitřní standard (IS, z angl. internal standard) je chemická sloučenina, která není stanovovaný analyt, ale v daném množství se přidává ke všem vzorkům, standardům a slepému vzorku (blanku). Nesmí interagovat se stanovovaným analytem. Používá se

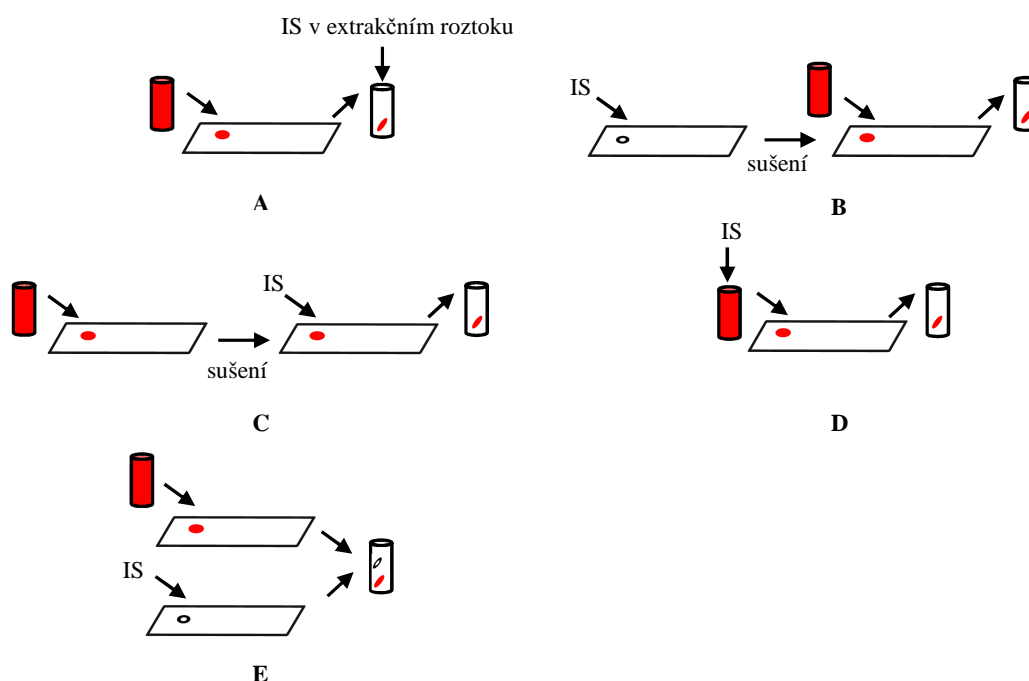
u metod, kde se předpokládá, že výtěžnost analytů bude nižší, než je 100 %. Při výběru IS vhodného pro analýzu musí být splněno několik kritérií. Zaprvé, nesmí do analýzy vnášet zbytečný šum. Zadruhé, nesmí během analýzy interferovat s ostatními analyty, např. při chromatografii musí být pík IS zcela oddělen od všech ostatních píků. Zatřetí, chování IS musí napodobovat chování analytu po celý čas zpracování vzorku. Začtvrté, množství IS přidaného ke vzorku musí být takové, aby signál IS byl přibližně stejný jako signál analyzované látky. Zapáté, pokud je v analýze přítomno více analytů s různými vlastnostmi, musí se použít více než jeden IS. Zašesté, IS musí být následně použit při vyhodnocování, jelikož koriguje ztráty, které mohou vzniknout při zpracování vzorku, např. při extrakci [22, 23].

V současné době jsou k dispozici tři druhy IS, strukturní analog stanovované látky, izotopem značený analyt ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ) nebo jiná vhodná chemická látka. Izotopem značený IS je vhodnou volbou, protože splňuje požadavky kladené na spolehlivost analýzy. Jeho velkou nevýhodou je ale vysoká pořizovací cena a možnost použití jen při metodách s MS detekcí. Z tohoto důvodu se nejčastěji používají látky, které mají podobnou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti, jako sledovaný analyt. V případě MS detekce je důležité také dbát na přítomnost funkčních skupin, kdy dochází ke změně rozložení náboje a rozdílné účinnosti ionizace [24].

Způsob přidání IS k vzorkům DBS je komplikovaný, proto se aplikace IS stala předmětem řady studií. V současné době je cílem nalézt techniku, která by nejlépe umožnila začlenění IS do DBS, ale zároveň by zachovala jednoduchost provedení. K dnešnímu dni existuje pět možných způsobů aplikace IS. Nejpoužívanější je přidání IS do extrakčního roztoku při prvním kroku extrakce (Obr. 1A). Velkou nevýhodou této techniky je, že IS není zcela integrován do matrice filtračního papíru a není tak extrahován spolu s analytem, tedy poskytuje jen omezené množství informací o sledované látce (nepoukazuje na ztráty při skladování či při extrakci analytu z DBS). Další často používanou možností je přidání IS na filtrační papír předtím, než bude nanášena krev (Obr. 1B). Na rozdíl od první možnosti je IS úplně integrován do matrice a extrahován spolu s analytem. Filtrační papír může ale pohlcovat vzdušnou vlhkost, což by mohlo při aplikaci vzorku způsobit vytěsnění IS ze středu DBS. Třetí možností je aplikace IS na už připravený vzorek DBS, kdy dochází k lepšímu začlenění IS do matrice vzorku (Obr. 1C). V praxi je ale tento proces náročný na provedení, protože IS by musel aplikovat sám pacient nebo by docházelo k časové prodlevě, než se vzorek dostane do laboratoře. Dvě výše uvedené techniky lze provést buď pipetováním, nebo sprejem. Přidání IS do plné krve před aplikací na filtrační papír je čtvrtou



možností, kdy IS je opět plně začleněn do matrice a následně extrahován spolu s analytem (Obr. 1D). Tato metoda může být provedena skleněnou kapilárou, jejíž vnitřní stěna je předem potažena IS, kdy po odběru vzorku se krev s IS promíchá a následně jsou společně nanášeny na filtrační papír [25]. Poslední ze zmíněných možností je IS a krev nanést každý zvlášť na samostatný papír a po vysušení je extrahovat společně (Obr. 1E). Nevýhodou jsou dva odlišné terčičky, čímž se zdvojnásobí počet vyseknutí a také předpoklad, že IS interaguje s matricí filtračního papíru, ale ne s krví. Variabilita výsledků poukazuje na skutečnost, že dva samostatné terčičky (zvlášť pro analyt a pro IS) nemohou být obecně použity v praxi. Rozdíly jak v pozici terčičku na filtračním papíru, tak v podmínkách extrakce, ale i charakteru sloučeniny, mohou mít nepředvídatelné vlivy [2, 8, 16, 25-27]



**Obrázek 1** Schéma pěti možných způsobů aplikace IS (upraveno podle [8])

### 1.1.6 Stabilita a skladování

Zajistit stabilitu analytů během vzorkování, přepravy, skladování a analýzy je velmi důležité pro správné výsledky. Jak už bylo zmíněno, výhodou DBS techniky je, že při uchovávání biologických vzorků není nutná přítomnost chladicího zařízení. Několik studií ukázalo, že po zaschnutí vzorku na filtračním papíru je mnoho analytů stabilních a nepodléhají degradaci. Nestabilita vzorku je často způsobena enzymatickou aktivitou, např. hydrolýzou esterů, deaminací, dealkylací, hydroxylací, fosforylací, které jsou až desetkrát pomalejší, pokud teplota klesne z 22 °C na 0 °C [2, 8, 13, 16]. Bylo zjištěno, že některé biomarkery jsou

při pokojové teplotě stabilní několik dnů, měsíců i let, např. určité drogy, léčiva, nukleové kyseliny nebo vitamin D. Přesto DBS nelze považovat za univerzální řešení skladování, protože ne všechny analyty jsou stabilní, např. enzymy při vyšších teplotách degradují [28].

Existuje několik přístupů, které mají za cíl zlepšit stabilitu analytů, mezi něž patří regulace teploty a vlhkosti, zlepšení vlastností filtračního papíru, použití antikoagulancií nebo snížení pH. Teplota a vlhkost hrají při skladování důležitou úlohu. Vzorky by proto neměly být uchovány v hermeticky uzavřených nádobách, kde by docházelo k akumulaci tepla a vlhkosti, což by způsobovalo degradaci některých analytů. Problém by mohl nastat při zaslání DBS vzorků do laboratoří poštou, protože v poštovních schránkách se teplota může vyšplhat i na 60 °C. Vlhkost může zase indukovat bakteriální růst a pozměnit účinnost extrakce. Z tohoto důvodu by DBS karta měla být skladována v plastovém sáčku s vysoušedlem. Stabilitu je možné zvýšit i skladováním vzorků při 4 °C, - 20 °C nebo - 80 °C. Chemicky ošetřené DBS karty, jejichž cílem je lyzovat buňky, denaturovat proteiny a inhibovat bakteriální růst, mohou také přispět k stabilizaci jinak nestabilních sloučenin [2, 8, 11, 13, 16].

Znalost stability látky našeho zájmu je pro použití DBS techniky klíčová. Např. stabilita protilátek IgG, IgM a IgA se liší při různých podmínkách. Při pokojové teplotě a při 2 až 8 °C jsou v DBS vzorku stabilní po dobu 14 dnů, ale při teplotě 37 °C jenom 3 dny [29]. Dalším příkladem jsou protilátky proti viru Epstein-Barrové, které jsou při pokojové teplotě stabilní až 8 týdnů, ale po jednom týdnu skladování při 37 °C se jejich stabilita zhoršuje [13]. Koncentrace C-reaktivního proteinu významně klesá po 3 dnech skladování při 37 °C, ale při 22 °C je tento protein akutní fáze stabilní po dobu 2 týdnů [13]. Hlavní intracelulární antioxidant, glutathion (GSH, redukovaná forma), podléhá v zásaditém prostředí neenzymatické autooxidaci, a proto během několika minut po odběru krve dochází k poklesu jeho hladiny. Při odběru DBS je možné filtrační papír předem ošetřit redukčním činidlem, např. dithiothreitem (DTT), a tak vyřešit problém se stabilitou GSH. Po zaschnutí krve je GSH stabilní při -20 °C po dobu několika měsíců [30, 31]. Aktivita lysosomálních enzymů, jako jsou glukosidasa, galaktosidasa, glukocerebrosidasa, sfingomyelinasa, galaktocerebrosidasa, je silně ovlivněna podmínkami přípravy a skladováním DBS vzorku. Aktivita uvedených enzymů prudce klesá při 37 °C a vysoké vlhkosti, zatímco při -20 °C či 4 °C jsou stabilní až po dobu 6 měsíců [32]. Co se týká aminokyselin, tak ty jsou prakticky stabilní. Nicméně hladiny sarkosinu, ornithinu a serinu klesají už po 1 dnu skladování při pokojové teplotě, zatímco hladina argininu se naopak zvyšuje [8]. Acylkarnitiny jsou při pokojové teplotě v důsledku hydrolýzy stabilní jenom 2 týdny, ale při -18 °C je možné

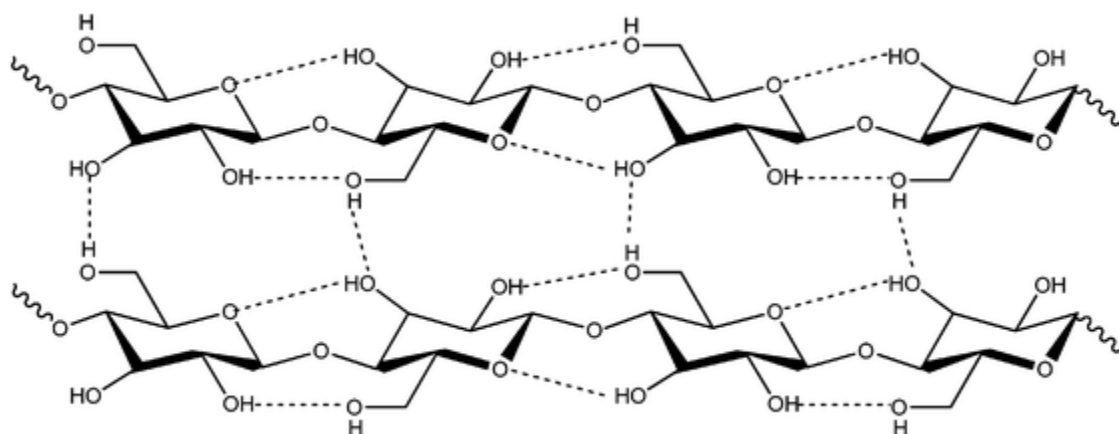
vzorky uchovávat až po dobu 330 dní [16]. Thyreotropní hormon a tyroxin jsou stabilní po dobu 30 dní při 4 °C či -20 °C, ale jsou nestabilní při 37 °C [33]. Z nukleových kyselin je DNA stabilnější než RNA, protože se na druhém uhlíku D-ribosy nenachází -OH skupina. Obě zmíněné nukleové kyseliny jsou dlouhodobě stabilní při -20 °C až -80 °C, ale pokud jsou skladovány při teplotě 30 °C, tak už během 2 týdnů dochází k progresivním ztrátám, především méně stabilní RNA. Genomová DNA uchovávaná za tropických podmínek (28 °C a 73% vlhkost) je stabilní několik let, ale po 10 letech skladování její kvalita pro amplifikaci DNA fragmentů výrazně klesá [34,35]. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, z angl. polyunsaturated fatty acids) jsou během skladování náchylné k lipoperoxidaci. Aby se zabránilo jejich degradaci, tak se na filtrační papír aplikuje butylhydroxytoluen (BHT). Pokud jsou PUFA skladovány při pokojové teplotě bez přítomnosti BHT, tak už po 1 až 3 dnech dochází k výraznému poklesu jejich hladin, zatímco s přídavkem BHT zůstávají za volného přístupu vzduchu stabilní i 21 dní. V případě zamezení přístupu kyslíku (uchování ve vakuovaných polypropylenových sáčkách) může být jejich stabilita prodloužena až na 8 týdnů [36].

### 1.1.7 Vliv matrice

Vliv matrice je definovaný jako kombinovaný účinek všech složek, s výjimkou cílového analytu [37]. V případě MS lze matricové efekty vysvětlit jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou, které vznikají při soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem [24, 38, 39]. Při chromatografii se vliv matrice může projevit koelucí jejich složek v retenčním čase sledovaného analytu [40]. V případě, že analytická metoda je citlivá na složky matrice, tak získaná data nemusí být spolehlivá. Zdrojem matricových efektů jsou endogenní a exogenní složky obsažené v biologických vzorcích. Mohou to být aditiva mobilní fáze, plastový materiál, antikoagulanty, fosfolipidy, soli, sacharidy, aminy, močovina a další komponenty. Z tohoto důvodu je odstranění nežádoucích složek matrice důležité, protože tyto látky mohou negativně ovlivňovat některé analytické parametry, jako např. schopnost detekce, přesnost a správnost [40, 41].

Filtrační papír pro aplikaci vzorku DBS je vyrobený z bavlněných vláken, jejichž chemickou podstatou je celulóza. Jedná se o polysacharid složený z několika monomerů D-glukosy. Glukosové podjednotky dlouhých polymerních řetězců celulózy interagují přes vodíkové vazby s dalšími polymerními řetězci celulózy. Tato vazba se také vyskytuje v rámci jednoho polymerního vlákna celulózy, mezi podjednotkami glukosy

(Obr. 2). V suchém stavu je polymer pevně vázán k dalším složkám celulosy, ale přidavek vody nebo jiných hydrofilních rozpouštědel způsobuje bobtnání. Z tohoto důvodu dochází k narušení vodíkové vazby mezi celulosovými vazbami, disperzi rozpouštědla do mezer a zvětšení objemu pórů. Nicméně, po vysušení se celuloza opět vrátí do původního stavu, ale už se zachycenými molekulami. Pokud jsou ve vodné matrici přítomné malé molekuly, mohou přes vodíkové vazby přímo interagovat s celulosou nebo zůstat rozpuštěné ve vodném rozpouštědle a vyplnit mezery ve filtračním papíru. Zvýšený počet akceptorů vodíkových vazeb umožňuje větší afinitu analytů k celulosě, což vede k méně efektivní extrakci [2, 16].



**Obrázek 2** Struktura celulosy (převzato z [42])

Filtrační papír musí splňovat přísná kritéria kontroly kvality. Požadovanými vlastnostmi jsou celistvost, žádné chemické vylouhování a minimální chromatografický efekt. Některé studie naznačují, že rozdíly mezi filtračními papíry od různých výrobců mohou existovat, zejména při extrémně nízkých či vysokých koncentracích sledovaného analytu či extrémních hladinách hematokritu (HCT, z angl. hematocrit). Při vysokých koncentracích analytů jsou účinky HCT výraznější než při nízkých koncentracích [43, 44]. Jiné studie uvádějí, že výsledky jsou porovnatelné bez ohledu na použitý filtrační papír [45]. Rozdíl v koncentracích stanovovaného analytu při použití různých filtračních papírů by pro zachování porovnatelnosti neměl být větší než 5 % [46].

Při analýze vzorků DBS může být výtěžnost extrakce některých látek nízká, protože mohou tvořit s endogenními složkami matrice komplexy. Například hemové železo vytváří s antibiotikem rifampicinem komplex. Pokud se do extrakčního roztoku přidá chelatační činidlo schopné vyvázat železo, tak se výtěžnost rifampicinu zvýší téměř na 100 %. Tímto činidlem může být např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid) nebo deferoxamin [41]. Každá matrice má unikátní složení,

proto i snaha minimalizovat nebo kompenzovat její vlivy, bude vyžadovat jedinečný přístup. Navíc každý typ analytické metody je složkami matrice ovlivněn jinak. Vzhledem k jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem karty pro odběr vzorku DBS mohou některé analyty při nízkých koncentracích zůstat na povrchu a při vyšších koncentracích proniknout hlouběji do filtračního papíru, což má za následek, že při nízkých koncentracích bude výtěžnost extrakce vyšší než při vyšších koncentracích, pokud nebude extrakce optimalizována. Ošetření filtračního papíru před aplikací vzorku krve umožní lepší deaktivaci adsorpčních míst, čímž se zjednoduší desorpce analytů. Nicméně, přítomnost matrice může při analýzách přinášet mnoho neočekávaných problémů [16, 41].

Matricové efekty není možné vždy zcela odstranit, ale jejich vliv možno alespoň eliminovat. Jedním z nejčastějších způsobů je analýza slepého vzorku, to znamená materiálu podobného charakteru jako má samotný vzorek, ale kde se předpokládá přítomnost stanovovaného analytu pod mezí detekce (LOD, z angl. limit of detection). Hodnota signálu slepého pokusu je následně odečítána od hodnoty signálu při měření vzorku s analytem [47]. K potlačení vlivu matrice je nutné používat kalibračních roztoků v dané matrici. Pokud ta není dostupná, používá se metoda standardních přídavek k vzorku s obsahem analytu [48].

### 1.1.8 Vliv hematokritu

HCT patří mezi základní parametry krevního obrazu a udává poměr objemu erytrocytů k celkovému objemu krve. Hodnota je vyjádřena v procentech. Odráží přenosovou kapacitu pro kyslík. Čím vyšší je hodnota HCT, tím více kyslíku se dostává k buňkám i při sníženém průtoku krve. V případě, že HCT je snížený, musí protéct tkáň více krve, aby dodala stejné množství kyslíku, a to znamená větší zátěž pro srdce. U zdravého muže činí hodnota HCT  $44 \pm 5 \%$ , u ženy  $39 \pm 4 \%$ . Hodnota HCT u novorozence je o 10 % vyšší, její pokles nastane v průběhu 28 dní po narození. Vyšší HCT se objevuje při dehydrataci, pobytu ve vyšších nadmořských výškách, kouření nebo primární polycytemii (*polycytemia vera*). Naopak snížená hodnota HCT se vyskytuje u anémií, infekcí nebo po podání infuzí [8, 10, 16].

Největším problémem DBS techniky, především z hlediska kvantitativní analýzy vzorku, je právě HCT. Ten ovlivňuje viskozitu krve, a tedy i její šíření na filtračním papíru při vzorkování. Z tohoto důvodu budou terčíky stejného průměru vyseknuté z DBS vzorků s různými hodnotami HCT obsahovat rozdílný objem krve. Proto v závislosti na fyzikálně-chemickém charakteru analytu a vlastnostech filtračního papíru DBS karty, může docházet ke zkreslení výsledků testu. Například ve vzorcích s nízkým HCT mají

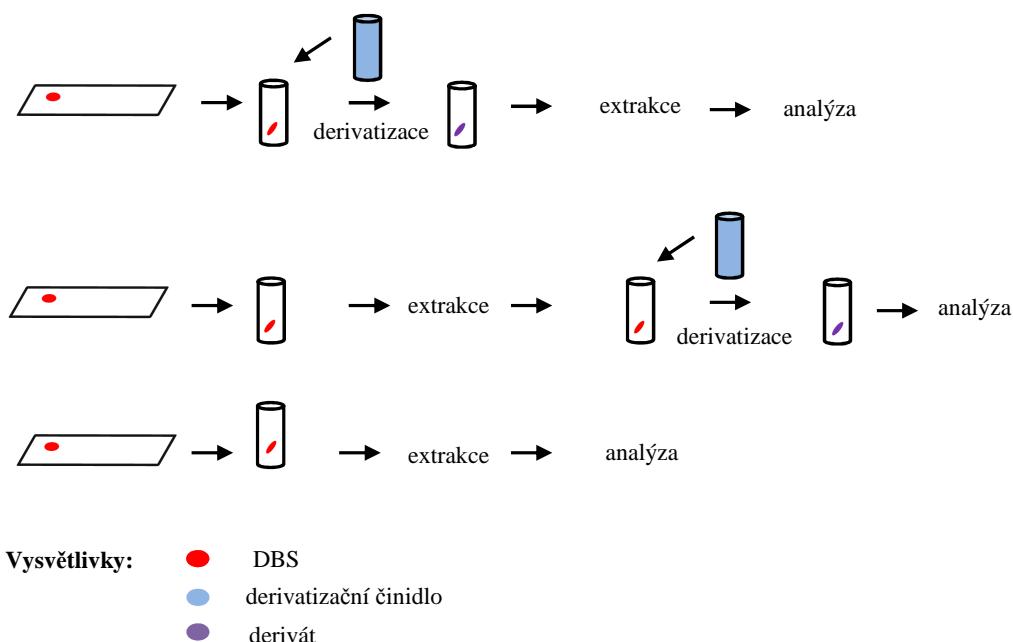
aminokyseliny a acylkarnitiny vyšší koncentraci na periférii terčiku než ve středu [49]. Kromě HCT může mít tedy významný vliv na kvantifikaci analytů v DBS vzorku i poloha vyseknutého terčiku. U pacientů s vysokou hladinou HCT je šíření krve na filtračním papíru snižené, což má za následek vznik menších krevních skvrn s vysokou koncentrací sledovaného analytu v porovnání se vzorkem krve s nízkým HCT, kdy dojde k většímu rozprostření krve na filtračním papíru, a tedy i k většímu rozptylu analytu na ploše DBS [11, 16, 19, 41].

V posledních letech bylo navrženo několik způsobů, které se zaměřují buď na minimalizaci, nebo zabránění vlivu HCT. Vyhnout se účinku HCT je možné, pokud se analyzuje celý terčík DBS. Eliminuje se jak nehomogenita krve, tak její kolísání v distribuci. Nicméně, tato možnost vyžaduje přesný objem krve aplikované na filtrační papír, což vyžaduje pipetování odebrané krve školeným pracovníkem. To přináší velký problém při odběru vzorku krve samotným pacientem [12, 50]. Jiným způsobem je použití modifikované DBS techniky, kdy se nejdříve z filtračního papíru vyrazí terčík o průměru několika milimetrů (cca 6 mm) a pak se aplikuje krev. Na rozdíl od klasické metody jsou pozorované pouze nepatrné systematické chyby (bias) v rozmezí  $\pm 3\%$ , které jsou nezávislé na hladině HCT a typu použitého filtračního papíru. Metoda vykazuje dobrou přesnost a správnost [12, 51]. Nejčastějším způsobem je ale zahrnutí různých hladin HCT přímo do validace metody. Používají se kalibrační standardy krve s hodnotou HCT nacházející se v blízkosti očekávaného mediánu cílové populace ( $\pm 15\%$ ) [50]. Hladinu HCT je možno u vzorků DBS určit stanovením hladiny draselného iontu. Intracelulární koncentrace je asi 35krát vyšší než extracelulární. Tento koncentrační rozdíl dobře koresponduje s počtem erytrocytů, tedy i s hladinou HCT a je prakticky neměnný. Tento způsob využívá např. post-kolonová infuzní IS metoda (PCI-IS, z angl. post-column infused-internal standard) s LC-ESI-MS, jejímž cílem je odhadnout a upravit odchylky objemu odebrané krve aplikované na DBS filtrační papír. Výhodou PCI-IS techniky je jednoduchost, rychlost, automatizace, ale také poskytnutí správných výsledků. Na druhé straně je destruktivní a časově náročná [12, 52, 53]. Další možností jak odhadnout HCT v DBS vzorku, je měření hladiny hemoglobinu difúzně-reflexní infračervenou spektrometrií. Tato metoda je kvantitativní, nedestruktivní, nevyžaduje žádnou speciální přípravu vzorku ani předem ošetřený filtrační papír, umožňuje predikovat HCT jak ve starých, tak v čerstvě připravených DBS vzorcích a poskytuje přijatelné výsledky [5].

### 1.1.9 Extrakce a derivatizace

Díky unikátním vlastnostem matrice DBS představuje extrakce z pevné fáze do kapaliny jeden z kritických kroků zpracování vzorku. Vzorky DBS jsou připravovány standardním postupem, kdy je ze středu krevní skvrny vyražen jeden nebo více terčků o průměru 3–6 mm. Během zpracování vzorku je důležité si uvědomit, zda je potřeba analyty derivatizovat pro zvýšení citlivosti a selektivity metody [2, 8, 16]. Pokud je tato úprava vzorku nutná, lze ji realizovat dvěma způsoby. Buď je derivatizační činidlo přidáno přímo k DBS vzorku a až po proběhlé reakci se provádí extrakce vzniklých derivátů, nebo v prvním kroku jsou analyty ze vzorku DBS extrahovány a až v dalším kroku derivatizovány [55-58]. Nicméně, derivatizace vzorku může být dalším zdrojem chyb nebo může vést k celkovému prodloužení analýzy. V případě, že derivatizace není potřeba, jsou analyty ze vzorku DBS pouze extrahovány (Obr. 3) [59, 60]. Volba extrakčního činidla závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech sledovaného analytu. V praxi je rozhodujícím faktorem polarita rozpouštědla, která musí odpovídat polaritě extrahované látky. Zvolené extrakční rozpouštědlo musí být dostatečně silné, aby přerušilo vazby analytu s matricí DBS vzorku. [41]. Pro zvýšení efektivity extrakce může být cílová látka extrahována za mírného třepání, vortexování nebo použitím ultrazvuku [16]. Pro malé molekuly se nejčastěji používají vodou mísitelná organická rozpouštědla, jako např. methanol, acetonitril, směsi vody a těchto rozpouštědel v různém poměru nebo pufry. Tato činidla jsou vhodná i pro extrakci mastných kyselin (MK) [61]. Voda snižuje interakci mezi hydroxylovými skupinami celulosy a cílovým analytem. Její množství je voleno na základě maximální extrakční výtěžnosti. Čím vyšší je obsah vody, tím více krevních buněk a jiných endogenních složek se vyloučí z DBS vzorku, což umožňuje větší možnosti projevu matrice. Naopak použití čistých organických rozpouštědel může mít za následek nižší účinnost extrakce. Pro zlepšení účinnosti se do extrakčního roztoku mohou přidat látky upravující hodnotu pH, soli a další látky v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu [2, 8, 9, 16]. Do vodného rozpouštědla se mohou také přidat i povrchově aktivní látky, např. Triton-X-100, Tween nebo chelatační činidlo, jako je EDTA, a to především za účelem úplné disociace matrice z filtračního papíru [62, 63]. Nicméně, přítomnost povrchově aktivních látek může ve výsledné matici vést k nežádoucí iontové supresi u LC-MS/MS metod. Pro extrakci analytů z DBS se mohou používat také vodou nemísitelná organická rozpouštědla, např. methyl-*tert*-butylether (MTBE), ethylacetát, chloroform, hexan a dichlormethan [2, 8, 64]. Na trhu jsou také k dispozici komerční kity pro extrakci nukleových kyselin [65, 66].

Extrakce analytů ze vzorku DBS může probíhat v on-line nebo off-line zapojení. Off-line systém představuje manuální postup zpracování vzorku. Je jednoduchý, vhodný pro větší počet vzorků, finančně méně nákladný, protože na rozdíl od on-line systému nevyžaduje žádné dodatečné přístrojové vybavení. Nicméně, je časově náročný, pracný, s velkou spotřebou organických rozpouštědel. Tradiční off-line metody využívající srážení proteinů nebo extrakci kapalina-kapalina a jsou obtížně automatizovány, proto se v současné době pro přípravu vzorku k analýze vyvíjí mnoho on-line technik, které eliminují výše uvedené nedostatky. Tento přístup je plně automatizovaný a poskytuje řadu výhod, jako např. rychlost, eliminaci manuálního vyražení terčíku, snížení množství nebezpečného odpadu, což je přínosné pro životní prostředí, lepší účinnost přípravy vzorků, vyšší citlivost, specifitu, selektivitu analýzy a minimální ztráty analytu, na druhou stranu je omezený na počet vzorků [2, 8, 16, 67, 68].



**Obrázek 3** Schéma možných způsobů extrakce

## 1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) tvoří hlavní složku lipidů. Mají strukturální, zásobní, mechanickou a tepelnou funkci. Dále jsou prekurzory důležitých látek, např. prostaglandinů, tromboxanů, leukotrienů, přičemž jejich příjem je nutný pro správný vývoj centrálního nervového systému, srážlivost krve a také ovlivňují bolest či zánět. Jsou to karboxylové kyseliny s alifatickým řetězcem, nejčastěji se sudým počtem uhlíkových atomů (4 až 26). Jejich obecný zápis je RCOOH, kde R představuje uhlovodíkový zbytek. Mají amfipatickou strukturu, což znamená, že mají hydrofobní i hydrofilní část. Čím je mastná kyselina delší, tím více se projevují její



hydrofobní vlastnosti a tím méně je rozpustná ve vodě [69, 70]. Přítomnost dvojně vazby v konfiguraci *cis* významně mění tvar molekuly, zatímco vazba v poloze *trans* nemá na vzhled molekuly výraznější vliv. Přirozeně se poloha dvojně vazby vyskytuje v *cis* konfiguraci. Na délce řetězce, počtu a izomerii dvojných vazeb závisí mnohé fyzikálně-chemické vlastnosti MK [69-72]. MK se v přírodě obvykle vyskytují v esterifikované formě. Některé živočišné druhy nejsou schopny při syntéze MK zavést dvojnou vazbu za devátý uhlík. Z tohoto důvodu člověk není schopen syntetizovat kyselinu linolovou a  $\alpha$ -linolenovou, které jsou proto označeny jako esenciální MK a musí být přijímány potravou. Známé jsou také podmíněně esenciální MK, kam se řadí kyselina palmitolejová, laurová a  $\gamma$ -linolenová. Neesenciální MK, jako např. kyselina laurová, myristová, palmitová, stearová či olejová, mohou být syntetizovány v organismu a nejsou nezbytnou součástí potravy [69, 70, 73]. Vstupní látkou pro syntézu MK je acetyl-CoA, který je tvořen např. oxidací pyruvátu v mitochondriální matrix. Vnitřní mitochondriální membrána je ale pro acetyl-CoA nepropustná, a proto se musí do cytoplazmy transportovat ve formě citrátu. Ten je v cytosolu štěpen za katalýzy ATP-citrátlyasou na oxalacetát a acetyl-CoA, který je karboxylován za katalýzy acetyl-CoA-karboxylasou na malonyl-CoA. Vlastní syntéza MK probíhá cyklicky za katalýzy synthasy MK, což je multienzymový komplex skládající se ze dvou polypeptidových monomerů, přičemž každý z nich obsahuje sedm enzymů a protein přenášející acyl (ACP, z angl. acyl carrier protein). Cyklus začíná přenesením acetyl-CoA na -SH skupinu cysteinu, který je katalyzován acetyltransacylasou. Dále je malonyl-CoA přenesen na -SH skupinu fosfopantetheinu za katalýzy malonyltransacylasou, vzniká acetyl(acyl)-malonyl enzymový komplex. Při syntéze dochází k postupné kondenzaci a redukci dvouhlíkatých a tříhlíkatých prekurzorů. Řetězec MK se vždy prodlužuje o dva uhlíky. V závěrečném kroku vzniká palmitát. MK s vyšším počtem uhlíků se vytvářejí při procesu prodlužování (elongaci) v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondriích. Za katalýzy enzymů desaturas jsou syntetizovány MUFA, kdy vznikají dvojně vazby za devátým uhlíkem od karboxylového konce. Například desaturací kyseliny stearové (18:0) vzniká kyselina olejová (18:1 n-9). Jelikož savci nemají enzymy katalyzující tvorbu dvojně vazby za devátým uhlíkem mastné kyseliny, musí se nové dvojně vazby zavádět už mezi existující dvojnou vazbou a karboxylovou skupinou. Mohou syntetizovat pouze omega-9-PUFA kombinací elongace a desaturace řetězce MK [74-76].

Neesterifikované MK jsou v plazmě vázány na albumin a v buňce se váží buď na vazebný protein pro MK (FABP, z angl. fatty acid binding protein), nebo na protein s označením FAT/CD36. Dříve než jsou MK katabolizovány, musí být nejprve aktivovány za katalýzy

acyl-CoA-synthetasou. Aktivovaný acyl-CoA s dlouhým řetězcem se uvolňuje do cytosolu, ale není schopen proniknout přes vnitřní mitochondriální membránu do mitochondriální matrix, neboť je pro něj nepropustná. Proto je transportován jako acyl-karnitin. K oxidaci MK dochází na  $\beta$  (C3) atomu uhlíku, proto se celý katabolický děj nazývá  $\beta$ -oxidace. Jedná se o metabolický sled čtyř reakcí, což jsou dehydrogenace, hydratace, dehydrogenace a thiolysa. Jednotlivé kroky reakce jsou katalyzované čtyři enzymy, kterými jsou acyl-CoA-dehydrogenasa (kofaktor  $FAD^+$ ), enoyl-CoA-hydratasa, L-3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa (kofaktor  $NAD^+$ ) a  $\beta$ -thiolasa. Z molekuly acyl-CoA jsou odštěpeny pokaždé dva uhlíky ve formě acetyl-CoA, který následně vstupuje do citrátového cyklu. Tento děj probíhá pouze za aerobních podmínek a vzniklé redukované koenzymy jsou využity v dýchacím řetězci [74-76].

### 1.2.1 Názvosloví mastných kyselin

Systematické názvosloví MK je odvozeno od uhlovodíku se shodným počtem uhlíku, kde koncovka -ová spolu se slovem kyselina dává jméno příslušné MK. Pro názvy většiny MK se používají triviální názvy, které jsou odvozeny např. od materiálů, ze kterých byly poprvé izolovány. Číslování začíná vždy od karboxylového uhlíku, kterému je přiřazeno číslo 1, další atom uhlíku v řetězci je číslo 2 (někdy označovaný jako  $\alpha$ -uhlík), následuje uhlík číslo 3 (nebo také  $\beta$ -uhlík), atd. Uhlík koncového methyly se označuje jako n- nebo  $\omega$ -uhlík. Pozice dvojných vazby je po formální stránce označena jako  $\omega$ -3, je-li na třetím uhlíku,  $\omega$ -6, je-li na šestém, a  $\omega$ -9, je-li na devátém uhlíku od  $\omega$  uhlíku. Takto jsou klasifikovány 3 základní skupiny MK, které známe pod označením  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 a  $\omega$ -9. Z hlediska dalších vlastností je dobré uvést, v jaké prostorové konfiguraci se dvojně vazby nacházejí, zda v *cis* nebo *trans*. Obecný zápis MK je CN:M n-X, kde CN udává počet uhlíků, M počet dvojných vazeb a X polohu dvojně vazby od koncového methyly (n), např. zápis kyseliny olejové tak je C18:1 n-9 [69, 75].

### 1.2.2 Rozdělení mastných kyselin

Podle délky řetězce lze MK dělit na MK s krátkým řetězcem (SCFA, z angl. short chain fatty acids), středně dlouhým řetězcem (MCFA, z angl. medium chain fatty acids), dlouhým řetězcem (LCFA, z angl. long chain fatty acids) a velmi dlouhým řetězcem (VLCFA, z angl. very long chain fatty acids). Na základě přítomnosti dvojných vazeb v molekule MK, se dělí

na nasycené MK (SFA, z angl. saturated fatty acids), mononenasycené MK (MUFA, z angl. monounsaturated fatty acids) a PUFA [69, 70].

SFA v řetězci neobsahují dvojnou vazbu. Jejich nadměrná konzumace má neblahý vliv na hladinu cholesterolu, zvyšují insulinovou rezistenci, riziko kardiovaskulárních chorob a obezity. Do této kategorie patří řada známých MK, jako např. kyselina máselná, laurová, myristová a palmitová [69, 70, 77].

MUFA ve svém řetězci obsahují pouze jednu dvojnou vazbu, nejčastěji v konfiguraci *cis*. Tyto MK zrychlují odbourávání lipoproteinu o nízké hustotě (LDL, z angl. low-density lipoprotein) a snižují hladinu cholesterolu v krvi. Naopak MK s konfigurací *trans* hladinu cholesterolu zvyšují, a tím i riziko aterosklerózy. Nejznámějšími zástupci jsou kyselina olejová, palmitolejová, elaidová a eruková [69, 70, 77].

PUFA mají ve svém řetězci více než jednu dvojnou vazbu. Do této skupiny patří zejména esenciální mastné kyseliny, např. kyselina linolová,  $\gamma$ -linolenová,  $\alpha$ -linolenová, arachidonová, klupadonová, eikosapentaenová a dokosaheptaenová. Tyto MK hrají významnou úlohu např. v těhotenství, kdy mají vliv jak na porodní váhu, tak na vývoj mozku plodu. Dále zlepšují kognitivní funkce centrálního nervového systému, regenerují cévní endotel, zároveň mají protizánětlivý, protrombotický, aterogenní, antiarytmický a hypolipidemický účinek, potlačují proliferaci, angiogenezi a invazivní růst nádoru, a rozvoj metastáz [69, 70, 77].

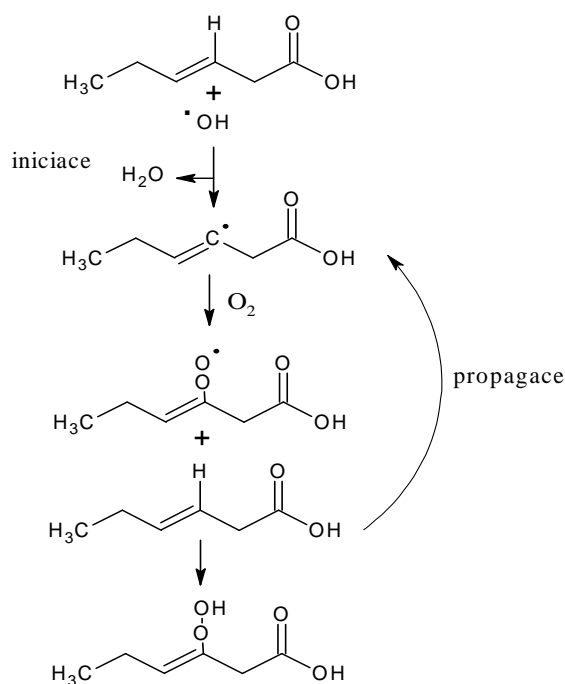
### 1.2.3 Lipoperoxidace

Lipoperoxidace se považuje za škodlivou, neboť jejím působením dochází k strukturálním změnám v biologických membránách a lipoproteinech. Tento děj je možné vysvětlit jako radikálovou řetězovou reakci, při které dochází k oxidačnímu poškození PUFA vlivem volných radikálů a kyslíku za vzniku hydroperoxidů. PUFA ve své struktuře obsahují methylenovou (-CH<sub>2</sub>-) skupinu, která obklopena dvojnou vazbou je cílovým místem pro atak volnými kyslíkovými radikály. Základem buněčné membrány je lipidová dvojvrstva, která se skládá z amfipatických molekul, při čemž hydrofobní část směřuje do středu dvojvrstvy a hydrofilní skupina je orientována na povrch. Hlavní součástí membránových lipidů jsou PUFA, které jsou nejvíce náchylné k lipoperoxidaci. Dochází ke snížení fluidity membrány, zvýšení její propustnosti pro ionty, změně membránového potenciálu až k apoptóze buňky. Během tohoto destruktivního procesu vznikají peroxidy, hydroperoxidy, ketony, aldehydy a ethery, z nichž nejvýznamnějšími konečnými produkty jsou mutagenní malondialdehyd a toxický 4-hydroxy-2-nonenal [78-82]. Tyto zmíněné látky reagují s aminoskupinou lysinu,

thiolovou skupinou cysteinu a imidazolem histidinu, což může vést k poškození proteinů, inaktivaci enzymů a inhibici syntézy proteinů. Peroxidace lipidů se může uskutečňovat dvěma možnými mechanismy, buď enzymatickými, nebo neenzymatickými [78].

Enzymová peroxidace lipidů je fyziologický děj, kdy se působením enzymů (lipoxygenasy, cyklooxygenasy) produkují biologicky aktivní látky (např. prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany). Při této reakci vznikají jako meziprodukty volné radikály, které jsou však vázány v aktivním centru enzymů [78-82].

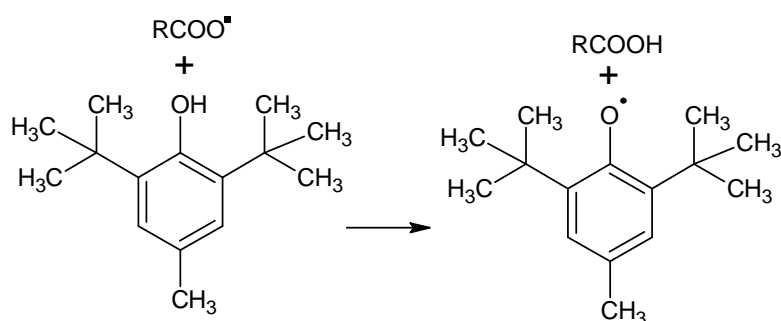
Neenzymatický způsob peroxidace lipidů je nekontrolovatelný, degenerativní a patologický proces, který probíhá hlavně v biologických membránách a lipoproteinech, a to ve třech fázích, iniciaci, propagaci a terminaci (Obr. 4). Lipoperoxidaci může způsobit každá látka s dostatečnou afinitou k elektronům a schopností vytrhnout vodíkový atom (proton a elektron) z methylenové skupiny uhlovodíkového řetězce MK. MK nebo lipid se tak stávají uhlíkovým radikálem, protože přítomnost dvojně vazby v sousedství methylenové skupiny oslabuje vazbu C-H, z tohoto důvodu PUFA snadněji podléhají peroxidaci než jiné biomolekuly. [78-82].



**Obrázek 4** Mechanismus lipidové peroxidace (upraveno podle [83])

Lipidovou peroxidaci inhibují antioxidanty, které působí na různých úrovních ochrany, např. potlačením tvorby volných radikálů, zabráněním radikálové propagace, ochranou před oxidačním stresem a dalšími. Řadí se sem např. katalasa, superoxiddismutasa transferin, ferritin, ceruloplasmin, vitamin E a GSH [84]. V případě stanovení MK se ke vzorkům krve

přidává nejčastěji syntetický fenolový antioxidant s chemickým názvem 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT), který brání tvorbě volných radikálů a tím také lipoperoxidaci PUFA. Jedná se o bílou krystalickou látku dobře rozpustnou v organických rozpouštědlech. BHT reaguje s radikály za vzniku radikálu BHT, který je stabilizován rezonancí aromatického jádra a stericky bráněn dvěma objemnými *tert*-butylovými skupinami. Vzniklý radikál tak nemůže reagovat s dalšími molekulami a brání rozvoji radikálové řetězové reakce, tedy propagaci (Obr. 5) [36, 85, 86].



**Obrázek 5** Reakční mechanismus BHT (upraveno podle [87])

### 1.3 Metody stanovení mastných kyselin

MK se přirozeně nevyznačují vlastnostmi, na základě kterých by byly dobře detegovatelné. V UV oblasti významně absorbují pouze konjugované dienové a trienové MK, v infračervené oblasti je možné stanovit jen MK s *trans* konfigurací. Proto je ve většině případů nutné MK převést na vhodný derivát, který je dobře detegovatelný. Existují dva přístupy pro stanovení MK. Protože jsou základní stavební jednotkou lipidů, je možné je stanovit po předchozím rozdělení do jednotlivých frakcí tenkovrstvou chromatografií (TLC, z angl. thin layer chromatography) nebo hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií (HILIC, z angl. hydrophilic interaction liquid chromatography). Poté je možné MK v konkrétní frakci analyzovat elektromigračními metodami, GC nebo HPLC, které lze také použít pro přímou analýzu celkového lipidového extraktu, bez předchozí separace. Přímá analýza bez předchozí derivatizace či separace je možná, pokud bude vzorek ihned zpracován metodou „shotgun“ MS. Nejvíce se ale používá MS ve spojení se separačním krokem jako detektor [88-90].

#### 1.3.1 Derivatizace

Derivatizace je proces při němž se mění fyzikálně-chemické vlastnosti sledovaných analytů za účelem zlepšení separačních či detekčních vlastností. Výsledkem by mělo být zvýšení

citlivosti a selektivity metody, neboť nederivatizované sloučeniny mohou být obtížně separovány, detegovány nebo mohou být tepelně nestabilní. Každá z analytických technik klade na připravené deriváty jiné požadavky. U GC je třeba docílit toho, aby vznikající deriváty byly těkavější než látky původní, zatímco v kapalinové chromatografii v plošném uspořádání je tomu naopak. U kapalinové kolonové chromatografie nehraje tenze par separovaných složek významnou úlohu, ale jde především o změnu v rozpustnosti jednotlivých komponent obsažených ve směsi. Nejčastěji se MK derivatizují na methylestery, méně pak na ethylestery. Existuje několik způsobů derivatizace MK na methylestery [88, 89].

### **Kysele katalyzovaná esterifikace**

Kysele katalyzovanou reakcí jsou karboxylové skupiny MK esterifikovány nadbytečným množstvím alkoholu za vzniku esterů MK. Protože alkoholy jako neutrální molekuly jsou pouze slabě nukleofilní a karboxylová skupina nedostatečně elektrofilní, musí se esterifikace katalyzovat minerálními nebo Lewisovými kyselinami. Jedná se o vratnou reakci, která je výrazně posunuta na stranu vzniklého produktu. Nesmí být přítomna voda, neboť zabraňuje tvorbě meziprojektu a reakce nemůže dále pokračovat. Nejčastěji se používá buď 5% bezvodý roztok kyseliny chlorovodíkové v methanolu, připravený probubláváním suchého plynného chlorovodíku v suchém methanolu, nebo 1-2% roztok koncentrované kyseliny sírové v methanolu. Mezi další činidla patří 12–14% roztok fluoridu boritého v methanolu, který je schopen rychlé esterifikace volných MK. Nicméně, nevýhodou tohoto činidla je omezená trvanlivost, a pokud budou použity staré nebo příliš koncentrované roztoky, může docházet k tvorbě artefaktů a ztrátě PUFA [88, 89].

### **Bazicky katalyzovaná esterifikace**

Bazicky katalyzovaná esterifikace je založena na zmýdelnění triacylglycerolů, přičemž transesterifikace proběhne během několika minut. Katalyzátorem je ve většině případů 0,5 mol/l roztok methoxidu sodného v bezvodém methanolu. Činidlo je při pokojové teplotě stabilní několik měsíců. Méně používané jsou např. methoxid draselný, hydroxid draselný či tetramethylguanidin, všechny v bezvodém methanolu. Reakce je vhodná pro stanovení MK vázaných v triacylglycerolech, ale ne pro volné MK. Oproti kyselé katalýze je rychlejší a jednodušší [88, 89].

### **Diazomethan**

Diazomethan reaguje s neesterifikovanými MK v přítomnosti malého množství methanolu, který katalyzuje vznik methylesterů. Toto činidlo má řadu výhod, např. vysokou výtěžnost,

krátkou dobu inkubace, mírné reakční podmínky, na druhou stranu je vysoce toxické, karcinogenní a potenciálně výbušné. Z tohoto důvodu se v laboratořích nepoužívá. Komerčně dostupným zdrojem je trimethyldiazomethan, nejčastěji ve formě 2mol/l roztoku v diethyletheru nebo hexanu, který je bezpečnější, stabilnější, s minimálními vedlejšími reakcemi. Esterifikace probíhá okamžitě za mírných podmínek, ale aby poskytovala dobré výtěžky, musí probíhat v přítomnosti methanolu [88, 89].

### 1.3.2 Elektromigrační metody

Kapilární elektroforéza (CE) nepatří mezi metody první volby při analýze MK, ale může být vhodnou alternativou či doplňkem k chromatografickému stanovení. Tato separační elektromigrační technika je založená na migraci elektricky nabitých látek, rozpuštěných v roztoku elektrolytu, kapilárou vlivem stejnosměrného elektrického pole. Existuje několik variant CE, např. kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, mikroemulzní elektrokinetická chromatografie a další. K detekci je možné použít UV-Vis detektor s diodovým polem, MS nebo laserem indukovaný fluorescenční detektor. Separace nejčastěji probíhá v křemenné kapiláře. Hlavní složkou základního elektrolytu (BGE, z angl. background electrolyte), je pufr o  $\text{pH} > 7$ , do něhož se přidávají další látky, jako např. dodecylbenzensulfonát sodný, polyoxyethylen(23)laurylether, cyklodextrin a organická rozpouštědla jako methanol, acetonitril, ethanol, 1-propanol nebo 2-propanol. Hodnota  $\text{pH}$  vyšší než  $\text{pK}_a$  MK ( $\text{pK}_a \sim 5$ ) podporuje disociaci karboxylových skupin a vznik aniontů. S rostoucí délkou řetězce MK, jejich rozpustnost ve vodě klesá, což může vést ke kolísání napětí a způsobovat ucpání kapiláry během separace. Z tohoto důvodu je důležité CE metodu optimalizovat. CE má řadu výhod, mezi něž patří vysoká účinnost separace, nízká spotřeba vzorků a reagensů, jednoduchá příprava, ale nevýhodou je nízká citlivost a v porovnání s HPLC a GC metodami omezený rozsah. CE s přímou UV detekcí je vhodná pouze pro MK s jednou nebo více dvojnými vazbami. Pro lepší separaci SFA, *cis/trans* izomerů MUFA a PUFA se používá nepřímá UV detekce s přidáním chromoforu (adenosinmonofosfát, cyklodextrin, dodecylbenzensulfonát sodný), který má při určité vlnové délce vyšší molární absorpční koeficient. [91-94].

### 1.3.3 Kapalinová chromatografie

#### Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) a její moderní verze vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC, z angl. high-performance thin layer chromatography) je založena na separaci složitějších látek při průchodu rozpouštědla vrstvou sorbentu. Pro kvalitní separaci je volba stacionární a mobilní fáze velmi důležitá, neboť vždy se vychází z povahy separovaných látek. Metoda TLC se používá k dělení lipidů do jednotlivých frakcí (fosfolipidy, monoacylglyceroly, diacylglyceroly, cholesterol, volné MK, triacylglyceroly a estery cholesterolu), pro separaci MUFA a PUFA, ale není vhodná pro dělení *cis/trans* izomerů MK. Jako stacionární fáze se používají silikagel, oxid hlinitý nebo celulosa nanesené na skleněnou nebo hliníkovou desku. Ty mohou být impregnovány  $\text{AgNO}_3$ , kdy  $\text{Ag}^+$  vytváří komplex s  $\pi$ -elektrony dvojných vazeb nenasycených MK, což může vést k zpomalení jejich migrace. Dalšími látkami pro modifikaci stacionární fáze mohou být EDTA, síran amonný nebo 5-10% roztok kyseliny borité. Mobilní fází je směs rozpouštědel v různém poměru, např. cyklohexanu, toluenu, chloroformu, dichlormethanu, acetonu, ethanolu, methanolu, amoniaku a kyseliny octové. Detekce v TLC je založena na vizualizaci lipidových frakcí různými činidly. Používá se např. 2,7-dichlorofluorescein, kyselina fosfomolybdenová, rhodamin 6G, páry jódu, kyselina sírová, dichroman draselný v 40% kyselině sírové nebo 3–6% roztok octanu měďnatého v kyselině fosforečné. Vzniklé barevné skvrny jsou poté detegovány denzitometricky nebo UV detektorem. V dnešní době se TLC používá samostatně jen zřídka. Častěji se setkáváme s dvourozměrnou TLC (2D, z angl. two dimensional) nebo se spojením TLC a HPLC či GC-MS. Výhodou této separační metody je snadné provedení, nízké finanční náklady, nevýhodou nižší přesnost stanovení, nižší citlivost, horší mez detekce. TLC metoda funguje jako otevřený systém, takže faktory jako vlhkost, teplota a přítomnost kyslíku, mohou mít na výsledky nežádoucí vliv [88, 90, 94, 95].

#### Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je pokročilá instrumentální technika, kde hlavním mechanismem separačního procesu je opakovaná adsorpce analytu na rozhraní dvou fází. Pro lepší separační účinnost se používají kolony se stacionární fází chemicky vázanou na volné silanolové skupiny pevného nosiče, např. C18, C8, nebo CN, které dávají povrchu nosiče hydrofobní charakter. Jedná se o HPLC s obrácenými fázemi (RP, z angl. reversed phase), která je v poslední době využívána nejvíce. Jako mobilní fáze je volena směs vody/pufry a polárního organického



rozpouštědla, např. methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu, která je za vysokých tlaků čerpána skrz kolonu. HPLC analýza může probíhat za isokratických nebo gradientových podmínek. Nejčastěji se HPLC používá v kombinaci s UV, MS nebo fluorimetrickou detekcí. UV detektor vyžaduje derivatizaci analytů vhodnými chromofory, např. fenacylbromid-2-bromo-2'-acetonafonem, 2-nitrofenylhydrazinem, dibromoacetofenonem nebo 1-aftylaminem, při fluorimetrické detekci se pro derivatizaci analytů používají fluorofory, např. 9-anthryldiazomethan, 9-(2-hydroxyethyl)-karbazol, 9-bromomethylakridin a 3-bromoacetyl-7-methoxykumarine. Metodou HPLC se stanovují triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly, SFA, MUFA a PUFA. [88, 95, 96].

### **Hydrofilní interakční kapalinové chromatografie**

Na klasických RP je obtížné separovat polární analyty, neboť se prakticky nezadržují stacionární fází. V roce 1990 byla publikována metoda HILIC, která je určena pro separaci silně polárních a hydrofobních molekul s nízkou retencí v systémech s RP a vysokou retencí v systémech s normální fází. Hlavní hnací silou retence jsou hydrofilní donor-akceptorové a dipólové interakce, jak s povrchem stacionární fáze, tak i kapalinou okludovanou na jejím povrchu v difúzní vrstvě. K HILIC separacím lze použít různých typů polárních kolon s neiontovými i iontovými skupinami na povrchu silikagelu nebo organických polymerních matric. Oblíbeným materiálem je nemodifikovaný silikagel se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin, případně hybridní kolony s alkylovými skupinami inkorporovanými do silikagelové matrice. Využívají se i stacionární fáze s chemicky vázanými aminopropylovými, amidovými, nitrilovými, karbamátovými, diolovými, polyethylenglykolovými či polyhydroxylovými skupinami. Speciálně pro HILIC chromatografii byla v nedávné době vytvořena zwitteriontová stacionární fáze nesoucí pozitivní a negativní náboj, které se vyznačují vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě. Jako mobilní fáze se používá voda s vysokým podílem organického rozpouštědla (více jak 60 %). HILIC lze kombinovat s MS detektorem a nukleární magnetickou rezonancí (NMR, z angl. nuclear magnetic resonance) [96-98].

### **1.3.4 Plynová chromatografie**

GC se používá k separaci těkavých látek. V současné době je nejvíce používanou metodou pro stanovení MK, které samy o sobě těkavé nejsou. Z tohoto důvodu musí být převedeny na vhodné deriváty (nejčastěji methylestery). Většinou se používá kyselá/bazická katalyzovaná esterifikace za vzniku derivátů např. methyl-, ethyl- nebo isopropyl-deriváty. Délka, vnitřní

průměr kolony a polarita stacionární fáze hrají důležitou úlohu pro úspěšnou separaci derivátů MK. Nejčastěji se používají křemenné kapilární kolony potažené polyimidem, čímž získají pružnost. Na polárních stacionárních fázích (polyestery) se methylestery MK separují na základě počtu uhlíků a stupně nasycení, polysiloxanové kolony umožňují separaci *cis/trans* isomerů. Obvykle se jako nosný plyn volí helium, dusík nebo vodík. Výběr nosného plynu závisí na typu použitého detektoru a kolony, nosný plyn musí být dostatečně čistý a inertní. Nejčastěji se používá vodík, protože má ze všech plynů nejnižší viskozitu, čímž je zajištěn rychlý průtok mobilní fáze a tudíž doba analýzy je krátká. Na druhou stranu je vysoce hořlavý a se vzduchem tvoří explozivní směs. Nejpoužívanějšími detektory v GC jsou plamenově ionizační detektor (FID, z angl. flame ionization detector), dusík-fosforový detektor (NPD, z angl. nitrogen-phosphorus detector), detektor elektronového záchytu (ECD, z angl. electron capture detector) nebo MS detektor. Pro určení struktury MK se využívají infračervený detektor s Fourierovou transformací (FTIR, z angl. Fourier-transformation infrared spectroscopy) nebo NMR detektor [88, 94, 95].

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je optimalizovat metodu přípravy a zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- 2-propanol, HPLC grade ( $C_3H_8O$ ,  $M_r$  60,1), 99,5% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Acetylchlorid, ( $CH_3COCl$ ,  $M_r$  78,50), 98 %, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Butylovaný hydroxytoluen ( $C_{15}H_{24}O$ ,  $M_r$  220,35), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda ( $H_2O$ ,  $M_r$  18,  $G = 0,055 \mu S$ )
- Diethylether ( $C_4H_{10}O$ ,  $M_r$  74,12), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ethanol HPLC gradient grade ( $C_2H_6O$ ,  $M_r$  46,07) (Merck, Darmstadt, Německo)
- Hydrogenuhličitan draselný ( $KHCO_3$ ,  $M_r$  100,12), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Supelco 37 Component FAME Mix v dichlormethanu, certifikovaný referenční materiál, 1 ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina 12-methyltetradekanová ( $C_{15}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  242,40), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina 13-methyltetradekanová ( $C_{15}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  242,40), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina 14-methylhexadekanová ( $C_{18}H_{36}O_2$ ,  $M_r$  284,48), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina dokosanová ( $C_{22}H_{44}O_2$ ,  $M_r$  340,59), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová ( $C_{22}H_{32}O_2$ ,  $M_r$  328,49), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-4,7,10,13,16-dokosapentaenová ( $C_{22}H_{34}O_2$ ,  $M_r$  330,50), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-5,8,11,14,17-eikosapentaenová ( $C_{20}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  302,45), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-5,8,11,14-eikosatetraenová ( $C_{20}H_{32}O_2$ ,  $M_r$  304,47), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- Kyselina *all-cis*-5,8,11-eikosatrienová ( $C_{20}H_{34}O_2$ ,  $M_r$  306,48), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-6,9,12,15,18,21-tetrakosaheptaenová ( $C_{24}H_{38}O_2$ ,  $M_r$  355,53), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-6,9,12,15,18-tetrakosapentaenová ( $C_{24}H_{38}O_2$ ,  $M_r$  358,56), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-6,9,12,15-oktadekatetraenová ( $C_{18}H_{28}O_2$ ,  $M_r$  276,41), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-6,9,12-oktadekatrienová ( $C_{18}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  278,44), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-7,10,13,15,19-dokosapentaenová ( $C_{22}H_{34}O_2$ ,  $M_r$  330,50), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-7,10,13,16-dokosatetraenová ( $C_{22}H_{36}O_2$ ,  $M_r$  332,52), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-8,11,14-eikosatrienová ( $C_{20}H_{34}O_2$ ,  $M_r$  306,48), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-9,12,15,18-tetrakosatetraenová ( $C_{24}H_{40}O_2$ ,  $M_r$  360,58), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-9,12,15-oktadekatrienová ( $C_{18}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  278,44), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-cis*-9,12-oktadekadienová ( $C_{18}H_{32}O_2$ ,  $M_r$  280,45), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *all-trans*-9,12-oktadekadienová ( $C_{18}H_{32}O_2$ ,  $M_r$  280,45), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *cis*-6-hexadecenová ( $C_{16}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  254,41), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *cis*-9-hexadecenová ( $C_{16}H_{30}O_2$ ,  $M_r$  254,41), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *cis*-9-oktadecenová ( $C_{18}H_{34}O_2$ ,  $M_r$  282,47), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *cis*-9-tetradecenová ( $C_{14}H_{26}O_2$ ,  $M_r$  226,36), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- Kyselina *cis*-10-pentadecenová (C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 240,38), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *cis*-15-tetrakosenová (C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 366,62), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina dekanová (C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 172,26), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina eikosanová (C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 312,54), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina heptadekanová (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 270,45), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina hexadekanová (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 256,42), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina hexakosanová (C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 396,69), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina hexanová (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 16,16), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina nonadekanová (C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 298,50), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina oktanová (C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 144,21), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina tetrakosanová (C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 368,63), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina *trans*-9-hexadecenová (C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> 254,41), p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Methanol HPLC gradient grade (CH<sub>3</sub>OH, M<sub>r</sub> 32,04) (Merck, Darmstadt, Německo)
- n-Hexan HPLC grade (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, M<sub>r</sub> 86,18) (Merck, Darmstadt, Německo)

### 3.1.2 Pracovní roztoky

#### Zásobní roztok vnitřního standardu (asi 970 µg/ml)

Navážka 0,0097 g kyseliny heneikosanové (C<sub>21</sub>:0) byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu. Roztok byl uchován při -20 °C.

#### Roztok hydrogenuhličitanu draselného (asi 6%)

Navážka 0,6 g KHCO<sub>3</sub> byla rozpuštěna v 9,4 ml deionizované vody. Roztok byl uchován při 4 °C.

### Derivatizační směs

K 25 dílům vychlazeného methanolu byly opatrně přidány 2 díly acetylchloridu. Směs byla připravována denně čerstvá.

### Směs hexanu a diethyletheru (95:5, v/v)

Směs byal připravena smícháním 95 dílů hexanu a 5 dílů diethyletheru. Směs byla připravována denně čerstvá.

### **3.1.3 Pomůcky a přístroje**

- Analytické váhy Adventurer™ Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Automatické mikropipety Eppendorf Research® plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Děrovačka, pinzeta, jehla
- Filtrační papír na odběr krve Whatmann 903 (Whatmann, GmbH, Dassel, Německo)
- Inserty pro vialky šroubovací ND8, 100 µl (Fisher Scientific Pardubice, ČR)
- Jednorázové Bond Elut Si kolonky na SPE extrakci (Analytichem Instrumental, Harbor City, CA, USA)
- Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (Philips, Amsterdam, Nizozemí)
- Krimpovací kleště (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Manifold Visiprep™ pro vakuovou SPE extrakci (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Membránová vývěva (KNF Neuberger, Inc., Trenton, NJ, USA)
- Míchadlo hladké 8 x 3 mm (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Odstředivka Beckman GPR Centrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Odstředivka Eppendorf MiniSpin Centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Kolona HP-88: 100 m x 0,25 mm, 0,20 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Polypropylenové zkumavky 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Předvážky Ohaus Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Pyrex® zkumavky s teflonovým těsněním (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Velká Británie)
- Skleněné vialky s krimpovacími víčky (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

- Sušárna Memmert UFB 400 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Německo)
- Termoblok Thermo scientific, model 18821, Reacti-Therm™ Heating/Stirring Module (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Tlakové lahve:
  - Dusík: N<sub>2</sub> 4,0 UN 1066 (Linde Gas, Praha, ČR)
  - Helium: He 5,0 UN 1046 (Linde Gas, Praha, ČR)
  - Vzduch: O<sub>2</sub> 20% (zbytek dusík) UN 1956 (Linde Gas, Praha, ČR)
  - Vodík: H<sub>2</sub> 5,0 ≥ 99,999 (Linde Gas, Praha, ČR)
- Vortex Relax top (Heidolph, Frankfurt, Německo)
- Zařízení pro úpravu vody Smart2Pure (TKA, Niederelbert, Německo)

### 3.1.4 Vzorky

#### Vzorky plazmy

Vzorky venózní krve byly ráno po několikahodinovém lačnění odebrány kvalifikovaným lékařem z loketní jamky do vakuovaných zkumavek s EDTA. Plazma byla získána centrifugací plné krve (1764 x g, 10 minut, 4 °C) a až do doby zpracování byla uchovávána při -20 °C.

#### Vzorky DBS

Na filtrační papír pro odběr DBS vzorků bylo pipetováno 30 µl plné krve s hodnotou hematokritu v referenčním rozmezí testované populace (přibližně 0,42). Vzorky byly sušeny při laboratorní teplotě v horizontální poloze po dobu minimálně 3 hodin. Až do dalšího zpracování byly DBS vzorky uchovávány v nepropustných polypropylenových sáčcích při -20 °C.

## 3.2 Stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

### 3.2.1 Příprava vzorků

#### Vzorky DBS

Z DBS vzorku byl vyražen terčík o průměru přibližně 6 mm, vložen do skleněné zkumavky s uzávěrem a přidáno 200 µl roztoku IS v methanolu o koncentraci 6,75 nebo 4,5 µg/ml. Po tříhodinové eluci za laboratorní teploty byl terčík opatrně vyjmut jehlou (mezi jednotlivými vzorky byla jehla vždy opláchnuta v methanolu a osušena buničinou,



aby se předešlo kontaminaci). Následně bylo přidáno 200 µl směsi derivatizačního činidla a obsah zkumavky byl po dobu 2 hodin inkubován při 100 °C. Po ochlazení směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 300 µl asi 6% roztoku KHCO<sub>3</sub> a obsah zkumavky byl promíchán. Následovala dvojnásobná extrakce methylesterů MK do hexanu. K směsi bylo přidáno 500 µl hexanu a po 10minutovém třepání byla směs odstředěna (1225 x g, 5 minut, 4 °C). Horní organická vrstva (po 1. extrakci 400 µl, po 2. extrakci 550 µl) byla opatrně odtažena do čistých skleněných vialek a v atmosféře dusíku odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 100 µl hexanu a směs byla převedena do insertu krimpovací vialky.

### Vzorky plazmy

Do 1,5ml polypropylenové zkumavky bylo pipetováno 200 µl plazmy a 300 µl roztoku IS v methanolu o koncentraci 30 µg/ml. Směs byla promíchána na vortexu. Následovala dvojnásobná extrakce, kdy k směsi bylo přidáno 500 µl hexanu a po 5minutovém třepání byla směs odstředěna (1073 x g, 1 minuta, 4 °C). Horní organická vrstva (po 1. extrakci 400 µl, po 2. extrakci 550 µl) byla odtažena do čistých skleněných zkumavek Pyrex a v atmosféře dusíku odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 300 µl methanolu. Poté bylo do zkumavky vloženo míchadlo a pipetováno 300 µl směsi derivatizačního činidla. Směs byla inkubována po dobu 1 hodiny při 75 °C s rychlostí míchání 7. Po ochlazení směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 400 µl asi 6% roztoku KHCO<sub>3</sub> a obsah zkumavky promíchán. Dále byla směs zpracována stejným postupem jako v případě zpracování vzorku DBS.

### **3.2.2 Podmínky analýzy plynovou chromatografií**

Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A

- HP-88 kolona (100 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,20 µm)

#### Dávkování

Oplach rozpouštědlem	2 x 10 µl před nástřikem 2 x 10 µl po nástřiku
Oplach vzorkem	1 x 2 µl
Objem dávkovaného vzorku	1 µl
Split mód	10:1
Průtok děličem	15,4 ml/min
Teplota nástřiku	250 °C

Průtok oplachu septa 3 ml/min

#### Teplotní gradient

Změna [°C/min]	Teplota [°C]	Čas [min]
	80	3
10	180	3
1	220	1
5	240	40

Doba analýzy 101 min

Průtok mobilní fáze (helium) 1,54 ml/min

#### Detektor FID

Teplota 250 °C

Průtok H<sub>2</sub> 30 ml/min

Průtok vzduchu 400 ml/min

Průtok make-up (helium) 25 ml/min

### 3.2.3 Analytické parametry metody

#### Odezvový faktor

Odezvový faktor ( $R_f$ , z angl. response factor) je analytický parametr používaný pro kvantitativní analýzu v GC. Hodnota  $R_f$  se pro jednotlivé látky získává metodou vnitřního standardu, kdy se několikrát po sobě analyzují kalibrační roztoky obsahující IS o známé koncentraci a objemu. Z chromatogramu se odečtou plochy píků IS a složek, na jejichž základě se vypočítá poměr  $R_f$  pro každou složku. Sestrojí se graf kalibrační závislosti hodnot  $R_f$  na  $c_x/c_{IS}$ . Z hodnoty  $R_f$  je možné vypočítat koncentraci neznámého analytu podle vztahu

$$R_f = \frac{A_x c_{IS}}{A_{IS} c_x}$$

kde  $A_x$  je plocha píku neznámé látky,  $A_{IS}$  je plocha píku IS,  $c_x$  je koncentrace neznámé látky a  $c_{IS}$  je koncentrace IS.

#### Přesnost

Přesnost je analytický parametr definovaný jako míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky získanými opakovanými měřeními homogenního vzorku za předem stanovených podmínek. Závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k pravé nebo specifikované hodnotě. Míra přesnosti se zpravidla vyjadřuje číselně mírou nepřesnosti, například směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV (\%) = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

kde SD je směrodatná odchylka,  $x_i$  je hodnota i-tého měření, AVG je aritmetický průměr všech měření, n je počet měření a CV je variační koeficient.

#### Opakovatelnost

Opakovatelnost je definovaná jako těsnost shody mezi výsledky po sobě následujících měření téže měřené veličiny, provedených za stejných podmínek měření, což je za použití stejné metody, týmž pracovníkem, týmž přístrojem, na stejném místě, za stejných pracovních podmínek a opakované po krátkém časovém úseku.

#### Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je přesnost měření za podmínek reprodukovatelnosti měření, kdy výsledky se získají stejnou metodou, v různých laboratořích, různým personálem používající různé vybavení, po delší časový interval.

### **3.2.4 Zpracování výsledků**

Pro zpracování získaných dat byl použit program MS Excel.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Klasický odběr krve do vakuovaných polypropylenových zkumavek s antikoagulantem je dlouhodobě zlatým standardem pro stanovení celé řady látek jak v klinické praxi, tak výzkumu. V současnosti je stále větší důraz kladen jak na snižování nákladů spojených s odběrem vzorků, tak i na zmenšování spotřeby chemikálií potřebných k jejich zpracování. To splňuje DBS technika, známá především z programu NS. Méně invazivní a relativně bezbolestný odběr je zvláště vhodný pro novorozence a strašlivé osoby. Vzorky mohou být skladovány a přepravovány bez nutnosti chladicího zařízení, což je z ekonomických důvodů přínosné především v rozvojových zemích. Pozitiva, která tato technika nabízí [2, 9-15], jsou už dnes využívána např. při terapeutickém monitorování léčiv [12, 17], v mikrobiologii a virologii [13, 35, 44]. Na druhou stranu objem krve ve vzorcích DBS (jednotky mikrolitrů) je obvykle daleko nižší v porovnání s plazmou, sérem nebo plnou krví (jednotky mililitrů). Objem pipetované krve, pozice vyraženého terčiku, HCT, nedodržení podmínek při sušení, skladování, ale i způsob zpracování, mohou být zdrojem chyb, což se pak projeví ve výsledcích. Proto cílem této práce bylo optimalizovat jak přípravu, tak i celý postup zpracování vzorku v rámci stanovení vybraných MK v plné krvi.

Vycházeli jsme z diplomové práce autorky Zuzany Řehákové, která byla obhájena v roce 2016 [100], která derivatizovala MK směsí BF<sub>3</sub> v ethanolu. GC analýza trvala 92 minut. V naší práci jsme použili směs methanolu a acetylchloridu, proto jsme celý postup optimalizovali. Z praktických důvodů jsme se také snažili zkrátit čas analýzy.

MK jsme identifikovali na základě analýzy standardní směsi FAME 37 metodou GC-MS. Získaná MS spektra jsme porovnali s knihovnou a určili retenční časy jednotlivých derivátů MK. Doba analýzy byla 53 minut. Za stejných podmínek jsme tuto směs analyzovali metodou GC-FID. Na chromatogramu (Příloha A) jsou v čase 38,0-38,5 minut vidět 3 nerozdělené píky. Změnou teplotního gradientu se nám podařilo látky od sebe oddělit (Příloha B), ale došlo ke koeluci píků v čase 39,78 min. Z metabolické databáze „Human Metabolome Database“ jsme zjistili, že z těch tří koelujících MK se u člověka vyskytuje v nejvyšší koncentraci (C20:4 n6), zatímco zbylé dvě jen ve velmi nízkých koncentracích (C20:3 n3, C22:1 n9). Je zřejmé, že ve vzorcích DBS je nebude možné kvantifikovat, proto jsme se vrátili k původnímu gradientu. Některé MK (C6:0, C8:0, C10:0, C14:0, C15:0, C16:0, C16:1 n10, C16:1 n7*cis/trans*, C17:0, C18:0, C18:2 n6, C18:3 n6, C18:3 n3, C20:3 n9, C24:1, C22:5 n6, C22:5 n3, C18:4 n3, C19:0, C20:0, C20:4 n6, C20:5 n3, C20:3 n6, C22:0, C22:4 n6, C24:0, C24:1 n9, C24:4 n6, C24:5 n6, C24:6 n3, C26:0) byly identifikovány na základě

porovnání retenčního času odpovídající standardu dané MK. Celkem jsme do analýz zahrnuli 26 MK, které byly identifikovány jak v plazmě, tak i ve vzorcích DBS (Příloha C).

Při extrakci MK z biologických vzorků se současně extrahuje i cholesterol, který se zadržuje na koloně. K jeho odstranění z kolony bylo nutné prodloužit dobu analýzy až na 101 minut. Z literatury [60] jsme zjistili, že cholesterol lze od methylesterů MK (FAME, z angl. fatty acid methyl esters) odseparovat metodou SPE, jako stacionární fáze se používá silikagel. Jsou-li takto ošetřeny vzorky s nízkou koncentrací cholesterolu, a to vzorky DBS jsou, lze SPE kolonku použít opakovaně, což je ekonomicky výhodné. Směsí hexanu a diethyletheru (95:5, v/v) se eluovaly FAME, zatímco cholesterol byl na kolonkách zadržen. Výsledky naznačují, že ke ztrátám FAME nedochází a pík odpovídající cholesterolu se již na chromatogramu neobjevuje, lze tedy zkrátit dobu analýzy.

Jako IS byla zvolena kyselina heneikosanová, neboť se u člověka prakticky nevyskytuje a za daných podmínek je dobře separována od ostatních FAME. IS byl již součástí extrakčního činidla, do kterého se extrahovaly MK z DBS. Tento postup byl vybrán, jelikož je nejvíce používaný v literatuře [56, 60, 63].

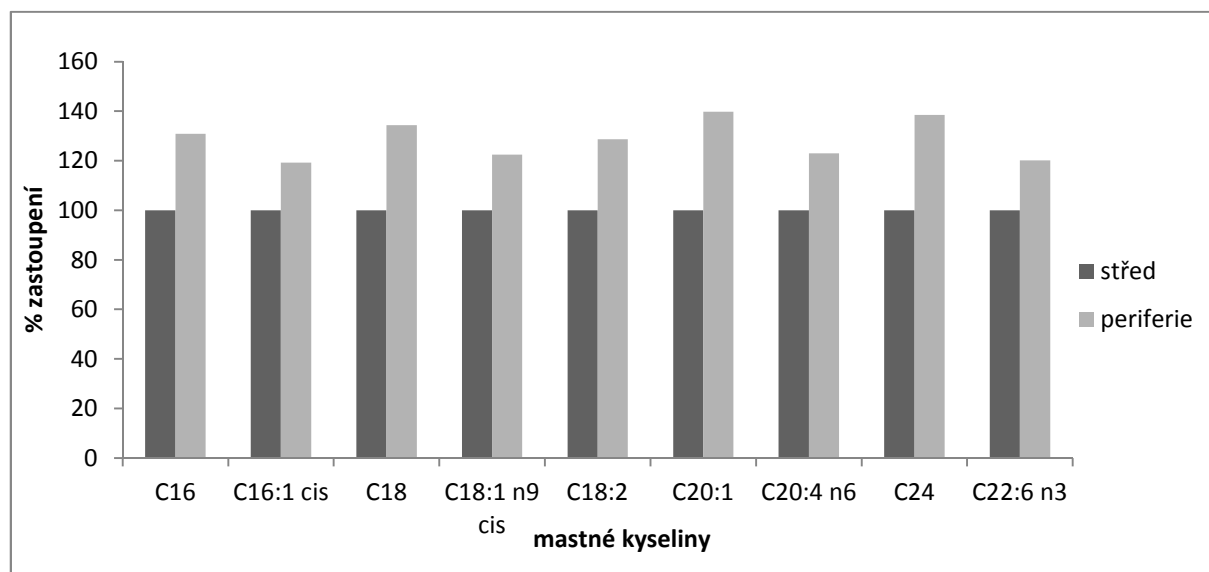
Kontaminace a přenos mezi vzorky by mohly ovlivnit výsledky analýzy. Pro zpracování vzorků DBS jsme používali skleněné zkumavky a vialky, které jsme umývali detergentem a sušili při 90 °C. Výsledky naznačují, že proces mytí skla je dostatečný a ke kontaminaci nedochází. Při testování přenosu mezi jednotlivými vyraženými terčíky DBS jsme zjistili přenesení několika MK (jedná se především o MK s největší koncentrací) (Příloha D). To může být odstraněno vyražením terčíku čistého filtračního papíru mezi dvěma vzorky. Při analýze samotného filtračního papíru se na chromatogramu objevilo 7 píků, jejichž retenční čas odpovídá retenčním časům derivátů MK (C16:0, C16:1 *cis*, C18:0, C18:1 n9 *cis*, C18:1 n7 *cis*, C18:2, C20:4 n6).

Byl optimalizován celý proces zpracování a přípravy vzorku DBS. Pro validaci procesu byly hodnoceny MK s vysokými koncentracemi, a to z SFA (kyselina hexadekanová, kyselina oktadekanová, kyselina tetrakosanová), z MUFA (kyselina *cis*-hexadecenová, kyselina *cis*-9-oktadecenová, kyselina *cis*-11-eikosaenová) a z PUFA (kyselina *cis*-9,12-oktadekadienová, kyselina *all-cis*-5,8,11,14-eikosatetraenová, kyselina *all-cis*-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová).

Prvním krokem optimalizace přípravy vzorku DBS před GC-FID analýzou je nanesení krve na filtrační papír. V literatuře [102-104] se uvádí, že vrstvení více kapek krve na sebe může vést ke zkreslení výsledků analýzy. Naše výsledky to ale nepotvrzují, hladiny MK ve vzorcích takto připravených se významně nelišily. Vlastnosti filtračního papíru jsou

obvykle pro NS velmi přísně kontrolované v rámci jedné šarže i mezi šaržemi navzájem [105, 106]. Stejně složení filtračního papíru by mělo zabezpečit stejné nasáknutí papíru plnou krví i při rozdílném dávkovaném objemu. Naše testy potvrzují, že dávkovaný objem nemá na analýzu vliv.

Někteří autoři naznačují, že analyty se mohou díky chromatografickému efektu nacházet ve vyšší koncentraci na periférii DBS než v jejím středu [49, 102, 103, 107, 108]. Při analýze MK jsme pozorovali vyšší koncentraci na okraji terčíku (Obr. 6), což potvrzuje tuto teorii.

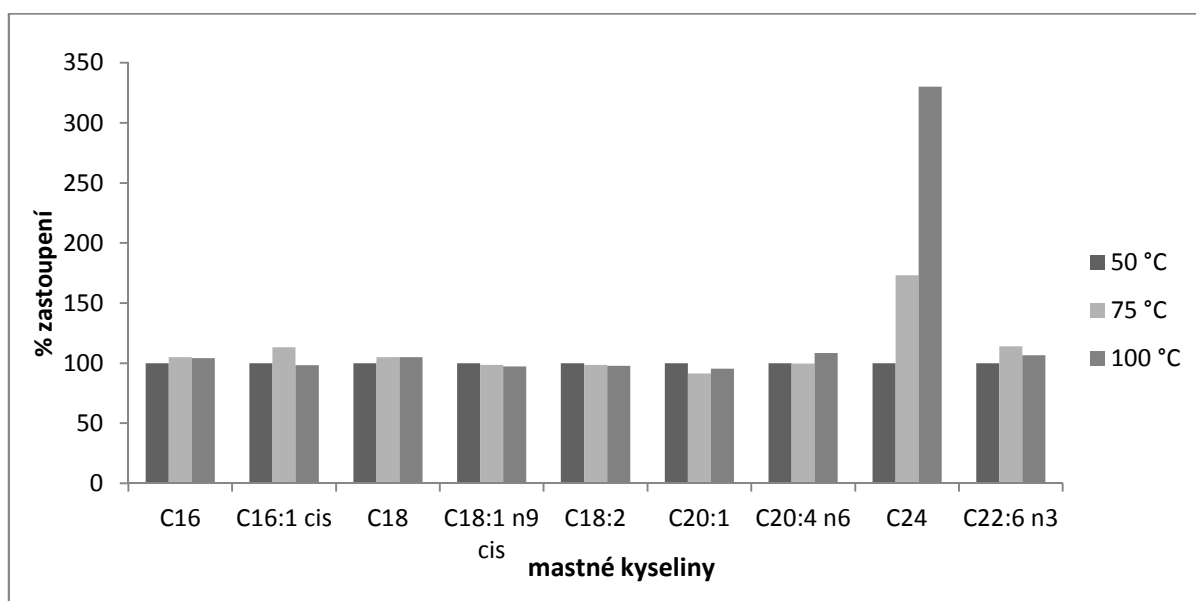


**Obrázek 6** Vliv pozice terčíku

Prvním krokem zpracování vzorku DBS je eluce vybraných analytů zadržovaných ve struktuře filtračního papíru. Voda by měla rozvolnit strukturu celulosy a umožnit tak uvolnění analytů. Jelikož MK nejsou ve vodě rozpustné a v našem případě byl s prvním krokem extrakce přidán i IS, byl jako rozpouštědlo, a současně i eluční činidlo, zvolený methanol. Testovali jsme, jak dlouhá doba je nutná k eluci MK z filtračního papíru (10 minut až 24 hodin). Výsledky naznačují, že optimální je tříhodinová eluce. Zvýšení teploty při eluci nemá na výtěžnost MK žádný vliv (testovaná teplota 60 °C, 37 °C a laboratorní teplota). Zvolili jsme proto eluci při laboratorní teplotě, která je běžně používána [49, 60, 109, 110]. V porovnání s předcházející diplomovou prací [100], kde byla volena přímá derivatizace vzorků DBS, je náš postup časově náročnější. Avšak při testování přímé derivatizace vzorků DBS směsí methanolu a acetylchloridu jsme pozorovali vysokou variabilitu výsledků, která může být důsledkem různého průběhu derivatizační reakce. Existuje možnost, že MK se derivatizují až po eluci do methanolu, což může být pro každou MK různé. Existuje riziko, že při derivatizační reakci se z filtračního papíru uvolní do směsi další nežádoucí látky,

případně může dojít k mechanickému poškození papíru, což by mohlo ovlivnit analýzu, proto jsme terčík DBS po eluci vyjmuli.

Testovali jsme optimální dobu derivatizace, stejně jako v předešlé diplomové práci [100], a to 10 až 180 minut. Zatímco při derivatizaci směsí  $\text{BF}_3$  v methanolu byla optimální doba derivatizace 3 hodiny, v našem případě, kdy jsme použili směs methanolu a acetylchloridu, postačují 2 hodiny. Gupta a kol. [109] uvádějí, že 1 hodina je dostačující. Z našich výsledků je ale zřejmé, že pro MK s nízkými koncentracemi je hodinová inkubace nedostačující. U MK s vysokými koncentracemi naopak hodinová derivatizace postačovala. Testovali jsme také optimální teplotu při derivatizačním kroku. Z teplot 50, 75 a 100 °C byla optimální teplota 100 °C, kdy byly intenzity píků derivátů MK nejvyšší, zejména derivátů kyseliny tetrakosanové a kyseliny *all-cis*-7,10,13,16-dokosatetraenové, intenzity derivátů ostatních MK byly prakticky stejné jak při 75 °C, tak také 100 °C (Obr. 7). Teplotu 100 °C volili i jiní autoři [109, 110].

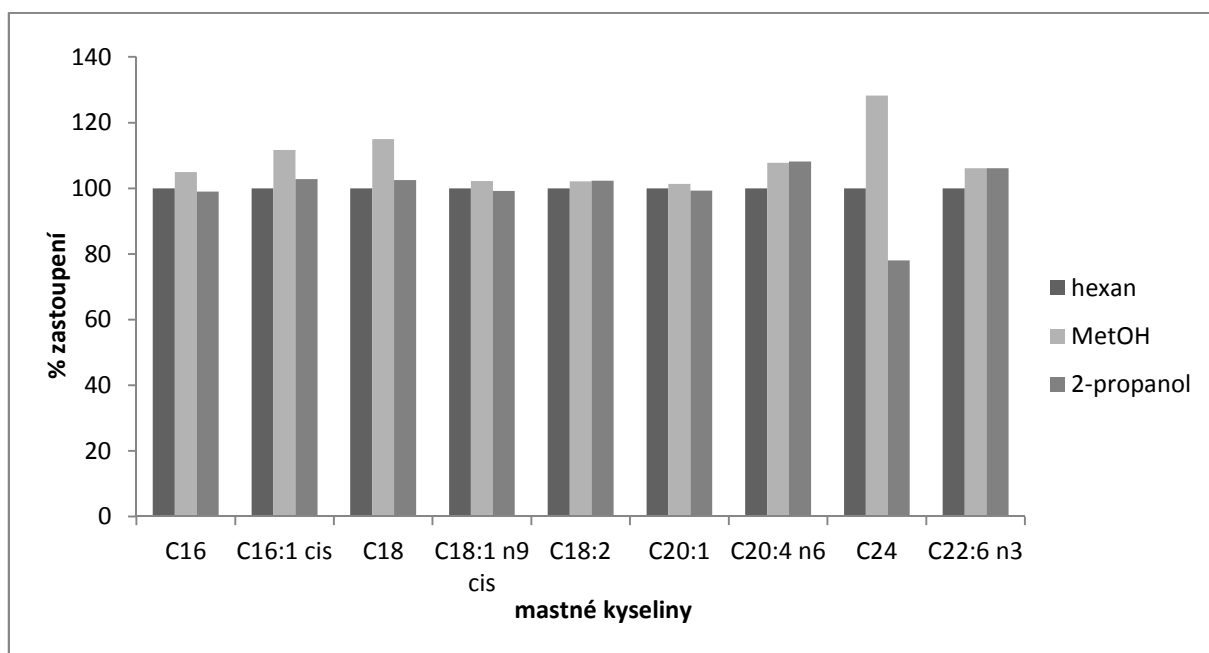


**Obrázek 7** Optimalizace teploty derivatizace

Po derivatizaci je nutné FAME extrahovat vhodným organickým rozpouštědlem. Pro tento účel byl použit hexan, rovněž jako v diplomové práci Zuzany Řehákové [100]. Testovali jsme opakované extrakce s různými objemy hexanu. Při dvojnásobné extrakci 500  $\mu\text{l}$  hexanu jsme získali přijatelné výsledky.

Posledním krokem před samotnou GC-FID analýzou je rozpuštění odparku ve vhodném organickém rozpouštědle. Testovali jsme methanol, hexan a 2-propanol. Zatímco v minulé práci [100] byl vybrán 2-propanol, naše výsledky naznačují, že lepší volbou je hexan

nebo methanol (Obr. 8). U většiny studií se používá hexan [56, 60, 109, 110]. V klinické praxi, z důvodu menší těkavosti, je lepší použití methanolu. I v dobře uzavřených krimpovacích vialkách hexan při laboratorní teplotě zcela vytěká.



**Obrázek 8** Volba organického rozpouštědla

Přesnost stanovení MK ve vzorcích DBS je uvedena v Tabulce 1. Naší metodou jsme byli schopni stanovit 25 MK. U většiny MK byla hodnota CV pod 5 %. V porovnání s minulou diplomovou prací [100] nastalo zlepšení u těchto MK: C14:0, C16:1 *cis*, C20:5, C24:1, C22:4 n6, C22:5 n3 a C22:6 n3. Jen v případě C18:3 n6 byla hodnota CV nad 20 %, což u MK s nízkou koncentrací může být způsobeno odečtem plochy píku na chromatografickém záznamu.



**Tabulka 1** Přesnost metody pro stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

<b>MK</b>	<b>AVG µg/ml</b>	<b>SD µg/ml</b>	<b>CV %</b>
C14	0,40	0,03	7,86
C15	0,15	0,02	9,80
C16	17,00	0,50	2,95
C16:1 n10	0,21	0,04	16,56
C16:1 <i>cis</i>	0,82	0,03	3,73
C17	0,23	0,03	11,52
C18	9,24	0,27	2,93
C18:1 n9 <i>cis</i>	10,90	0,29	2,69
C18:1 n7 <i>cis</i>	3,92	0,39	10,04
C18:2	17,38	0,52	2,97
C20	0,26	0,03	10,71
C18:3 n6	0,21	0,06	26,66
C18:3 n3	0,13	0,02	16,38
C20:1	0,27	0,03	11,76
C22	0,87	0,05	5,30
C20:3 n6	1,02	0,04	4,24
C20:4 n6	7,10	0,12	1,69
C20:5	0,28	0,03	9,22
C24	1,84	0,09	4,68
C24:1	2,47	0,11	4,49
C22:4 n6	1,08	0,12	11,44
C22:5 n6	0,31	0,04	13,80
C22:5 n3	0,95	0,08	8,43
C22:6 n3	1,84	0,10	5,19

Při GC-FID analýze se pro kvantifikaci MK ve většině případů používá procentuální zastoupení, které však není ideální. V případě změny počtu stanovovaných MK dochází k změně procentuálního zastoupení MK a obtížné interpretaci výsledků. Nejlepší možností by bylo použití metody kalibrační křivky, která je však při použití techniky DBS obtížná, protože MK jsou špatně až prakticky nerozpustné v krvi.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu přípravy a zpracování vzorku suché kapky krve pro stanovení mastných kyselin. Po derivatizaci mastných kyselin na methylestery směsí methanolu a acetylchloridu, byla k jejich analýze použita metoda plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Byl určen postup, na jehož základě se bude pokračovat v dalších studiích. Odstraněním cholesterolu SPE extrakcí bylo umožněno zkrácení doby analýzy, jelikož cholesterol eluuje daleko za poslední stanovovanou mastnou kyselinou (C24:5n6).

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

1. GRÜNER, N., O. STAMBOULI and R. S. ROSS. Dried blood spots - preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, **97**, 1-9.
2. LI, W. and M. S. LEE. *Dried blood spots: applications and techniques*. Hoboken: Wiley, 2014, 376 s. ISBN 978-1-118-05469-7.
3. PKU-TEST. Dr. Robert Guthrie – “Father” of mass newborn screening [online]. 2012 [cit. 2016-12-01]. Dostupné z: <http://www.pkutest.com/2012/07/22/dr-robert-guthrie-father-mass-newborn-screening/>
4. LINDSAY, G. Bacterial inhibition assays for phenylketonuria and other metabolic disorders. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1972, **9**, 115-117.
5. KUEHN, B. M. After 50 Years, Newborn screening continues to yield public health gains. *Journal of the American Medical Association*. 2013, **309**, 1215-1217.
6. PRŮŠA, R. *50 let České společnosti klinické biochemie*. 1. vyd. Praha: ČSKB ČLSJEP, 2008, 140 s. ISBN 978-80-254-2771-2.
7. ZAKARIA R., K. J. ALLEN, J. J. KOPLIN et al. Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*. 2016, **27**, 288-317.
8. WAGNER, M., D. TONOLI, E. VARESIO et al. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016, **35**, 361-438.
9. LEHMANN, S., C. DELABY, J. VIALARET et al. Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry: Progress to Date and Future Directions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013, **51**, 1897-1909.
10. DEEP, A., P. KUMAR, A. KUMAR et al. Dry blood spot technique: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012, **15**, 90-94.
11. HOLEN, T., F. NORHEIM, T. E. GUNDERSEN et al. Biomarkers for nutrient intake with focus on alternative sampling techniques: Analytics, validation, and applications. *Genes & Nutrition*. 2016, **11**, 1-20.
12. WILHELM, A. J., J. C. G. DEN BURGER and E. L. SWART. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: Progress to date and future directions. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014, **53**, 961-973.

13. MCDADE, T. W., S. A. WILLIAMS, J. J. SNODGRASS et al. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*. 2007, **44**, 899-925.
14. CHACE, D. H., V. R. DE JESÚS and A. R. SPITZER. Clinical chemistry and dried blood spots: increasing laboratory utilization by improved understanding of quantitative challenges. *Bioanalysis*. 2014, **6**, 2791-2794.
15. MCDADE, T. W., V. R. DE JESÚS and A. R. SPITZER. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *American Journal of Human Biology*. 2014, **26**, 1-9.
16. LI, W. and F. L. S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography*. 2010, **24**, 49-65.
17. MANOJ, A. S. A brief review on dried blood spots applications in drug development. *Journal of Pharmaceutical and BioSciences*. 2014, **1**, 17-23.
18. ENDERLE, Y., K. FOERSTER and J. BURHENNE. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **130**, 231-243.
19. MEI, J. V., J. R. ALEXANDER, B. W. ADAM et al. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *Journal of Nutrition*. 2001, **119**, 1632-1636.
20. MEI, J., V. R. DE JESÚS and A. R. SPITZER. Dried blood spot sample collection, storage, and transportation. *Dried Blood Spots*. 2014, **26**, 21.
21. VĚSTNÍK MINISTERSTVA ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. *Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče. Čl. 2: Odběr krve pro novorozenecký screening a odesílání vzorků*. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR. 2009.140 s.
22. OLIVEIRA, E. C. D., E. I. MULLER, F. ABAD et al. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Química Nova*. 2010, **33**, 984-987.
23. COLEMAN, D., L. VANATTA. Statistics in analytical chemistry: Part 19-nternal standards. *American Laboratory* [online]. 2005 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/1233-Part-19-Internal-Standards/>

24. KLAPKOVÁ, E. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, **19**, 5-8.
25. LIU, J., R. G. COOKS, Z. OUYANG et al. Enabling quantitative analysis in ambient ionization mass spectrometry: Internal standard coated apillary samplers. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**, 5632-5636.
26. ABU-RABIE, P., P. DENNIFF, N. SPOONER et al. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**, 8779-8786.
27. VAN BAAR, B. L. M., T. VERHAEGHE, O. HEUDI et al. IS addition in bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis*. 2013, **5**, 2137-2145.
28. CAMELIER, M. V., M. G. BURIN, J. D. MARI et al. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Clinica Chimica Acta*. 2011, **412**, 1805-1808.
29. YEL, L., CH. J. RABBAT, CH. CUNNINGHAM-RUNDLES et al. A novel targeted screening tool for hypogammaglobulinemia: Measurement of serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) levels from dried blood spots (Ig-DBS assay). *Journal of Clinical Immunology*. 2015, **35**, 573-582.
30. KANĎÁR, R., X. ŠTRAMOVÁ, P. DRÁBKOVÁ et al. Determination of total glutathione in dried blood spot samples using a high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, **53**, 879-885.
31. KANĎÁR, R. Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích. *Chemické listy*. 2016, **110**, 754-760.
32. ELBIN, C. S., P. OLIVOVA, C. A. MARASHIO et al. The effect of preparation, storage and shipping of dried blood spots on the activity of five lysosomal enzymes. *Clinica Chimica Acta*. 2011, **412**, 1207-1212.
33. EL EZZI, A. A., M. A. EL-SAIDI, R. H. KUDDUS et al. Long-term stability of thyroid hormones and DNA in blood spots kept under varying storage conditions. *Pediatrics International*. 2010, **52**, 631-639.

34. CHAISOMCHIT, S., R. WICHAJARN, N. JANEJAI et al. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2005, **36**, 270-273.
35. AITKEN, S. C., C. L. WALLIS, W. STEVENS et al. Stability of HIV-1 nucleic acids in dried blood spot samples for HIV-1 drug resistance genotyping. *Public Library of Science*. 2015, **10**, 1-10.
36. METHEREL, A. H., R. C. HOGG, L. M. BUZIKIEVICH et al. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids in Health and Disease*. 2013, **12**, 1-9.
37. CHIU, M. L., W. LAWI, S. T. SNYDER et al. Matrix effects - a challenge toward automation of molecular analysis. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 2010, **15**, 233-242.
38. GHOSH, CH., S. GAUR, CH. P. SHINDE et al. A systematic approach to overcome the matrix effect during LC-ESI-MS/MS analysis by different sample extraction techniques: Advancing biomonitoring. *Journal of Bioequivalence*. 2011, **3**, 122-127.
39. ISMAIEL, O. A., R. G. JENKINS, H. T. KARNES et al. Investigation of endogenous blood lipids components that contribute to matrix effects in dried blood spot samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2013, **5**, 710-715.
40. PANUWET, P., R. E. HUNTER, P. E. D'SOUZA et al. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: Advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2015, **46**, 93-105.
41. KOSTER, R. A., D. J. TOUW, J. W. C. ALFFENAAR et al. Dried blood spot analysis; facing new challenges. *Journal of Applied Bioanalysis*. 2015, **1**, 38-41.
42. WANG, H., G. GURAU, R. D. ROGERS et al. Ionic liquid processing of cellulose: Commentary on the history and quantitative nature of filter paper used in blood collection devices. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41**, 645-649.
43. KOSTER, R. A., R. BOTMA, B. GREIJ DANUS et al. The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants. *Bioanalysis*. 2015, **7**, 1225-1235.
44. ROTTINGHAUS, E. K., R. S. BEARD, E. BILE et al. Evaluation of dried blood spots collected on filter papers from three manufacturers stored at ambient temperature

- for application in HIV-1 drug resistance monitoring. *Public Library of Science*. 2014, **9**, 1-5.
45. MEI, J. V., S. D. ZOBEL, E. M. HALL et al. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis*. 2010, **2**, 1397-1403.
46. DE JESÚS, V. R., D. H. CHACE, E. M. HALL et al. Letter to the Editor: Commentary on the history and quantitative nature of filter paper used in blood collection devices. *Bioanalysis*. 2012, **4**, 645-647.
47. KATEDRA ANALYTICKEJ CHÉMIE PriF UK. Terminológia v oblasti analytických chemických meraní [online]. 2011 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://analytika.sk/skripta/terminologia.pdf>
48. HPLC CZ. Validační program pro statistické zpracování analytických dat. 3.3.2 Citlivost metody, Vliv matrice vzorku [online]. 2011 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/validace/program\\_validace.htm](http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm)
49. HOLUB, M., K. TUSCHL, R. RATSCHMANN et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **373**, 27-31.
50. DE KESEL, P. M. M., S. CAPIAU, W. E. LAMBERT et al. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis*. 2014, **6**, 1871-1874.
51. YOUHNOVSKI, N., A. BERGERON, M. FURTADO et al. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011, **25**, 2951-2958.
52. LIAO, H. W., S. W. LIN, G. Y. CHEN, et al. Estimation and correction of the blood volume variations of dried blood spots using a postcolumn infused-internal standard strategy with LC-electrospray ionization-MS. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**, 6457-6464.
53. CAPIAU, S., V. V. STOVE, W. E. LAMBERT, et al. Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**, 404-410.
54. CAPIAU, S., L. S. WILK, M. C. G. AALDERS et al. A novel, nondestructive, dried blood spot-based hematocrit prediction method using noncontact diffuse reflectance spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**, 6538-6546.

55. MESS, J. N., M. P. TAILLON, C. CÔTÉ et al. Dried blood spot on-card derivatization: an alternative form of sample handling to overcome the instability of thiorphan in biological matrix. *Biomedical Chromatography*. 2012, **26**, 1617-1624.
56. MARANGONI, F., C. COLOMBO, C. GALLI et al. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Analytical Biochemistry*. 2004, **326**, 267-272.
57. NAVARRO-GONZÁLEZ, R., A. NEGRÓN-MENDOZA and G. ALBARRÁN. Analysis of keto acids as their methyl esters of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1991, **587**, 247-254.
58. KOBAYASHI, K., E. FUKUI, M. TANAKA et al. Gas chromatographic analysis of a keto acids in aqueous solution as theo-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes of their methyl esters. *Journal of Chromatography A*. 1980, **202**, 93-98.
59. WUYTS, B., V. STOVE, L. GOOSSENS et al. Critical sample pretreatment in monitoring dried blood spot citrulline: an alternative form of sample handling to overcome the instability of thiorphan in biological matrix. *Clinica Chimica Acta*. 2007, **386**, 105-109.
60. MASHAVAVE, G., P. KUONA, W. TINAGO et al. Dried blood spot omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acid levels in 7–9 year old Zimbabwean children: a cross sectional study. *BMC Clinical Pathology*. 2016, **16**, 1-10.
61. PEREZ, J. W., B. G. PANTAZIDES, C. M. WATSON et al. Enhanced stability of blood matrices using a dried sample spot assay to measure human butyrylcholinesterase. Activity and nerve agent adducts: a cross sectional study. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**, 5723-5729.
62. KOPP, M., M. RYCHLIK, M. K. R. MUDIAM et al. Quantitation of 5-methyltetrahydrofolic acid in dried blood spots and dried plasma spots by stable isotope dilution assays: a cross sectional study. *Public Library of Science*. 2015, **10**, 1-18.
63. KOULMAN, A., P. PRENTICE, M. C. Y. WONG et al. The development and validation of a fast and robust dried blood spot based lipid profiling method to study infant metabolism: a cross sectional study. *Metabolomics*. 2014, **10**, 1018-1025.
64. LIANG, X., Y. LI, M. BARFIELD et al. Study of dried blood spots technique for the determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human whole blood by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2009, **877**, 799-806.



65. CHOI, E. H., S. K. LEE, CH. IHM et al. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: Potential applications in biobanking. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2014, **5**, 351-357.
66. SIRDAH, M. M., S. K. LEE, CH. IHM 33 et al. Superparamagnetic-bead based method: An effective DNA extraction from dried blood spots (DBS) for diagnostic PCR. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014, **5**, 1-4.
67. OLIVEIRA, R. V., J. HENION and E. R. WICKREMSINHE. Automated high-capacity on-line extraction and bioanalysis of dried blood spot samples using liquid chromatography/high-resolution accurate mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2014, **28**, 2415-2426.
68. OLIVEIRA, R. V., J. HENION and E. WICKREMSINHE. Fully-automated approach for online dried blood spot extraction and bioanalysis by two-dimensional-liquid chromatography coupled with high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**, 1246-1253.
69. WILHELM, Z. Mastné kyseliny  $\omega$ -3; od teorie po klinickou praxi. *Medicína pro praxi*. 2013, **10**, 72-76.
70. GROFOVÁ, Z. Mastné kyseliny. *Medicína pro praxi*. 2010, **10**, 388-390.
71. DLOUHÝ, P. a M. ANDĚL. Trans formy mastných kyselin ve výživě a jejich možná rizika pro zdraví. *Časopis lékařů českých*. 1998, **137**, 330-337.
72. RUSTAN, A. C. and CH. A. DREVON. Fatty Acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. [online]. 2005. [2017-04-22]. Dostupné z: [https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty\\_acids.pdf](https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty_acids.pdf)
73. ZADÁK, Z. *Výživa v intenzivní péči*. 2., rozšířené a aktualizované vydání. Praha: Grada, 2008, 542 s. ISBN 978-80-247-2844-5.
74. KOOLMAN, J. a K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2012, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
75. MURRAY, R. K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vydání. Praha: Galén, 2012, 872 s. ISBN 978-80-7262-907-7.
76. MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. české vydání. Praha: Galén, 2010, 554 s. ISBN 978-80-7262-702-8.
77. SIMONPHARMA, A. S. Nenasycené mastné kyseliny. [online]. [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.i-lekarna.cz/tema/nenasycene-mastne-kyseliny>

78. CATALA, Angel. *Lipid Peroxidation*. Rijeka: InTech, 2012, 1-30.  
ISBN 978-953-51-0716-3.
79. MYLONAS, C. and D. KOURETAS. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo*. 1999, **13**, 295-309.
80. BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress. *Current science*. 2014, **107**, 1811-1823.
81. AYALA, A., M. F. MUÑOZ and S. ARGÜELLES. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, **11**, 1-31.
82. SHAHIDI, F., Y. ZHONG and A. BOVERIS. Lipid oxidation and improving the oxidative stability: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**, 4067-4079.
83. METHEREL, A. H., K. D. STARK and A. BOVERIS. The stability of blood fatty acids during storage and potential mechanisms of degradation: A review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2016, **104**, 33-43.
84. ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
85. TRIVEDI M. K., A. BRANTON, D. TRIVEDI et al. Physicochemical and spectroscopic characterization of biofield treated butylated hydroxytoluene. *Journal of Food & Industrial Microbiology*. 2015, **1**, 1-7.
86. IVERSON LAB. Molecule of the day: BHT (a preservative) [online]. [cit. 2017-04-21].  
Dostupné z:  
<http://iverson.cm.utexas.edu/courses/310N/MOTD%20FI05/MOTDf103/BHT.html>
87. LOFTSSON, T. *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*. Boston: Elsevier, Inc., 2014, 170 s. ISBN 978-0-12-411598-4
88. SALIMON, J., T. A. OMAR, N. SALIH et al. Comparison of two derivatization methods for the analysis of fatty acids and trans fatty acids in bakery products using gas chromatography. *The Scientific World Journal*. 2014, **9**, 1-10.
89. ALDAI, N., B. E. MURRAY, A. I. NÁJERA et al. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, **85**, 1073-1083.
90. GAO, F., J. MCDANIEL, E. Y. CHEN et al. Dynamic and temporal assessment of human dried blood spot MS/MS<sup>ALL</sup> shotgun lipidomics analysis. *Nutrition & Metabolism*. 2017, **14**, 1-12.

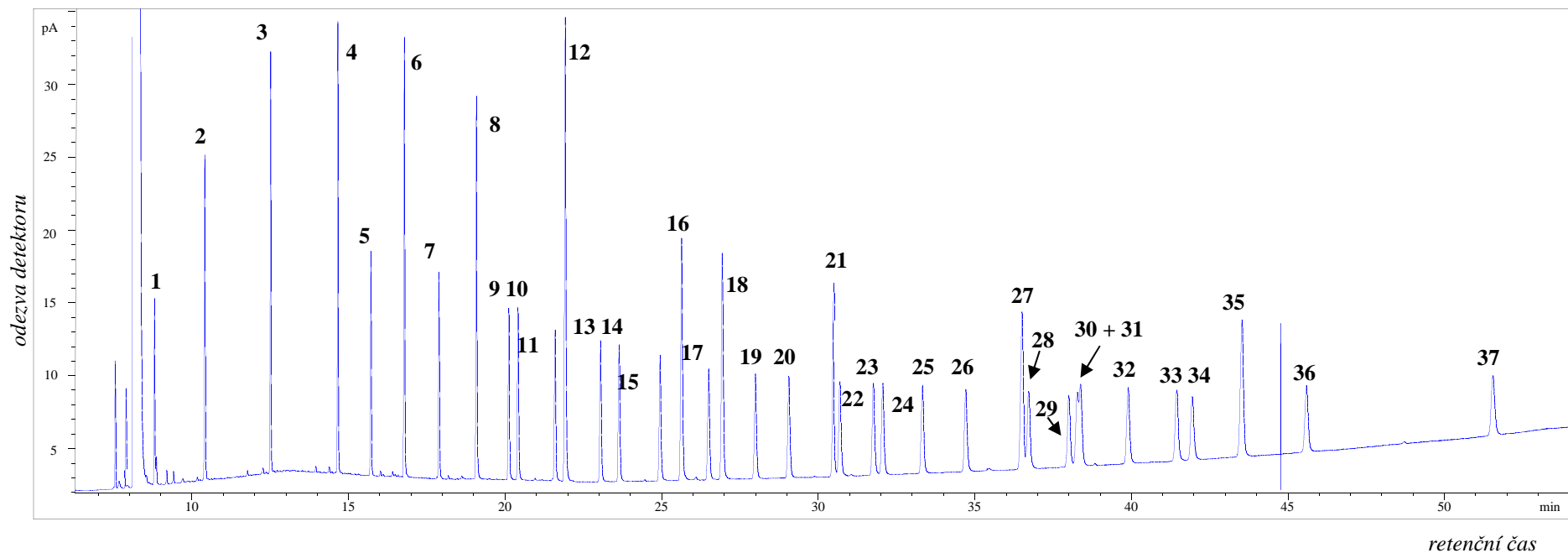
91. BYSTRICKÁ, Z., Z. ĎURAČKOVÁ, C. E. CHILDS et al. Gas chromatography determination of fatty acids in the human erythrocyte membranes. A review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2016, **115**, 35-40.
92. GABRIEL, H., T. V. AMELIA, F. CRISTINA et al. Capillary electrophoresis in the analysis of polyunsaturated fatty acids. *Acta Medica Marisiensis*. 2015, **61**, 378-381.
93. DE OLIVEIRA, M., B. PORTO, I. FARIA, et al. 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. *Molecules*. 2014, **19**, 14094-14113.
94. DESAUZIERS, V., M. AVEZAC and J. L. FANLO. Simple analysis of odorous fatty acids in distillery effluents by capillary electrophoresis. *Analysis*. 2000, **28**, 163-167.
95. FUCHS, B., R. SÜß, K. TEUBER et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography A review of the current state. *Journal of Chromatography A*. 2011, **19**, 2754-2774.
96. DOŁOWY, M., A. PYKA, I. FARIA, et al. Chromatographic methods in the separation of long-chain mono- and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chemistry*. 2015, **9**, 1-20.
97. VACEK, J., L. ONOFREJOVÁ a V. KUBÁŇ. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické listy*. 2009, **103**, 381-383.
98. JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011, **692**, 1-25.
99. KALÍKOVÁ, K., P. KOZLÍK, M. GILAR et al. Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**, 2421-2429.
100. ŘEHÁKOVÁ, Zuzana. *Stanovení vybraných mastných kyselin v suché kapce krve plynovou chromatografií*. Pardubice, 2015. 99 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.
101. FISHER SCIENTIFIC. Whatman™ Uni-Core Punch [online]. © 2017 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/shop/products/whatman-uni-core-punch-20/05715109>
102. O'BROIN, S. D., B. P. KELLEHER and E. GUNTER. Evaluation of factors influencing precision in the analysis of samples taken from blood spots on filter paper. *Clinical and laboratory haematology*. 1995, **17**, 185-188.

- 103.LAWSON, A. J., L BERNSTONE and S. K. HALL. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening*. 2016, **23**, 7-16.
- 104.GEORGE, R. S. and S. J. MOAT. Effect of dried blood spot quality on newborn screening analyte concentrations and recommendations for minimum acceptance criteria for sample analysis. *Clinical Chemistry*. 2016, **62**, 466-475.
- 105.AHLSTROM MUNKTELL. Advanced filtration TFN [online]. 2014 [cit. 2017-05-09].  
Dostupné z: <http://www.ahlstrom.com/globalassets/files/medical-care-and-life-science-files/medical-ba-literature/ahlstrom-tfn-sell-sheet.pdf>
- 106.GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. FTA cards [online]. © 2011 [cit. 2017-05-09].  
Dostupné z:  
[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1357903115683/litdoc28984354\\_20161015094924.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1357903115683/litdoc28984354_20161015094924.pdf)
- 107.O'MARA, M., B. HUDSON-CURTIS, K. OLSON et al. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis*. 2011, **3**, 2335-2347.
- 108.HALL, E., S. FLORES and V. D. JESÚS. Influence of hematocrit and total-spot volume on performance characteristics of dried blood spots for newborn screening: influence of spot size, punch location and haematocrit. *International Journal of Neonatal Screening*. 2015, **1**, 69-78.
- 109.GUPTA, R., R. A. ABRAHAM, S. DHATWALIA et al. Use of dried blood for measurement of trans fatty acids. *Nutrition Journal*. 2009, **8**, 1-5.
- 110.INOUE, K., Y. SUZUKI, S. YAJIMA et al. Very long chain fatty acid analysis of dried blood spots on filter paper to screen for adrenoleukodystrophy. *Clinical Chemistry*. 1997, **43**, 2197-2198.

## 7 PŘÍLOHY

Příloha A <i>Chromatografický záznam 10x naředěné směsi standardů FAME 37</i> .....	62
Příloha B <i>Chromatografický záznam 10x naředěné směsi standardů i FAME 37 (2)</i> .....	63
Příloha C <i>Chromatografický záznam vybraných 26 mastných kyselin ve vzorku DBS</i> .....	64
Příloha D <i>Chromatografický záznam přenosu mezi jednotlivými vyraženými terčíky DBS</i> .....	65

Příloha A Chromatografický záznam 10x naředěné směsi standardů FAME 37

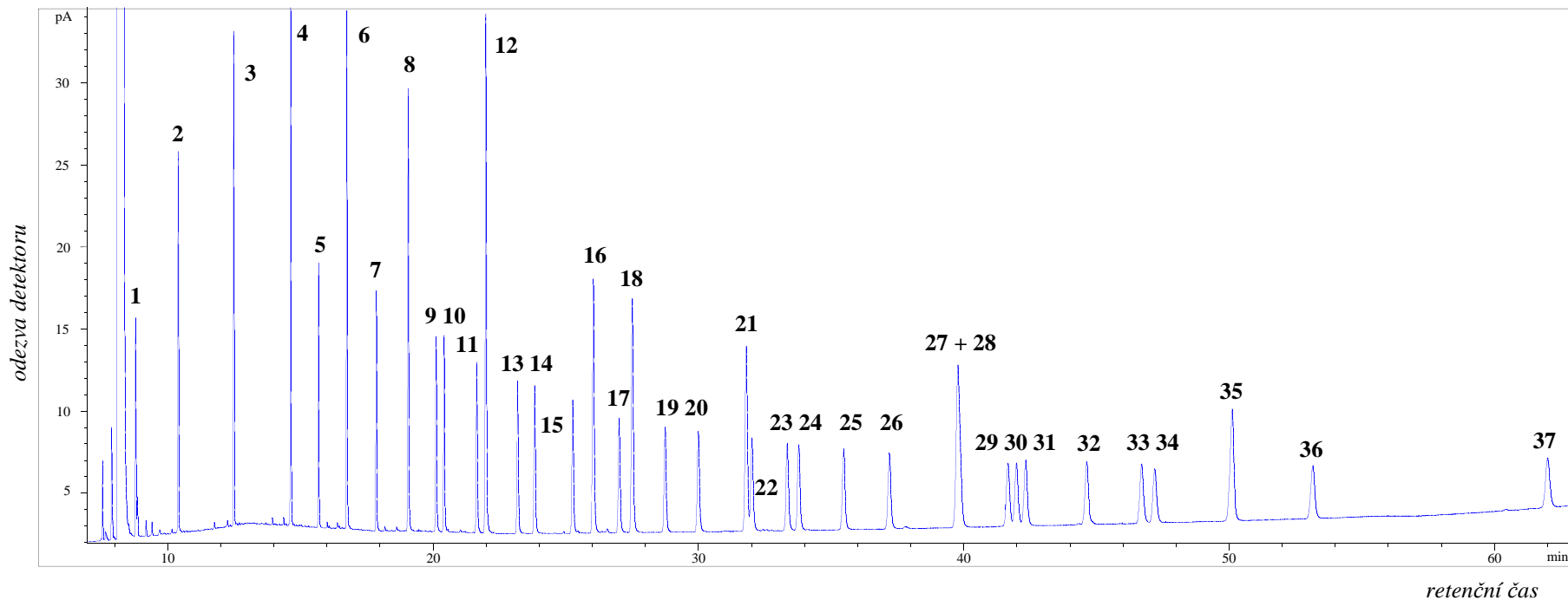


1 – C4:0, 2 – C6:0, 3 – C8:0, 4 – C10:0, 5 – C11:0, 6 – C12:0, 7 – C13:0, 8 – C14:0, 9 – C14:1n5, 10 - C15:0, 11 – C15:1 n5, 12 – C16:0, 13 – C16:1 n7, 14 – C17:0, 15 - C17:1 n7, 16 – C18:0, 17 - C18:1n9 *trans*, 18 – C18:1n9 *cis*, 19 – C18:2n6 *trans*, 20 – C18:2 n6 *cis*, 21 – C20:0, 22 – C18:3n6, 23 – C18:3n3, 24 – C20:1 n9, 25 – C21:0, 26 – C20:2 n6, 27 - C22:0, 28 - C20:3n6, 29 - C20:3n3, 30 – C22:1 n9, 31 – C20:4 n6, 32 – C23:0, 33 – C22:2 n6, 34 – C20:5 n3, 35 – C24:0, 36 – C24:1 n9, 37 – C22:6n3

GC podmínky: Dávkovaný byl 1  $\mu$ l vzorku v split módu (10:1) a při teplotě nástřiku 250 °C. Průtok mobilní fáze (helium) byl 1,54 ml/min. Separace probíhala na koloně HP-88 (100 m  $\times$  0,25 mm vnitřní průměr, 0,20  $\mu$ m tloušťka filmu). Teplotní gradient: 80 °C po dobu 3 minut, následně nárůst na 180 °C rychlostí 10 °C/min po dobu 3 minut, dále nárůst na 220 °C rychlostí 1 °C/min po dobu 1 minuty, dále nárůst na 240 °C rychlostí 5 °C/min. Na závěr udržování teploty 240 °C po dobu 40 minut. Teplota FID detektoru byla 250 °C.

Příloha B Chromatografický záznam 10x naředěné směsi standardů i FAME 37 (2)

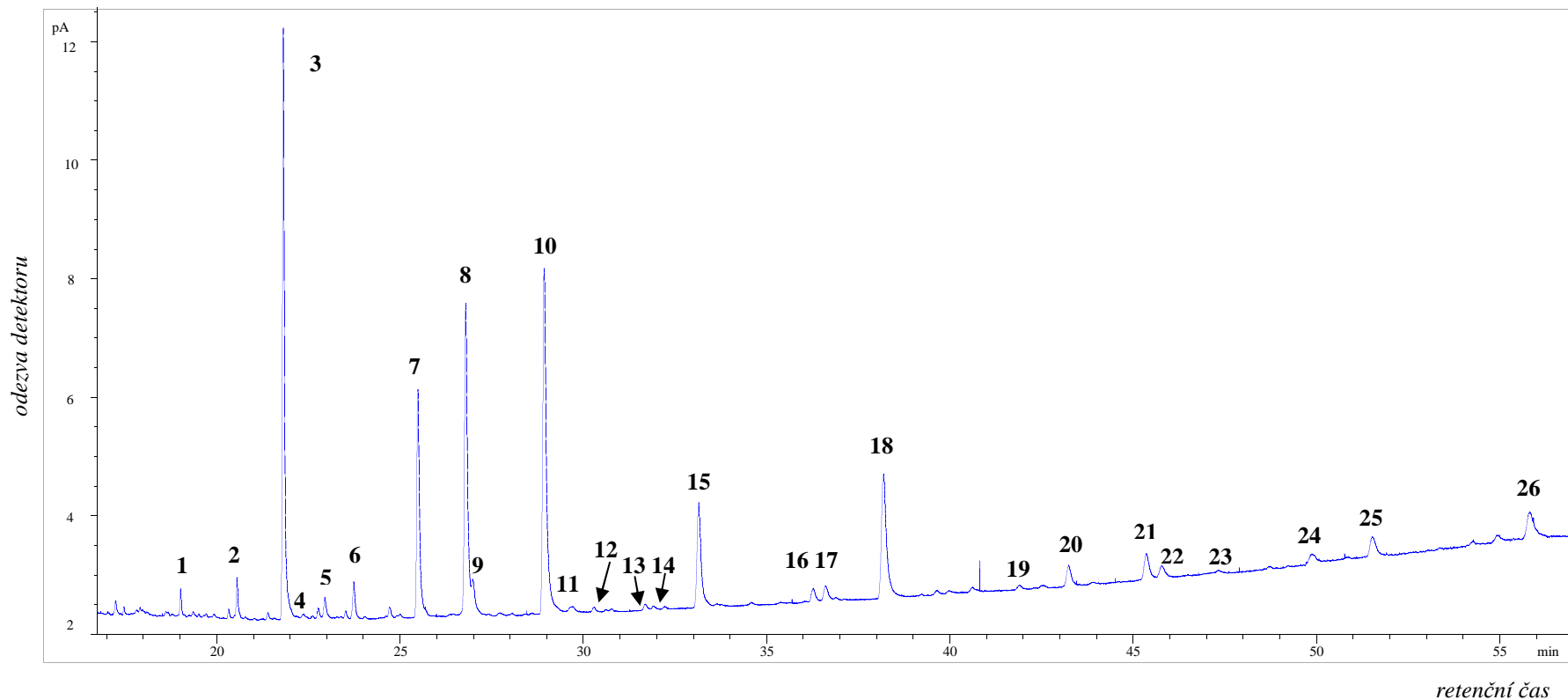
63



1 – C4:0, 2 – C6:0, 3 – C8:0, 4 – C10:0, 5 – C11:0, 6 – C12:0, 7 – C13:0, 8 – C14:0, 9 – C14:1n5, 10 - C15:0, 11 – C15:1 n5, 12 – C16:0, 13 – C16:1 n7, 14 – C17:0, 15 - C17:1 n7, 16 – C18:0, 17 - C18:1n9 *trans*, 18 – C18:1n9 *cis*, 19 – C18:2n6 *trans*, 20 – C18:2 n6 *cis*, 21 – C20:0, 22 – C18:3n6, 23 – C18:3n3, 24 – C20:1 n9, 25 – C21:0, 26 – C20:2 n6, 27 - C22:0, 28 - C20:3n6, 29 - C20:3n3, 30 – C22:1 n9, 31 – C20:4 n6, 32 – C23:0, 33 – C22:2 n6, 34 – C20:5 n3, 35 – C24:0, 36 – C24:1 n9, 37 – C22:6n3

GC podmínky: Jako příloha A, jen teplotní gradient: 80 °C po dobu 3 minut, následně nárůst na 180 °C rychlostí 10 °C/min po dobu 3 minut, opět nárůst na 220 °C rychlostí 10 °C/min po dobu 1 minut, dále při změně rychlosti 5 °C/min zvýšení na 230 °C. Na závěr udržování teploty 230°C po dobu 10 minut. Teplota FID detektoru byla 250 °C.

Příloha C Chromatografický záznam vybraných 26 mastných kyselin ve vzorku DBS



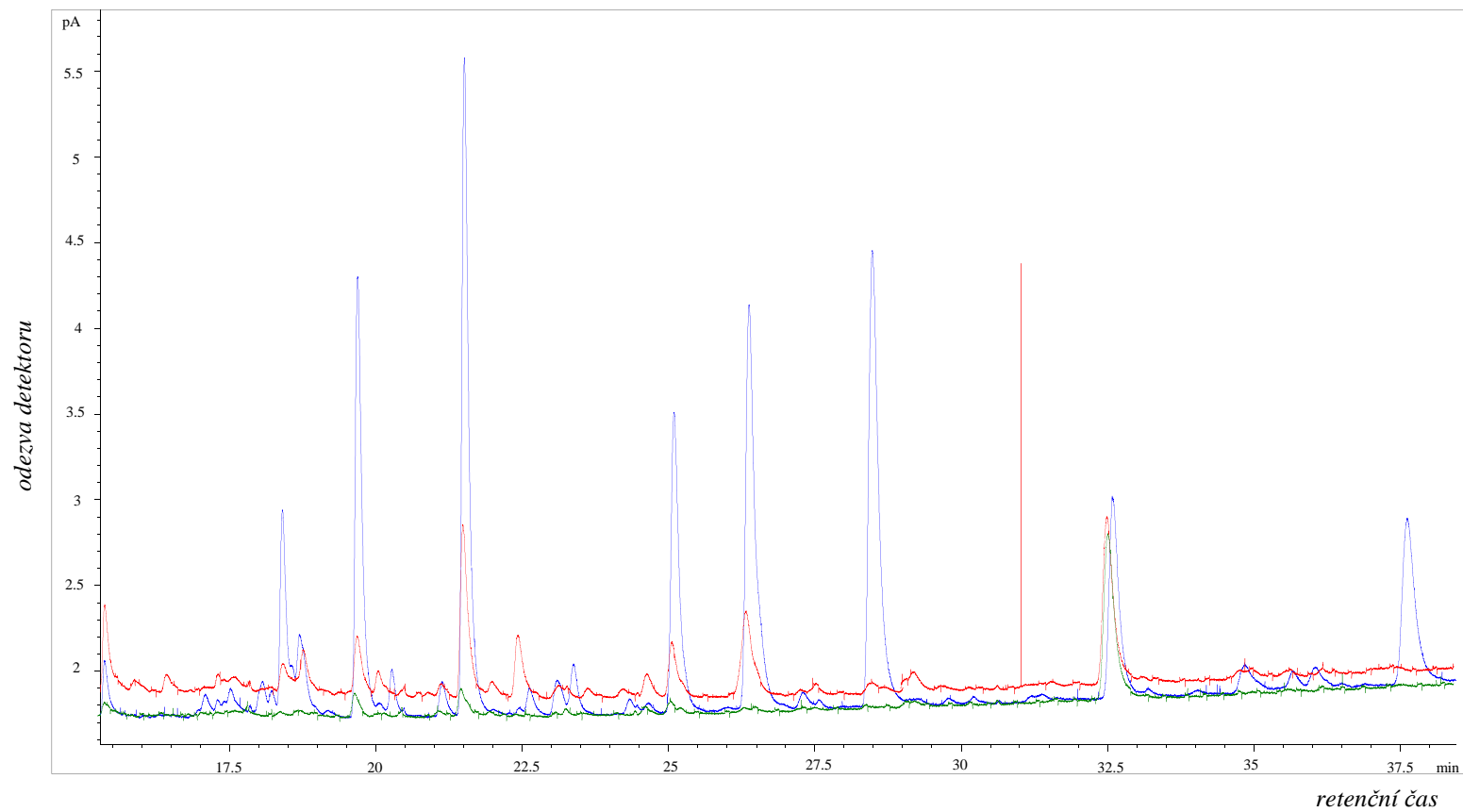
1 – C14:0, 2 – C15:0, 3 – C16:0, 4 – C16:1n10, 5 – C16:1cis, 6 – C17:0, 7 – C18:0, 8 – C18:1n9, 9 – C18:1n7cis, 10 – C18:2 n6, 11 – C20:0, 12 – C18:3n6, 13 – C18:3n3, 14 – C20:1 n9, 15 – IS, 16 – C22:0, 17 – C20:3n6, 18 – C20:4n6, 19 – C20:5 n3, 20 – C24:0, 21 – C24:1 n9, 22 – C22:4n6, 23 – C22:5n6, 24 – C22:5n3, 25 – C22:6n3, 26 – C24:5n6

GC podmínky: viz příloha A.



Příloha D Chromatografický záznam přenosu mezi jednotlivými vyraženími terčíku DBS

69



Záznam modře – vzorek DBS, červeně - vzorek blanku po prvním vyražení, zeleně – vzorek blanku po druhém vyražení

GC podmínky: viz příloha A.