

ANALÝZA EIKOSANOIDŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH S VYUŽITÍM KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Michaela Chocholoušková, Eva Cífková a Michal Holčapek

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

Eicosanoids play an important role in the ongoing inflammation in the human body. Eicosanoids are formed by the enzymatic or non-enzymatic oxidation mainly from arachidonic acid or other polyunsaturated fatty acids. Ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to negative-ion electrospray ionization mass spectrometry with triple quadrupole analyzer was used for the analysis of eicosanoids. Eicosanoids were separated in reversed-phase mode using Acquity UPLC BEH C18 (2.1x150 mm, 1.7 μ m) column. All important parameters, such as turbo ion spray source temperature, nebulizer, and turbo gas flow have been optimized to achieve the highest sensitivity for subsequent selected reaction monitoring (SRM) transitions. The collision energy was optimized for each precursor / product ion pair used for SRM detection. This method will be applied to samples of human plasma.

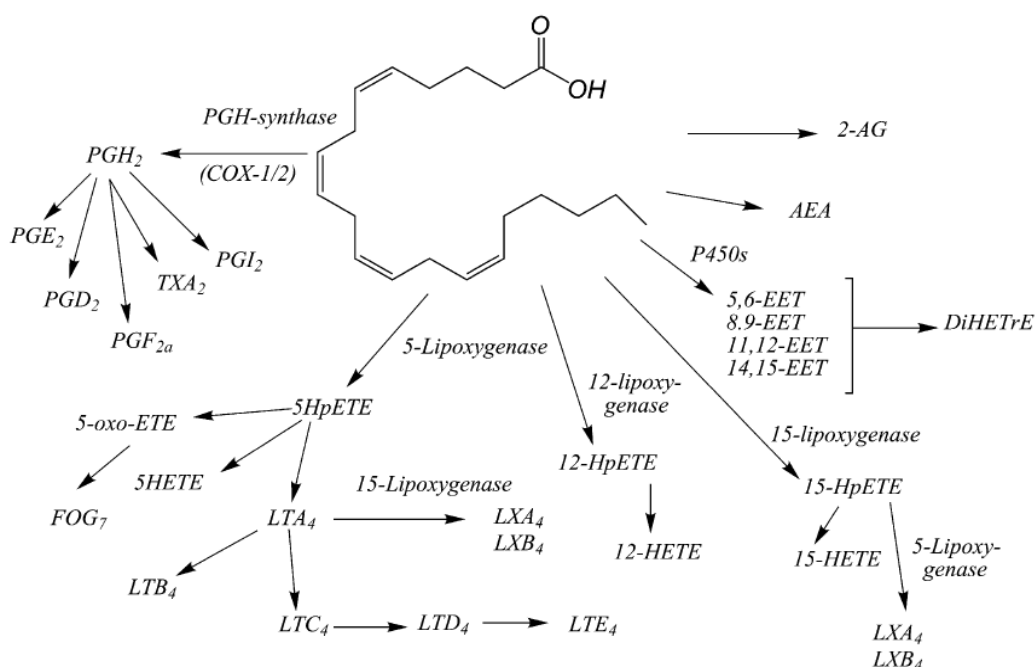
Souhrn

Eikosanoidy hrají důležitou roli při probíhajícím zánětu v lidském těle. Vznikají enzymatickou i neenzymatickou oxidací arachidonové kyseliny a jiných polynenasycených mastných kyselin. Pro analýzu eikosanoidů byla použita ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC/MS) pracující v negativním módu elektrosprejové ionizace a s použitím trojitého kvadrupólového analyzátoru. Analyty byly separovány na koloně Acquity UPLC BEH C18 (2.1x150 mm, 1.7 μ m). Všechny důležité parametry iontového zdroje, jako teplota iontového zdroje a průtoky plynů, byly optimalizovány tak, aby byla získána největší citlivost pro následnou SRM (Selected reaction monitoring) metodu. Kolizní energie byla optimalizována pro každý prekurzor/produkt iontový pár využitím SRM detekce. Tato metoda bude následně aplikována na vzorky lidské plazmy.

1. Úvod

Eikosanoidy jsou bioaktivní deriváty skupiny polynenasycených esenciálních mastných kyselin (např. kyseliny arachidonové), které se účastní řady důležitých fyziologických funkcí a procesů včetně zánětu [1]. Zánět je komplexní kaskádový proces generující odpověď na vnější/vnitřní podněty a podílející se na patogenezi řady onemocnění [2]. Mnoho eikosanoidů je spojeno s onemocněním srdce, rakoviny nebo artritidy [1].

Eikosanoidy se vytvářejí enzymatickou cestou, a to prostřednictvím cyklooxygenázy (COX), lipoxygenázy (LOX) a cytochromu P450 (**obrázek 1**). Pomocí enzymu COX vznikají produkty jako prostaglandiny a tromboxany. Hydroxyeikosatetranové kyseliny (HETE) a leukotrieny jsou produkty vznikající zejména pomocí enzymu LOX, zatímco epoxyeikosatrienové kyseliny (EET) a některé HETE jsou produkty vznikající pomocí enzymu P450. Vedle eikosanoidů existují i metabolity – resolviny - vznikající enzymaticky z kyseliny dokosahexanové (DHA) a metabolity - hydroxyoktadekadienové kyseliny (HODE) - vznikající z kyseliny linolové. Resolviny i HODE se generují prostřednictvím enzymu LOX. Kromě enzymatické cesty mohou eikosanoidy vznikat i neenzymatickou cestou. V tomto případě se jedná o isoprostanoidy, které vznikají peroxidací z arachidonové kyseliny [3].



Obrázek 1: Schéma tvorby eikosanoidů [4]

Tento plný enzymatický proces generuje řadu eikosanoidů s velmi podobnými strukturami, které jsou odvozené od kyseliny arachidonové nebo jiné polynenasycené mastné kyseliny. A právě kvůli této skutečnosti je jejich analýza složitá, což se týká zejména biologických vzorků. Jejich koncentrace v plazmě je nejnižší ze všech endogenních lipidových metabolitů (např. glycerolipidy, steroly, ceramidy a jiné). Nicméně právě při probíhajícím zánětu v těle se jejich hladina v plazmě mění, což může být velice nápomocné při stanovení patogeneze onemocnění [1,5].

Dříve byly eikosanoidy analyzovány pomocí enzymatických imunisorbentních testů (EIA) nebo pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Nevýhodou těchto metod je v případě EIA nemožnost analyzovat více analytů najednou a v případě GC/MS nutnost derivatizace. Progresivní metodou pro analýzu těchto lipidových metabolitů je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) [1]. Vzhledem k přítomnosti karboxylové skupiny se pro analýzu eikosanoidů nejčastěji využívá elektrosprejová ionizace ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a kapalinovou chromatografií (LC/ESI-MS/MS) v negativním ionizačním módu. V případě kvantifikace eikosanoidů se využívá selektivního záznamu iontových reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM), protože poskytuje přesné informace díky vysoké citlivosti a selektivitě bez derivatizačního kroku [2,6].

Kapalinová chromatografie představuje nejrozšířenější metodu pro separaci širokého spektra eikosanoidů. Využívá systému reverzních fází (RP) prováděných hlavně na kolonách C18 nebo C8, které pro separaci isobarických eikosanoidů poskytují nejvyšší selektivitu [7,8].

Cílem této práce byla optimalizace MS podmínek pro analýzu eikosanoidů tak, aby bylo docíleno nejlepší citlivosti a selektivity. Jednalo se především o zjištění optimální kolizní energie jednotlivých metabolitů pro následné SRM skeny, a poté aplikaci SRM metody na reálný vzorek lidské plazmy.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a standardy

Použitá rozpouštědla (acetonitril, 2-propanol) odpovídala čistotě pro gradientovou HPLC eluci (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Redestilovaná voda byla připravována na přístroji Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, France).

8R-hydroxy-4Z,6E,10Z-hexadekatrienová kyselina (**tetranor-12-HETE**), 12S-hydroxy-5Z,8E,10E-heptadekatrienová kyselina (**12-HHTrE**), 13-oxo-9Z,11E-octadekadienová kyselina (**13-OxoODE**), 9-oxo-10E,12Z-octadekadienová kyselina (**9-OxoODE**), 13S-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadekatrienová kyselina (**13-HOTrE**), (±)13-hydroxy-9Z,11E-octadekadienová kyselina (**13-HODE**), (±)9-hydroxy-10E,12Z-oktadekadienová kyselina (**9-HODE**), (±)12,13-dihydroxy-9Z-octadekanová kyselina (**12,13-DiHOME**), (±)15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eikosapentanová kyselina (**15-HEPE**), (±)5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eikosapentanová kyselina (**5-HEPE**), (±)11,(12)-epoxy-5Z,8Z,14Z-eikosatrienová kyselina (**11,12-EET**), (±)5,6-epoxy-8Z,11Z,14Z-eikosatrienová kyselina (**5,6-EET**), (±)12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eikosatetranová kyselina (**12-HETE**),

(±)15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eikosatetranová kyselina (**15-HETE**), (±)11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eikosatetranová kyselina (**11-HETE**), (±)5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eikosatetranová kyselina (**5-HETE**), 15S-hydroxy-8Z,11Z,13E-eikosatrienová kyselina (**15-HETrE**), 9S-hydroxy-11,15-dioxo-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-diová kyselina (**tetranor-PGDM**), 9-oxo-15S-hydroxy-5Z,10Z,13E-prostatrienová kyselina (**PGA2**), 11-oxo-15S-hydroxy-5Z,9,13E-prostatrienová kyselina (**PGJ2**), 9S-hydroxy-11-oxo-5Z,12E,14E-prostatrienová kyselina (**15-deoxy-δ-12,14-PGD2**), 15S-hydroxy-9-oxo-5Z,8(12),13E-prostatrienová kyselina (**PGB2**), (±)5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eikosatetraenová kyselina (**5,6-DiHETE**), 5S,15S-dihydroxy-6E,8Z,10Z,13E-eikosatetranová kyselina (**5,15-DiHETE**), 8S,15S-dihydroxy-5Z,9E,11Z,13E-eikosatetranová kyselina (**8,15-DiHETE**), 5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eikosatetranová kyselina (**LTB4**), 5S,12R-dihydroxy-6E,8E,10E,14Z-eikosatetranová kyselina (**6-trans LTB4**), (±)14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-eikosatrienová kyselina (**14,15-DiHETrE**), (±)5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z-eikosatrienová kyselina (**5,6-DiHETrE**), 14S-hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-dokosahexanová kyselina (**14-HDoHE**), (±)4-hydroxy-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-dokosahexanová kyselina (**4-HDoHE**), 9,15-dioxo-11R-hydroxy-5Z-prostanová kyselina (**13,14-dihydro-15-keto-PGE2**), 9S,11R-epidioxy-15S-hydroxy-5Z,13E-prostadienová kyselina (**PGH2**), 9-oxo-11R,15S-dihydroxy-5Z,13E-prostadienová kyselina (**PGE2**), 9S,15S-dihydroxy-11-oxo-5Z,13E-prostadienová kyselina (**PGD2**), 9S,11R-dihydroxy-15-oxo-5Z,13E-prostadienová kyselina (**15-keto-PGF2α**), 9S,11S-dihydroxy-15-oxo-5Z-prostanová kyselina (**13,14-dihydro-15-keto-PGF2α**), 9S,11R,15S-trihydroxy-5Z,13E-prostadienová kyselina (**PGF2α**), 9S,11R,15S-trihydroxy-5Z,13E-prostadienová kyselina - cyklo[8S,12R] (**8-iso-PGF2α**), (±)19,20-dihydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-dokosapentanová kyselina (**19,20-DiHDPE**), 9α,11,15S-trihydroxythromba-5Z,13E-dien-1-ová kyselina (**TXB2**), 6-oxo-9S,11R,15S-trihydroxy-13E-prostanová kyselina (**6-keto-PGF1α**) a 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-dokosahexanová kyselina (**resolvin D1**) standardy byly zakoupeny od firmy Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Standardy mastných kyselin - 6Z,9Z,12Z-oktadekatrienová kyselina (**γ-linolenová kyselina**), 9Z,12Z,15Z-oktadekatrienová kyselina (**α-linolenová kyselina**), 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-dokosahexanová kyselina (**DHA**) a 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eikosapentanová kyselina (**EPA**) byly zakoupeny od firmy Nu-Chek-Prep (Elysian, MN, USA).

2.2 Příprava vzorků

Zásobní roztok obsahující 43 standardů eikosanoidů a 9 standardů mastných kyselin o koncentraci 5000 pg/μl byl připraven v ethanolu. Dále byl zásobní roztok odpařen pod dusíkem a opět rozpuštěn v mobilní fázi A (acetonitril/voda/kys. octová (45/55/0,02, v/v/v)).

Vzorek krevní plazmy byl zpracován extrakcí pevnou fází. 500 μl plazmy bylo smícháno s 1,5 ml směsí methanolu a vody (10/90, v/v) a řádně promícháno. Dále byl roztok plazmy centrifugován (Hettich® EBA 20 centrifuge EBA 20) po dobu 10 minut při 6000 otáčkách. Samotná extrakce eikosanoidů byla provedena na extrakční polymerní kolonce Strata™ - X 33 μm (200 mg/3 mL) – reverzní fáze. SPE kolonka byla nejprve kondicionována 3 ml methanolu a poté vodou (3 ml). Po kondicionaci byly na kolonku nanесeny 2 ml vzorku plazmy a následně byly eikosanoidy eluovány 3 ml methanolu. Extrakt byl odpařen pod dusíkem a rozpuštěn v 50 μl mobilní fáze A (acetonitril/voda/kys. octová (45/55/0,02, v/v/v)). Nakonec byl extrakt centrifugován po dobu 1 minuty při 6000 otáčkách.

2.3 UHPLC/MS podmínky

Analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) spojeném s hmotnostním spektrometrem ABSciex 6500 QTRAP s trojitým kvadrupólem a Turbo V iontovým zdrojem.

Parametry kapalinového chromatografu byly následující: Acquity UPLC BEH C18 kolona (2.1x150 mm, 1.7 μm, Waters), dávkovaný objem 1 μl, teplota kolony 40°C. Mobilní fáze A obsahovala acetonitril – H₂O – kyselinu octovou (45/55/0,02, v/v/v) a mobilní fáze B acetonitril – 2-propanol (50/50, v/v). Gradientový program je zobrazen v **tabulce I**. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, přičemž doba analýzy byla 14 min a poté následoval promývací krok (14 – 20 min).

Hmotnostní spektrometr pracoval v negativním módu a v hmotnostním rozsahu m/z 50 – 500. Parametry iontového zdroje byly následující: napětí kapiláry -4,5 kV, teplota 525°C, hodnota zmlžujícího plynu (GS1) 50 psi, turbo plynu (GS2) 50 psi a „curtain“ plynu (CUR) 10 psi. Pro MS/MS a MRM analýzu eikosanoidů byly dalšími parametry: kolizní plyn (CAD) = medium, deklasterující potenciál (DP) = -80 V, vstupní potenciál (EP) = -10 V a potenciál kolizní cely (CXP) = -25 V. Kolizní energie (CE) byly optimalizovány pro každý metabolit.

Tabulka I. Gradientový program pro HPLC

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	98	2
12,0	38	62
12,1	1	99
13,5	1	99
13,6	1	99
14,5	1	99
15,0	98	2
20,0	98	2

3. Výsledky a diskuze

Prvním krokem byla optimalizace iontového zdroje, přičemž na začátku se vycházelo z doporučení od výrobce. Při průtoku 0,4 ml/min je doporučena teplota iontového zdroje 400 – 500°C, přičemž je lepší vyšší teplota, která udržuje iontový zdroj čistý. U GS1 jsou doporučené hodnoty od 20 – 60 psi, u GS2 od 20 – 50 psi. Tato optimalizace byla prováděna na standardní směsi eikosanoidů. Optimalizována byla teplota 500, 525, 550 a 575°C, při teplotě 525°C byla dosažena nejlepší citlivost. Průtoky plynů byly optimalizovány pro hodnoty 50 a 60 psi, přičemž lepší citlivost byla pozorována při hodnotě 50 psi. Při nižších hodnotách (teplota 400°C a průtoky plynů 30, 40 psi) docházelo k nežádoucímu jevu, a to k tvorbě kapiček v iontovém zdroji způsobených vyšším obsahem vody v mobilní fázi.

Další fází byla fragmentace jednotlivých eikosanoidů při různých kolizních energiích. Z fragmentace byl vybrán prekurzor/produkt iontový pár, přičemž cílem bylo vybrat nejintenzivnější produktový ion a následně i kolizní energii, při které bylo docíleno nejlepší citlivosti. U všech eikosanoidů je pozorována ztráta vody (18) a ztráta CO₂ (44). Ztráta vody je typická u všech látek obsahující kyslík a není tedy vhodné tento přechod zahrnovat do SRM metody. U většiny standardů eikosanoidů dochází k nejintenzivnější fragmentaci u hydroxylové skupiny, resp. u karbonylové skupiny. V případě mastných kyselin je nejintenzivnější fragmentací ztráta CO₂ (44). Optimalizované kolizní energie a SRM přechody pro jednotlivé standardy jsou uvedeny v **tabulce II**.

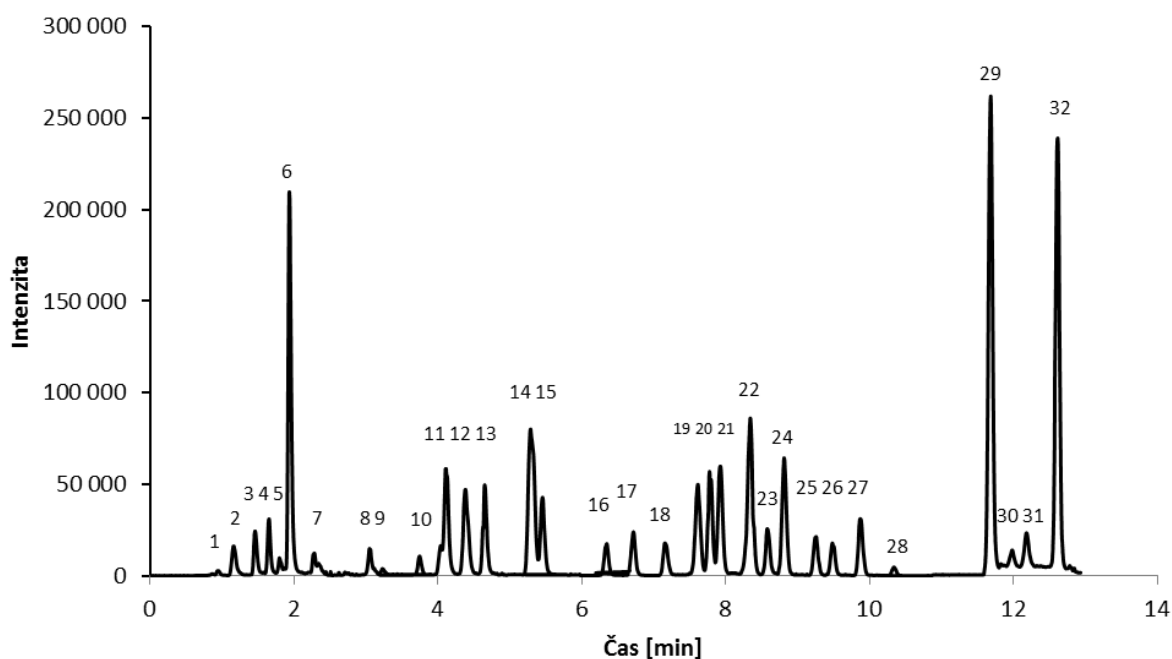
Tabulka II. Optimalizace SRM přechodů

Standard	[M-H]	Kolizní energie	Hlavní produkt	Produktové ionty	t _R [min]
tetranor-12-HETE	265	-16	109	221, 205, 165, 139, 109	5,29
12-HHTrE	279	-17	179	261, 217, 179, 135	5,47
13-HOTrE	293	-21	195	275, 223, 224, 195	6,36
13-OxoODE	293	-26	113	249, 195, 167, 113	7,94
9-OxoODE	293	-27	185	275, 249, 197, 185, 125	8,34
13-HODE	295	-25	195	277, 195	7,65
9-HODE	295	-23	171	277, 195, 171	7,82
12,13-DiHOME	313	-30	183	295, 277, 195, 183, 129	4,67
15-HEPE	317	-17	219	299, 255, 219, 175	6,74
5-HEPE	317	-17	255	299, 255, 201, 175, 115	7,61
15-HETE	319	-17	219	301, 257, 219, 175	7,95
11-HETE	319	-17	167	301, 167	8,38
12-HETE	319	-20	179	301, 257, 179, 135	8,62
5-HETE	319	-18	257	301, 257, 203, 115	9,28
11,12-EET	319	-17	167	301, 257, 179, 167	9,9
5,6-EET	319	-17	191	301, 209, 191	10,37
15-HETrE	321	-22	221	303, 259, 221	8,84
tetranor-PGDM	327	-22	247	309, 267, 247	0,88
PGA2	333	-20	271	315, 271, 235, 189	3,06
PGJ2	333	-20	189	315, 271, 233, 189	3,21
PGB2	333	-25	235	315, 271, 235, 175	3,21
15-deoxy-12,14 PGD2	333	-20	271	315, 271, 203	4,44
8,15 DiHETE	335	-21	235	317, 273, 235, 155	3,76
5,15-DiHETE	335	-18	173	317, 255, 201, 173, 115	4,05
6-trans LTB4	335	-22	195	317, 273, 195	4,13
LTB4	335	-20	195	317, 273, 195	4,39
5,6- DiHETE	335	-26	145	317, 145	5,47
14,15-DiHETrE	337	-22	207	319, 257, 207, 263, 129	5,35
5,6 -DiHETrE	337	-23	145	319, 191, 145	7,19
14-HDoHE	343	-20	205	325, 281, 205, 161	8,3
4-HDoHE	343	-15	281	325, 281, 101	9,51
PGH2	351	-20	271	333, 315, 271, 233, 189	1,77
PGE2	351	-23	271	333, 315, 271, 189	1,77
15-keto-PGF2 α	351	-23	219	333, 315, 289, 219	1,92
PGD2	351	-23	271/233	333, 271, 233, 189	1,93
13,14-dihydro-15-keto-PGE2	351	-21	315	333, 315	2,41
8-iso-PGF2 α	353	-28	193	309, 291, 255, 193	1,42
PGF2 α	353	-30	309	335, 309, 291, 193	1,62
13,14-dihydro-15-keto-PGF2	353	-33	291	291, 195, 183	2,35
19,20-DiHDPE	361	-23	273	343, 273, 229	5,29
6-keto-PGF1 α	369	-30	245	315, 245, 207, 163	1,13
TXB2	369	-21	195	195, 169	1,44
Resolvin D1	375	-21	141	357, 233, 141	2,27

EPA	301	-20	257	257, 203, 151	11,77
α -linolenová kys.	277	-21	233	233, 205, 179	12,10
γ -linolenová kys.	277	-19	233	233, 205, 179	12,30
DHA	327	-19	283	283, 229, 191	12,73
Arachidonová kys.	303	-20	259	259, 205, 177	13,00

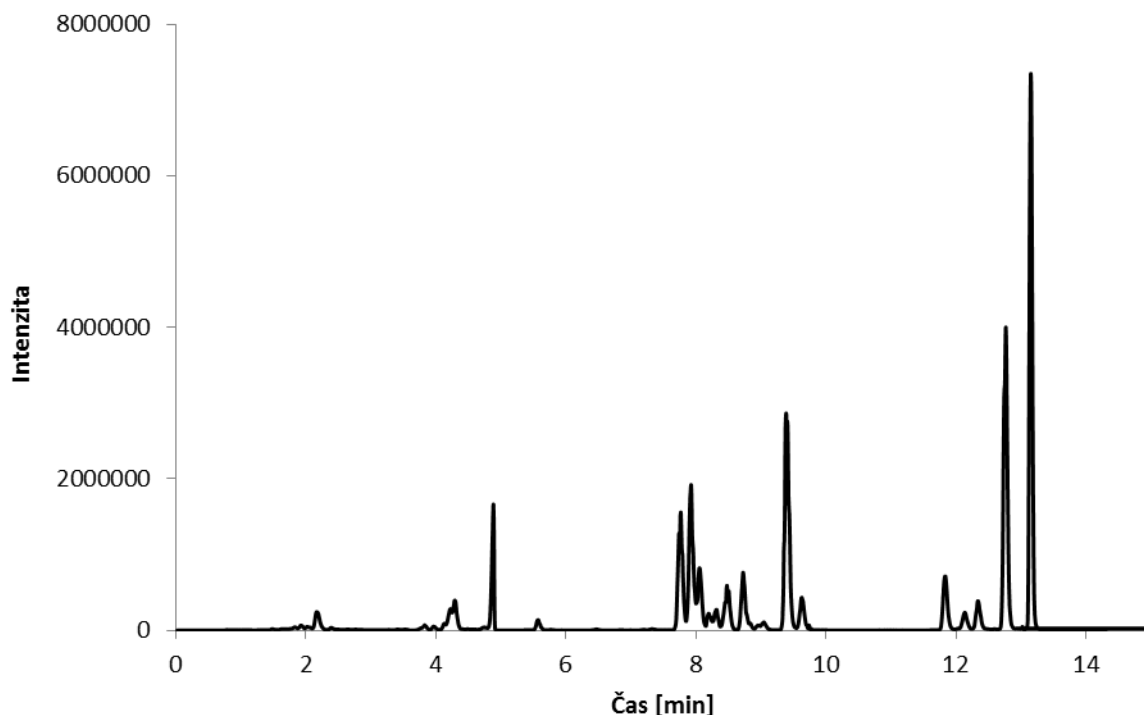
Chromatogram SRM přechodů je zobrazen na **obrázku 2**, kde **pík 1**: tetranor PGDM, **pík 2**: 6-keto-PGF1 α , **pík 3**: 8-iso-PGF2 α ; TXB2, **pík 4**: PGF2 α , **pík 5**: PGE2, **pík 6**: 15-keto PGF2 α ; PGD2, **pík 7**: 13, 14 dihydro-15-keto-PGF2 α ; Resolvin D1, **pík 8**: PGA2, **pík 9**: PGJ2, **pík 10**: 8,15-DiHETE, **pík 11**: 5,15-DiHETE; 6-trans-LTB4, **pík 12**: 15 deoxy- δ -12,14-PGD2; LTB4, **pík 13**: 12, 13-DiHETE, **pík 14**: tetranor-12-HETE; 19,20-DiHDPE; 14,15-DiHETE, **pík 15**: 5,6-DiHETE; 12-HHTrE, **pík 16**: 13-HOTrE, **pík 17**: 15-HEPE, **pík 18**: 5,6-DiHETE, **pík 19**: 13-HODE, 5-HEPE, **pík 20**: 9-HODE, **pík 21**: 13-OxoODE; 15-HETE, **pík 22**: 9-OxoODE; 11-HETE; 14-HDoHE, **pík 23**: 12-HETE, **pík 24**: 15-HETrE, **pík 25**: 5-HETE, **pík 26**: 4-HDoHE, **pík 27**: 11, 12-EET, **pík 28**: 5,6-EET, **pík 29**: EPA, **pík 30**: α -linolenová kyselina, **pík 31**: γ -linolenová kyselina a **pík 32**: DHA.

SRM přechody byly vybrány tak, aby i při koeluci bylo možné separovat jednotlivé analyty s ohledem na vysokou citlivost a selektivitu. Například 19,20-DiHDPE a tetranor-12-HETE mají stejný retenční čas (5,29 min), ale SRM přechod u 19,20-DiHDPE je 361 \rightarrow 273 a u tetranor 12-HETE je 265 \rightarrow 109. Naopak 11-HETE a 11,12-EET mají stejný SRM přechod 319 \rightarrow 167, ale retenční čas je rozdílný (11-HETE: 8,38 min, 11, 12-EET: 9,9 min).



Obrázek 2: Záznam chromatogramu SRM přechodů pro standardy eikosanoidů a mastných kyselin

Tato metoda byla poté aplikována na reálný vzorek lidské plazmy. Záznam chromatogramu je zobrazen na **obrázku 3**.



Obrázek 3: Záznam chromatogramu reálného vzorku lidské plazmy

Celkem bylo identifikováno 23 eikosanoidů a 5 mastných kyselin, které jsou uvedeny v **tabulce 3**. Problematickým bodem jsou prostaglandiny, kterých je v plazmě velký počet, mají velmi podobné struktury a téměř totožné fragmentace. Z tohoto důvodu je jejich rozeznání od sebe obtížnější než u jiných eikosanoidů jako jsou například hydroxyeikosatetranové kyseliny (HETE).

Tabulka III. Identifikované eikosanoidy a mastné kyseliny v lidské plazmě

Metabolit	[M-H] ⁻	Standard t _R [min]	Plasma t _R [min]	Metabolit	[M-H] ⁻	Standard t _R [min]	Plasma t _R [min]
tetranor-12-HETE	265	5,29	5,26	15-HETrE	321	8,84	8,80
12-HHTrE	279	5,47	5,43	8,15 DiHETE	335	3,76	3,71
13-HOTrE	293	6,36	6,32	5,15-DiHETE	335	4,05	4,02
13-OxoODE	293	7,94	7,90	6-trans LTB4	335	4,13	4,13
9-OxoODE	293	8,34	8,30	14,15-DiHETrE	337	5,35	5,31
13-HODE	295	7,65	7,60	5,6-DiHETrE	337	7,19	7,14
9-HODE	295	7,82	7,77	14-HDoHE	343	8,30	8,25
12,13-DiHOME	313	4,67	4,63	4-HDoHE	343	9,51	9,47
15-HEPE	317	6,74	6,69	19,20-DiHDPE	361	5,29	5,25
5-HEPE	317	7,61	7,56	Arachidonic	303	13,00	13,00
15-HETE	319	7,95	7,91	EPA	301	11,77	11,84
11-HETE	319	8,38	8,34	DHA	327	12,73	12,77
12-HETE	319	8,62	8,57	α-linolenic	277	12,10	12,14
5-HETE	319	9,28	9,23	γ-linolenic	277	12,31	12,35

4. Závěr

Pro analýzu eikosanoidů a mastných kyselin byla zoptimalizována SRM metoda s využitím UHPLC/MS. Jednalo se především o optimalizaci kolizní energie. Následně byly tyto metabolity identifikovány v lidské plazmě pomocí retenčních časů a fragmentačního chování. Celkem bylo v plazmě detegováno 23 eikosanoidů a 6 mastných kyselin. Dalším krokem bude validace metody pro kvantitativní analýzu.

Poděkování

Tato práce byla podporována grantovým projektem ERC CZ číslo LL1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Literatura

- [1] Wang J., Armando A. M., Quehenberger O., Yan Ch., Dennis E.A.: *J. Chromatogr. A* **1359** (2014) 60 – 69.
- [2] Ferreiro-Vero C., Mata-Granados J. M., Priego-Capote F., Quesada-Gómez J. M., Luque de Castro M. D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (2011) 1093 – 1103.
- [3] Kortz L., Dorow J., Becker S., Thiery J., Ceglarek U.: *J. Chromatogr. B* **927** (2013) 209 – 213.
- [4] Murphy R.C., Barkley R. M., Berry Zemski K., Hankin J., Harrison K., Johnson Ch., Krank J., McAnoy A., Uhlson Ch., Zarini S.: *Anal. Biochem.* **346** (2005) 1 – 42.
- [5] Quehenberger O., Armando A. M., Brown A. H., Milne S. B., Myers D. S., Merrill A. H., Bandyopadhyay S., Jones K. N., Kelly S., Shaner R. L., Sullards C. M., Wang E., Murphy R. C., Barkley R. M., Leiker T. J., Raetz Ch. R. H., Guan Z., Laird G. M., Six D. A., Russell D. W., McDonald J. G., Subramaniam S., Fahy E., Dennis E. A.: *J. Lipid Res.* **51** (2010) 3299 - 3305.
- [6] Puppolo M., Varma D., Jansen S.: *J. Chromatogr. B* **964** (2014) 50-64.
- [7] Shinde D. D., Kim K. B., Oh K. S., Abdalla N., Liu K. H., Bae S. K., Shon J. H., Kim H. S., Kim D. H., Shin J. G.: *J. Chromatogr. B* **911** (2012) 113-124.
- [8] Song J., Liu X., Wu J., Meehan M. J., Blevitt J. M., Dorrestein P. C., Milla M. E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **433** (2015) 181-188.