

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÁ
CHARAKTERIZACE SFINGOLIPIDŮ A GLYKOSFINGOLIPIDŮ
V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

DISERTAČNÍ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Ing. Roman Hájek

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**MASS SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF
SPHINGOLIPIDS AND GLYCOSPHINGOLIPIDS IN
BIOLOGICAL TISSUES**

THESIS

AUTHOR: Ing. Roman Hájek

SUPERVISOR: prof. Ing. Michal Holčápek, Ph.D.

2019

Poděkování:

Tato práce byla finančně podporována ERC CZ projektem č. LL1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Rád bych poděkoval Michalu Holčapkovi, Miroslavu Lísovi, Robertu Jiráskovi, Marii Khalíkové, Evě Cífkové a ostatním kolegům za odborné vedení při zpracování této disertační práce, za cenné rady a za věnovaný čas. Další poděkování patří Bohuslavu Melicharovi, Davidu Vránovi za poskytnutí vzorků a Lukáši Opálkovi za syntézu standardu GM3. Dále bych chtěl poděkovat lidem kteří byli oporou a dávali mi cenné rady. Zvláštní poděkování patří mé rodině za trpělivost a pochopení.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Všechny literární prameny a informace, které jsem v práci použil, jsem uvedl v seznamu použité literatury.

Byl jsem obeznámen 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 použití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že když dojde k použití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o použití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněná ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výšky.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním svojí práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 1.5.2019

Roman Hájek

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Cíl disertační práce	10
Shrnutí	11
Summary	13
1 Úvod	15
2 Teoretická část	17
2.1 Kapalinová chromatografie	17
2.1.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii	17
2.1.2 Chromatografické systémy	19
2.2 Hmotnostní spektrometrie	23
2.2.1 Instrumentace v hmotnostní spektrometrii	23
2.2.2 Ionizační techniky	24
2.2.3 Hmotnostní analyzátory	29
2.3 Lipidy a jejich klasifikace	36
2.3.1 Mastné kyseliny	36
2.3.2 Glycerolipidy	38
2.4 Lipidomická analýza	44
2.4.1 Extrakce lipidů	44
2.4.2 Separace lipidů	44
2.4.3 Hmotnostní spektrometrie lipidů	44
3 Experimentální část	46
3.1 Použité chemikálie a standardy	46
3.2 Příprava vzorku	46
3.3 Optimalizace HPLC/ESI-MS	47
4 Výsledky a diskuze	49

4.1	Optimalizace metody a identifikace gangliosidů	49
4.1.1	Optimalizace mobilní fáze	51
4.1.2	Hmotnostní spektrometrie gangliosidů	57
4.1.3	Retenční chování gangliosidů v HILIC módu	69
4.1.4	Analýza biologických vzorků	71
4.2	Kvantitativní analýza lipidů nádorové a sousední zdravé tkáně	73
5	Závěr	77
6	Seznam použité literatury	78
	Seznam publikovaných prací	85
	Přílohy	88

Seznam použitých zkratek

Ag-HPLC	Argentační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Silver-ion High Performance Liquid Chromatography)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure PhotoIonization)
BMI	Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
Cer	Ceramid (Ceramide)
CN	Počet uhlíků (Carbon Number)
DB	Dvojná vazba (Double Bond)
DMS	Diferenční mobiltní spektrometrie (Differential Mobility Spectrometry)
DTIMS	Iontová mobiltní spektrometrie v driftovací trubici (Drift Tube Ion Mobility Spectrometry)
EI	Elektronová ionizace (Electron Ionization)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry)
FA	Mastné kyseliny (Fatty Acids)
FAIMS	Iontová mobiltní spektrometrie s vysokonapětovou asymetrickou vlnou (Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance)
Fuc	Fukóza (Fucose)
FWHM	Šírka píku v polovině jeho výšky (Full Width at Half Maximum)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC/MS	Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry)
Gal	Galaktóza (Galactose)

Glc	Glukóza (Glucose)
Hex	Hexóza (Hexose)
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MS	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní Spektrometrií
ICR	Iontová cyklotronová rezonance (Ion Cyclotron Resonance)
IS	Vnitřní standard (Internal Standard)
IT	Iontová past (Ion Trap)
IMS	Iontová mobilitní spektrometrie (Ion Mobility Spectrometry)
K_D	Distribuční (rozdělovací) konstanta (Distribution Constant)
LOD	Limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of Quantification)
LPI	Lysofosfatidylinositoly (Lysophosphatidylinositoles)
LPA	Lysofosfatidové kyseliny (Lysophosphatidic Acids)
LPS	Lysofosfatidylseriny (Lysophosphatidylserines)
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MDA	Vícerozměrná analýza (Multidimensional Data Analysis)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
MSⁿ	Tandemová hmotnostní spektrometrie do n-tého stupně (Tandem Mass Spectrometry to nth degree)
MTBE	Methyl- <i>Terc</i> -Butyl-Ether
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti a náboje (Mass to Charge Ratio)
NeuAc	N-acetylneuraminová kyselina (N-Acetylneuraminic Acid)
NP	Systém s normálními fázemi (Normal-Phase)
OPLS	Ortogonalní metoda nejmenších čtverců (Orthogonal Partial Least Square)

PA	Fosfatidové kyseliny (Phosphatidic Acids)
PCA	Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PG	Fosfatidylglyceroly (Phosphatidylglycerols)
PI	Fosfatidylinositoly (Phosphatidylinositols)
PS	Fosfatidylseriny (Phosphatidylserines)
QqQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole)
QTof	Kvadrupól s analyzátozem doby letu (Quadrupole coupled with Time-ofFlight)
RCC	Karcinom ledvin (Renal Cell Carcinoma)
RIC	Rekonstruovaný iontový proud (Reconstructed Ion Current)
RP	System s obrácenými fázemi (Reversed-Phase)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SA	Kyselina sialová (Sialic Acid)
Tof	Analyzátor doby letu (Time-of-Flight)
TWIMS	Iontová mobilitní spektrometrie s pohybující se vlnou (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-HighPerformance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialová oblast (Ultra Violet)
VIS	Viditelná oblast (Visible)

Cíl disertační práce

1. Vývoj HILIC/ESI-MS metody pro stanovení gangliosidů
2. Popsání fragmentačního a retenčního chování gangliosidů
3. Detailní charakterizace lipidomického složení a zejména pak složení gangliosidů v biologických vzorcích pomocí vyvinuté HILIC/ESI-MS metody
4. Kvantitativní studie lipidů nádorové a okolní zdravé tkáně u pacientů trpících karcinomem ledvin

Shrnutí

Tato práce se zabývá analýzou lipidů, jež mohou mít vliv na mnohdy fatální onemocnění. Lipidy jsou především důležitou součástí všech biologických tkání s řadou důležitých funkcí v organismu. Základem lipidomických studií je identifikace a kvantifikace lipidů v biologických vzorcích. Detailní informace o celém lipidomu jsme schopni získat pomocí separačních technik ve spojení s hmotnostní. Vzhledem k velké komplexnosti lipidů je jejich identifikace a kvantifikace stále velmi náročným úkolem.

První část této práce se věnuje vývoji nové metody využívající chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC), ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionzací elektrosprejem (ESI-MS), ke komplexní charakterizaci sfingolipidů, zejména pak gangliosidů a ostatních polárních lipidů v biologických vzorcích. Předně došlo k extraci lipidů pomocí směsi chloroformu, metanolu a vody, kde vrchní vodná fáze obsahující gangliosidy a další polární lipidy byla přečištěna pomocí extrakce tuhou fází, kdy byla použita stacionární fáze C18. Následně byly testovány podmínky chromatografické separace za účelem dosáhnout nejlepšího rozlišení a intenzity separovaných tříd lipidů. Pro separaci byla použita povrchově porézní kolona Ascentis Si (150 × 2.1, velikost částic 3 μm). Byla testována různá koncentrace jednotlivých aditiv a pH mobilní fáze. Výsledek ukázal, že koncentrace aditiv a pH mobilní fáze nemá významný vliv pouze na separaci, ale také na intenzitu separovaných lipidů. Lipidy byly identifikovány s vysokou jistotou na základě přesné hodnoty m/z $[M-H]^-$ iontů a fragmentových iontů (MS/MS) měřených pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru. Díky detailní interpretaci fragmentačních spekter bylo umožněno zobecnění fragmentačních cest, což umožnilo následné zařazení gangliosidů do série *a*, *b* či *c*. Strukturní přiřazení bylo dále ve shodě s předpokládaným retenčním chováním v chromatografickém módu HILIC, na základě korelace mezi retencí gangliosidů, počtem sacharidových jednotek a jejich sekvencí. Finální HILIC/ESI-MS/MS metoda byla použita pro analýzu prasečího mozku, lidských ledvin, plic, plasmy a erytrocytů. Pomocí 15 minutové LC/MS analýzy bylo identifikováno 145 jednotlivých gangliosidů z 19 tříd, 71 sulfatidů a 59 polárních fosfolipidů (fosfatidylserinu, fosfatidylinositolu, lysofosfatidylinositolu a fosfatidylglycerolu).

Další část této práce se zaměřuje na optimalizaci HILIC/ESI-MS metody pro kvantitativní analýzu gangliosidů (GM3) a ostatních polárních lipidů jako jsou sulfatidy, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, lysofosfatidylinositoly a fosfatidylseriny. Metoda byla

validována pro kvantitativní studii lipidů v nádorové tkáni a okolní zdravé tkáni ledvin u pacientů trpících karcinomem ledvin (renal cell carcinoma, RCC). Kvantifikace probíhala na základě separace jednotlivých tříd a koeluce interního standardu náležícího pro danou třídu. Naměřená data byla semikvantitativně procesována pomocí softwaru LipidQuant a statisticky vyhodnocena pomocí vícerozměrné statistické analýzy dat (MDA), což umožnilo kompletní rozdělení obou skupin se 100 % specificitou a sensitivitou. Celkově, tak bylo identifikováno 115 jednotlivých lipidů ze sedmy tříd ve 40 vzorcích nádorové tkáně a okolní zdravé tkáně ledvin. Pro nejvýznamnější vybrané lipidy byly vytvořeny box ploty a vypočítány parametry určující významnost lipidů jako je: fold change, T hodnota a p hodnota.

Klíčová slova: lipidomika, lipidy, sfingolipidy, gangliosidy, kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí, hmotnostní spektrometrie, biologické vzorky, karcinom ledvin.

Summary

Lipids are important compounds in all biological tissues having many essential functions in the organism. The identification and quantification of lipids in biological samples is a base for lipidomic studies. High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry was used to obtain detailed information of the lipidome. Identification and quantification of lipids is still a challenging task due to their extraordinary complexity of the samples.

The first part of this thesis aims to the development of a new method based on hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to a negative-ion electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) used for the identification of sphingolipids mainly gangliosides and other polar lipids in biological samples. Lipids were extracted by chloroform–methanol–water mixture, where an upper aqueous layer containing gangliosides and other polar lipid classes was further purified by solid-phase extraction using stationary phase C18. The optimization of chromatographic conditions was done with the goal to achieve the best resolution and MS sensitivity of separated lipids classes. Core–shell Ascentis Si column ($150 \times 2.1, 3 \mu\text{m}$) was tested for the separation of gangliosides. Diverse concentration of additives and pH values were used during the testing. It has been identified that additive concentration and pH values do not significantly affect separation only but also MS sensitivity. The identification of lipids was based on accurate m/z values of $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions and fragment ions (MS/MS) measured by high-resolution MS. The detailed interpretation of MS/MS spectra enabled the generalization of fragmentation pathways, which was used for the differentiation of gangliosides a, b, and c series. The structural assignment was further in alignment with the predicted retention behavior in HILIC mode on the basis of the correlation among the ganglioside retention, the number of saccharide units and their sequences. The final HILIC/ESI-MS/MS method was applied for the analysis of porcine brain, human kidney, lungs, plasma, and erythrocytes. Resulting in identification of 145 ganglioside species from 19 classes 71 sulfatides and 59 polar phospholipids (phosphatidylserines, phosphatidylinositols, lysophosphatidylinositols, and phosphatidylglycerols) by using 15 minutes LC/MS analysis run.

The next part of this thesis is focusing on optimization of the negative-ion hydrophilic liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HILIC/ESI-MS) method used for the quantitative analysis of ganglioside (GM3) and other polar lipid classes, such as sulfohexosylceramides (SulfoHexCer), sulfodihexosylceramides (SulfoHex2Cer), phosphatidylglycerols (PG), phosphatidylinositols (PI), lysophosphatidylinositols (LPI), and phosphatidylserines (PS). The method was fully validated for the quantitation of the studied lipids in kidney tumor and surrounding normal tissues on patients suffering by renal cell carcinoma (RCC). Quantification was based on lipid class separation and the coelution of lipid class internal standard. The raw data were semi-automatically processed using our software LipidQuant and statistically evaluated using multivariate data analysis (MDA) methods, which allowed the complete differentiation of both groups with 100% specificity and sensitivity. Overall was determined 115 lipid species from seven classes in 40 samples of RCC tumor and surrounding normal tissues. The box plots and values highlighting statistical significance such as fold changes together with T and p values were prepared for the most significant dysregulated lipids.

Keywords: lipidomics, lipids, sphingolipids, gangliosides, hydrophilic interaction liquid chromatography, mass spectrometry, biological samples, renal cell carcinoma.

1 Úvod

Lipidy jsou přírodní látky, rostlinného nebo živočišného původu, které jsou obvykle nerozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Lipidy můžeme rozdělit do osmi základních skupin na mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy [1]. Molekuly v uvedených skupinách jsou dále rozděleny na další třídy a podtřídy. Komplexní analýza lipidů se nazývá lipidomika. Jejím cílem je pochopení funkce lipidů v biologických systémech a mechanismu vzniku a průběhu mnoha metabolických chorob. Porucha metabolismu lipidů může vést ke vzniku diabetu, rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, obezity, neurodegenerativních poruch a dalších vážných onemocnění. Lipidy tvoří nezbytnou složku potravy a jsou zdrojem vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Jsou součástí biologických tkání a mají mnoho klíčových funkcí v organismu. Tvoří nedílnou součást našeho života, proto získání informací o jejich detailním profilu, složení a znalosti jejich metabolismu je velmi důležité a může vést k lepšímu porozumění onemocněním, či k objevení jejich biomarkerů.

Vzhledem k obrovské rozmanitosti jednotlivých lipidů lišících se strukturou, polaritou, a navázanou funkční skupinou je jejich analýza velmi náročným úkolem. Mezi často používané přístupy v lipidomické analýze patří tzv. shotgun, který využívá přímé infuze bez předchozí chromatografické separace a iontový zdroj elektrosprej. Shotgun přístup využívá tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Velmi často používaným přístupem v lipidomické analýze je kapalinová chromatografie, využívající různé chromatografické módy ve spojení s tandemovými a vysokorozlišujícími hmotnostními spektrometry. Další často používanou separační technikou je superkritická fluidní chromatografie, která se používá, jako kapalinová chromatografie, ve spojení s tandemovými a vysokorozlišujícími hmotnostními spektrometry. Mezi velké výhody vysokorozlišujících hmotnostních spektrometrů patří přesná hmota a vysoké rozlišení. Separační techniky s hmotnostní spektrometrií nám umožňují identifikovat a kvantifikovat komplexní směsi vzorků. Další technikou, která nám přináší informaci o prostorové distribuci lipidů v tkáních je hmotnostně spektrometrické zobrazování.

Cílem této práce bylo vyvinutí metody, využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií, pro charakterizaci sfingolipidů a glykosfingolipidů v biologických vzorcích. Konkrétně identifikace obtížně stanovitelných tříd lipidů, jako jsou gangliosidy a sulfatidy, které mají důležité biologické funkce v savcích

buňkách. Pro vyvinutí metody byla použita kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), umožňující separovat komplexní lipidomické extrakty na jednotlivé třídy, na základě jejich rozdílných polarit, ve spojení s vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometrem. Pro dosažení nejlepší citlivosti a chromatografického rozlišení je testováno složení mobilní fáze, pH mobilní fáze a koncentrace přidaných aditiv. Optimalizovaná necílená metoda umožňuje charakterizovat jednotlivé gangliosidy, sulfatidy a ostatní lipidy na základě retenčních časů, přesné hodnoty m/z a charakteristických fragmentových iontů v lidských ledvinách, plicích, plazmě, erytrocytech a prasečím mozku. Dalším cílem práce bylo použití vyvinuté metody pro kvantitativní analýzu vzorků nádorové a sousední zdravé ledvinové tkáně získané od 20 pacientů. Získaná kvantitativní data byla dále vyhodnocena pomocí vícerozměrné statistické analýzy dat (MDA), k určení nejvýraznějších změn ve složení polárních lipidů mezi nádorovou a sousední zdravou ledvinovou tkání.

2 Teoretická část

2.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní fáze a druhá je stacionární fáze. Mobilní (pohyblivá) fáze je kapalina a stacionární (nepohyblivá) fáze je tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči [2]. Princip separace je založen na opakovaném ustalování rovnováhy dělených látek ve fázovém rozhraní mezi stacionární a mobilní fází [3]. Dochází k distribuci dělených látek mezi stacionární a mobilní fází, kdy separované látky jsou unášeny mobilní fází ložem stacionární fáze. Separované látky opakovaně interagují s mobilní a stacionární fází a velikost interakce určuje zadrž v systému. Čím více separovaná látka interaguje se stacionární fází, tím je látka více zadržovaná a zvyšuje se její retenční čas. Distribuci separované látky mezi stacionární a mobilní fází můžeme popsat pomocí distribuční (rozdělovací) konstanty K_D .

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

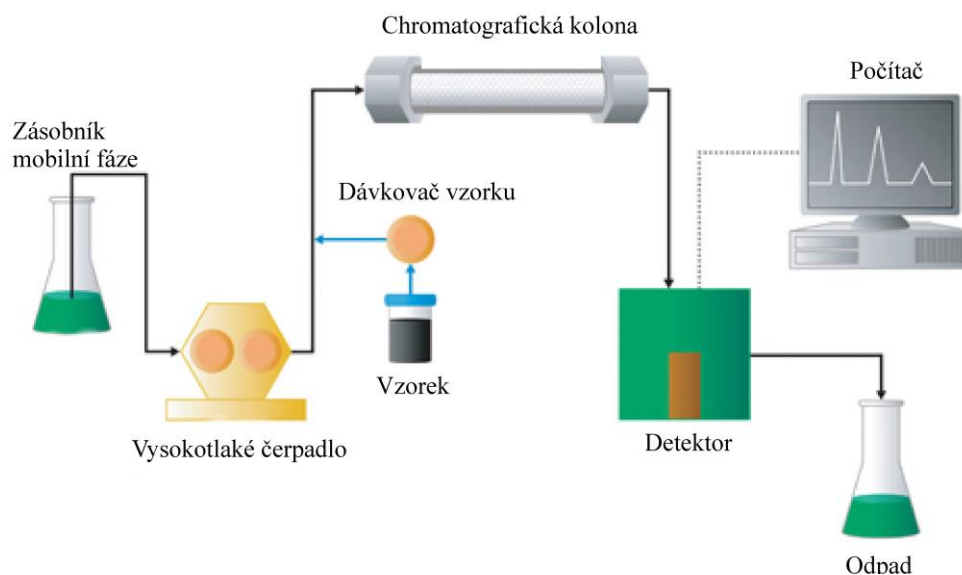
kde koncentrace separované látky ve stacionární fází je c_s a koncentrace separované látky v mobilní fází je c_m .

Separované látky mohou mít různé hodnoty distribučních konstant, přičemž čím je hodnota distribuční konstanty separované látky vyšší tím déle setrvává ve stacionární fází a tím větší je její doba retence. Na separaci analytů mají tedy vliv vlastnosti mobilní fáze a zároveň vlastnosti stacionární fáze. Složení mobilní fáze může být během separace konstantní, jde o tzv. izokratickou eluci, nebo se mobilní fáze může měnit s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvýšení eluční síly, jde o tzv. gradientovou eluci. Optimální kombinace stacionární a mobilní fáze a separačních podmínek je velice důležitá pro separaci komplexních analytů a vyžaduje důkladnou optimalizaci parametrů.

2.1.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) (Obrázek 1) se může skládat ze zásobníků mobilní fáze, jejíž průtok je regulovaný pomocí softwaru, zařízení sloužícího k odplynění mobilní fáze. Dále se skládá z čerpadla pumpujícího stabilním průtokem mobilní fáze. Za čerpadlem je umístěn dávkovač vzorku, ze kterého je vzorek unášen mobilní fází na chromatografickou kolonu sloužící k separaci analytů. Kolona je umístěna v kolonovém

termostatu kontrolující teplotu kolony. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, z něhož je veden signál do datové stanice. Kapalinové chromatografy se konstruuji tak, aby jejich mrtvý objem byl co nejmenší.



Obrázek 1: Schéma HPLC (zdroj: <http://www.pharmacelsus.de/hplc/>)

Chromatografická kolona je zkonstruovaná z pláště kolony, který nejčastěji bývá z vysoce antikorozičního materiálu jako je nerezová ocel (typ 316) [3], další variantou složení pláště může být plast. Kolona je uzavřena porézní fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze. Konce kolony obsahují ochranné kroužky a koncové hlavice, které jsou uzpůsobeny pro vstup kapilár se šroubením. Délka chromatografických kolon se pohybuje od 3 do 25 cm, ale můžeme se setkat s kolonami, které se pohybují řádově v jednotkách až desítkách milimetrů. Může se například jednat o 5 mm kolony, které se využívají jako předkolony k zachycování mechanických nečistot a slouží k ochraně chromatografických kolon. Vnitřní průměr chromatografických kolon se pohybuje od 1,0 do 4,6 mm. Velikost částic sorbentu se pohybuje od 1,6 do 5 μm , je však třeba brát v potaz, že částice v chromatografické koloně mají určitou distribuci velikostí a je kladen důraz na to, aby distribuce částic byla co nejužší pro lepší chromatografické vlastnosti. Dnešním moderním trendem je miniaturizace jak kolon, tak i částic sorbentu a tomu odpovídající spotřebě mobilní fáze a zejména pak zrychlování analýz. Tento trend odpovídá ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC), která je využívána pro zvýšení účinnosti separace za použití částic pod 2 μm [4-6]. UHPLC systémy jsou odolné vůči vysokým zpětným tlakům a využívají vysoce výkonná čerpadla, která mohou

pracovat při tlacích více jak 1000 bar. Při použití UHPLC systémů je třeba klást důraz na kvalitní a stabilní stacionární fáze. Většina stacionárních fází určených pro UHPLC má široké pracovní rozmezí pH a vysokou odolnost vůči ultra-vysokým tlakům. S tímto novým trendem byly také vyvinuty různé typy modifikací, například ACQUITY UPC 2™ Tours: DEA (diethylamin), Diol, 2-PIC (2-picolylamin), 1-AA (1-aminoantracen) (Waters), Cogent Diamond Hydride 2.0™ (Microsolv) atd. pro získání odlišné selektivity separace.

Eluát je veden z kolony do různých typů detektorů, které jsou založeny na fyzikálně chemických procesech a poskytují elektrický signál jako odezvu úměrnou změně sledovaného eluátu. Často využívaným detektorem v HPLC je spektrofotometrický detektor (UV/VIS), který pracuje při zvolené vlnové délce nebo zaznamenává celé spektrum látky tzv. detektor s fotodiodovým polem. UV/VIS je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm a řídí se Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient, l je tloušťka absorbující vrstvy a c je koncentrace absorbující složky.

Pro látky, které neobsahují ve své molekule chromofor (molekula nebo část molekuly absorbující záření), lze použít odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD). Tento detektor je založen na bázi rozptylu světla. ELSD je univerzální detektor, který se může použít při gradientové eluci k detekci fosfolipidů, mastných kyselin, sacharidů atd. Dalším možným typem detektoru pro spojení s HPLC je refraktometrický detektor, který měří změny indexu lomu eluátu procházejícím měřicí celou. Refraktometrický detektor je nevhodný pro gradientovou eluci, na rozdíl od ELSD. Dalšími typy detektorů jsou elektrochemické detektory (amperometrický, coulometrický), vodivostní atd. Detektor by se měl vyrábět tak, aby byl schopný detekovat přítomné analyty, měl nízkou úroveň šumu a vysokou citlivost, aby odezva detektoru byla co nejrychlejší, a měl vysoký lineární koncentrační rozsah. V případě používání gradientové eluce je nutné, aby byl použitelný pro tento typ analýz a hlavně, aby byl robustní a co nejjednodušší.

2.1.2 Chromatografické systémy

Chromatografické systémy jsou založeny na rozdílných principech distribuce separovaných látek mezi mobilní fází a stacionární fází a typu jejich interakcí. Liší se typem stacionárních a mobilních fází v závislosti na vlastnostech analyzovaných látek.

2.1.2.1 Systémy s reverzními fázemi

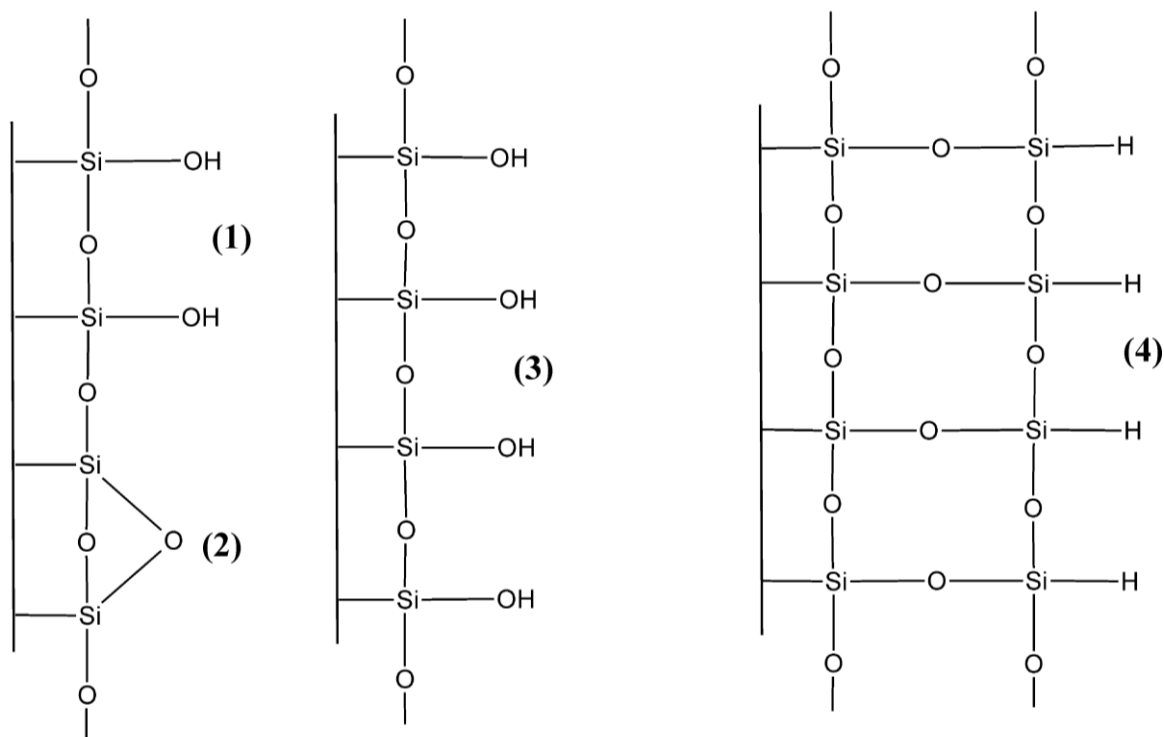
Princip chromatografie na reverzních fázích (RP) je založen na rozdílných a relativně slabých interakcích [7]. V systémech s reverzními fázemi se vyskytují nesespecifické mezimolekulové interakce (disperzní síly) mezi analytem a sorbentem a zároveň polární interakce mezi polárními molekulami mobilní fáze a analytu. Nesespecifické interakce jsou mnohem slabší než polární interakce, proto polární interakce ulehčují návrat molekulám do mobilní fáze a dochází tak k separaci analytů. Látky jsou zadržovány tím více, čím nižší je jejich polarita.

V RP systémech se používá polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze. Obvyklou mobilní fází je spojení směsi vodné složky a organických rozpouštědel, která jsou mísitelná s vodou. Vodné složky se mohou skládat z vodných roztoků kyselin, bází anebo pufrů. Obvyklá organická rozpouštědla jsou alkoholy (metanol, 2-propanol), acetonitril či méně polární tetrahydrofuran. Používané stacionární fáze v RP systémech mají nepolární charakter. Často používanou stacionární fází je dlouhý alkylový řetězec C₁₈, který je chemicky navázaný na povrchu nosiče (silikagel, hybridní sorbent atd.). Další možné typy stacionárních fází v systémech s obrácenými systémy jsou C₈, fenyl, propylfenyl. Dále lze využít polárnější stacionární fáze s propylaminovou či propylkyanovou skupinou, které mohou být použity jak v systémech s reverzními fázemi, tak v systémech s normálními fázemi.

2.1.2.2 Systémy s normálními fázemi

Systémy s normálními fázemi (NP) patří mezi nejstarší chromatografické módy, které byly vyvinuty M. S. Tswettem v roce 1903 [7]. Princip retence je založen na rozdílných polárních silách, které působí mezi analytem – stacionární fází a mezi stacionární fází – mobilní fází. Při použití nevodných mobilních fází dochází k separaci vlivem adsorpce, kdy analyt a mobilní fáze soutěží o polární adsorpční centra umístěná na povrchu stacionární fáze. Retence separovaných látek se tedy zvyšuje se zvyšující se polaritou analyzovaných látek a klesá s rostoucí koncentrací polarity mobilní fáze. Systém s normálními fázemi je vhodný pro separaci polárních analytů.

V NP systémech se používají nepolární mobilní fáze a polární stacionární fáze. Jako mobilní fáze se používají nepolární rozpouštědla, např. hexan, heptan, dichlormethan a chloroform. Tato rozpouštědla je nutné zbavit vlhkosti, aby bylo dosaženo požadované reprodukovatelnosti. Separace v NP systémech probíhá na polárních stacionárních fázích.



Obrázek 2 Silanolové skupiny na povrchu silikagelu: (1) silanolové skupiny, (2) siloxanové skupiny. Struktura klasického silikagelu (3) a hydrosilovaný silikagel (silikagelu typu C) (4).

Používané polární stacionární fáze mohou být anorganické, jako je silikagel, oxid hlinitý (alumina) nebo chemicky vázané středně polární stacionární fáze na silikagelovém nosiči, např. aminopropyl, kyanopropyl, diol atd. [3]. Nejrozšířenějším polárním anorganickým sorbentem je silikagel, který má vysokou mechanickou odolnost a lze ho použít i při vysokých tlacích v UHPLC chromatografii. Aktivními centry na povrchu silikagelu jsou hydroxylové nebo silanolové skupiny (Obrázek 2).

2.1.2.3 Hydrofilní interakční chromatografie

V posledních letech se zvýšila poptávka po separaci silně polárních látek, které jsou v RP systémech zadržovány velmi slabě a v NP systémech při použití nevodných mobilních fází dochází k velmi silné adsorpci na stacionární fázi. Tento problém lze vyřešit použitím chromatografie hydrofilních interakcí, tzv. HILIC, který navrhl Alpert v roce 1990 [8]. Systém HILIC využívá stacionární fáze, které jsou typické pro NP fáze, tedy stacionární fáze mající polární charakter. HILIC využívá mobilní fáze obsahující organická rozpouštědla a vodu

podobně jako RP systémy. Hydrofilní proto, že se charakterizuje afinitou k vodě, která se při separaci přidává do mobilní fáze. Principem retence jsou hydrofilní proton donor-akceptorové a dipól-dipólové interakce, jak s povrchem stacionární fáze, tak i s imobilizovanou kapalinou na stacionární fázi [9]. Retence je zvyšována s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polarity mobilní fáze. Retenci lze ovlivnit přidáním solí a pH mobilní fáze.

Jako stacionární fázi v HILIC systémech lze použít nemodifikovaný silikagel se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin, silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem (Obr. 2), kde jsou silanolové skupiny (-Si-OH) nahrazeny hydridovými skupinami (-Si-H). Dále se využívají stacionární fáze s chemicky vázanými aminopropylými, amidovými, nitrilovými, diolovými a dalšími polárními skupinami. Pro svou specifickou si v chromatografii našel své místo HILIC systém, který umožňuje výrazné zvýšení separovaných látek v jednom experimentu ve složitých vzorcích.

2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) [10] je destruktivní analytická fyzikálně-chemická metoda sloužící k určování molekulové hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení na ionty. Ionty mohou být buď kladné nebo záporné a jsou rozděleny podle poměru jejich hmotnosti a náboje, tzv. m/z . Hmotnostní spektrometr zaznamenává hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z , přičemž intenzita může být absolutní nebo relativní. Pomocí MS můžeme určit strukturu analyzovaných látek.

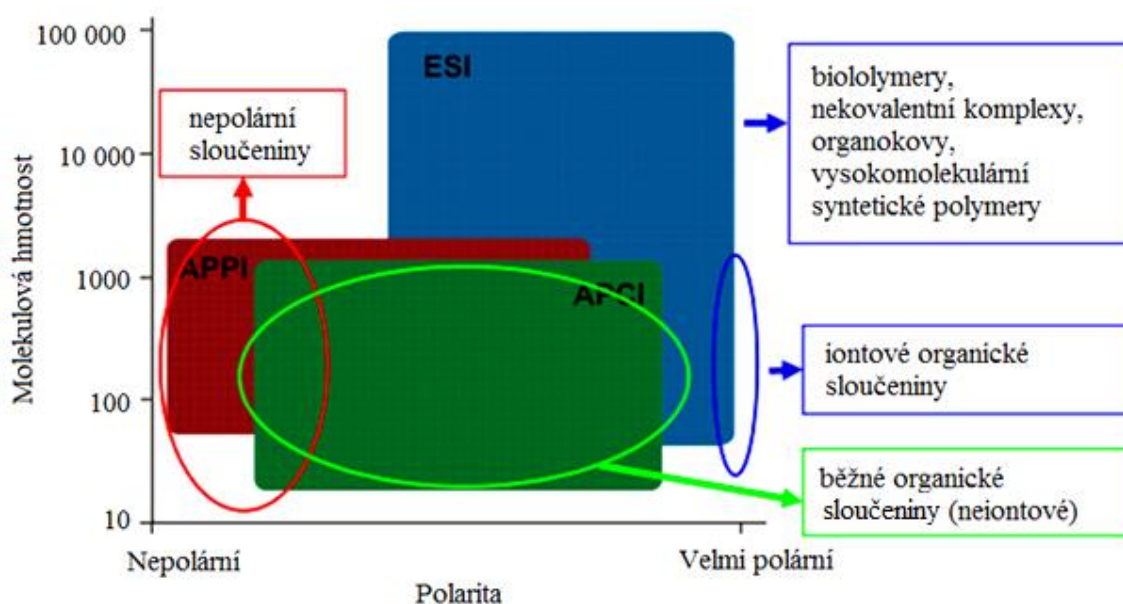
MS umožňuje spojení se separačními technikami, jako je kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, ale i kapilární elektroforéza či supekritická fluidní chromatografie. Toto spojení se separačními technikami nám umožňuje identifikovat a kvantifikovat komplexní vzorky, které se vyznačují vysokým počtem látek. MS ve spojení se separačními technikami je klíčová pro analýzu vzorků, které mají biologický původ, či při analýze stopových látek v environmentální matrici. MS technika patří mezi široce používané analytické metody ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství, zemědělství, vodárenství, laboratorní diagnostice a dalších oblastech.

2.2.1 Instrumentace v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení skládající se z několika hlavních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Hmotnostní spektrometr se dále skládá z vakuové techniky, iontové techniky sloužící k fokusaci iontů a počítače, který řídí celý systém, zaznamenává a vyhodnocuje naměřená data. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analyzovaných látek na nabitě částice, tzv. ionty. Ionizace může probíhat buď za atmosférického nebo za sníženého tlaku. Tyto ionty jsou pak vedeny pomocí iontové optiky do hmotnostního analyzátoru. V hmotnostním analyzátoru jsou ionty v plynném stavu a za vysokého vakua (10^{-3} až 10^{-9} Pa) rozděleny podle jejich m/z . Rozdělené ionty vycházející z hmotnostního analyzátoru dopadají na detektor, kterým může být fotonásobič, elektronásobič, případně Faradayova klec. V případě hmotnostních analyzátorů typu orbitální pasti a iontové cyklotronové resonance dochází k detekci přímo v analyzátoru.

2.2.2 Ionizační techniky

Ionizační techniky lze rozdělit na tvrdé (elektronová ionizace), měkké (chemická ionizace, ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku, ionizace laserem za účasti matrice), podle množství vnitřní energie po ionizaci. Ionizace molekul může probíhat za sníženého tlaku (elektronová ionizace, chemická ionizace, ionizace laserem za účasti matrice) nebo za atmosférického tlaku (ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku) [10].



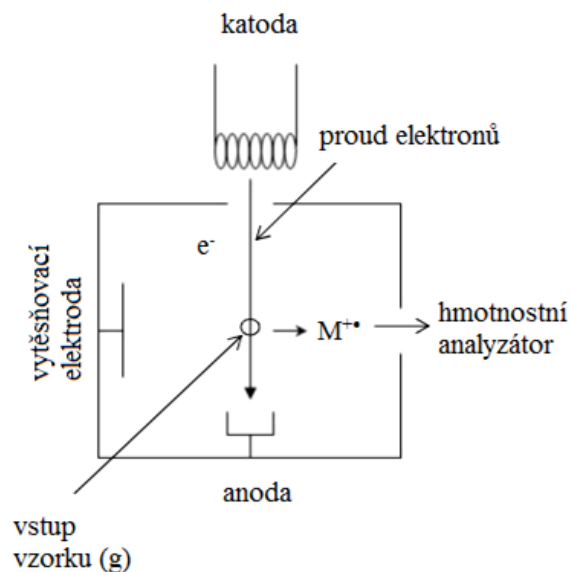
Obrázek 3: Graf pro výběr ionizačních technik za atmosférického tlaku v závislosti na polaritě a molekulové hmotnosti analytu (zdroj: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>)

Ionizační technika, která by byla vhodná pro všechny typy látek, neexistuje. Ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku jsou techniky pokrývající velkou škálu polarit a molekulových hmotností (Obrázek 3). Při výběru ionizační techniky je důležité brát v potaz těkavost analyzovaných látek, molekulovou hmotnost, a hlavně jejich tepelnou stabilitu.

2.2.2.1 Elektronová ionizace

Nejstarší ionizační technikou, která má stále svoji oblast pokrytí, je elektronová ionizace (EI) [10, 11]. EI (Obrázek 4) bývá označována jako tvrdá ionizační technika, kdy molekula

získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví rozsáhlou fragmentací molekulárního iontu. Při použití EI vznikají ionty s lichým počtem elektronů a spektra jsou bohatá na fragmentové ionty vlivem vysoké energie ionizace. Ionizace probíhá za vakua 10^{-3} až 10^{-5} Pa a v plynné fázi při teplotě 150 až 400 °C. Při EI jsou elektrony emitovány ze žhavené katody, která může být z wolframu nebo rhenia, zachyceny na anodě po průchodu iontovým zdrojem. Katodou emitované elektrony mají určitou energii, která je



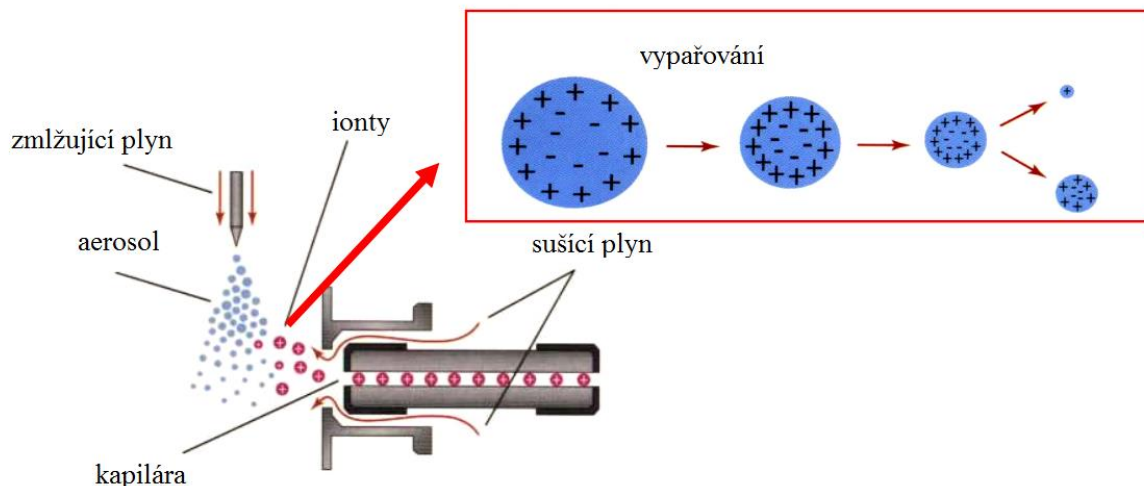
Obrázek 4: Schéma EI iontového zdroje (zdroj: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>)

dána urychlujícím potenciálem, jenž je uváděný v elektronvoltech (eV), mezi katodou a anodou. Standardní urychlující energie pro tvorbu knihoven hmotnostních EI spekter 70 eV. Dochází k ovlivnění magnetických polí volného elektronu emitovaného katodou a valenčního elektronu ionizované molekuly, čímž dojde k uvolnění valenčního elektronu a tím vzniku radikalkationtu. Vzniklé ionty jsou následně vypuzeny z iontového zdroje pomocí vytěšňovací elektrody do analyzátoru. Abychom dosáhli požadovaného iontu, je zapotřebí 10^5 interakcí, na základě čehož vyplývá, že účinnost ionizace je velice nízká. EI se používá pro těkavé a termostabilní látky, a to zejména v pozitivním iontovém módu. Dnes EI nalézá uplatnění zejména při spojení s plynovou chromatografií (GC), kde je možnost porovnat naměřená spektra se spektry z knihovny.

2.2.2.2 Ionizace elektrosprejem

Nejpoužívanější ionizační technikou, která je vhodná pro spojení LC/MS, je ionizace elektrosprejem (ESI) [10]. ESI (Obrázek 5) je ionizace pracující za atmosférického tlaku a patří mezi měkké ionizační techniky. Při ionizaci téměř nevznikají fragmentové ionty a vznikají zejména protonované $[M+H]^+$ molekuly v pozitivním iontovém módu, deprotonované $[M-H]^-$ molekuly v negativním iontovém módu a aduktové ionty. Při ESI ionizaci mohou vznikat vícenásobně nabitě ionty, proto je tato technika vhodná pro ionizaci biomakromolekul a

proteomickou analýzu. Pomocí ESI můžeme analyzovat sloučeniny středně polární až iontové. Při této ionizaci je rozpuštěný analyt v mobilní fázi přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo napětí v kV (1-5 kV). Analyt s rozpouštědlem je pomocí zamlžujícího plynu (N_2) rozprášen. Vzniklé kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry nesou na svém povrchu velké množství nábojů. V iontovém zdroji dochází k odpařování rozpouštědla z kapičky a tím



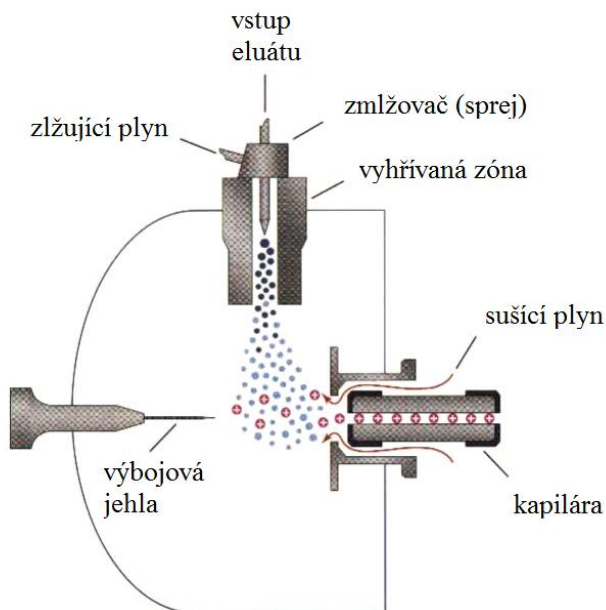
Obrázek 5: Schéma ionizace elektrosprejem (zdroj: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>)

dochází ke zvýšení hustoty náboje na povrchu. Při dosažení kritické hodnoty (překročení Rayleighova limitu) dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky. Opakováním tohoto procesu vede až k uvolnění iontů. Ionty mohou vznikat buď odpařením rozpouštědla z nabitě kapičky, jde o vznik tzv. zbytkového náboje nebo vypařením iontu, kdy za pomoci povrchového napětí je ion analytu vytržen z kapičky.

2.2.2.3 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Druhou nejčastěji používanou ionizační technikou pro spojení HPLC/MS je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [10, 12]. Jelikož je APCI mírně tvrdší než ESI ionizační technika a při ionizaci vznikají protonované $[M+H]^+$ molekuly, deprotonované $[M-H]^-$ molekuly a také fragmentové ionty, tak APCI není vhodná pro analýzu biomolekul. Používá se zejména pro ionizaci méně polárních až středně polárních sloučenin. Geometrie iontového zdroje je analogická s ESI, ale kapilára přivádějící analyt není nabitá. Ionizace probíhá pomocí výbojové jehly, na kterou je vloženo napětí (3-4 kV), čímž vzniká koronový výboj. Pomocí koronového výboje nejprve dochází k ionizaci molekul mobilní fáze a následně molekul

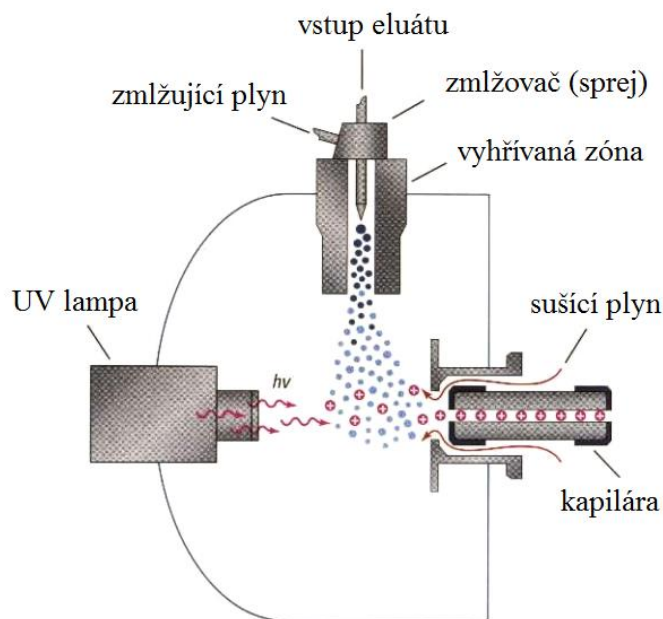
analytu ion-molekulárními reakcemi s reakčním plynem (mobilní fázi). Vzniklé ionty jsou následně pomocí iontové optiky usměrněny do hmotnostního analyzátoru.



Obrázek 6: Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku (zdroj: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>)

2.2.2.4 Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [10] je měkká ionizační technika, při které vznikají protonované $[M+H]^+$ a deprotonované $[M-H]^-$ ionty a zároveň při této ionizaci běžně vznikají ionty s lichým počtem elektronů (M^+ , M^-). APPI technika je vhodná pro ionizaci nepolárních látek, středně polárních látek a pro analýzu labilních molekul. Geometrie zdroje je totožná s APCI, avšak místo výbojové jehly je umístěn zdroj UV záření (Obrázek 7). Jako často používaný zdroj UV záření je Kr výbojka (10 a 10.6 eV), protože energie fotonů je nižší než ionizační energie složek vzduchu (O_2 – 12,1 eV, N_2 – 15,7 eV) a některých rozpouštědel jako je voda, acetonitril, chloroform, metanol (10,3 – 12,6 eV). Vhodným výběrem UV záření lze zajistit selektivní ionizaci analytu, nikoliv mobilní fáze. Při APPI molekuly interagují s fotonem o energii vyšší, než je jejich ionizační energie a dochází k fotoexcitaci a následné ionizaci. Přímá ionizace molekul je statisticky málo pravděpodobná, proto se obvykle používají dopanty. Dopanty slouží jako mezičlánek mezi fotony a analytem a mohou výrazně zvýšit tvorbu iontů. Jako dopant se často používá aceton nebo toluen, jejichž ionizační energie je do 10 eV. APPI stejně jako APCI lze použít v systémech s normálními fázemi.

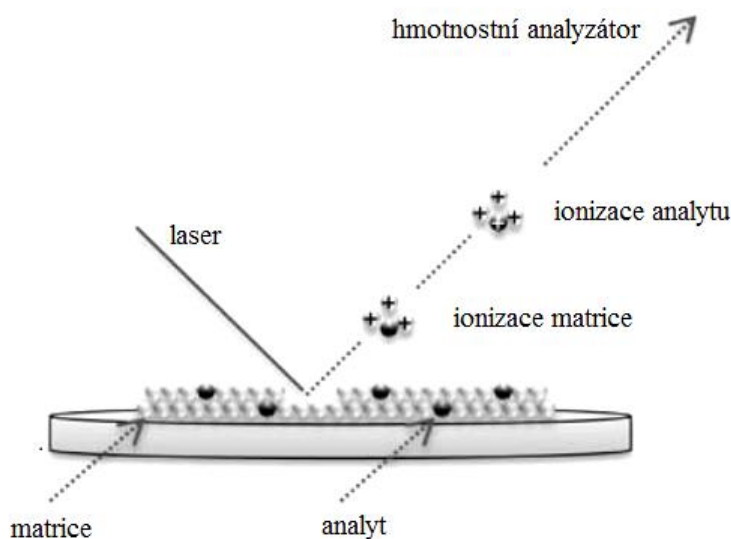


Obrázek 7: Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku (zdroj: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>)

2.2.2.5 Ionizace laserem za účasti matrice

Ionizace laserem za účasti matrice neboli MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [11, 13] (Obrázek 8) je rovněž měkká ionizační technika, za jejíž vývoj získal v roce 2002 K. Tanaka Nobelovu cenu. Při konvenčním použití MALDI vznikají jednou nabitě ionty, a to buď protonované $[M+H]^+$ nebo deprotonované $[M-H]^-$. Avšak ve spektrech lze pozorovat též vícenásobně nabitě ionty, a to za použití speciálních matric při atmosférické MALDI. Tato technika může probíhat za různých tlaků: nízkotlaké MALDI, kdy ionizace probíhá za vakua, střednětlaké MALDI, které probíhá za sníženého tlaku a atmosférické MALDI probíhající za okolního tlaku. MALDI ionizace se používá pro molekuly s velkou molekulovou hmotností jako jsou biopolymery, syntetické polymery, lipidy atd. MALDI je pulzní ionizační technika, při které je vzorek společně s matricí nanesen na MALDI terčík. Jako matrice se nejčastěji používá organická kyselina, která dobře rozpouští analyt a snadno absorbuje energii laseru, např. α -kyano-4-hydroxybenzoická kyselina, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 9-aminoakridin, 4-nitroanilin, atd. U této techniky nejprve dochází pomocí krátkého laserového pulsu (dusíkový UV laser 337 nm, nebo IČ lasery) k absorpci energie převážně matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Spolu s matricí se desorbují analyt a zároveň při desorpci

dochází k ionizaci matrice, která se stabilizuje předáním náboje na analyt. Vzniklé ionty jsou následně analyzovány pomocí analyzátoru doby letu, iontové pasti či orbitální pasti.



Obrázek 8: Princip MALDI ionizace (zdroj: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>)

2.2.3 Hmotnostní analyzátoary

Nedílnou součástí hmotnostního spektrometru jsou hmotnostní analyzátoary, které slouží k separaci iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Dělení iontů v analyzátoaru probíhá za vysokého vakua, dle typu analyzátoaru se vakuum pohybuje od 10^{-3} do 10^{-11} Pa. Hmotnostní analyzátoar je umístěn za iontovým zdrojem, kde ionty vznikají, a před detektorem. Hmotnostní analyzátoary můžeme rozdělit podle pěti základních principů na:

- Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoar)
- Různá stabilita oscilací iontů v dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
- Různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoar doby letu)
- Různá frekvence harmonických oscilací v elektrickém poli (Orbitální past)
- Různá frekvence harmonických oscilací v magnetickém poli (iontová cyklotronová resonance)

Hmotnostní analyzátory můžeme rozdělit podle způsobu dělení iontů na skenovací, iontové pasti a průletové. Mezi základní parametry hmotnostních analyzátorů patří rozlišovací schopnost, správnost určení m/z , hmotnostní rozsah, dynamický rozsah, rychlost záznamu spekter. Definice rozlišovací schopnosti může být založena na šířce jednoho píku (Full Width at Half Maximum, FWHM), kterou lze vypočítat jako poměr hmotnosti iontu m ku šířce tohoto iontu Δm v polovině jeho výšky ($RP = m/\Delta m$). Další definici lze vypočítat pomocí překryvu dvou píků, kdy počítáme poměr hmotnosti iontu m_1 ku rozdílu iontů m_1 a m_2 , přičemž oba píky musí být stejně vysoké a podmínkou je překryv z 10 % ($RP = m_1/(m_2-m_1)$). Hmotnostní analyzátory lze rozdělit podle rozlišovací schopnosti do dvou skupin. Přístroje s nízkou rozlišovací schopností, mezi něž patří kvadrupóly, dosahují rozlišovací schopnosti 10^2 až 5×10^3 a šířky píku v rozmezí 0,2 až 1,0 m/z . Do druhé skupiny spadají přístroje s vysokou rozlišovací schopností, kam se řadí průletové analyzátory, sektorové přístroje, orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. Správnost určení hodnoty m/z (Mass Accuracy) si lze představit jako chybu měření, která je definována jako relativní rozdíl mezi experimentálně naměřenou hodnotou a teoreticky vypočtenou m/z iontu vztaženou k teoretické hodnotě. Výsledkem je bezrozměrná veličina vyjádřena v ppm. Pomocí vysoké správnosti hmoty jsme schopni určit elementární složení iontu.

$$\text{Správnost určení } m/z = \frac{m/z_{exp} - m/z_{teor}}{m/z_{teor}} * 10^6$$

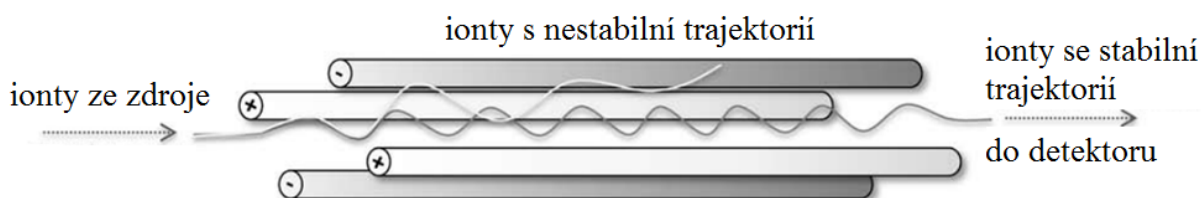
2.2.3.1 Magnetický sektorový analyzátor

Magnetický [10] sektorový analyzátor je první nejstarší používaný hmotnostní analyzátor. Je to typický hmotnostní analyzátor používaný ve spojení GC/MS pro analýzu dioxinů, furanů, bromovaných difenyletherů, polychlorovaných naftalenů atd. Princip tohoto analyzátoru je založen na průchodu iontů magnetickým polem, kdy ionty vstupují do magnetického pole, čímž dochází k zakřivení dráhy letu iontu. U iontů s nižší hodnotou m/z dochází k většímu zakřivení. Plynulou změnou magnetické indukce při konstantním poloměru daným pro použitý přístroj projdou výstupní šterbinou na detektor postupně všechny ionty a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé m/z , čímž získáme hmotnostní spektrum. K magnetické fokusaci iontů může být ještě zařazena elektrostatická fokusace iontů, čímž dojde k výraznému zvýšení maximální RP z jednotek na desítky tisíc. Elektrostatická fokusace slouží

ke sjednocení energií iontů se stejnou hodnotou m/z , to vede ke zúžení paprsku iontů dopadající na detektor a zlepšení rozlišení.

2.2.3.2 Kvadrupólový analyzátor

Velmi oblíbeným a často používaným hmotnostním analyzátozem je kvadrupólový analyzátor neboli kvadrupól (Obrázek 9) [11]. Jeho výhodou je nízká pořizovací cena a možnost použití pro spojení se separačními technikami, zejména pro GC/MS, HPLC/MS. Kvadrupól se skládá ze čtyř kovových tyčí o délce 20 až 30 cm kruhového a hyperbolického průřezu. Na tyče je vloženo kladné a záporné stejnosměrné napětí, a to vždy na dvě protilehlé tyče. Zároveň je na všechny tyče vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Na základě velikosti



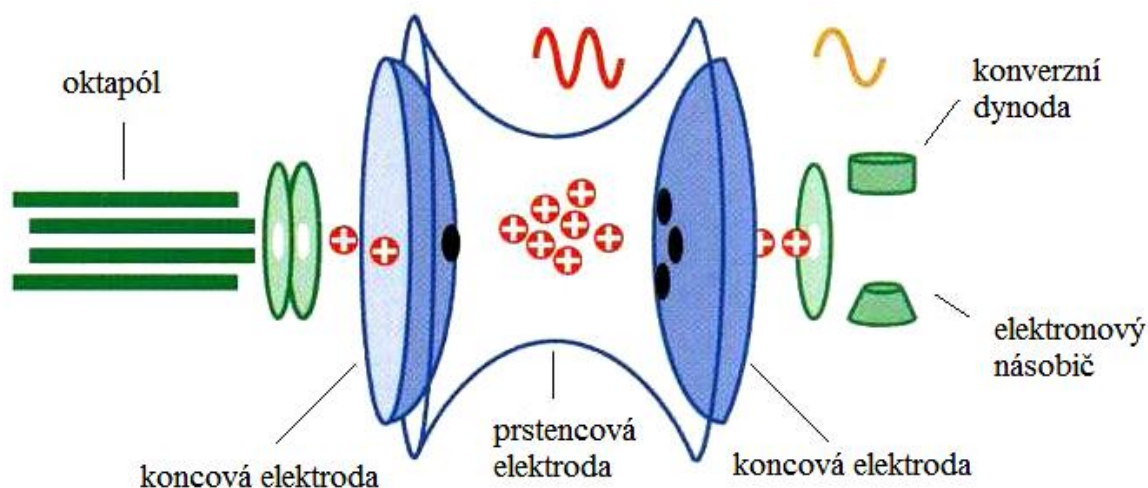
Obrázek 9: Schéma kvadrupólového analyzátoru (zdroj: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>)

stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku se ionty s určitou hodnotou m/z pohybují po stabilní trajektorii dále k detektoru, případně do další části analyzátoru. Ionty s nestabilní trajektorii jsou vychýleny a zachytí se na tyčích. Záchyt iontů na tyčích záleží na hmotě, náboji iontu, a také na frekvenci oscilací. Samotný analyzátor může pracovat ve dvou režimech. Ve skenovacím režimu, kdy se kontinuálně mění elektrické pole, což umožňuje proměřit všechny hodnoty m/z v krátkém časovém úseku. Anebo se nastaví elektrické pole kvadrupólu tak, aby procházely ionty pouze s příslušnou hodnotou m/z , tzv. selektivní záznam iontu (Selected Ion Monitoring, SIM). V prvním případě sledujeme všechny ionty ve zvoleném rozsahu, ale s nízkou citlivostí. V druhém případě zvýšíme výrazně citlivost, ale už neměříme hmotnostní spektrum, pouze záznam intenzity iontu na čas. SIM režim je vhodný pro kvantitativní a stopovou analýzu, kdy známe strukturu sledovaných látek. V dnešní době se v rutinních laboratořích běžně setkáváme s kombinací hmotnostních analyzátorů, zejména s kombinací třech kvadrupólů (QqQ), které jsou velmi populární pro kvantitativní analýzu díky cenové dostupnosti, vysoké citlivosti a robustnosti. V tomto uspořádání slouží druhý (prostřední) kvadrupól jako kolizní cela, do které je zaveden kolizní plyn (dochází

k fragmentaci). Kvadrupól lze využít i v hybridním uspořádání s průletovým analyzátozem a Orbitální pastí.

2.2.3.3 Iontová past

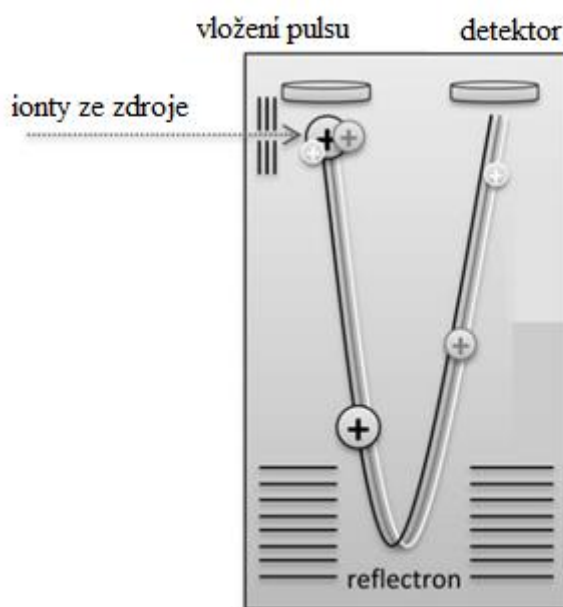
Iontová past (IT) se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod, na elektrody je aplikován vhodný poměr napětí [10]. Vzniklé ionty v iontovém zdroji jsou do pasti přivedeny vstupním otvorem koncové elektrody pomocí krátkého napěťového pulzu. Uvnitř pasti jsou ionty uvedeny do stabilních oscilací a jsou udržovány v pasti pomocí vhodného vloženého poměru napětí na elektrodách. Plynulou změnou těchto napětí dochází k vypuzování iontů podle jejich m/z na detektor. Do pasti se zavádí helium, které slouží jako tlumící plyn. Helium tlumí oscilace iontů a zároveň zvyšuje záchyt iontů a zlepšuje rozlišení. Iontová past umožňuje experimenty MS^n , kdy v pasti dochází k izolaci iontů a fragmentaci. V iontové pasti je třeba optimalizovat množství iontů, aby nedocházelo ke vzniku prostorového náboje a tím ke zhoršení rozlišení a posunu m/z . Problém vzniku prostorového náboje může vyřešit lineární iontová past, která se vyznačuje vyšší účinností plnění a je méně náchylná ke vzniku prostorového náboje vlivem vyšší kapacity.



Obrázek 10: Schéma hmotnostního analyzátoru na principu iontové pasti (zdroj: <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Esquire.html>)

2.2.3.4 Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu (Obrázek 11) je pulzní hmotnostní analyzátor, který měří dobu letu iontů potřebnou po překonání určité dráhy [10, 11]. V tomto případě jsou ionty v pulzech akcelerovány elektrickým polem do vakuové trubice, ve které různou rychlostí v závislosti na jejich m/z , dopadají na detektor. Analyzátor doby letu nabízí lepší rozlišovací schopnost iontů než kvadrupólové analyzátoři. Často se využívá uspořádání za použití tzv. reflektromu (iontového zrcadla). Reflektrom je soustava mřížek, na které je vloženo postupně se zvyšující napětí opačné polarity, než mají nabité částice. Reflektrom slouží k prodloužení dráhy letu iontů, vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z , což výrazně zlepšuje rozlišení iontů.

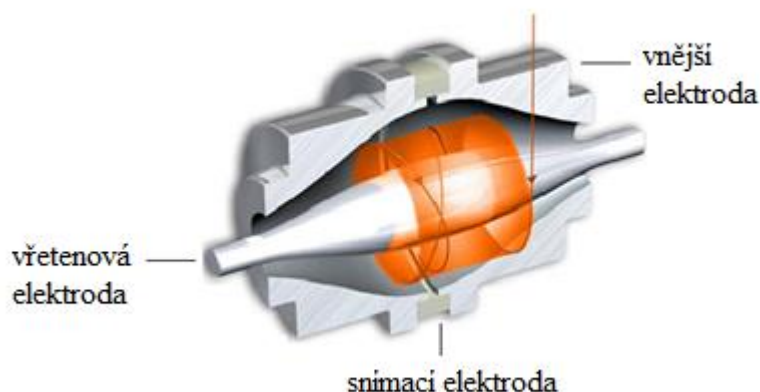


Obrázek 11 Schéma analyzátoru doby letu s reflektromem
(zdroj: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>)

2.2.3.5 Orbitální past

Orbitální past (Orbitrap) je nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru, který byl popsán ruským fyzikem Makarovem v roce 2005 [10]. Orbitrap funguje na principu pasti a patří mezi hmotní analyzátoři s vysokým rozlišením. Analyzátor se skládá z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je vloženo napětí. Úzký svazek iontů o různých m/z je přiveden do analyzátoru a současně je na centrální elektrodu aplikováno rostoucí napětí čímž jsou ionty

přinuceny k oscilacím v podélném směru (zprava doleva) kolem této elektrody. Následně se hodnota napětí na centrální elektrodě stabilizuje na konstantní hodnotě a dochází ke stabilizaci trajektorií iontů. Frekvence podélných (axiálních) oscilací každého prstence iontů indukuje proudový obraz na vnějších elektrodách, který je pomocí Fourierovy transformace převeden na frekvenční závislost a následně konvertován do závislosti na m/z (každé hodnotě m/z náleží určitá hodnota frekvence axiální oscilace).



Obrázek 12: Schéma Orbitální pasti (zdroj: <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>)

2.2.3.6 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Princip iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace je založen na různé frekvenci pohybu iontů ve velmi silném magnetickém poli v závislosti na hodnotě m/z [10]. Vzniklé ionty v iontovém zdroji se postupně dostanou až do cyklotronové cely (ICR cely), která funguje jako elektromagnetická iontová past. V ICR cele je vakuum 10^{-10} až 10^{-11} Pa. Tento analyzátor využívá silného homogenního magnetického pole. Toto pole způsobí, že ionty vykonávají kruhový pohyb s frekvencí, která je závislá na jejich m/z (cykloidální trajektorie s cyklotronovou frekvencí). Následně jsou ionty excitovány pomocí vysokofrekvenčního napětí. Po vypnutí vysokofrekvenčního napětí ionty pokračují na stejných frekvencích na drahách s vyšším poloměrem, přičemž každé hodnotě m/z náleží charakteristická cyklotronová frekvence. Detekce iontů probíhá na detekčních deskách, kde se měří ionty indukovaný proud. Následně jsou pomocí Fourierovi transformace tyto frekvence přepočteny do stupnice m/z .

2.2.3.7 Iontová mobilní spektrometrie

Iontová mobilní spektrometrie (IMS) [10, 14] patří mezi separační metody. Ionty jsou separovány na základě jejich pohybu v plynné fázi v driftovém plynu v mobilní cele, na kterou je aplikováno elektrické pole. IMS umožňuje rozlišit ionty na základě velikosti náboje, hmotnosti a velikosti průřezu částic. Obecně lze říci, že čím větší je plocha průřezu iontu, tím větší je počet kolizí s inertním plynem, a zároveň tedy roste čas, který ion potřebuje, aby urazil vzdálenost do detektoru. Ionty o stejné hmotnosti, ale s různým tvarem molekuly, mohou být pomocí IMS rozděleny.

Technickým řešením IMS je několik. Nejjednodušším typem je iontová mobilita v driftové trubici (Drift-Time Ion Mobility Spectrometry (DTIMS)). Při této analýze je vzorek zveden do driftové trubice spolu s inertním plynem při použití relativně nízkého napětí. Driftový plyn proudí trubicí v opačném směru, než je směr migrace ionizovaných částic. Menší ionty budou méně brzděny protiproudem plynu a budou dopadat detekovány dříve než větší ionty [14].

Dalším typem analyzátoru je diferenční mobilní spektrometrie (Differential-Mobility Spectrometry (DMS)) nebo iontová mobilní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou (Field-Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS)). V tomto analyzátoru jsou ionty proudem nosného plynu vedeny mezi dvě elektrody. Ionty jsou vystaveny vysokým potenciálem elektrického pole po krátkou dobu a nízkým potenciálem elektrického pole po delší čas. Během aplikace nízkého a vysokého potenciálu elektrického pole se ionty posouvají k jedné ze dvou elektrod, jejichž trajektorie k elektrodám se upravuje pomocí kompenzačního napětí, které zajišťuje stabilní trajektorii iontů daného analytu. Používá se zejména jako iontový filtr pro zlepšení senzitivity. Válcové uspořádání elektrod je obvyklé pro FAIMS, zatímco konfigurace s paralelními destičkami elektrod nese označení DMS [14].

Iontová mobilní spektrometrie s pohybující se vlnou (Traveling-Wave Ion Mobility Spectrometry (TWIMS)) je hmotnostní analyzátor, ve kterém separace iontů probíhá pomocí série napěťových pulzů. TWIMS se skládá ze sérií prstencových elektrod, ze kterých jsou vytvářeny kontinuálně symetrické potenciálové vlny, jež slouží k unášení iontů na detektor za současného protiproudu inertního plynu [14].

2.3 Lipidy a jejich klasifikace

Lipidy jsou důležité organické sloučeniny (polární až nepolární látky) obsahující mastné kyseliny a jejich deriváty [15]. Nacházejí se ve všech živých buňkách, od primitivních archaebakterií až po rostliny nebo buňky savců [16]. Lipidy jsou skupinou hydrofobních nebo amfipatických molekul, které vznikají zejména kondenzací karbokationtů thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy) nebo kondenzací karbokationtů izoprenových jednotek (steroly, prenoly) [1]. Lipidy jsou důležitou součástí potravy, a to nejen pro svoji vysokou energetickou hodnotu, ale také pro obsah esenciálních mastných kyselin a vitamínů rozpustných v tucích.

Funkce lipidů jsou stejně rozmanité jako jejich struktury. Jejich funkce v lidském organismu jsou různé, patří mezi hlavní složku buněčných membrán, slouží jako zásobárna energie, v kombinaci s proteiny mají hlavní transportní funkci v krevním řečišti a účastní se v mnoha důležitých fyziologických procesech v buňkách. Poruchy v metabolismu lipidů mohou souviset s řadou závažných onemocnění, např. obezita, diabetes melitus, ateroskleróza, Alzheimerova choroba a mnoho dalších [17].

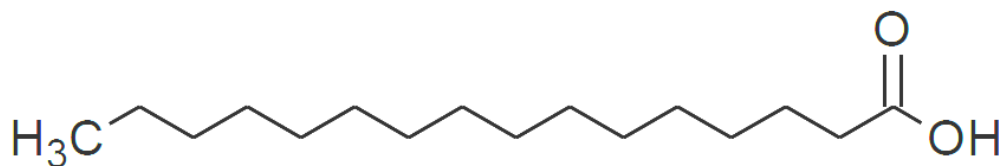
Lipidy se dělí do 8 základních skupin: mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy. Tato klasifikace dle Lipid Maps je založena na doporučeních International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) [1].

2.3.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (FA) (Tabulka 1) představují hlavní stavební složku komplexních lipidů, a proto jsou jednou ze základních kategorií lipidů. Skládají se z hydrofobního uhlovodíkového řetězce a hydrofilní karboxylové kyseliny, což je část způsobující amfipatický charakter struktury. Mastné kyseliny se v organismu nachází především ve formě esterů v přirozeně se vyskytujících olejích a tucích. Mohou se vyskytovat také v neesterifikované formě jako volné mastné kyseliny přenášející se krevní plazmou [17]. V tkáních rostlinného a živočišného původu jsou nejhojněji zastoupeny mastné kyseliny obsahující atomy uhlíku s číslem 16 a 18, tj. kyselina palmitová, stearová, olejová a linolová [18].

Mastné kyseliny můžeme rozdělit podle stupně nasycenosti na nasycené kyseliny, které neobsahují žádnou dvojnou vazbu. Dále pak mononenasycené tzv. monoenoové kyseliny, které

obsahují pouze jednu dvojnou vazbu. A posledním typem jsou polynenasycené (polyenové) kyseliny obsahující dvě či více dvojných vazeb.



Obrázek 13: Strukturální vzorec kyseliny palmitové

Mezi nejběžnější nasycené mastné kyseliny patří kyselina arachová (C20:0), stearová (C18:0), palmitová (C16:0) (Obrázek 13), myristová (C14:0), laurová (C12:0). Nasycené mastné kyseliny jsou zdrojem energie a jsou obsaženy převážně v rostlinných a živočišných tucích [17]. Větší příjem může vést ke zvýšení aterosklerózy a kardiovaskulárního onemocnění

Tabulka 1: Běžné mastné kyseliny, jejich triviální názvy, počet atomů uhlíku a počet dvojných vazeb.

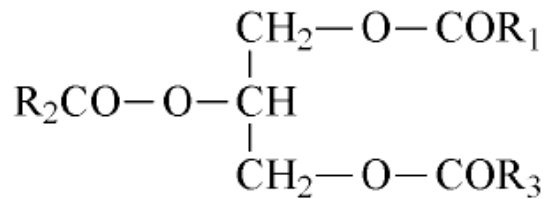
Systematický název	Triviální název	Zkratka	CN:DB
Tetradekanová	Myristová	M	C14:0
<i>cis</i> -9-Hexadecenová	Palmitoolejová	Po	C16:1 (9Z)
Hexadekanová	Palmitová	P	C16:0
<i>cis</i> -9,12,15-Oktadekatrienová	α -Linolenová	Ln	C18:3 (9Z, 12Z, 15Z)
<i>cis</i> -9,12-Oktadekadienová	Linolová	L	C18:2 (9Z, 12Z)
<i>cis</i> -9-Oktadecenová	Olejová	O	C18:1 (9Z)
Oktadekanová	Stearová	S	C18:0
<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eikosapentaenová	Timnodová	Ep	C20:5 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)
<i>cis</i> -5,8,11,14-Eikosatetraenová	Arachidonová	Ar	C20:4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)
<i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienová	---	---	C20:3 (8Z, 11Z, 14Z)
<i>cis</i> -11,14-Eikosadienová	---	---	C20:2 (11Z, 14Z)
<i>cis</i> -9-Eikosenová	Gadolejová	G	C20:1 (9Z)
Eikosanová	Arachová	Ar	C20:0
<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Dokosahexanová	Cervonová	Dh	C22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)
<i>cis</i> -7,10,13,16,19-Dokosapentaenová	Klupadonová	Dp	C22:5 (7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)
Dokosanová	Behenová	B	C22:0
Trikosanová	---	---	C23:0
<i>cis</i> -9,15-Tetrakosadienová	---	---	C24:2 (9Z, 15Z)
<i>cis</i> -15-Tetrakosenová	---	---	C24:1 (15Z)
Tetrakosenová	Lignocerová	Lg	C24:0

[19], jako je abnormální srdeční rytmus (fibrilace síní) [20]. Příkladem mononenasycených

kyselin je palmitoolejová (16:1), kyselina olejová (C18:1), gadolejová (20:1), nervonová (24:1) a další. Kyselina olejová se vyskytuje v přírodních tucích a je obsažena především v olivovém oleji [21]. Polynenasycené kyseliny můžeme dělit podle polohy nejbližší dvojně vazby k hydrofobnímu uhlovodíkovému konci řetězce, a to na řadu n-6 a n-3. Do skupiny n-3 se řadí například kyselina α -linolenová (C18:3) a eikosapentaenová (C20:5). FA patřící do n-3 skupiny se vyskytují zejména v semenech některých rostlin a jejich olejů (sójové boby, lněná semena, semena černého rybízu), dále pak v mořských rybách jako je sardinka, tuňák, makrela, sled' [18]. V mozku je obsah polynenasycených mastných kyselin přibližně 30% z celkového množství lipidů [22]. FA patřící do n-6 skupiny jsou převážně obsaženy v rostlinných olejích, jako je sójový, slunečnicový či olej z černého rybízu. Hlavním představitelem této skupiny je kyselina linolová (C18:2) a dále kyselina γ -linolenová (C18:3), kyselina arachidonová (C20:4) [18, 21]. FA n-3 a n-6 polynenasycené mastné kyseliny se podílejí na velkém počtu fyziologických procesů v mozku [22, 23]. Obsah n-3 polynenasycených mastných kyselin může mít na léčbu epilepsie [22].

2.3.2 Glycerolipidy

Glycerolipidy [1] [15] tvoří rozsáhlou skupinu neutrálních lipidů a jsou to deriváty glycerolu, ve kterých jsou jednotlivé hydroxylové skupiny esterifikovány FA. Glycerolipidy jsou bohaté buněčné lipidy, které mají fyziologické úlohy při skladování energie [24]. Hlavním představitelem neutrálních lipidů jsou triacylglyceroly (Obrázek 14), diacylglyceroly a monoacylglyceroly jejichž glycerolovou kostru tvoří FA připojené esterovými vazbami. Triacylglyceroly jsou často se vyskytující lipidy v tucích a olejích rostlinného a živočišného původu. Nadměrné hromadění triacylglycerolu může zvyšovat riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a být spojováno s chorobami jako je obezita, diabetes melitus atd. [25, 26].

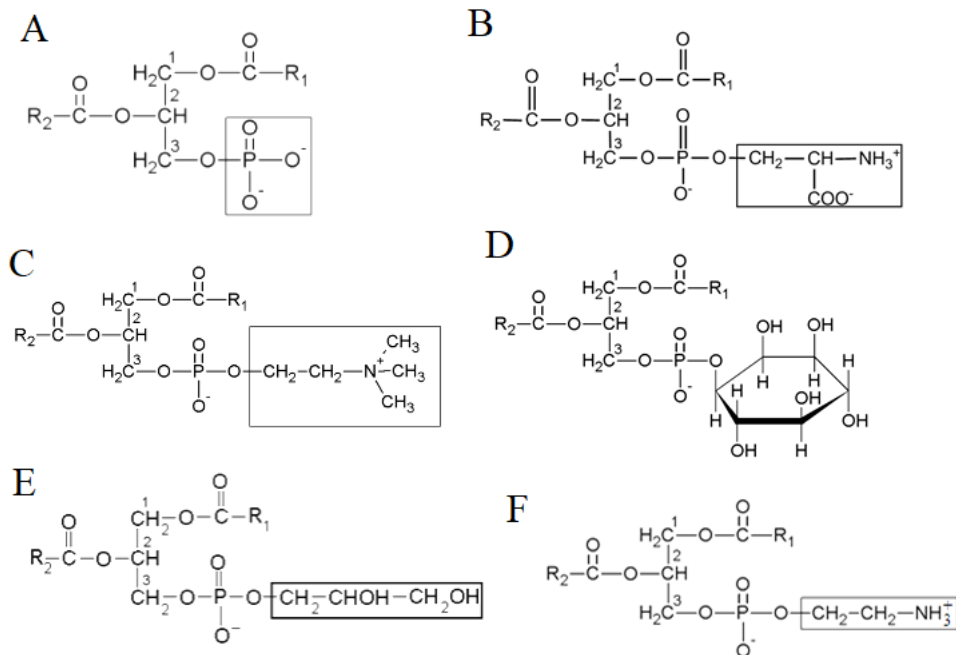


Obrázek 14: Strukturální vzorec triacylglycerolu, kde R₁, R₂ a R₃ jsou acylové řetězce.

2.3.2.1 Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy [1, 15, 27-29] nazývány také jako fosfolipidy, jejichž hlavní charakteristikou je přítomnost fosfátové skupiny. Glycerofosfolipidy jsou amfipatické molekuly, kde polární (hydrofilní) část je tvořena fosfátovou skupinou a nepolární (hydrofobní) část tvoří dlouhé acylové řetězce mastných kyselin. Glycerofosfolipidy jsou součástí lipidové dvojvrstvy a buněčných membrán. Jsou hlavními strukturálními lipidy v eukaryotických membránách [30]. Některé fosfolipidy jsou obsaženy v nervových membránách a jejich změna složení může vést ke změně průchodnosti. Společně s akumulací lipidových peroxidů mohou tyto změny způsobovat neurologické poruchy [31].

Nejjednodušším fosfolipidem je kyselina fosfatidová (Obrázek 15 A). Další fosfolipidy se nazývají podle navázané funkční skupiny na kyselině fosfatidové: fosfatidylcholin

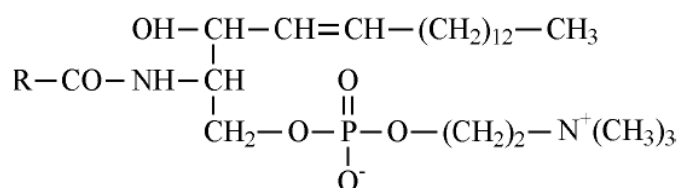


Obrázek 15: Strukturální vzorce fosfolipidů: A kyselina fosfatidová, B fosfatidylserin, C fosfatidylcholin, D fosfatidylinositol, E fosfatidylglycerol, F fosfatidylethanolamin.

(Obrázek 15 C), fosfatidylethanolaminy (Obrázek 15 F), fosfatidylinositolu (Obrázek 15 D), fosfatidylglyceroly (Obrázek 15 E) a fosfatidylseriny (Obrázek 15 B). Jestliže jedna poloha na glycerolovém řetězci v poloze sn-1 nebo sn-2 obsahuje hydroxy skupinu místo mastné kyseliny, pak se jedná o lysofosfolipidy.

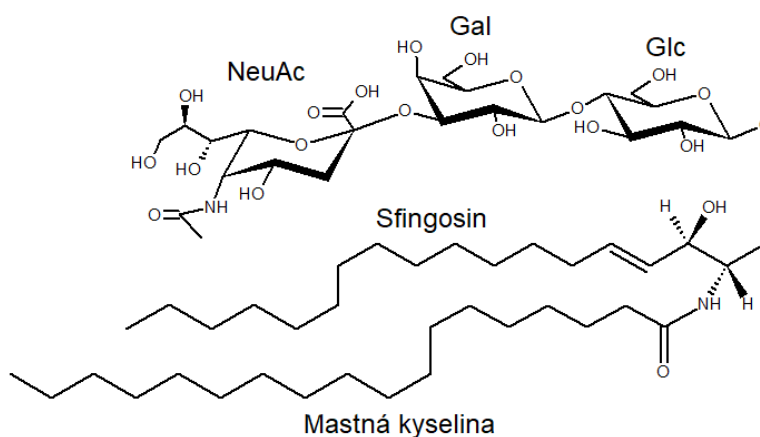
2.3.2.2 Sfingolipidy

Sfingolipidy [1, 15, 29, 32, 33] jsou komplexní třídou lipidů, ve kterých je acylová skupina mastné kyseliny vázána amidovou vazbou. Mezi sfingolipidy patří ceramidy (Cer), fosfosfingolipidy a glykosfingolipidy. Sfingolipidy jsou přítomny ve velkém množství v nervových tkáních, a to zejména v mozku. Mezi hlavní představitele patří sfingomyeliny (Obrázek 16), které se vyskytují ve velkých koncentracích v krevní plazmě.



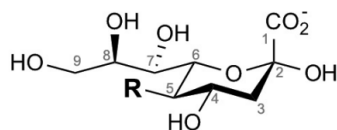
Obrázek 16: Strukturální vzorec sfingomyelinu.

Mezi sfingolipidy patří také velmi složité cukerné lipidy, jako jsou gangliosidy (Obrázek 17) [34], které patří do skupiny kyselých glykosfingolipidů. Gangliosidy se skládají z ceramidového řetězce, na něhož jsou navázány cukerné jednotky a alespoň jedna kyselina sialová (NeuAc, SA). Hlavními složkami cukerných jednotek jsou glukóza (Glc), galaktóza



Obrázek 17: Strukturální vzorec pro GM3.

(Gal) a fukóza (Fuc). Výše zmíněné sacharidy mohou být modifikovány například acylací. Sialové kyseliny (Sia) tvoří velkou skupinu derivátů neuraminové kyseliny a mohou se vyskytovat v různých formách (Obrázek 18) [35-37]. Je známo zhruba 50 Sia typů s N-



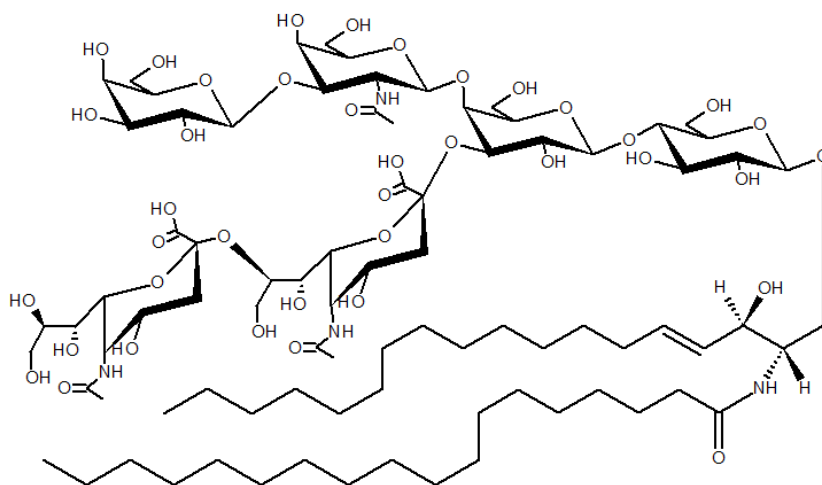
Kyselina neuraminová (Neu), R = H₂N-

N-acetylneuraminová kyselina (NeuAc), R = H₃C-C(=O)-N-

N-glycolylneuraminovou kyselinou (NeuGc), R = HO-H₂C-C(=O)-N-

Obrázek 18: Deriváty kyseliny sialové.

acetylneuraminovou kyselinou (NeuAc), N-glycolylneuraminovou kyselinou (NeuGc) a O-acetylované deriváty mezi nimiž je nejběžnější N-acetyl-9-O-acetylneuraminová kyselina. Nejběžnějším derivátem kyseliny sialové vyskytující se v lidském organismu je NeuAc [37]. Názvosloví gangliosidů uveřejnil Svennerholm [38] a později schválil IUPAC [39]. První písmeno G znamená, že se jedná o gangliosid, druhé písmeno indikuje počet residuí Sia M pro mono-, D pro di-, T pro tri- atd. Číslo je pak řazeno jednotlivě sloučenině, která původně odkazovala na svoji migraci v určitém chromatografickém systému [38], nicméně se jedná o počet neutrálních sacharidů vypočtený jako 5-n sacharidových jednotek [40]. Malé písmeno značí pozici Sia. Ačkoliv tyto názvy nejsou systematické mají tu výhodu, že jsou krátké a dobře pochopitelné. Pro příklad GD1a (Obrázek 19), gangliosid (G) obsahující dvě Sia (D, 2x NeuAc), čtyři neutrální sacharidy (n=4, tj. 5-4 = 1) a písmeno a určuje pozici Sia.

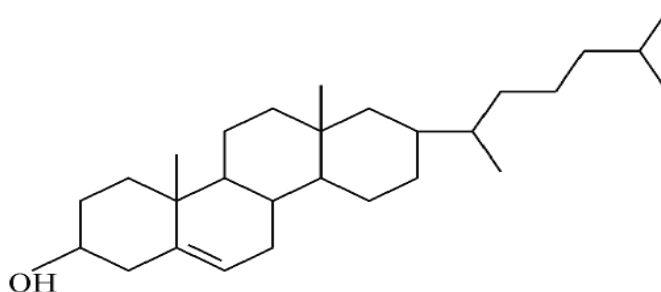


Obrázek 19: Strukturální vzorec GD1a.

Gangliosidy, sialované glykosfingolipidy, jsou nejhojněji zastoupené sialované glykány v nervových buňkách a extracelulárních orgánech jako jsou plíce, slezina a střeva a také v některých tekutinách jako je krev a mléko [41-46]. Gangliosidy mají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech v buňkách, jako je buněčná signalizace, ochrana neuronů, adheze, diferenciaci a tvorba dendritů [44, 47]. Gangliosidy mohou mít vliv na střevní imunitu, na progresi nádorů [43, 48] a jsou také spojovány s Alzheimerovou chorobou [49].

2.3.2.3 Steroly

Steroly [1, 50] se vyskytují v rostlinných i živočišných buňkách. Jsou podskupinou steroidů a nejvýznamnější z nich jsou cholesterol, ergosterol a stigmasterol. Cholesterol (Obrázek 18) je podstatnou složkou membrán živočišných buněk [51]. Je hlavní složkou

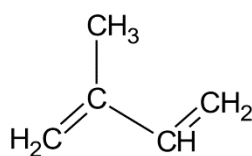


Obrázek 20: Strukturální vzorec cholesterolu

plazmatické membrány a lipoproteinů krevní plazmy. Cholesterol je nejvíce spojován s arteriosklerózou a srdečními chorobami. Má i značný biochemický význam, neboť slouží jako prekurzor důležitých steroidů, mezi které patří žlučové kyseliny, hormony kůry nadledvin, pohlavní hormony a vitamin D [1].

2.3.2.4 Prenoly

Tato skupina přírodních lipidů pochází z jedné izoprenové jednotky (Obrázek 21), která se skládá z pěti uhlíků [52]. Prenoly [1] jsou složeny z jedné a více izoprenových jednotek a jsou prekurzory polyprenolů a isoprenoidů. Důležitými isoprenoidy jsou některé vitamíny rozpustné v tucích jako je vitamin A, jehož prekurzorem jsou karotenoidy patřící do skupiny



Obrázek 21: Struktura isoprenové jednotky

polyterpenů, dále vitamíny E a K produkované také bakteriemi [17]. Polyprenoly se nachází v mnoha bakteriálních a rostlinných membránových frakcích. Vyskytují se v membránách prokaryotických a eukaryotických buňkách [52].

2.3.2.5 Sacharolipidy

Sacharolipidy [1, 17] jsou třídou lipidů, kde jsou FA vázané přímo na molekulu sacharidu. Sacharolipidy se mohou vyskytovat jako glykany nebo jako fosforylované deriváty. Sacharolipidy jsou důležité lipidy povrchu buněk [53].

2.3.2.6 Polyketidy

Polyketidy [1] jsou velmi rozmanitými lipidovými molekulami, které se dělí na mnoho strukturních podskupin, z nichž nejdůležitější jsou makrolidy, aromatické polyketidy a polyketidové hybridy. Chemicky jsou polyketidy velmi složité organické sloučeniny. Hlavní polyketidové řetězce jsou často modifikovány glykosylací, methylací, hydroxylací nebo oxidací či jinými procesy [54]. Funkčně se jedná o sekundární metabolity lidského organismu, podle kterých jsou syntetizována mnohá léčiva, jako například antibiotika a také některé insekticidy [1].

2.4 Lipidomická analýza

2.4.1 Extrakce lipidů

Prvním a velmi důležitým krokem pro kvantitativní a kvalitativní analýzu lipidů je extrakce lipidů z analyzovaného materiálu, který může mít charakter živočišný či rostlinný [55-57]. Dle použité techniky se extrahované látky mohou dělit buď mezi dvě nemísitelné kapalně fáze, dvě mísitelné kapaliny (butanol/metanol) nebo mezi tuhou a kapalnou fází. V lipidomické analýze je důležité dosáhnout stabilního výtěžku extrakce lipidů.

V současné době se v lipidomické analýze používají extrakční postupy vyvinuté Folchem [58], Blighem a Dyerem [59] a Schevchenkem [56]. Při extrakci dle Folche a Bligh-Dyera se používají stejná rozpouštědla, jsou to chloroform, metanol a voda, každá z metod se vyznačuje jiným poměrem použitých rozpouštědel. Novější extrakční postup dle Schevchenka se od předchozích dvou extrakcí liší zejména použitými rozpouštědly, kdy se místo chloroformu používá metyl-*tert*-butyl etheru (MTBE). Při použití metody dle Schevschenka je organická vrstva obsahující většinu lipidů ve vrchní vrstvě.

2.4.2 Separace lipidů

Nejčastější separační technikou pro analýzu lipidů je kapalinová chromatografie. Lze využít systém HILIC, kdy jsou lipidy separovány podle polárních funkčních skupin [47, 60-68]. Dále pak lze použít RP-HPLC [43, 45, 69-75], kdy jsou lipidy separovány pomocí navázaného acylového řetězce anebo Ag-HPLC [76-78], kdy jsou lipidy separovány podle počtu a polohy dvojných vazeb. V poslední době si nachází své místo v analýze lipidů také superkritická fluidní chromatografie, kde se lipidy separují na základě své polaritě od nepolárních po polární [79, 80].

2.4.3 Hmotnostní spektrometrie lipidů

Hmotnostní spektrometrie se v lipidomické analýze vyznačuje vysokou citlivostí a možností kvantitativní a kvalitativní analýzy. Je to destruktivní metoda, během které se spotřebovává minimální množství vzorku. Hmotnostní spektrometrii lze použít ve spojení se separačními technikami jako je LC/MS, GC/MS nebo bez předchozí separace, tzv. shotgun

přístup. Nejčastější používanou ionizační technikou pro analýzu polárních lipidů je ESI [57, 60, 62, 67, 73], kdy lze spektra měřit při záznamu kladných a záporných iontů. V kladném záznamu iontů můžeme pozorovat ionty protonovaných molekul $[M+H]^+$ a aduktové ionty s alkalickými kovy jako je sodný adukt $[M+Na]^+$ a draselný adukt $[M+K]^+$. V záporném záznamu iontů se objevují deprotonované molekuly $[M-H]^-$ a adukty s aditivou mobilní fáze. Pro analýzu nepolárních lipidů se často využívá ionizační technika APCI [76, 81] Polární lipidy a nepolární lze také analyzovat pomocí MALDI ionizace [42, 82].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a standardy

Použitá rozpouštědla acetonitril, metanol, (HPLC/MS čistoty pro gradientovou eluci), chloroform (HPLC čistoty stabilizovaný 0,5% - 1%) byla dodána firmou Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Dále byla používána voda, která byla redestilována pomocí demineralizačního přístroje Milli-Q[®] Reference systém (Molsheim, Francie). Do mobilní fáze byl přidáván octan amonný o čistotě $\geq 99,995\%$, mravenčan amonný o čistotě $\geq 99,0\%$ a pro úpravu pH byla použita kyselina octová o čistotě $\geq 99,99\%$ a kyselina mravenčí o čistotě $\sim 98\%$ od firmy Sigma-Aldrich. Standard celkového extraktu gangliosidů byl zakoupen z Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, U.S.A.). Vnitřní standardy (IS) sulfatid (SulfoHexCer, d18:1/12:0), fosfatidylserin (PS, 14:0/14:0) zakoupené z Avanti Polar Lipids byly použity pro validaci a kvantifikaci studie rakoviny ledvin. Tkáň mozku prasete domácího byla zakoupena v místním obchodě. Vzorky lidské krevní plazmy, erytrocytů, tkáně nádoru a okolní tkáň nádoru ledvin byly získány z Onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vzorky tkáně nádoru a okolní tkáň nádoru plic byly obdrženy z Nemocnice Pardubice. Studie byla schválena etickou komisí a všichni pacienti dobrovolně podepsali informovaný souhlas.

3.2 Příprava vzorku

2 mg celkového extraktu gangliosidů z prasečího mozku bylo rozpuštěno ve směsi 1100 μl chloroform/metanol/voda (600:425:75, v/v/v). Lidská krev byla odebírána do heparin-lithiových zkumavek a následně centrifugována pro oddělení erytrocytů a krevní plazmy. Vzorky lidských ledvin a plic byly získány během operace a ihned zmrazeny a skladovány při -80°C . Vzorky lidských ledvin, plic, plazmy, erytrocytů a prasečího mozku byly extrahovány podle Folche [58] s mírnou modifikací [34]. K extrakci bylo použito 25 mg tkáň (lidských ledvin, plic a prasečího mozku), ke které bylo přidáno 6 ml směsi chloroform/metanol (2:1, v/v). Vzniklá směs byla homogenizována 10 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 40°C . Po homogenizaci bylo ke směsi přidáno 1200 μl redestilované vody a následně byla směs promíchána a centrifugována po dobu 3 minuty při 3000 otáčkách za minutu. Poté byla horní vodná vrstva odebrána a odpařena do sucha pod mírným proudem dusíku. Pro extrakci lidských tekutin (plazma a erytrocyty) bylo použito 200 μl vzorku a přidány 3 ml chloroform/metanol

(2:1, v/v). Vzniklá směs byla homogenizována 10 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 40°C. Po homogenizaci bylo ke směsi přidáno 600 µl redestilované vody a následně byla směs promíchána a centrifugována po dobu 3 minuty při 3000 otáčkách za minutu. Poté byla horní vodná vrstva odebrána a odpařena do sucha pod mírným proudem dusíku. Po vysušení byly vzorky rozpuštěny v 1 ml vody a přečištěny pomocí SPE kolonek. Byly použity SPE kolonky typu tC18 s 200 mg gramáží sorbentu (Sep-Pak Vac, 37-55 µm velikost částic) (Waters, Milford, MA, U.S.A.). V prvním kroku byly kolonky kondicionovány 3 ml metanolu, následně promyty 3 ml redestilované vody. Poté byl nanesen vzorek rozpuštěný v 1 ml vody. Následovalo promytí 3 ml vody pro odstranění solí a následovala eluce 3 ml metanolu. Eluát byl následně odpařen pod mírným proudem dusíku a rozpuštěn v 500 µl metanol/voda/chloroform (300:150:50, v/v/v). Rozpuštěný vzorek byl následně analyzován pomocí HILIC/ESI-MS pro charakterizaci.

Lidské tkáně nádoru ledvin a sousední zdravé tkáně ledvin byly použity pro validaci a následnou kvantifikaci. Pro validaci metody byl připraven směsný vzorek, který obsahoval tkáně tumoru a tkáně okolí tumoru od 20 pacientů. K extrakci bylo použito 25 mg tkáně, ke které byla přidána směs IS a následně 6 ml směsi chloroform/metanol (2:1, v/v). Vzniklá směs byla homogenizována 10 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 40°C. Po homogenizaci bylo ke směsi přidáno 1200 µl redestilované vody a následně byla směs promíchána a centrifugována po dobu 3 minuty při 3000 otáčkách za minutu. Poté byla horní vodná vrstva odebrána a odpařena do sucha pod mírným proudem dusíku. Odsolení vzorku probíhalo jako u výše zmíněné extrakce. Přečištěný vzorek byl následně rozpuštěn v 500 µl směsi metanol/voda/chloroform (300:150:50, v/v/v) a analyzován pomocí HILIC/ESI-MS.

3.3 Optimalizace HPLC/ESI-MS

HILIC/ESI-MS experimenty byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity série (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Finální podmínky použité pro charakterizaci gangliosidů v biologických vzorcích jsou: Ascentis Si kolona (150 x 2,1; 3 µm; Sigma-Aldrich), průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, objemový nástřik vzorku 1 µl, teplota kolony 40°C. Gradient mobilní fáze je 0 minut: 87,7% A +12,3% B; 15 minut: 77,9% A + 22,1% B, kde A je acetonitril s kyselinou octovou a B je 10 mmol/L vodný octan amonný s kyselinou octovou, která upravuje pH mobilní fáze na 6,1. Hodnota pH byla měřena pH metrem Checker (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, U.S.A.). Pro všechny mobilní fáze při optimalizaci aditiv bylo množství kyseliny octové a mravenčí přidávané do mobilní fáze A

stejně jako do mobilní fáze B. Koncentrace 10 mmol/L mravenčanu amonného a 10 mmol/L octanu amonného byla použita pro testování různých pH. Pro optimalizaci aditiv byl použit průtok mobilní fáze 0,4 ml/min a následující gradient: 0 minut 99,5% A + 0,5% B, 55 minut 75,4% A + 24,6% B. Pro optimalizaci LC podmínek byl použit hybridní hmotnostní spektrometr micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (v uspořádání kvadrupólový analyzátor a analyzátor doby letu tzv. QToF). Byla použita sonda ESI, napětí na kapiláře 2,5 kV, tlak zamlžujícího plynu 1,2 barů, průtok sušícího plynu 9,3 litrů/minutu a teplota sušícího plynu 210°C. Spektra byla měřena v negativním módu v rozsahu 50-3000 *m/z*. Hybridní hmotnostní spektrometr MALDI Synapt G2-Si HDMS (Waters, QToF) byl použit pro identifikaci látek. Měření probíhalo při záznamu negativních iontů pomocí ESI v rozlišovacím módu (resolution) s rozsahem hmot 50-2000 *m/z*. Napětí na kapiláře bylo 2,2 kV, vstupní kužel 20 V, napěťový rozdíl iontového bloku 90 V (source offset), teplota ve zdroji 150°C, teplota sušícího plynu 500°C, průtok sušícího plynu 17 l/min, tlak sušícího plynu 4 bary. MS/MS experimenty byly prováděny pomocí transferové kolizní cely (transfer cell) s kolizní energií, která byla zvyšována z 20 eV do 70 eV. Měření dat probíhalo za pomoci softwaru MassLynx (Waters).

Pro studii rakoviny ledvin byl použit výše zmíněný kapalinový chromatograf od firmy Agilent 1290 Infinity série. Použitá kolona pro tuto studii byla Ascentis Si (150 x 2,1; 3 µm; Sigma-Aldrich), průtok mobilní fáze 0,3 ml/min., objemový nástřik vzorku 0,5 µl, teplota kolony 40°C a gradient: 0 min. 95% A + 5% B, 10 min. 78% A + 22% B, kde A je acetonitril s kyselinou octovou a B je 10 mmol/L vodný octan amonný s kyselinou octovou (přidávaný objem kyseliny octové byl 0,5 µl do 100 ml mobilní fáze A i B). Studie byla měřena za použití hmotnostního spektrometru v hybridním uspořádání typu XEVO G2-XS QToF (Waters). Měření probíhalo při záznamu negativních iontů pomocí ESI v sensitivním módu s rozsahem hmot 50-2000 *m/z*. Napětí na kapiláře bylo 1 kV, vstupní kužel 20 V, napěťový rozdíl iontového bloku 90 V (source offset), teplota ve zdroji 150 °C, teplota sušícího plynu 500°C, průtok sušícího plynu 17 l/min. Měření dat probíhalo za pomoci softwaru MassLynx (Waters).

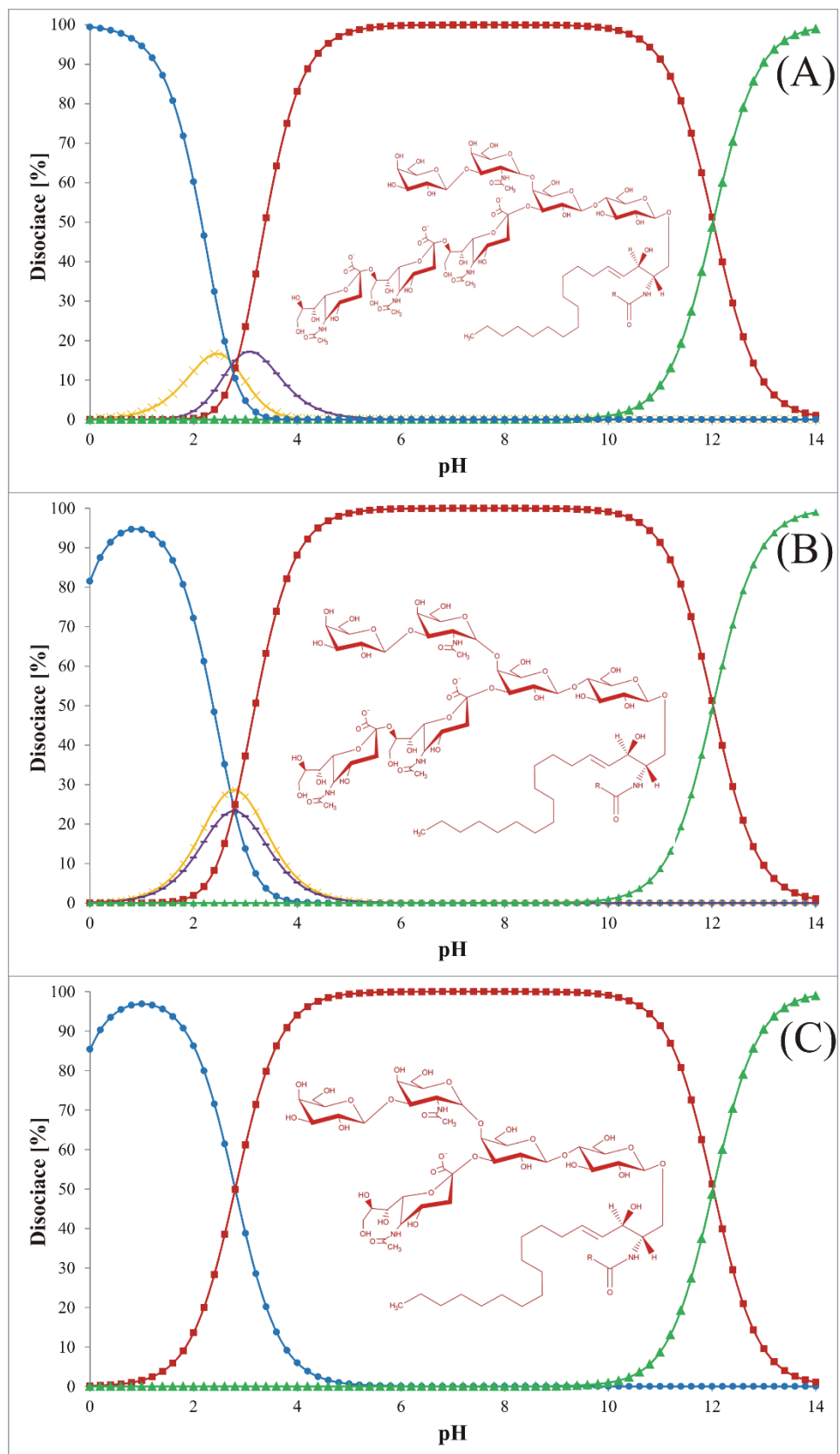
MDA byla provedena s využitím SIMCA softwaru verze 13.0 (Umetrics, Umeå, Sweden), který umožnil nesupervizovanou PCA a supervizovanou OPLS analýzu získaných dat [83-85].

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace metody a identifikace gangliosidů

Analýza lipidů je velmi náročným úkolem vzhledem k velké rozmanitosti lipidů, které se mimo jiné navzájem liší svou polaritou, strukturou, navázanou funkční skupinou a počtem, polohou a délkou acylových řetězců. Hlavním cílem této práce byla analýza sfingolipidů a zejména pak složitých gangliosidů, které mají důležitou roli v organismu a hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech v buňkách. Z důvodů velké rozmanitosti těchto látek byl přednostně použit princip chromatografie HILIC, při kterém dochází k separaci lipidů podle polaritativní funkčních skupin. Na základě dříve optimalizované HILIC metody [86], pro analýzu polárních tříd lipidů jako jsou PS, PA, LPS a LPA, byla vybrána pro optimalizaci gangliosidů kolona Ascentis Si (150 x 2,1 mm, 3 μm).

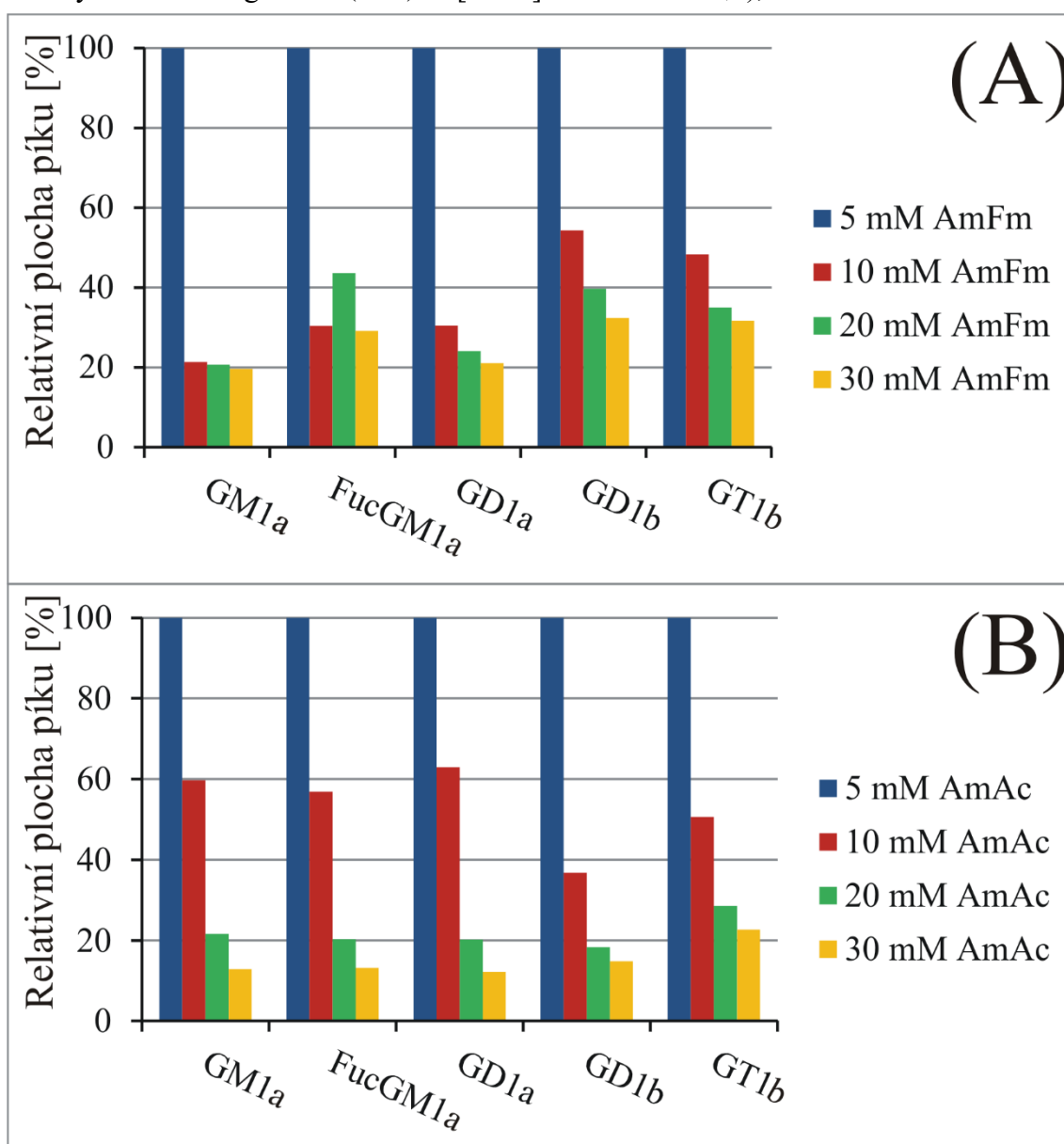
Gangliosidy mohou být vícenásobně nabitě v závislosti na počtu přítomných jednotek kyseliny sialové a hodnotě pH, což může zásadním způsobem ovlivnit kvalitu jejich separace. Před optimalizací metody byly nejprve vypočteny pomocí komerčně dostupného Marvin demo softwaru disociační křivky pro vybrané hlavní zástupce gangliosidů: GT1 (Obrázek 22 A), GD1 (Obrázek 22 B) a GM1 (Obrázek 22 C). GT1 se vyskytuje v jedné formě, a to konkrétně třikrát nabitě na karboxylových skupinách v rozsahu pH od 5 do 10 (Obrázek 22 A, červená křivka). Její neutrální forma je přítomna při pH menším jak 3 (Obrázek 22 A, modrá křivka), avšak okolo tohoto pH jsou přítomny další formy, konkrétně jednou nabitá (Obrázek 22 A, žlutá křivka) a dvakrát nabitá (Obrázek 22 A, fialová křivka). Pro pH vyšší jak 10 je přítomna čtyřikrát nabitá forma GT1 (Obrázek 22 A, zelená křivka), která má náboje na karboxylových skupinách a na N-acetylgalaktosaminu (GalNAc). U gangliosidů GD1 (Obrázek 22 B) a GM1 (Obrázek 22 C), odpovídá stejný rozsah pH od 5 do 10 jedné formě. Pro GD1 je to dvakrát nabitá forma (Obrázek 22 B, červená křivka) a pro GM1 je to jednou nabitá forma (Obrázek 22 C, červená čára). Izomerie gangliosidů *a*, *b* a *c* neměla vliv na disociační křivky. Na základě těchto teoretických výpočtů byl zvolen rozsah pH 5 až 10, kde jsou různé skupiny gangliosidů přítomny v jen jedné iontové formě s ohledem na jejich lepší separaci.



Obrázek 22: Disociační křivky (A) GT1, (B) GD1 and (C) GM1 vypočítány pomocí Marvin demo softwaru [34]. Struktura odpovídá iontové formě v rozsahu pH 5 až 10.

4.1.1 Optimalizace mobilní fáze

Pro optimalizaci separace gangliosidů byla použita Ascentis Si kolona o rozměrech 150 x 2,1 mm, 3 μm , která má vysokou účinnost pro tento typ polárních sfingolipidů. V předchozí práci [86] byl testován typ aditiv a jejich koncentrace, které hrají důležitou roli pro stanovení polárních lipidů. Pro vývoj metody byl použit celkový extrakt gangliosidů z prasečího mozku a byly sledovány tyto hlavní třídy gangliosidů: GM1a, Fuc-GM1a, GD1a, GD1b a GT1b. Pro každou třídu byl dle nejvyššího zastoupení vybrán jeden zástupce: GM1a 36:1 (rekonstruovaný iontový chromatogram (RIC) $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 1544,9$), Fuc-GM1a 36:1 (RIC



Obrázek 23 Porovnání relativních ploch píků vs. koncentrace mravenčanu amonného (AmFm) (A) a octanu amonného (AmAc) (B) pro zástupce tříd gangliosidů: GM1a 36:1 (RIC (rekonstruovaný iontový chromatogram) $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 1544,9$), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 1690,9$), GD1a 36:1 (RIC $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 917,5$), GD1b 36:1 (RIC $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 917,5$) a GT1b 38:1 (RIC $[\text{M}-\text{H}]^{2-}$ $m/z = 1077,0$).

[M-H]⁻ $m/z = 1690,9$), GD1a 36:1 (RIC [M-H]²⁻ $m/z = 917,5$), GD1b 36:1 (RIC [M-H]²⁻ $m/z = 917,5$) a GT1b 38:1 ([M-H]²⁻ $m/z = 1077,0$). Pro testování typu aditiv byly vybrány mravenčan amonný (Obrázek 23 A) a octan amonný (Obrázek 23 B), které jsou vhodné pro LC/MS analýzu. Koncentrace aditiv byla testována v rozsahu od 0 do 30 mmol/L (Obrázek 23). Bez použití aditiv (0 mmol/L) nedošlo k separaci některých tříd, proto není tato koncentrace znázorněna v obrázku 23. Pro porovnání jednotlivých koncentrací byly zvoleny tyto parametry: relativní plochy píků (Obrázek 23), jejich symetrie (Tabulka 2, Obrázek 24 C, D) a šířka v

Tabulka 2: Porovnání symetrie píků (tailing faktor) pro jednotlivé koncentrace [mmol/L] mravenčanu amonného a octanu amonného.

c [mmol/L]	Mravenčan amonný					Octan amonný			
	0	5	10	20	30	5	10	20	30
GM1a	1,83	1,41	1,21	1,31	1,25	1,44	1,21	1,20	1,36
Fuc-GM1a	1,70	1,51	1,69	1,24	0,90	1,34	1,38	1,14	0,95
GD1a	2,28*	1,46	1,14	1,26	1,23	1,37	1,36	1,22	1,22
GD1b	2,28*	1,56	1,02	1,15	1,11	1,20	1,05	0,95	1,05
GT1b	2,23	1,39	1,02	1,06	0,99	1,17	1,05	1,05	0,97

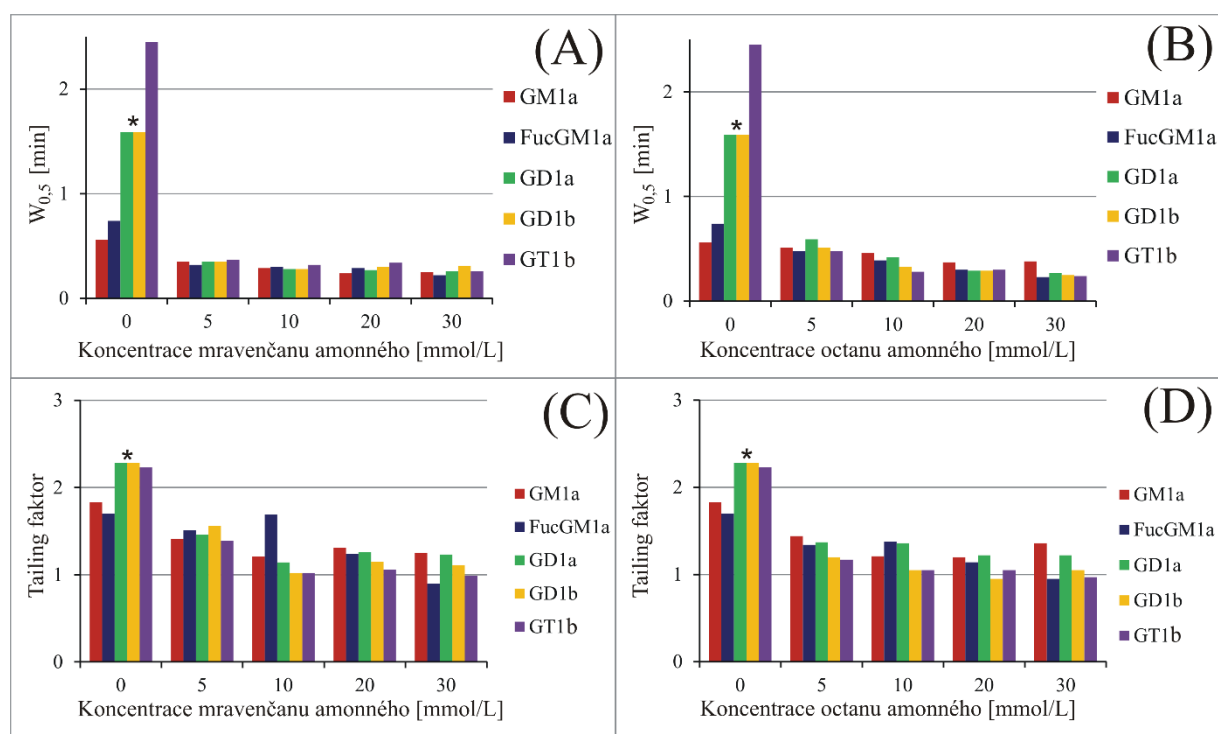
*GD1a a GD1b nejsou separovány bez použití aditiv

Tabulka 3: Porovnání šířky píku v polovině jeho výšky pro jednotlivé koncentrace [mmol/L] mravenčanu amonného a octanu amonného.

c [mmol/L]	Mravenčan amonný					Octan amonný			
	0	5	10	20	30	5	10	20	30
GM1a	0,56	0,35	0,29	0,24	0,25	0,51	0,46	0,37	0,38
Fuc-GM1a	0,74	0,32	0,30	0,29	0,22	0,48	0,39	0,30	0,23
GD1a	1,59*	0,35	0,28	0,27	0,26	0,59	0,42	0,29	0,27
GD1b	1,59*	0,35	0,28	0,30	0,31	0,51	0,33	0,29	0,25
GT1b	2,45	0,37	0,32	0,34	0,26	0,48	0,28	0,30	0,24

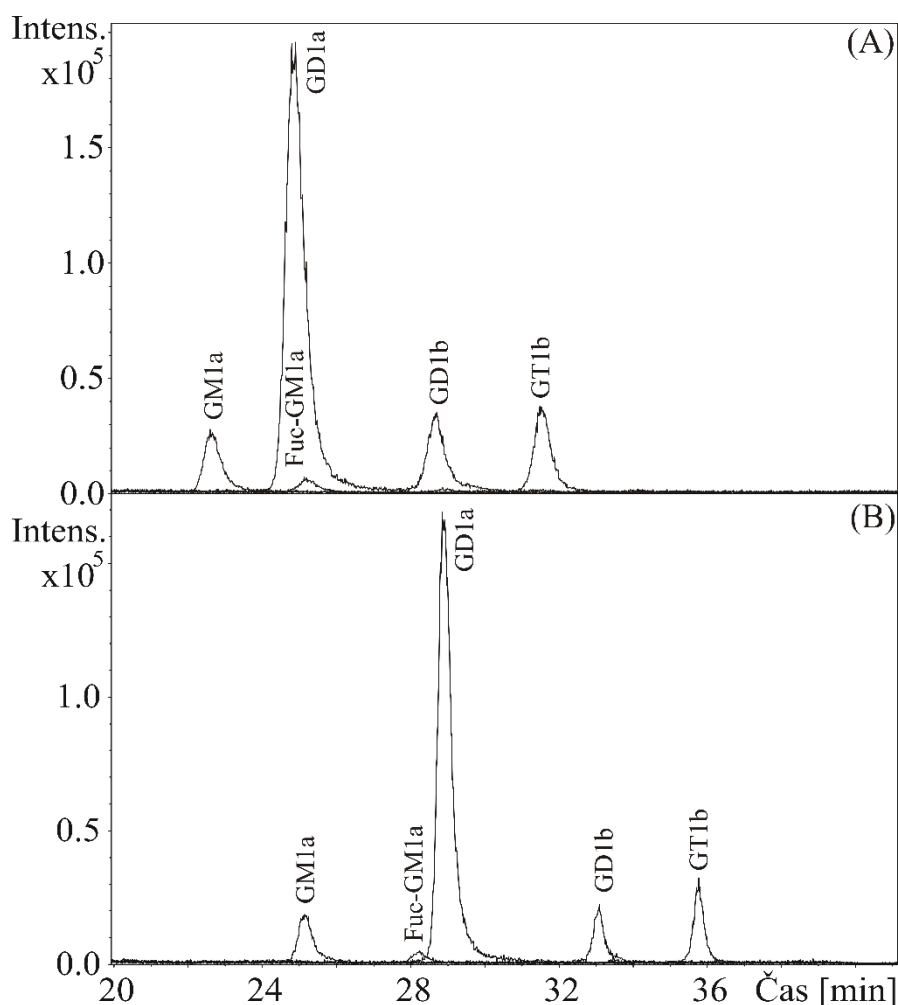
*GD1a a GD1b nejsou separovány bez použití aditiv

polovině jejich výšky ($w_{0,5}$) (Tabulka 3, Obrázek 24 A, B). Nejvyššího signálu pro octan a mravenčan amonný bylo dosaženo při koncentraci 5 mmol/L (Obrázek 23). Se zvyšující se koncentrací mravenčanu a octanu amonného klesala odezva všech gangliosidů. Tabulka 2 znázorňuje chvostování píku v rozmezí koncentrací 0 mmol/L až 30 mmol/L. Bez použití aditiv (0 mmol/L) docházelo k výraznému chvostování a izomery GD1a a GD1b nebyly od sebe separovány a eluovaly v jednom píku. Tabulka 2 ukazuje, že se zvyšující se koncentrací se zlepšuje tvar píků. Vliv koncentrace na tvar píku znázorňuje i Tabulka 3, kde je patrné, že se zvyšující se koncentrací se šířka píku v polovině jeho výšky snižuje. Při porovnání separace bez použití aditiv nebo při použití koncentrace 5 mmol/L či 10 mmol/L je viditelný velký rozdíl v symetrii píků a rozlišení látek. Stejný trend lze pozorovat pro octan i mravenčan amonný. Mobilní fáze bez použití aditiv nelze použít z důvodů velkého chvostování píku a nedostatečné separaci izomerů GD1a a GD1b. Typ a koncentrace aditiv také ovlivňuje chromatografické rozlišení, kdy při použití koncentrace 5 mmol/L octanu amonného nedochází k separaci třídy GD1a a Fuc-GM1a (Obrázek 25 A). Naopak při použití koncentrace 10 mmol/L octanu amonného dochází k mírnému rozdělení třídy GD1a a Fuc-GM1a (Obrázek 25 B). Nejlepšího kompromis mezi odezvou a tvarem píku je dosaženo s použitím koncentrace 10 mmol/L octanu amonného a mravenčanu amonného.

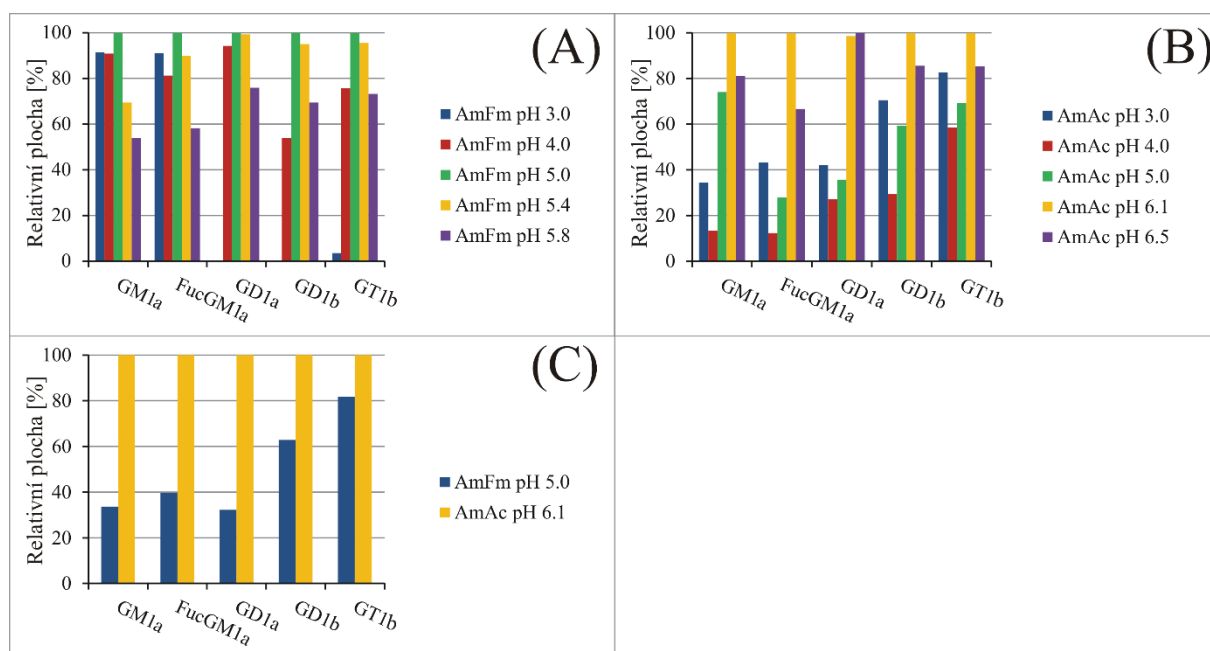


Obrázek 24: Závislost šířky píku v polovině jeho maxima ($w_{0,5}$) [min] na koncentraci (mM - mmol/L) mravenčanu amonného (A) a octanu amonného (B) a symetrie (tailing factor) na koncentraci mravenčanu amonného (C) a octanu amonného (D) pro zástupce tříd gangliosidů GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1544,9$), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1690,9$), GD1a 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$), GD1b 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$) a GT1b 38:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 1077,0$).

Dalším krokem optimalizace separace bylo testování pH. Bylo testováno rozmezí pH od 3,0 do 5,8 pro 10 mmol/L mravenčan amonný za použití kyseliny mravenčí (Obrázek 26 A) a pH v rozmezí od 3,0 do 6,5 pro 10 mmol/L octan amonný za použití kyseliny octové (Obrázek 26 B). Nejlepšího signálu bylo dosaženo pomocí mravenčanu amonného při pH 5. U třídy GT1b došlo k výraznému potlačení signálu při použití pH 3. Izomery GD1a a GD1b nebyly separovány a eluovaly v jednom píku při pH 3 (Obrázek 27 A), a to byl důvod k jejich vyřazení z obrázku 26 A. Při pH 5,8 došlo u všech tříd k potlačení signálu v porovnání se signálem, který byl naměřen při pH 5. Se změnou pH docházelo ke změně symetrie píků (Tabulka S1). U třídy GM1a a Fuc-GM1a docházelo s rostoucím pH ke zvyšování tailing faktoru (Tabulka S1). Při



Obrázek 25: Vliv koncentrace octanu amonného 5 mmol/L (A) a 10 mmol/L (B) na HILIC/ESI-MS analýzu GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1544,9$), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1690,9$), GD1a 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$), GD1b 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$) a GT1b 38:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 1077,0$).

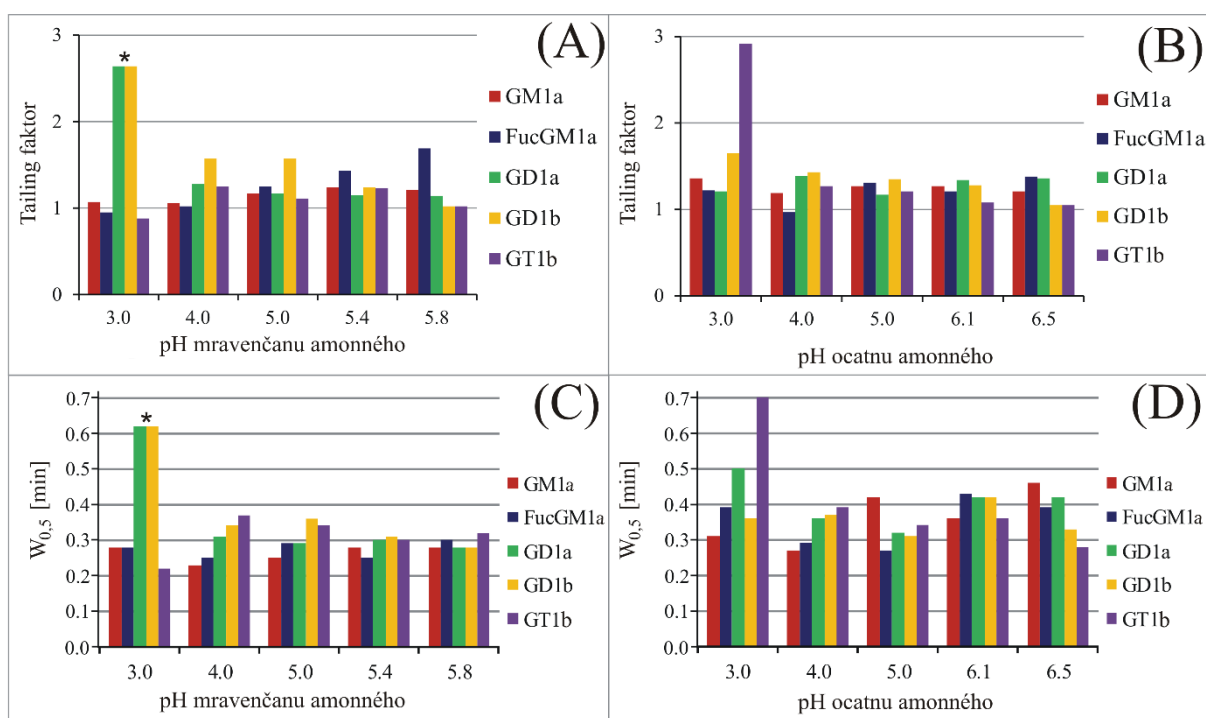


Obrázek 26 Porovnání relativních ploch píků v závislosti na pH pro 10 mmol/L mravenčan amonný (AmFm) (A) a octan amonný (AmAc) (B) a porovnání optimálního pH mravenčanu a octanu amonného (C) pro tyto individuální zástupce tříd gangliosidů GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1544,9$), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ $m/z = 1690,9$), GD1a 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$), GD1b 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 917,5$) a GT1b 38:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ $m/z = 1077,0$).

hodnotách pH 3,0 a 4,0 měly třídy GM1a a Fuc-GM1a tailing faktor hodnotu blížíci se jedné. Se zvyšujícím se pH se hodnoty tailing faktoru zvyšovaly a dosáhly hodnoty 1,24 pro GM1a při hodnotě pH 5,4 a 1,69 pro FucGM1a při hodnotě pH 5,8. Opačný trend byl pozorován u třídy GT1b, u které se zvyšujícím se pH bylo dosaženo lepších hodnot tailing faktoru, a to konkrétně třída GT1b měla hodnotu 1,02 při pH 5,8. Tailing faktor u třídy GD1a a GD1b měl hodnotu 2,64 při pH 3, protože tyto izomery nebyly separovány a eluovaly v jednom píku. Při zvyšujícím se pH se tyto izomery separovaly a tailing faktor se u těchto izomerů blížil hodnotě 1. Docházelo tedy ke zlepšení tvaru píku. Šířka v polovině výšky píku se při změně pH u tříd GM1a a Fuc-GM1a výrazně neměnila (Tabulka S 2) (Obrázek 27 C). Při použití pH 3 až 5,8 se hodnota $w_{0,5}$ pohybovala okolo 0,25 pro třídu GM1a a 0,28 pro třídu Fuc-GM1a. Nejvýraznější rozdíl byl u třídy GT1b při pH 3 v porovnání s vyššími hodnotami pH, což bylo způsobeno nízkým signálem při pH 3. Jako nejlepší kompromis mezi tvarem píku a jeho intenzitou bylo zvoleno pH 5,0 mravenčanu amonného o koncentraci 10 mmol/L (Obrázek 26 C). Toto rozmezí bylo vypočteno jako ideální i na základě teoretických výpočtů disociačních křivek v předchozí sekci.

Při použití octanu amonného bylo testováno pH v rozmezí od 3,0 do 6,5. Nejlepší odezva pro všechny pozorované třídy byla při pH 6,1. Za použití octanu amonného při pH 3,0

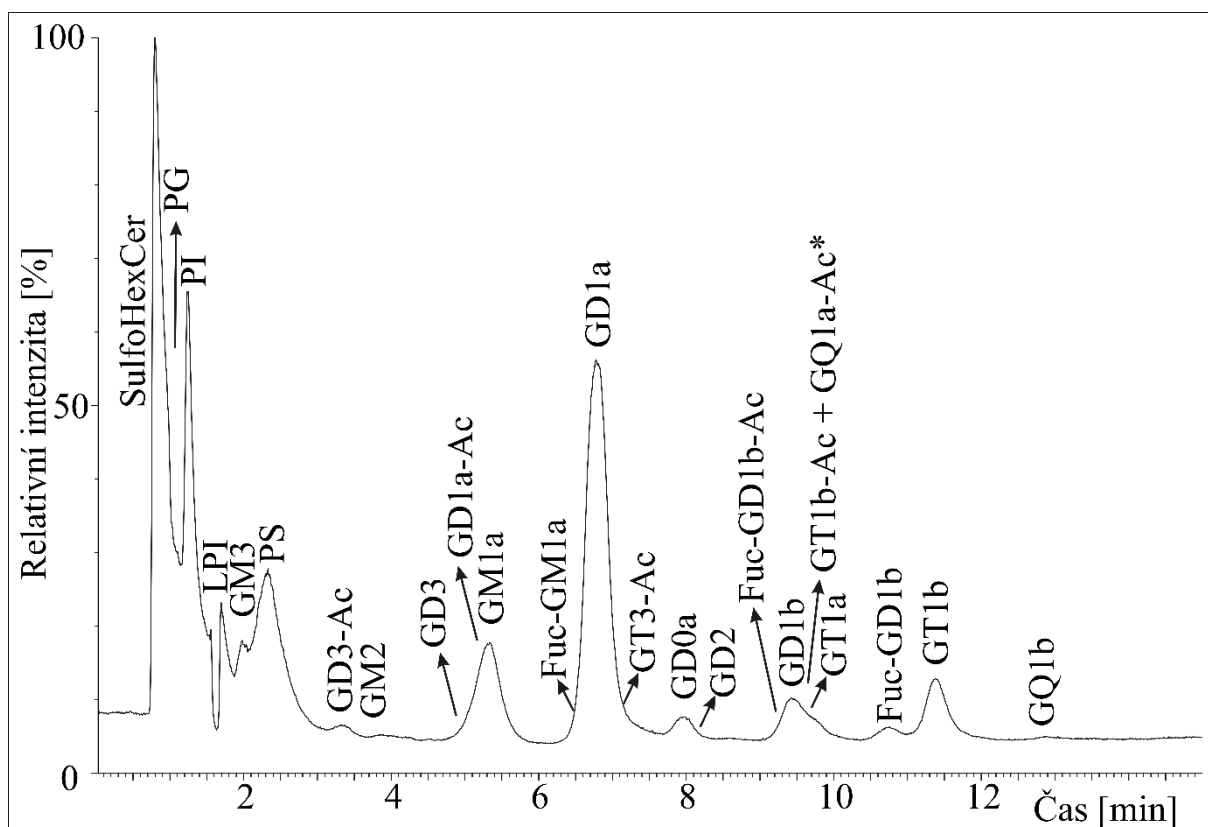
byly izomery GD1a a GD1b rozseparovány. V rozmezí pH od 3,0 do 5,0 byla pro jednotlivé třídy nízká intenzita signálu. Hodnota tailing faktoru při pH 3 byla nejhorší pro třídy GM1a, GD1b a GT1b. Třída Fuc-GM1a měla nejhorší hodnotu tailing faktoru 1,38 při pH 6,5 a GD1a 1,39 při pH 4,0. GT1b, GD1b měly nejlepší tvar píku při pH 6,5 a třída GM1a měla nejlepší tvar píku při pH 4,0 a 6,5. GD1a mělo nejlepší tvar píku při pH 5,0. Fuc-GM1a mělo nejlepší tvar při pH 4,0. Obrázek 27 B znázorňuje, že se zvyšujícím se pH se tailing faktor snižuje pro třídu GT1b a GD1b. Nejnižší hodnoty šířky píku v polovině jeho výšky byly dosaženy při pH 4,0 pro třídu GM1a, při pH 5,0 pro Fuc-GM1a, GD1a, GD1b a při pH 6,5 pro GT1b. Jako nejlepší kompromis mezi tvarem píku a jeho intenzitou bylo zvoleno pH 6,1 octanu amonného (Obrázek 26 C). Porovnání nejlepších vybraných pH mobilních fází pro octan a mravenčan amonný znázorňuje obrázek 26 C. Při použití octanu amonného bylo dosaženo vyšších signálů pro všechny pozorované třídy. Na základě provedených experimentů byla mobilní fáze obsahující 10 mmol/L octan amonný při pH 6,1 vybrána jako nejvhodnější.



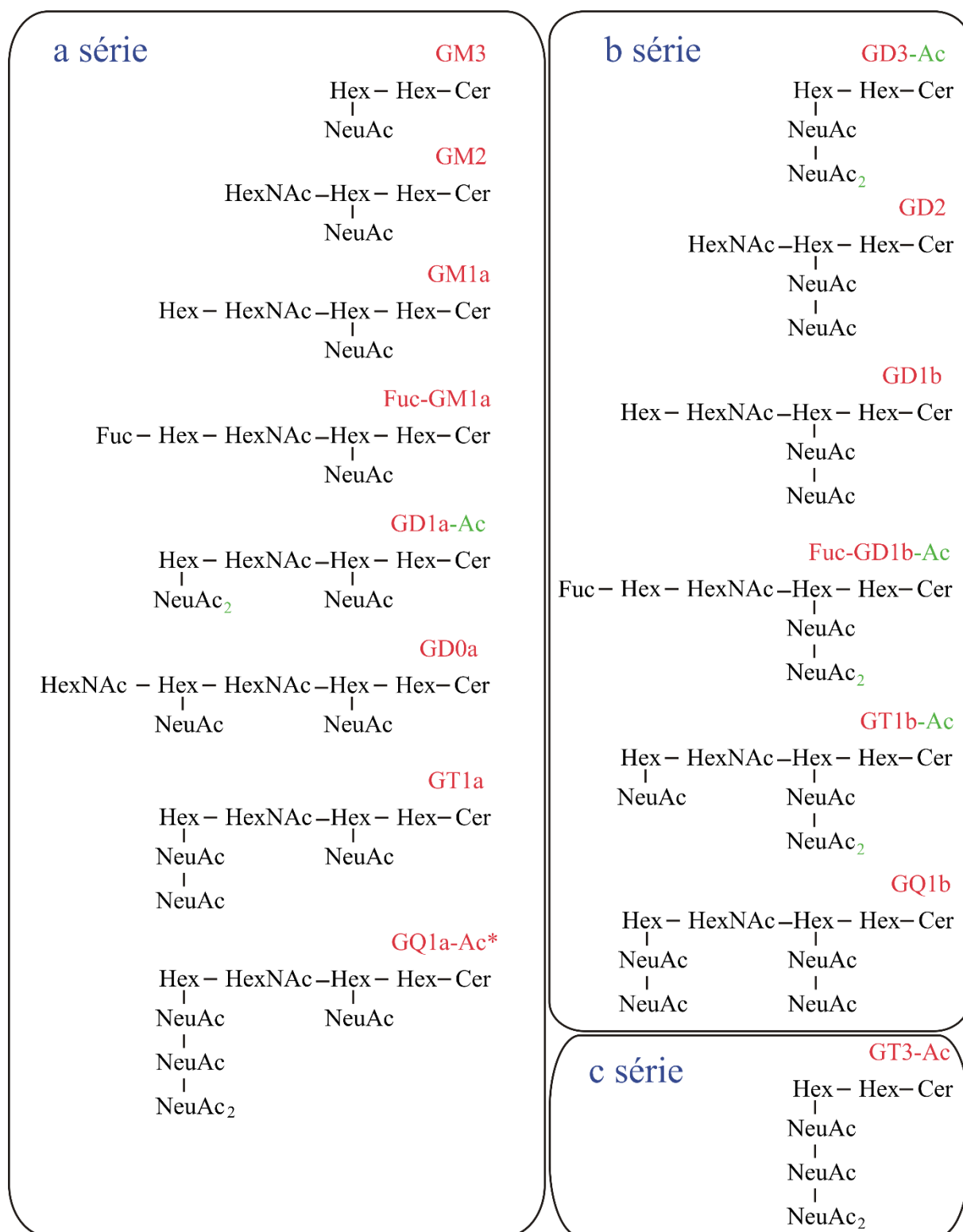
Obrázek 27: Porovnání šířky píku v polovině jeho maxima ($w_{0,5}$) [min] v závislosti na pH mravenčanu amonného (A) a pH octanu amonného (B). Porovnání tailing faktoru vs. pH mravenčanu amonného (C) a pH octanu amonného (D) pro zástupce tříd gangliosidů GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ m/z = 1544,9), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ m/z = 1690,9), GD1a 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z = 917,5), GD1b 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z = 917,5) a GT1b 38:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z = 1077,0).

4.1.2 Hmotnostní spektrometrie gangliosidů

Optimalizovaná metoda byla použita pro analýzu extraktu z prasečího mozku (Obrázek 28). Bylo identifikováno 19 tříd gangliosidů a 5 tříd ostatních polárních lipidů. Identifikace gangliosidů byla provedena na základě: retenčního času, přesné hmoty m/z při záznamu záporných iontů v ESI režimu a pomocí MS/MS spekter. Nejprve probíhalo MS měření, kdy na základě správné m/z iontů $[M-H]^-$, $[M-2H]^{2-}$ a $[M-3H]^{3-}$ bylo určeno elementární složení pro každý jednotlivý gangliosid. Správnost určení elementárního složení byla v průměru 3,1 ppm. Poté bylo provedeno MS/MS měření, jednoho až dvou nejintenzivnějších zástupců pro každou třídu. Fragmentace poskytla informaci o větvení a umožnila určit pozice sialových kyselin a tím rozpoznat jednotlivé izomery, které jsou označovány písmeny *a*, *b* a *c* (Obrázek 29).



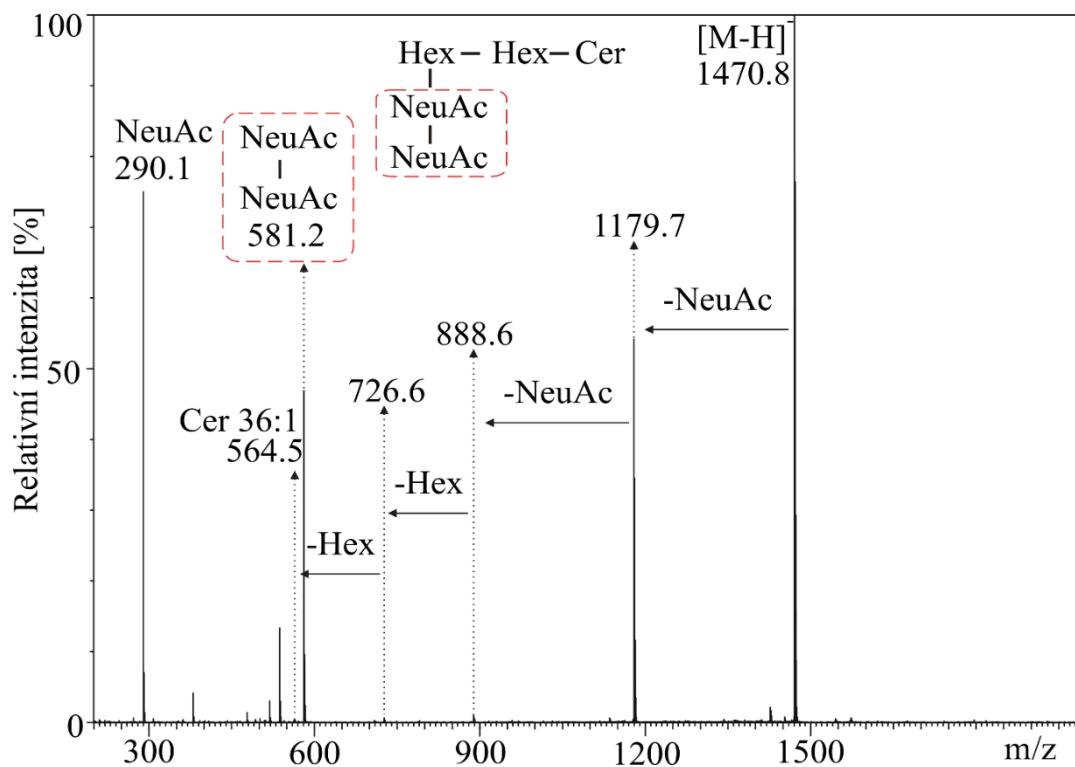
Obrázek 28: HILIC/ESI-MS analýza extraktu prasečího mozku. Podmínky analýzy: Ascentis Si kolona (150x2,1; 3 μ m, Sigma-Aldrich), průtok 0,3 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradient mobilní fáze 0 min: 87,7 % A + 12,3 % B; 15 min: 77,9 % A + 22,1 % B, kde A je acetonitril s kyselinou octovou a B je 10 mmol/L vodný octan amonný s kyselinou octovou pH 6,1.



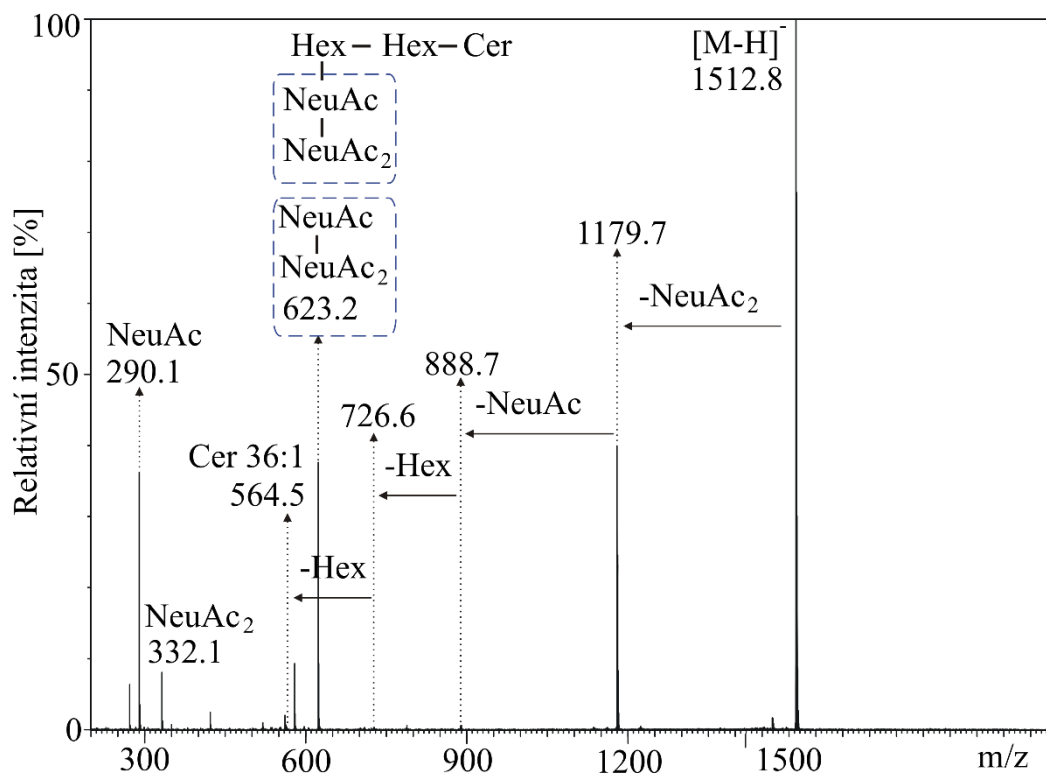
Obrázek 29: Struktury gangliosidů identifikované v prasečím mozku. G znamená gangliosid, následně písmeno značí počet kyselin sialových (M-jedna, D-dvě atd.) a číslo značí počet neutrálních sacharidů vypočítaný jako 5-n (pro GM3 tedy 5-2=3). Další malé písmeno značí sérii neboli navázaný počet NeuAc na druhé Hex, kde série *a* je –Hex(NeuAc)–Hex–Cer, série *b* je –Hex(NeuAc–NeuAc)–Hex–Cer a série *c* je –Hex(NeuAc–NeuAc–NeuAc)–Hex–Cer. GQ1a–Ac* je třída pro kterou nebyla naměřena MS/MS spektra.

Všechny třídy gangliosidů, které byly identifikovány v prasečím mozku jsou znázorněny na obrázku 29, kde G znamená gangliosid, následné písmeno značí počet kyselin sialových (M-jedna (mono), D-dvě (di) atd.) a číslo značí počet neutrálních sacharidových jednotek vypočítaný jako 5-n. Pro třídu GM3, která obsahuje dvě sacharidové jednotky Hex, je to $5-2=3$. V celé práci používáme označení Hex, protože nebyl rozlišován typ sacharidových jednotek, jestli jde o Gal nebo Glc. Další malé písmeno značí sérii neboli navázaný počet NeuAc na druhém sacharidu Hex (druhý od Cer), kde série *a* je –Hex(NeuAc)–Hex–Cer, série *b* je –Hex(NeuAc–NeuAc)–Hex–Cer (dvě sacharidové jednotky NeuAc návázané na druhé sacharidové jednotce Hex) a série *c* je –Hex(NeuAc–NeuAc–NeuAc)–Hex–Cer (tři sacharidové jednotky NeuAc návázané na druhé sacharidové jednotce Hex). Byla zjištěna druhá acylace na NeuAc u “stejných“ tříd (zelené popisy v Obrázku 29), pro příklad: v sérii *a* je tedy třída GD1a a zároveň třída GD1a-Ac, která obsahuje dvě acylace na NeuAc. GQ1a-Ac* je třída pro kterou nebyla naměřena MS/MS spektra. Identifikované třídy obsahují jednu NeuAc (GM) až čtyři NeuAc (GQ), kdy tyto sacharidy jsou navázané na Hex, nebo jsou navázané za sebou a mají polohy *a*, *b* a *c*. Počty neutrálních sacharidů se pohybují od dvou do pěti a jsou to Hex, HexNAc a Fuc.

Fragmentační chování gangliosidů (Obrázky 30-38) umožnilo velmi dobré určení sekvence sacharidové části. Fragmentace běžných gangliosidů jako je GM3, GM2, GM1a a Fuc–GM1a byly dostatečně popsány v předchozích pracích [73, 74, 87], proto zde nebudou popsány a práce je zaměřena na komplexnější třídy. Všechny fragmentové ionty byly jednou nabitě, až na ion $m/z = 931,5$ odpovídající iontu $[M-2H-NeuAc_2]^{2-}$ (Obrázek 35, 38). Symbol černého kosočtverce značí ve fragmentačních spektrech ion prekurzoru. Mezi spektra jednodušší pro vyhodnocení patří MS/MS spektrum GD3 36:1, kde byl pro fragmentaci vybrán ion $[M-H]^-$ ($m/z = 1470,8$; Obrázek 30). Ve spektru se vyskytuje velmi intenzivní ion 1179,7, který znázorňuje odštěpení jedné NeuAc a za vzniku iontu Hex(NeuAc)–Hex–Cer. Dalším odštěpením NeuAc vzniká ion 888,6, který odpovídá struktuře Hex–Hex–Cer. Pokud se od struktury Hex–Hex–Cer odštěpí Hex, tak je pozorován ion 726,6 odpovídající struktuře Hex–Cer. Poslední ztrátou sacharidu (Hex) vzniká ion Cer, který v tomto případě obsahuje 36 atomů uhlíků (CN) 36 a jednu dvojnou vazbu (DB) 1, tzn. Cer 36:1. Ve fragmentačním spektru se nachází ion 290,1 odpovídající sacharidu NeuAc a tedy iontu $[NeuAc-H]^-$. Ve spektru se také nachází intenzivní ion 581,2, který odpovídá struktuře NeuAc–NeuAc a iontu $[NeuAc-NeuAc-H]^-$. Další zdánlivě velmi podobná struktura gangliosidu je znázorněna v MS/MS spektru na obrázku 31. Pro fragmentaci byl vybrán ion $[M-H]^-$ ($m/z = 1512,8$)

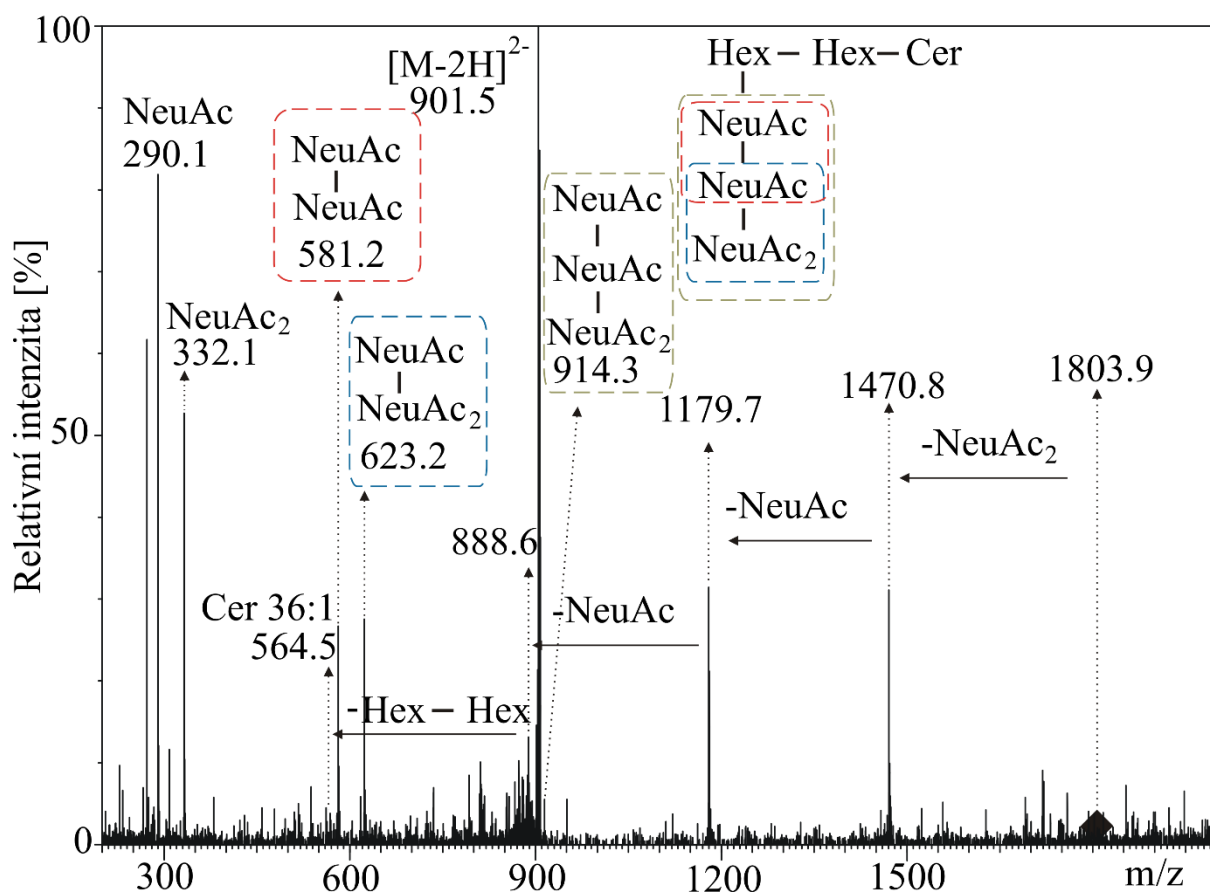


Obrázek 31: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD3 36:1 ($[M-H]^-$ 1470,7 m/z).



Obrázek 30: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD3-Ac 36:1 ($[M-H]^-$ 1512,8 m/z).

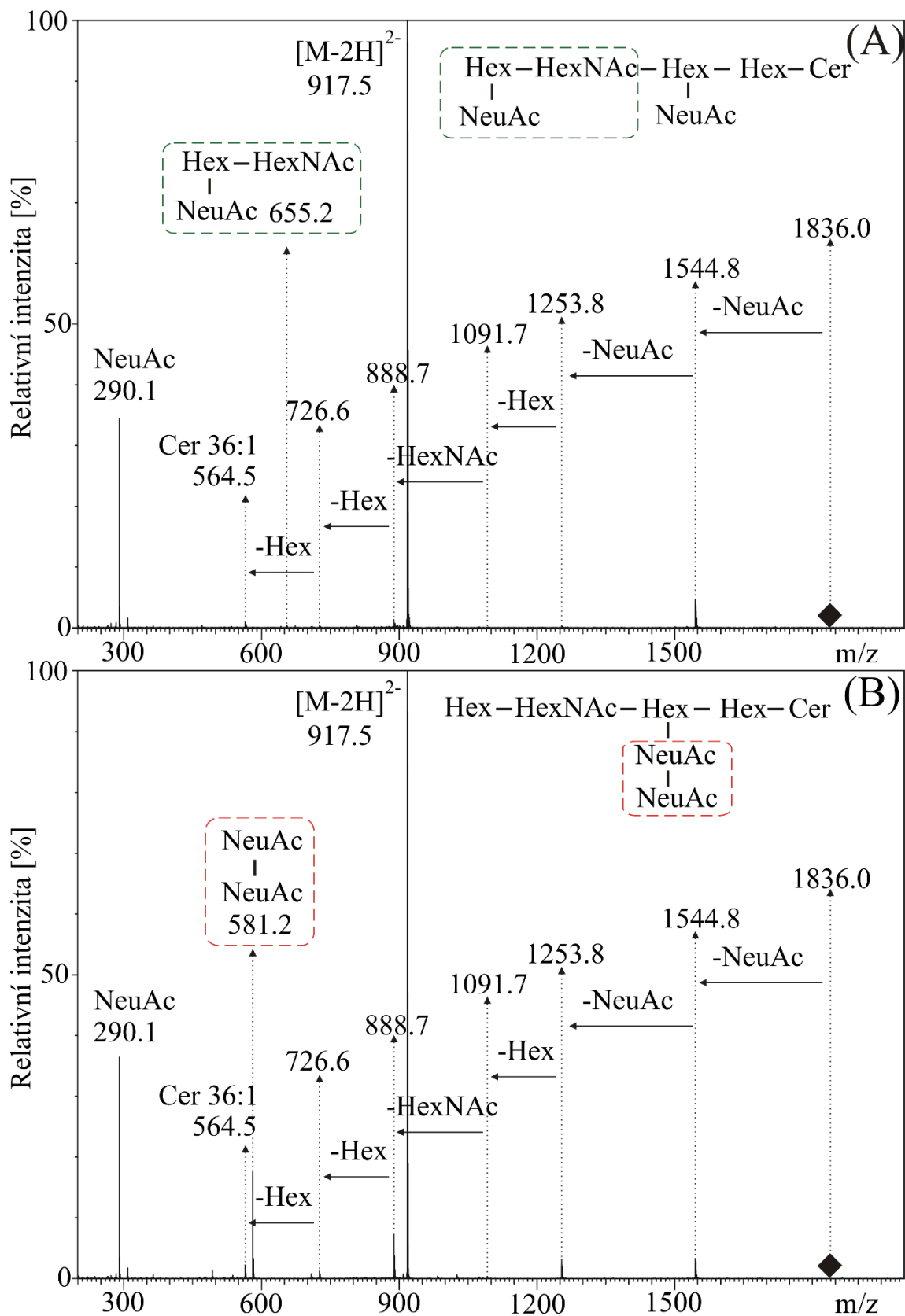
odpovídající třídě GD3-Ac 36:1. Toto MS/MS spektrum se liší od spektra GD3 36:1 sacharidovou jednotkou NeuAc. Druhá NeuAc jednotka obsahuje navíc acetyl navázaný na OH skupinu a je označena NeuAc₂. Ve spektru se nachází ion 1179,7, což je fragment vzniklý neutrální ztrátou 333,1 odpovídající NeuAc₂. V MS/MS spektru je také přítomen ion $m/z = 332,1$, potvrzující přítomnost NeuAc₂. Dále je ve spektru pozorován ion $m/z = 290,1$, který odpovídá NeuAc, stejně jako v dalších spektrech (např. obrázek 30). Ion $m/z = 623,2$ ve spektru GD3-Ac 36:1 odpovídá iontu [NeuAc-NeuAc₂-H]⁻. Pozice NeuAc₂ byla určena na základě vysoké intenzity iontu 1179,7, protože v případě NeuAc₂ mezi NeuAc a Hex, by byl očekáván intenzivní ion 1221,7, odpovídající neutrální ztrátě 291,1 (NeuAc) z iontu prekursoru. V dalším MS/MS spektru byl změřen dvakrát nabitý ion prekursoru [M-2H]²⁻ $m/z = 850,5$ (Obrázek S-1), který odpovídá gangliosidu GD2 38:1. MS/MS spektrum poskytlo velmi podobnou sekvenci neutrálních ztrát sacharidů, jako u GD3 36:1 (Obrázek 30). Ve struktuře byl však přítomen HexNAc a struktura byla identifikována jako HexNAc-Hex(NeuAc)-Hex-Cer (Obrázek S-1). MS/MS spektra gangliosidu se 3 kyselinami



Obrázek 32: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GT3-Ac 36:1 ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 901,5$).

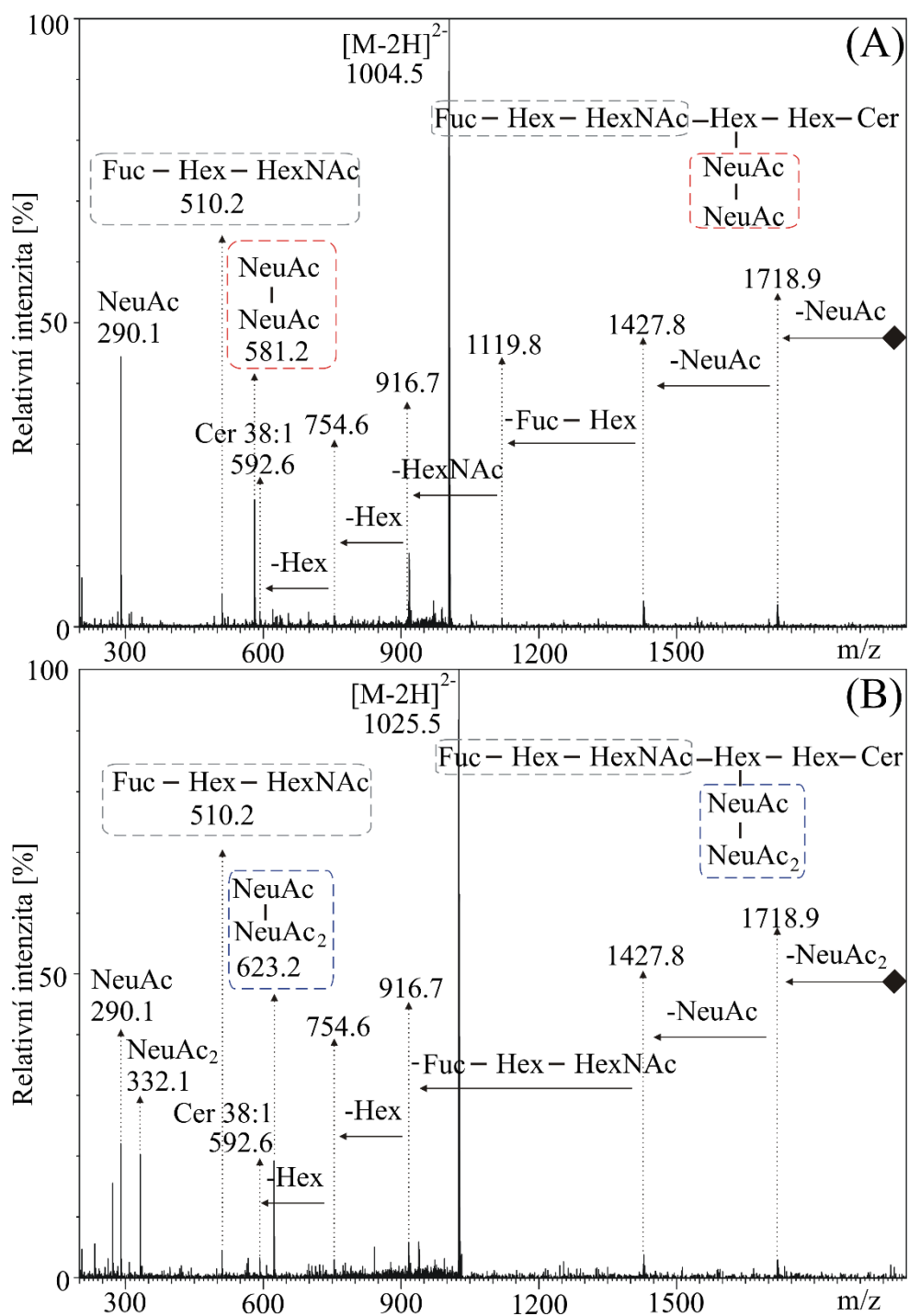
sialovými znázorňuje obrázek 32. Jednalo se o gangliosid GT3-Ac 36:1, který byl identifikován na základě MS/MS spektra iontu $[M-2H]^{2-}$ ($m/z = 901,5$). Ve spektru jsou pozorovány ionty NeuAc (290,1), NeuAc₂ (332,1), dále pak NeuAc–NeuAc (581,2) a NeuAc–NeuAc₂ (623,2). Dalším důležitým iontem je o $m/z = 914,3$, jenž odpovídá NeuAc–NeuAc–NeuAc₂. Pozorovaná sekvence v MS/MS spektru znázorněná na obrázku 32 je nejpravděpodobnější z důvodů výskytu intenzivních iontů, jako je ion $m/z = 1470,8$ odpovídající neutrální ztrátě NeuAc₂ (333,1) z iontu prekurzoru a iontu $m/z = 1179,7$ odpovídající ztrátě NeuAc (291,1) a dalším ztrátám až na Cer.

Rozdíly v MS/MS spektrech izomerů GD1a (Obrázek 33 A) a GD1b (Obrázek 33 B) jsou znázorněny na obrázku 33. Ionty prekurzorů $[M-2H]^{2-}$ jsou stejné pro oba dva izomery a mají hodnotu $m/z = 917,5$, ale rozdíly jsou pozorovány v jejich fragmentačních spektrech. Mezi nejvíce rozdílné ionty patří $m/z = 655,2$ (Obrázek 33 A) a $m/z = 581,2$ (Obrázek 33 B). Ion $m/z = 655,2$ je přítomen pouze ve spektru GD1a a odpovídá struktuře NeuAc–Hex–HexNAc. Dalším iontem, dle kterého lze určit sérii gangliosidu je velmi intenzivní ion $m/z = 581,2$ přítomný pouze ve spektru na obrázku 33 B, odpovídající NeuAc–NeuAc. Dalším zajímavým iontem je $m/z = 1253,8$, což je neutrální ztráta dvou NeuAc z iontu prekurzoru. V MS/MS spektru na obrázku 33 B je tento ion intenzivní a lze tedy usuzovat, že ztráta obou NeuAc z GD1b probíhá s větší pravděpodobností než ze třídy GD1a. Z těchto fragmentačních rozdílů a retenčního chování izomerů GD1a a GD1b lze určit pozici NeuAc a tedy sérii gangliosidů. Velmi podobná spektra jsou znázorněna na obrázku S 2, kde byly fragmentovány izomery GT1a (Obrázek S 2 A) a GT1b $[M-2H]^{2-}$ (Obrázek S 2 B) $m/z = 1077,0$. Ve spektru jsou pozorovány ionty popsané výše a dále pak dvakrát nabitě ionty $[M-2H]^{2-}$ $m/z = 931,5$. V těchto spektrech je důležité sledovat poměr jednotlivých iontů a zejména pak intenzitu iontu $m/z = 581,2$ odpovídající NeuAc–NeuAc. V obrázku S 2 A, B se vyskytuje ion $[M-2H-NeuAc]^{2-}$ ($m/z = 931,5$) odpovídající jedné ztrátě NeuAc z iontu prekurzoru a vzniku dvakrát nabitěho iontu, který odpovídá GD1a,b. Ze spekter (Obrázek 33 a S 2), lze tedy určit specifické fragmentové ionty odpovídající jednotlivým polohám NeuAc. Ion $m/z = 655,2$ odpovídající NeuAc–Hex–HexNAc je specifický pro GD1a a GT1b a ion $m/z = 581,2$ odpovídající NeuAc–NeuAc je specifický pro GD1b a GT1a. Pro GT1a je dále důležitý poměr jednotlivých iontů ve spektru.



Obrázek 33: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD1a 36:1 (A) a GD1b 36:1 (B) ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 917,5$).

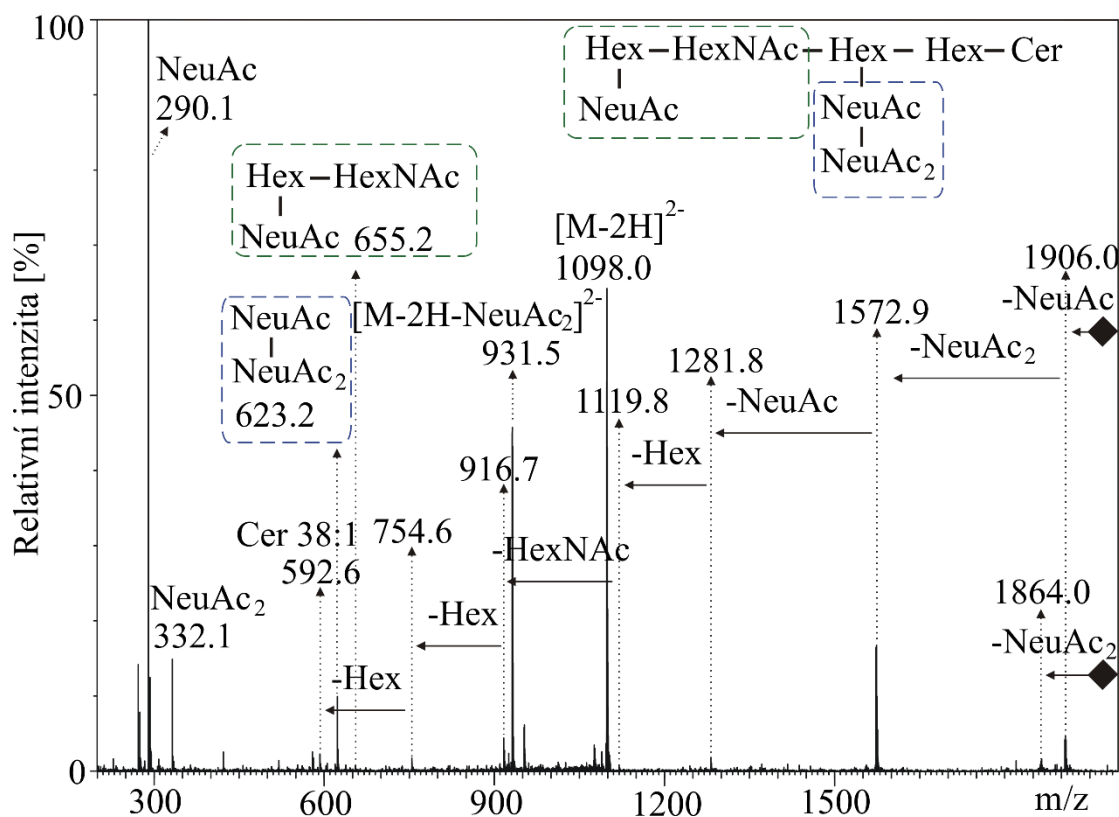
Rozdíl ve spektrech tříd Fuc-GD1b a Fuc-GD1b-Ac je znázorněn na obrázku 34, kde lze pozorovat sekvenci sacharidové části, jako v předešlých případech. Nejzajímavější jsou ionty jednotlivých sacharidů případně řetězce sacharidových jednotek. Na obrázku 34 A je ion $m/z = 290,1$ odpovídající NeuAc, ion $m/z = 510,2$ odpovídající Fuc-Hex-HexNAC a ion $m/z = 581,2$ odpovídající NeuAc-NeuAc. Je patrný rozdíl spekter na obrázku 34 A a B. Na obrázku 34 B není přítomný ion $m/z = 581,2$ a naopak je zde přítomen ion $m/z = 332,1$



Obrázek 34: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů Fuc-GD1b 38:1 (A) ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 1004,5$) a Fuc-GD1b-Ac 38:1 (B) ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 1025,5$).

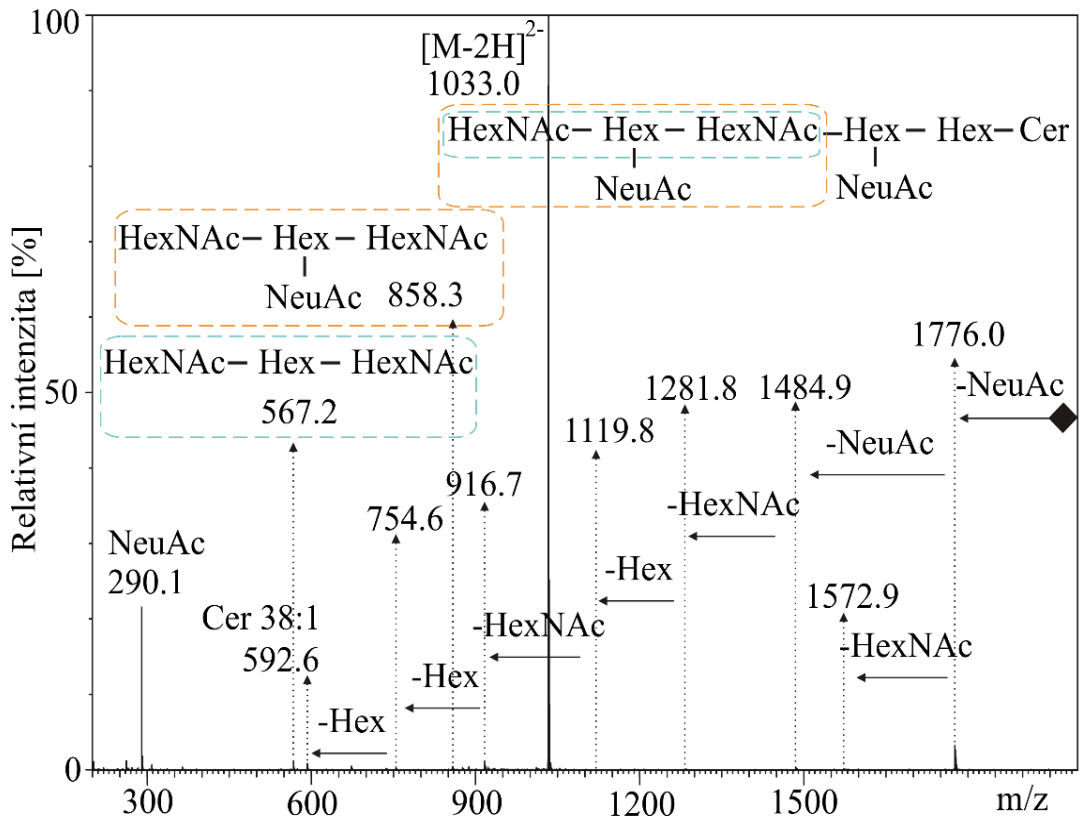
odpovídající NeuAc₂ a ion $m/z = 623,2$ odpovídající NeuAc–NeuAc₂. Jsou patrné společné rysy těchto fragmentačních spekter s fragmentačním spektrem GD1b. Spektra se vyznačují velmi intenzivními ionty $m/z = 581,2$ a ionty $m/z = 623,2$ které nám dokazují přítomnost série *b*.

Třída GT1b-Ac a její fragmentační spektrum je znázorněno na obrázku 35. Ve spektru jsou patrné dříve diskutované ionty $m/z = 290,1$, $m/z = 332,1$, $m/z = 623,2$ a $m/z = 655,2$. Dále jsou zde přítomné ionty $[M-2H-NeuAc]^{2-}$ $m/z = 1906,0$ a $[M-2H-NeuAc_2]^{2-}$ $m/z = 1864,0$ vzniklé ztrátou NeuAc a NeuAc₂ z iontu prekursoru.

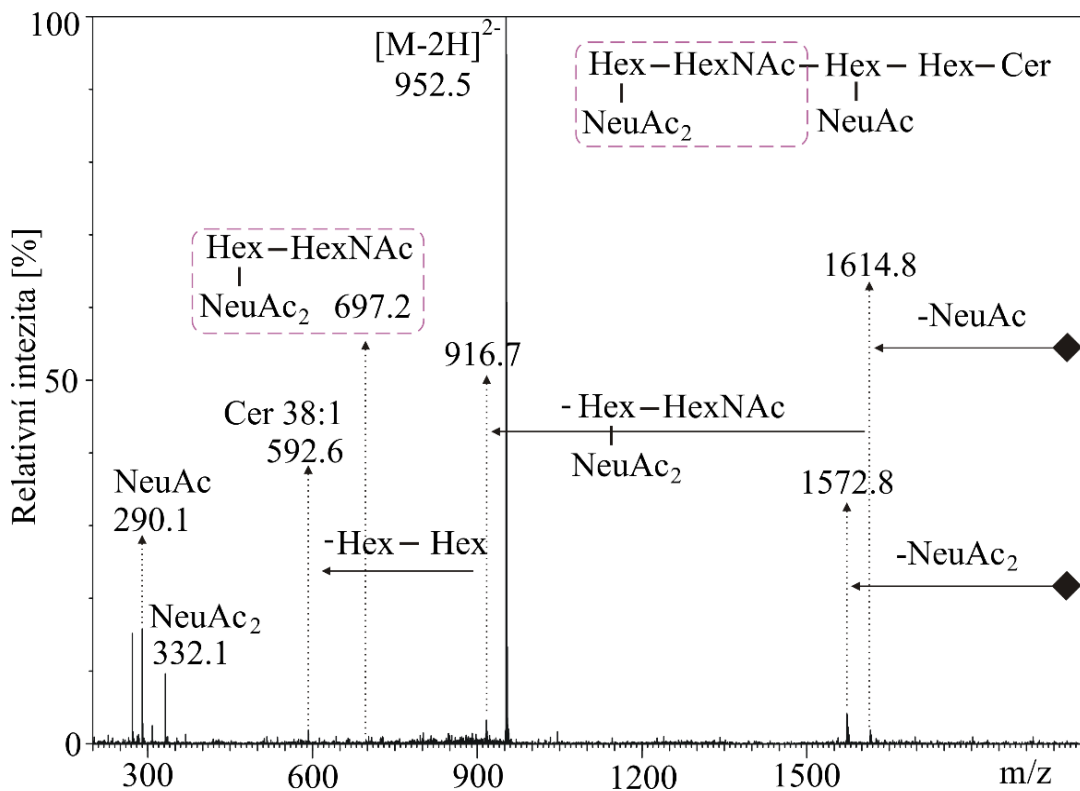


Obrázek 35: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GT1b-Ac 38:1 ($[M-2H]^{2-}$ 1098,0 m/z).

Fragmentační chování třídy GD0a je znázorněno na obrázku 36. Jako v předešlých případech je zde zřejmá sekvence sacharidové části. Přítomný ion $m/z = 1572,9$ odpovídá ztrátě NeuAc a HexNAc z iontu prekursoru. Mezi další ionty určující polohu sacharidů patří ion $m/z = 567,2$ odpovídající HexNAc–Hex–HexNAc a ion $m/z = 858,3$ odpovídající HexNAc–Hex(NeuAc)–HexNAc.



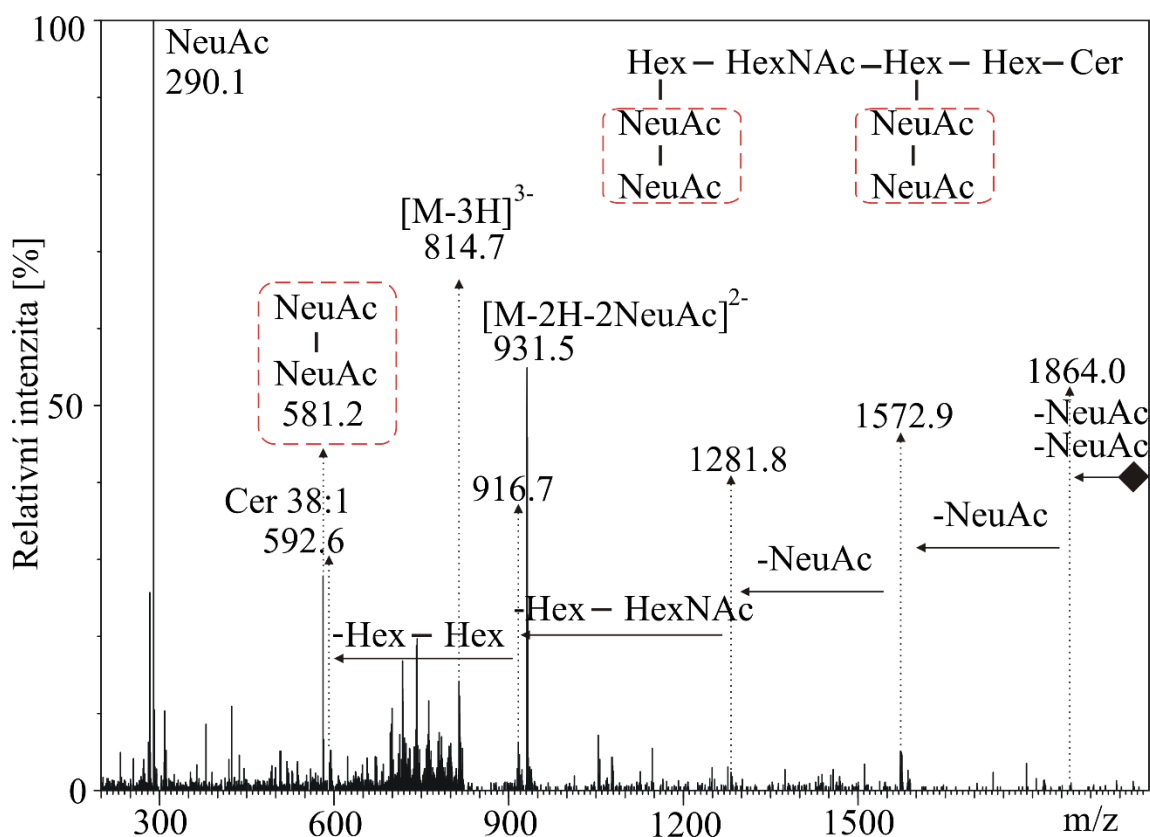
Obrázek 37: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD0a 38:1 ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 1033,0$).



Obrázek 36: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD1a-Ac 38:1 ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 952,5$).

Dalším typem třídy gangliosidů patřící do série *a* je GD1a-Ac. Na základě znalosti fragmentačního chování z předešlých fragmentačních spekter lze určit strukturu na základě známých iontů $m/z = 290,1$, $m/z = 332,1$ a iontu $m/z = 697,2$ odpovídajícímu NeuAc₂-Hex-HexNAc.

MS/MS spektrum třídy GQ1b z iontu $[M-3H]^{3-}$ $m/z = 814,7$ je na obrázku 38. Toto fragmentační spektrum znázorňuje velmi podobnou sekvenci sacharidové části a ionty, které byly popsány výše. Struktura patří do série *b* z důvodu nalezení jediného specifického iontu 581,2 odpovídajícímu NeuAc-NeuAc.



Obrázek 38: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GQ1b 38:1 ($[M-3H]^{3-}$ $m/z = 814,7$).

Na základě fragmentačního chování gangliosidů byla vytvořena Tabulka 4, která specifikuje charakteristické fragmentové ionty vzniklé při měření MS/MS v negativním módu. S její pomocí lze rychleji identifikovat jednotlivé ionty a přiřadit k nim příslušné sacharidy a sacharidové sekvence. Získané znalosti z fragmentačních spekter umožnily vytvořit záznam neutrálních ztrát pro tyto sacharidové jednotky: Fuc, Hex, HexNAc, NeuAc, NeuAc₂ (Tabulka 5). Díky ní jsme schopni jednoduše dopočítat sekvenci sacharidové části a vysvětlit přítomné ionty ve fragmentačních spektrech.

Tabulka 4: Tabulka charakteristických fragmentových iontů v MS/MS spektrech gangliosidů v negativním módu.

Fragmentový ion	Elementární složení	$\Delta m/z$
[NeuAc – H] ⁻	C11H16NO8	290,0881
[NeuAc ₂ – H] ⁻	C13H18NO9	332,0987
[Fuc-Hex-HexNAc – H] ⁻	C20H32NO14	510,1828
[HexNAc-Hex-HexNAc – H] ⁻	C22H35N2O15	567,2043
[NeuAc-NeuAc – H] ⁻	C22H33N2O16	581,1836
[NeuAc-NeuAc ₂ – H] ⁻	C24H35N2O17	623,1941
[NeuAc-Hex-HexNAc – H] ⁻	C25H39N2O18	655,2203
[NeuAc ₂ -Hex-HexNAc – H] ⁻	C27H41N2O19	697,2309
[HexNAc-Hex-NeuAc-HexNAc – H] ⁻	C33H52N3O23	858,2997
[NeuAc-NeuAc-NeuAc ₂ – H] ⁻	C35H52N3O25	914,2895

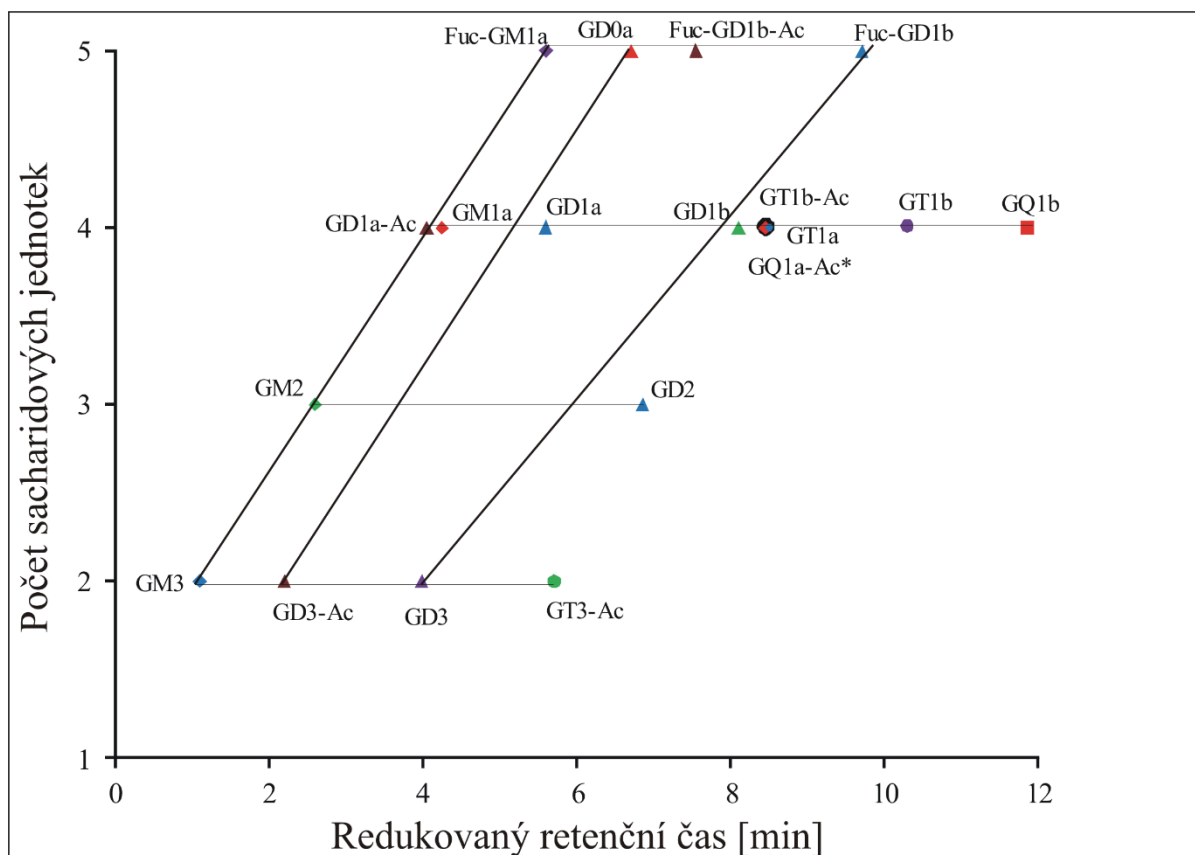
Tabulka 5 Tabulka neutrálních ztrát jednotlivých sacharidů v MS/MS spektrech gangliosidů v negativním módu.

Neutrální ztráta	Elementární složení	$\Delta m/z$
Fucose (Fuc)	C6H10O4	146,0579
Hexose (Hex)	C6H10O5	162,0528
<i>N</i> -Acetylhexose (HexNAc)	C8H13NO5	203,0794
<i>N</i> -Acetylneuraminic acid (NeuAc)	C11H17NO8	291,0954
<i>O</i> -Acetyl-NeuAc (NeuAc ₂)	C13H19NO9	333,1060

Ve vzorku se dále vyskytovali polární fosfolipidy a sulfatidy, jejichž identifikace proběhla na základě popsaných pravidel v předchozích pracích [68, 76, 79]. V případě sulfatidů docházelo k časté interferenci hydroxylovaného sulfatidu (např. SulfoHexCer 38:2 (OH) o m/z 848.5563) a sulfatidu s další methylovou skupinou (např. SulfoHexCer 39:1 o m/z 848.5927). Tyto problémy s identifikací sulfatidů nešlo vyřešit pomocí použitých QToF spektrometrů z důvodu nízké rozlišovací. Identifikace proběhla na základě m/z , fragmentačního chování, retence a byla ověřena na základě předchozí práce [88].

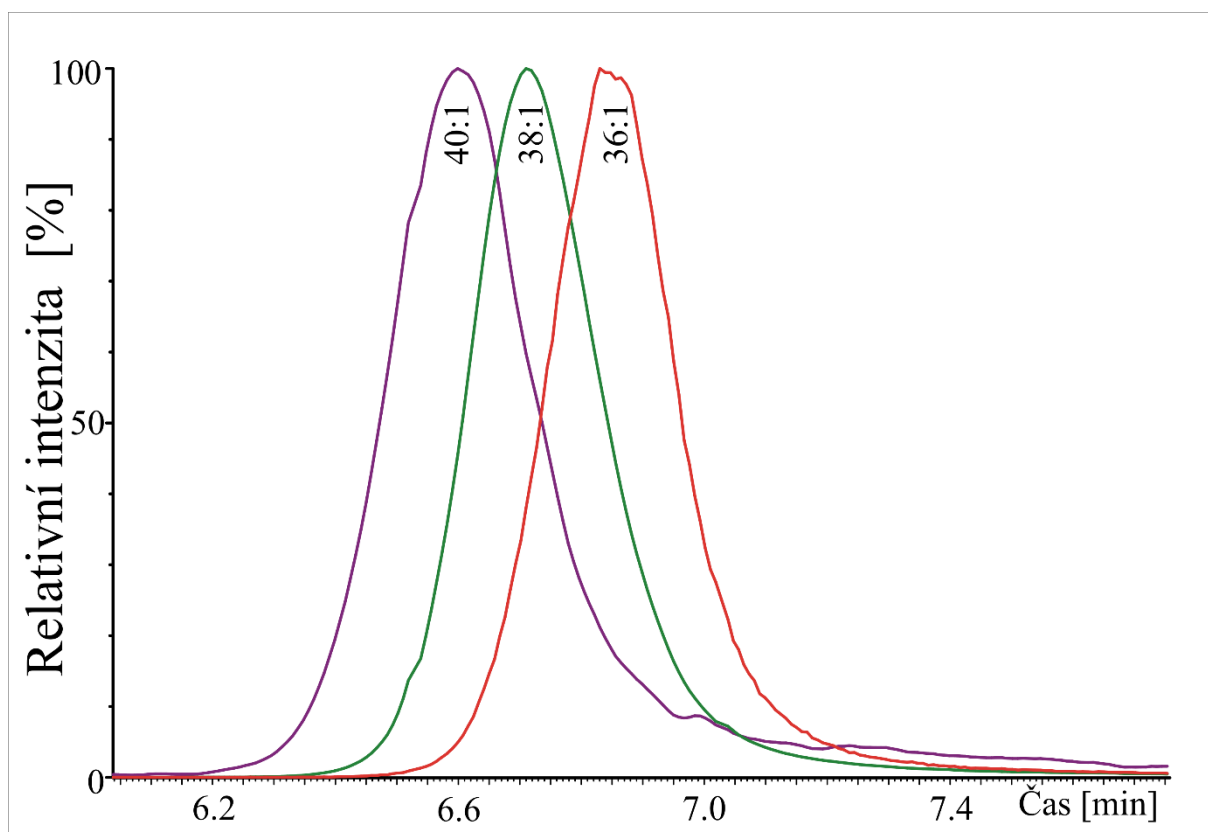
4.1.3 Retenční chování gangliosidů v HILIC módu

Retenční chování lipidů se řídí obvyklými pravidly, které souvisejí s typem polární funkční skupiny, počtem atomů uhlíku a také počtem dvojných vazeb, jak bylo prezentováno v předešlých pracích [68, 86, 89-92]. Popsání retenčního chování lipidů může sloužit pro předpověď jejich retenčního času a může usnadnit identifikaci lipidů ve stanovovaných vzorcích. Tento přístup může být použit pro separaci v reverzních fázích, HILIC a nedávno bylo také popsáno retenční chování lipidů při použití supektrické fluidní chromatografie [79]. Na obrázku 39 je znázorněna závislost redukovaného retenčního času na počtu neutrálních sacharidových jednotek pomocí optimalizované HILIC metody. Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi. Na obrázku 39 jsou znázorněny vybrané série gangliosidů GM3, GM2, GM1a a Fuc-GM1a ve kterých s přibývajícím počtem sacharidových jednotek vzrůstá retenční čas, a to zhruba o 1,5 minuty. Retenční rozdíl mezi GD3 a GD2 je do 3 minut. Vyšší počet sacharidových jednotek zvyšuje retenční čas, a to cca o



Obrázek 39: Závislost redukovaného retenčního času pomocí HILIC/ESI-MS na počtu neutrálních sacharidových jednotek.

1,5-3 min v závislosti na typu sacharidové jednotky. V případě zvyšujícího se počtu NeuAc (sialové kyseliny) můžeme pozorovat stejné retenční chování, kdy NeuAc silně ovlivňuje retenční chování. V případě GM3 a GD3, tedy zvýšení o jednu NeuAc, dochází ke zvýšení retenčního času o 3 minuty. Velmi podobně je na tom porovnání retence GM2 a GD2, kdy dochází ke zvýšení retenčního času o cca 4 minuty. Dále byla pozorována rozdílná retence GD3 (obsahující dvě NeuAc) a GD3-Ac (obsahující NeuAc a NeuAc₂), kdy GD3 má vyšší retenční čas. Gangliosidy se stejným počtem sacharidových jednotek a stejným počtem sialových kyselin obsahující ve své struktuře NeuAc₂ mají nižší retenci. Dále je pozorována nižší retence u gangliosidů, které patří do *a* série v porovnání s *b* sérií. Na základě tohoto retenčního chování a správné *m/z* lze přiřadit do série *a* třídu GQ1a-Ac*, u které nebylo možné naměřit MS/MS spektra z důvodů nízké koncentrace. V HILIC módu lze pozorovat částečnou separaci jednotlivých gangliosidů na základě délky acylového řetězce v ceramidu (Obrázek 40) pomocí rekonstruovaných iontových proudů, což poskytuje další informaci pro určení struktury.



Obrázek 40: Rekonstruované iontové proudy jednotlivých gangliosidů třídy GD1a lišících se v acylovém řetězci.

4.1.4 Analýza biologických vzorků

Optimalizovaná LC/MS metoda byla použita pro analýzu vzorků lidských ledvin, plic, plasmy, erytrocytů a prasečího mozku. Tabulka S 3 obsahuje seznam jednotlivých identifikovaných gangliosidů a ostatních polárních lipidů (PS, PI, LPI, PG a sulfatidů), jejich relativní intenzity (stanovené z RIC jednotlivých lipidů pro danou třídu) a správné m/z jednotlivých lipidů. Gangliosidy jsou identifikované s vysokou spolehlivostí na základě splnění následujících třech kritérií. První kritérium je správná m/z (určení elementárního složení se správností pod 10 ppm u 99% identifikovaných gangliosidů, u 87% identifikovaných gangliosidů pod 5 ppm a průměrná správnost u všech gangliosidů byla 3,1 ppm). Druhým kritériem je fragmentační chování (včetně přesné hmoty m/z v MS/MS spektrech) a posledním kritériem je retenční chování. Přehled identifikovaných tříd lipidů v jednotlivých vzorcích je uveden v tabulce 6. Celkově bylo identifikováno 25 tříd lipidů a 272 jednotlivých lipidů v lidských ledvinách, plicích, plasmě, erytrocytech a prasečím mozku. Nejvyšší počet identifikovaných lipidů byl v prasečím mozku, kde z celkového počtu 189 lipidů bylo identifikováno 38 sulfatidů, 42 fosfolipidů a 109 gangliosidů. V lidských ledvinách bylo identifikováno 51 sulfatidů, 39 fosfolipidů a 32 gangliosidů. V lidských plicích byly identifikovány 3 sulfatidy, 30 fosfolipidů a 34 gangliosidů. V lidských tekutinách byl identifikován nižší počet lipidů než v tkáních. V lidské plasmě byly identifikovány 2 sulfatidy, 13 fosfolipidů a 15 gangliosidů patřících do skupiny GM3. V lidských erytrocytech bylo identifikováno 8 sulfatidů, 19 fosfolipidů a 9 gangliosidů.

Tabulka 6: Přehled identifikovaných tříd lipidů v lidských ledvinách, plicích, plasmě, erythrocytech a prasečím mozku.

Lipidová třída	Retenční čas [min]	Typ vzorku					Celkem
		Prasečí mozek	Lidské ledviny	Lidské plice	Lidská plasma	Lidské erythrocyty	
SulfoHexCer	0,6-1,7	38	26	3	2	4	43
SulfoHex ₂ Cer	0,6-1,7	0	25	0	0	4	25
PG	1-1,5	7	4	5	0	0	9
PI	1-1,5	10	20	13	8	9	20
LPI	1,7-2,4	8	8	4	5	0	10
PS	2,0-2,9	17	7	8	0	10	20
GM3	1,9-2,5	2	16	15	15	4	22
GD3-Ac	2,8-3,8	13	0	2	0	0	14
GM2	3,3-4,1	3	3	2	0	0	6
GD3	4,5-5,7	9	9	13	0	0	17
GD1a-Ac	4,8-5,5	3	0	0	0	0	3
GM1a	4,9-5,8	10	0	0	0	5	11
Fuc-GM1a	6,2-7,2	7	0	0	0	0	7
GD1a	6,3-7,1	7	4	2	0	0	10
GT3-Ac	6,3-7,3	6	0	0	0	0	6
GD0a	7,3-8,3	7	0	0	0	0	7
GD2	7,5-8,4	2	0	0	0	0	2
Fuc-GD1b-Ac	8,3-9,0	3	0	0	0	0	3
GD1b	8,8-9,6	8	0	0	0	0	8
GT1b-Ac	9,2-9,9	4	0	0	0	0	4
GQ1-Ac	9,2-9,9	2	0	0	0	0	2
GT1a	9,3-9,9	4	0	0	0	0	4
Fuc-GD1b	10,3-11,3	5	0	0	0	0	5
GT1b	10,8-12	12	0	0	0	0	12
GQ1b	12,4-13,5	2	0	0	0	0	2
Celkem		189	122	67	30	36	272

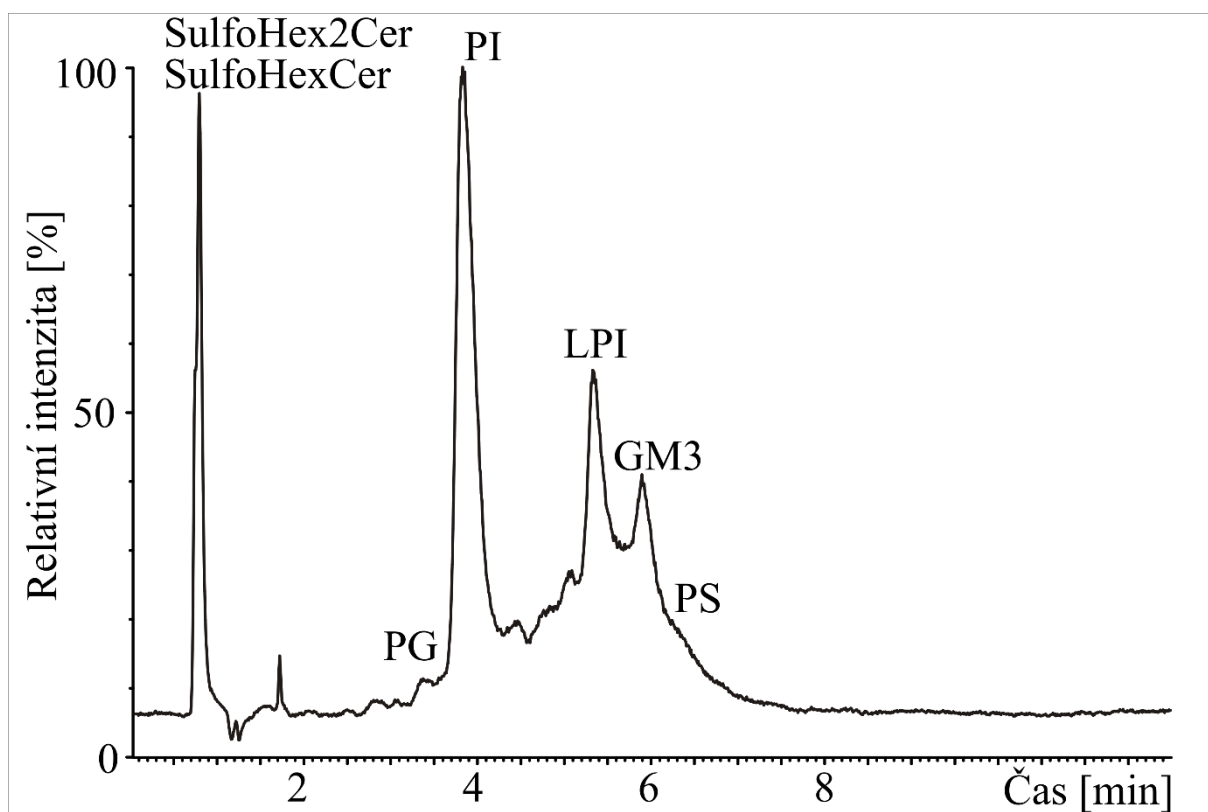
4.2 Kvantitativní analýza lipidů nádorové a sousední zdravé tkáně

Nádorové onemocnění ledvin se v posledních desetiletích stále zvyšuje [93, 94]. Karcinom ledvin (renal cell carcinoma, RCC) se řadí mezi 10 nejčastějších typů rakoviny v průmyslových zemích, což představuje přibližně 2 % ze všech maligních novotvarů [93-95]. RCC pochází z renálního epitelu a odpovídá více než 90% nádorů ledvin [96]. Bylo popsáno více než deset histologických a molekulárních RCC podtypů, z nichž ccRCC (clear cell RCC) představuje většinu úmrtí souvisejících s RCC a s převahou 75 % všech primárních karcinomů ledvin [97]. K určení nejvýznamnějších změn ve složení lipidů mezi nádorovou a okolní zdravou tkání byla provedena HILIC/ESI-MS analýza vzorků získaných od 20 pacientů trpících ccRCC.

Pro kvantitativní analýzu lipidů nádorové a nádorové okolní tkáně byl upraven gradient výše vyvinuté metody, pro dosažení co nejlepšího rozlišení v krátkém čase. Dále byla upravena MS metoda pro kvantitativní analýzu, která probíhala na spektrometru Xevo G2-XS QToF, zatímco výše vyvinutá metoda pro identifikaci probíhala na Synapt G2-Si. K validaci a kvantitativní analýze byly použity 3 interní standardy GM3, SulfoHexCer a PS. Standard GM3 d18:1/12:0 není komerčně dostupný a byl syntetizován na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové [98]. Pro účel validace byla připravena směs interních standardů, která byla přidávána k extraktu směsného vzorku ledvinové tkáně (směs všech použitých vzorků – 20 vzorků nádorové tkáně a 20 vzorků okolní zdravé tkáně). Validační parametry jako je selektivita, přesnost, přenos vzorku, limit detekce, limit kvantifikace a matricový efekt byly určeny podle European Medicines Agency (EMA) [99], matricový efekt byl určen podle Food and Drug Administration (FDA) [100]. Selektivita byla určena pomocí šesti náhodně vybraných extraktů z celého souboru 40 vzorků. Bylo testováno 6 extraktů u kterých byly IS přidány před extrakcí na střední koncentrační hladině (GM3 1,2 $\mu\text{g/mL}$, SulfoHexCer $4,0 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$ a PS 4,0 $\mu\text{g/mL}$) a šest extraktů do kterých nebyly IS přidány. Selektivita se pohybovala kolem 98%. Pro třídu PS byla hodnota 98%, pro GM3 98,7% a pro SulfoHexCer 97,9%. Limit detekce byl počítán jako trojnásobek úrovně šumu ($S/N = 3$) a limit kvantifikace byl počítán jako desetinásobek šumu ($S/N = 10$). Pro kalibraci byl použit soubor devíti kalibračních vzorků, které obsahovaly IS s matricí směsného vzorku. Zásobní roztok obsahoval IS SulfoHexCer:GM3:PS v poměru 0,1:3:9 a zředění jednotlivých kalibračních vzorků bylo 48, 147, 312, 480, 675, 961, 1470, 1923 a 2500 krát. Koeficient determinace (R^2) kalibračních křivek byl 0,9985 pro SulfoHexCer, 0,9977 pro GM3 a 0,9992 pro PS. Extrakční účinnost byla testována pro vysokou (HL) a nízkou (LL) koncentraci. Extrakční účinnost byla testována na

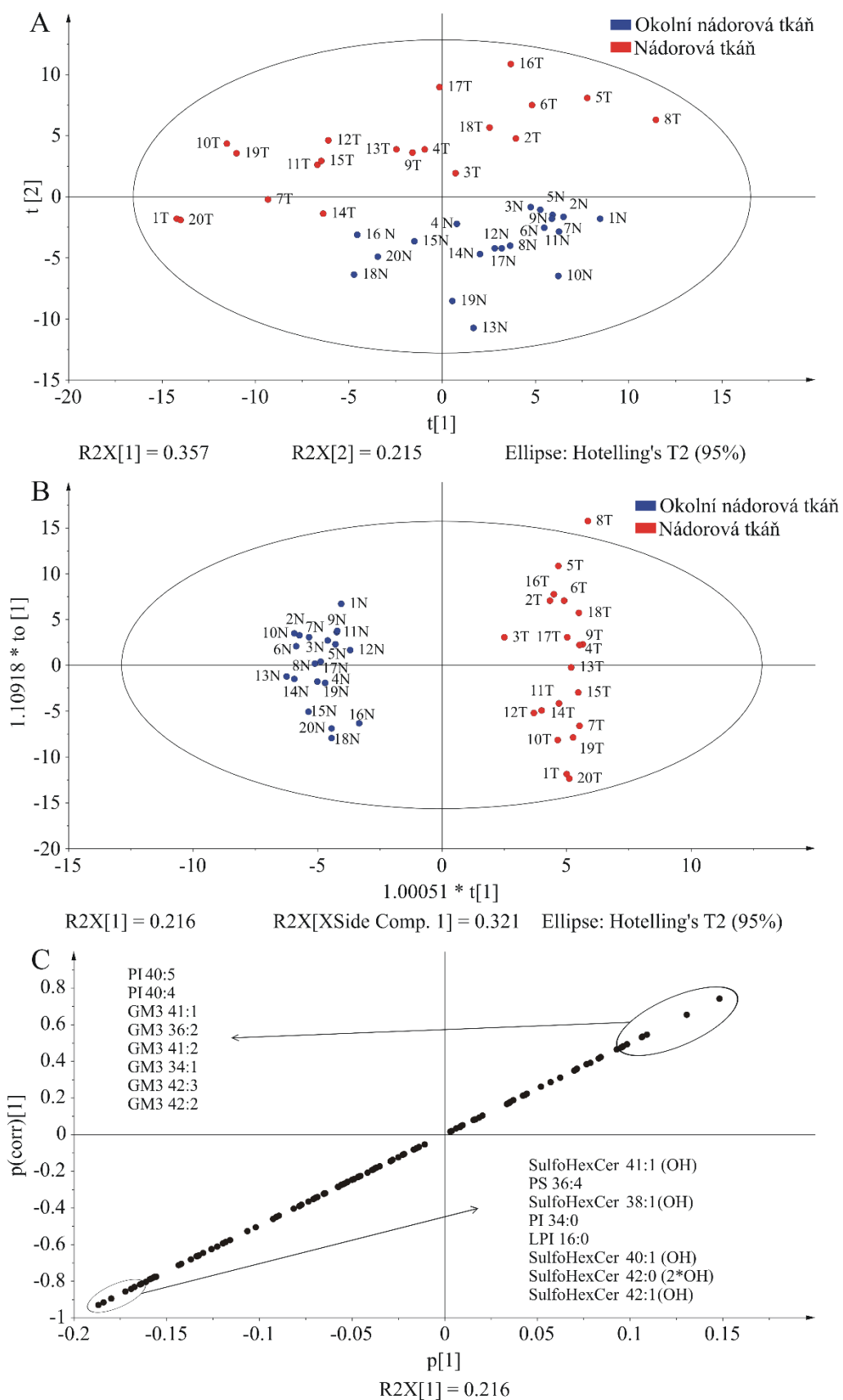
směsném vzorku, ke kterému byly IS přidávány před extrakcí a po extrakci. Zředovací faktor směsi IS pro HL byl 147 (koncentrace GM3 1,5 µg/mL, SulfoHexCer $5,2 \times 10^{-2}$ µg/mL a PS 5,2 µg/mL) a 961 pro LL (koncentrace GM3 0,2 µg/mL, SulfoHexCer $8,0 \times 10^{-3}$ µg/mL a PS 0,8 µg/mL). Extrakční účinnost pro IS PS se pohybovala kolem 50 %, to znamená, že zvolený IS se extrahuje z 50 % do vodné fáze a z 50 % do organické fáze. Na druhé straně extrakční účinnost IS GM3 byla cca 100% a prokazuje selektivní extrakci do vodné fáze. Extrakční účinnost IS SulfoHexCer byla pro LL 55 % a pro HL 70 %. Dalším testovaným parametrem byl přenos vzorku, jehož vyhodnocení probíhalo pro každý IS následujícím způsobem. Nejprve byl měřen IS o koncentraci HL a poté blank (čistá rozpouštědla). Přenos vzorku pro GM3, SulfoHexCer a PS bylo do 3 %. Použitelnost systému byla testována jako reprodukovatelnost šesti analýz při koncentraci LL a HL a výsledky byly vypočteny jako relativní standardní odchylky (RSD %). Matricový efekt byl testován porovnáním IS v matrici a IS v rozpouštědle. Všechny validační parametry jsou znázorněny v tabulce S 4 a 5. Na základě validace bylo možné metodu považovat za vhodnou ke komplexní klinické analýze vzorků ledvin u pacientů s ccRCC.

Detailní informace o vybraných vzorcích obsahuje tabulka S 6. Jelikož se jedná o malou studii 20 vzorků, tak pro nejnižší variabilitu byli vybráni muži. Průměrný věk byl $61,7 \pm 11,5$ roku a průměrný index tělesné hmotnosti (BMI) byl $28,9 \pm 7,5$ kg/m². Celkově bylo identifikováno 115 jednotlivých lipidů z vodného extraktu nádorové a okolní zdravé tkáně ccRCC pacientů. Identifikované lipidy pocházeli ze 7 tříd s následujícím zastoupením: 21 GM3, 28 SulfoHexCer, 26 SulfoHex₂Cer, 10 PG, 19 PI, 4 LPI a 7 PS. Jednotlivé lipidy byly identifikovány na základě retenčních časů v HILIC módu (Obrázek 41) a správné *m/z* [M-H]⁺ iontů. Kvantitativní analýza SulfoHexCer, SulfoHex₂Cer, GM3 a PS probíhala na základě normalizování intenzity koelujícího IS příslušné třídy. Ostatní glycerofosfolipidy (PI, LPI a PG) byly kvantifikovány pomocí PS 14:0/14:0, který eluoval v jiném retenčním čase než zmíněné glycerofosfolipidy. Data jsou prezentována jako semikvantitativní a poskytují důležité informace o dysregulaci lipidů vlivem onemocnění. Koncentrace všech identifikovaných lipidů v nádorové a okolní zdravé tkáni ledvin byly vyhodnoceny pomocí vícerozměrné statistické analýzy (MDA) s použitím softwaru SIMCA. Nejprve byla použita nesupervizovaná analýza hlavních komponent (PCA) (Obrázek 42 A), čímž došlo k rozlišení nádorové tkáně (červené body) a okolní zdravé tkáně (modré body). Dále byla data procesována pomocí supervizované metody tzv. ortogonální projekce na latentní struktury diskriminační analýzy (OPLS-DA) (Obrázek 42 B), což ukázalo výborné rozdělení obou skupin. Z OPLS-DA metody byl vytvořen



Obrázek 41: HILIC/ESI-MS analýza extraktu nádorové a sousední zdravé tkáně ledvin. Podmínky analýzy: Ascentis Si kolona (150x2,1; 3 μ m, Sigma-Aldrich), průtok 0,3 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradient mobilní fáze 0 min: 95 % A + 5% B; 10 min: 78 % A + 22 % B, kde A je acetonitril s kyselinou octovou a B je 10 mmol/L vodný octan amonný s kyselinou octovou.

S-plot (Obrázek 42 C), který zobrazuje významně zvýšené a snížené koncentrace lipidů. Pomocí S-plotu jsme získali informaci o lipidech se zvýšenou koncentrací (Obrázek 42 C vpravo nahoře) a se sníženou koncentrací (Obrázek 42 C vlevo dole) v tumoru. Koncentračně zvýšené lipidy byly: PI 40:5, PI 40:4, GM3 41:1, GM3 36:2, GM3 41:2, GM3 42:3, GM3 34:1 a GM3 42:2, zatímco snížené byly: SulfoHexCer 41:1 (OH), PS 36:4, SulfoHexCer 38:1 (OH), PI 34:0, LPI 16:0, SulfoHexCer 40:1, SulfoHexCer 42:0 (2*OH), SulfoHexCer 42:1 (OH). U vybraných lipidů (15 lipidů, které byly koncentračně nejvíce zvýšené a 15 lipidů, které byly koncentračně nejvíce snížené) byly vypočteny tyto parametry: fold change, T hodnota, p hodnota, které nám určují významnost lipidů na klastrování (Tabulka S 7).



Obrázek 42: Vícerozměrná statistická analýza kvantifikovaných lipidů v ccRCC vzorcích pomocí (A) PCA metody, (B) OPLS-DA metody a (C) S-plotu.

5 Závěr

V této práci byla vypracována HILIC/ESI-MS/MS metoda pro charakterizaci gangliosidů v biologických vzorcích s důrazem na maximální počet identifikovaných lipidů. Pro finální metodiku byla použita kolona se silikagelovou stacionární fází, povrchově porézními částicemi a gradient acetonitril/vodný octan amonný. Identifikace gangliosidů a dalších lipidů byla založena na měření hmotnostních MS a MS/MS spekter s vysokým rozlišením a správnou m/z . Jednotlivé struktury byly v korelaci s retenčním chováním tříd gangliosidů, ale také ve shodě jednotlivých lipidů uvnitř tříd. Kombinace přesné m/z prekurzorů, fragmentových iontů a retenčního času poskytla identifikaci gangliosidů s vysokou jistotou. Vyvinutá HILIC/ESI-MS/MS metoda byla použita pro analýzu lidských ledvin, plic, plasmy, erytrocytů a prasečího mozku. Nejvíce jednotlivých gangliosidů bylo identifikováno v prasečím mozku. Celkově HILIC separace umožnila identifikovat 145 jednotlivých gangliosidů z 19 tříd a dalších 6 tříd polárních lipidů (SulfoHexCer, SulfoHex₂Cer, PG, PI, LPI a PS).

Výše vyvinutá metoda byla v další fázi upravena pro kvantitativní analýzu gangliosidů, sulfatidů a polárních fosfolipidů v extraktech ledvin v rámci klinické studie. Metoda byla plně validována v souladu s doporučeními FDA a EMA. Metoda byla použita pro analýzu nádorové a okolní zdravé tkáně ledvin v rámci studie 20 pacientů trpících ccRCC. Ve všech vzorcích bylo celkově identifikováno a kvantifikováno 115 jednotlivých lipidů ze sedmi tříd (GM3, SulfoHexCer, SulfoHex₂Cer, PG, PI, LPI a PS). Pomocí MDA byla naměřená data statisticky zpracována. Použitím PCA metody došlo k rozlišení nádorové a sousední zdravé tkáně. Za použití S-plotu a OPLS-DA byly určeny nejvýznamnější lipidy, u kterých byly dále vypočítány p a T hodnoty. Lipidy ve třídě GM3 byly koncentračně silně zvýšené v nádorových tkáních. Na druhé straně byly některé sulfatidy, konkrétně s 36-42 uhlíky, 0-1 dvojnou vazbou a 1-2 další hydroxylovou skupinou koncentračně silně sniženy.

6 Seznam použité literatury

- [1] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, A comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research*, 46 (2005) 839-862.
- [2] J. Churáček, *Analytická separace látek*, SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha (1990).
- [3] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I a II*, Praha, (2013).
- [4] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 68 (2006) 908-918.
- [5] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta*, 656 (2009) 8-35.
- [6] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of separation science*, 29 (2006) 1836-1848.
- [7] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons (2007).
- [8] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*, 499 (1990) 177-196.
- [9] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review, *Analytica Chimica Acta*, 692 (2011) 1-25.
- [10] M. Holčapek, *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*, Univerzita Pardubice, (2001).
- [11] D. Friedecký, K. Lemr, Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klin. Biochem. Metab*, 20 (2012) 152-157.
- [12] R. Norková, J. Jaklová, Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí *Chem. Listy*, 107 (2013) 949-955.
- [13] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 17 (1998) 337-366.
- [14] C. Laphorn, F. Pullen, B.Z. Chowdhry, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions, *Mass spectrometry reviews*, 32 (2013) 43-71.
- [15] W.W. Christie, <http://lipidlibrary.aocs.org/>, Staženo 2.3.2018.
- [16] T. Řezanka, I. Kolouchová, L. Gharwalová, A. Palyzová, K. Sigler, Lipidomic Analysis: From Archaea to Mammals, *Lipids*, 53 (2018) 5-25.
- [17] R.K. Murray, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, V.W. Rodwell, P.A. Weil, *Harperova ilustrovaná biochemie*, Galén,, Praha (2009).

- [18] E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions, *Biomedical Papers*, 155 (2011) 117-130.
- [19] B.G. Nordestgaard, M.J. Chapman, K. Ray, J. Borén, F. Andreotti, G.F. Watts, H. Ginsberg, P. Amarenco, A. Catapano, O.S. Descamps, Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: current status, *European heart journal*, 31 (2010) 2844-2853.
- [20] P.T. Dinesen, T.A. Rix, A.M. Joensen, A. Tjønneland, S. Lundbye-Christensen, K. Overvad, E.B. Schmidt, Adipose tissue content of saturated fatty acids and atrial fibrillation: A case-cohort study, *European journal of clinical investigation*, 47 (2017) e12836.
- [21] M.Z. Grofová, Mastné kyseliny, *Medicína pro praxi*, 7 (2010) 388-390.
- [22] A.Y. Taha, W.M. Burnham, S. Auvin, Polyunsaturated fatty acids and epilepsy, *Epilepsia*, 51 (2010) 1348-1358.
- [23] I. Lauritzen, N. Blondeau, C. Heurteaux, C. Widmann, G. Romey, M. Lazdunski, Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors, *The EMBO journal*, 19 (2000) 1784-1793.
- [24] P. Zhang, K. Reue, Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859 (2017) 1583-1595.
- [25] C.-L.E. Yen, S.J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, R.V. Farese, Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis, *Journal of Lipid Research*, 49 (2008) 2283-2301.
- [26] I. Graham, D. Atar, K. Borch-Johnsen, G. Boysen, G. Burell, R. Cifkova, J. Dallongeville, G. De Backer, S. Ebrahim, B. Gjelsvik, European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts), *European heart journal*, 28 (2007) 2375-2414.
- [27] F.D. Gunstone, J.L. Harwood, A.J. Dijkstra, *The lipid handbook with CD-ROM*, CRC Press, 2007.
- [28] C.R. Santos, A. Schulze, Lipid metabolism in cancer, *Febs Journal*, 279 (2012) 2610-2623.
- [29] C.C. Akoh, D.B. Min, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, CRC Press, 2008.
- [30] G. Van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature reviews Molecular cell biology*, 9 (2008) 112.
- [31] A.A. Farooqui, L.A. Horrocks, T. Farooqui, Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders, *Chemistry and Physics of Lipids*, 106 (2000) 1-29.
- [32] S.T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C.A. Haynes, M.C. Sullards, D.C. Liotta, A.H. Merrill, Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols, *Journal of Lipid Research*, 49 (2008) 1621-1639.
- [33] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 25847-25850.

- [34] R. Hájek, R. Jirásko, M. Lída, E. Cífková, M. Holčapek, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Characterization of Gangliosides in Biological Samples, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 12425-12432.
- [35] X. Chen, A. Varki, Advances in the biology and chemistry of sialic acids, *ACS chemical biology*, 5 (2010) 163-176.
- [36] M. Scherer, G. Schmitz, G. Liebisch, High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid in plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Clinical chemistry*, 55 (2009) 1218-1222.
- [37] R.L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration, *Physiological Reviews*, 94 (2014) 461-518.
- [38] L. Svennerholm, CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF HUMAN BRAIN GANGLIOSIDES, *Journal of neurochemistry*, 10 (1963) 613-623.
- [39] M. Chester, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997, *European journal of biochemistry*, 257 (1998) 293.
- [40] H. Farwanah, T. Kolter, Lipidomics of glycosphingolipids, *Metabolites*, 2 (2012) 134-164.
- [41] R. Lacomba, J. Salcedo, A. Alegría, M.J. Lagarda, R. Barberá, E. Matencio, Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51 (2010) 346-357.
- [42] T. Valdes-Gonzalez, N. Goto-Inoue, W. Hirano, H. Ishiyama, T. Hayasaka, M. Setou, T. Taki, New approach for glyco- and lipidomics–Molecular scanning of human brain gangliosides by TLC-Blot and MALDI-QIT-TOF MS, *Journal of neurochemistry*, 116 (2011) 678-683.
- [43] F. Giuffrida, I.M. Elmelegy, S.K. Thakkar, C. Marnett, F. Destaillets, Longitudinal evolution of the concentration of gangliosides GM3 and GD3 in human milk, *Lipids*, 49 (2014) 997-1004.
- [44] T. Kaneko, Y. Tsubakihara, H. Fushimi, S. Yamaguchi, Y. Takabatake, H. Rakugi, H. Kawakami, Y. Isaka, Histochemical and immunoelectron microscopic analysis of ganglioside GM3 in human kidney, *Clinical and experimental nephrology*, 19 (2015) 403-410.
- [45] M. Fuller, S. Duplock, L.K. Hein, B.A. Rigat, D.J. Mahuran, Liquid chromatography/electrospray ionisation–tandem mass spectrometry quantification of GM2 gangliosides in human peripheral cells and plasma, *Analytical biochemistry*, 458 (2014) 20-26.
- [46] L. Ma, A.K. MacGibbon, H.J.B.J. Mohamed, S. Loy, A. Rowan, P. McJarrow, B.Y. Fong, Determination of ganglioside concentrations in breast milk and serum from Malaysian mothers using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry-multiple reaction monitoring method, *International Dairy Journal*, 49 (2015) 62-71.
- [47] A.D. Garcia, J.L. Chavez, Y. Mechref, Rapid and sensitive LC-ESI-MS of gangliosides, *Journal of Chromatography B*, 947 (2014) 1-7.
- [48] S. Fougeray, J. Fleurence, S. Faraj, M. Bahri, D. Cochonneau, M. Terme, M.-D. Leclair, E. Thébaud, F. Paris, S. Birklé, O-acetylated gangliosides: Structure, biosynthesis, immunogenicity, functions and their potential for cancer immunotherapy, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 4 (2016) 21-30.

- [49] L. Svennerholm, G. Bråne, I. Karlsson, A. Lekman, I. Ramström, C. Wikkelsö, Alzheimer disease—effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 14 (2002) 128-136.
- [50] D. Bach, E. Wachtel, Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610 (2003) 187-197.
- [51] J.L. Goldstein, R.A. DeBose-Boyd, M.S. Brown, Protein sensors for membrane sterols, *Cell*, 124 (2006) 35-46.
- [52] K. Walinska, Comparison of the influence of the polyprenol structure on model membranes, *Desalination*, 163 (2004) 239-245.
- [53] G. Yan, L. Li, B. Zhu, Y. Li, Lipidome in colorectal cancer, *Oncotarget*, 7 (2016) 33429.
- [54] M. Bou Khalil, W. Hou, H. Zhou, F. Elisma, L.A. Swayne, A.P. Blanchard, Z. Yao, S.A. Bennett, D. Figeys, Lipidomics era: accomplishments and challenges, *Mass spectrometry reviews*, 29 (2010) 877-929.
- [55] J. Folch, M. Lees, G. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem*, 226 (1957) 497-509.
- [56] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics, *Journal of Lipid Research*, 49 (2008) 1137-1146.
- [57] B.L. Peterson, B.S. Cummings, A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples, *Biomedical Chromatography*, 20 (2006) 227-243.
- [58] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem*, 226 (1957) 497-509.
- [59] E.G. Blish, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (1959) 911-917.
- [60] K. Ikeda, R. Taguchi, Highly sensitive localization analysis of gangliosides and sulfatides including structural isomers in mouse cerebellum sections by combination of laser microdissection and hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with theoretically expanded multiple reaction monitoring, *Rapid communications in mass spectrometry*, 24 (2010) 2957-2965.
- [61] O. Berdeaux, P. Juaneda, L. Martine, S. Cabaret, L. Bretillon, N. Acar, Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7738-7748.
- [62] R. Käkälä, P. Somerharju, J. Tyynelä, Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of neurochemistry*, 84 (2003) 1051-1065.
- [63] A. Cascone, S. Eerola, A. Ritieni, A. Rizzo, Development of analytical procedures to study changes in the composition of meat phospholipids caused by induced oxidation, *Journal of Chromatography A*, 1120 (2006) 211-220.
- [64] W. Byrdwell, W.E. Neff, Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of

triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16 (2002) 300-319.

[65] L.M. Rodríguez-Alcalá, J. Fontecha, Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3063-3066.

[66] L.-Q. Pang, Q.-L. Liang, Y.-M. Wang, L. Ping, G.-A. Luo, Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy, *Journal of Chromatography B*, 869 (2008) 118-125.

[67] C. Zhu, A. Dane, G. Spijksma, M. Wang, J. van der Greef, G. Luo, T. Hankemeier, R.J. Vreeken, An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column, *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012) 26-34.

[68] E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, Nontargeted Lipidomic Characterization of Porcine Organs Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Off-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Lipids*, 48 (2013) 915-928.

[69] E.J. Ahn, H. Kim, B.C. Chung, G. Kong, M.H. Moon, Quantitative profiling of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in a steatosis/fibrosis model of rat liver by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1194 (2008) 96-102.

[70] D.Y. Bang, M.H. Moon, On-line two-dimensional capillary strong anion exchange/reversed phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry for comprehensive lipid analysis, *Journal of Chromatography A*, 1310 (2013) 82-90.

[71] Y. Sato, T. Nakamura, K. Aoshima, Y. Oda, Quantitative and wide-ranging profiling of phospholipids in human plasma by two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 9858-9864.

[72] K. Retra, O.B. Bleijerveld, R.A. van Gestel, A.G. Tielens, J.J. van Hellemond, J.F. Brouwers, A simple and universal method for the separation and identification of phospholipid molecular species, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (2008) 1853-1862.

[73] K. Ikeda, T. Shimizu, R. Taguchi, Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring, *Journal of lipid research*, 49 (2008) 2678-2689.

[74] B. Fong, C. Norris, E. Lowe, P. McJarrow, Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Gangliosides, *Lipids*, 44 (2009) 867-874.

[75] L.K. Sørensen, A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae, *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 20 (2006) 3625-3633.

[76] M. Lísa, K. Netušilová, L. Franěk, H. Dvořáková, V. Vrkoslav, M. Holčapek, Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7499-7510.

- [77] R.O. Adlof, A. Menzel, V. Dorovska-Taran, Analysis of conjugated linoleic acid-enriched triacylglycerol mixtures by isocratic silver-ion high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 953 (2002) 293-297.
- [78] S.M. Momchilova, B.M. Nikolova-Damyanova, Advances in Silver Ion Chromatography for the Analysis of Fatty Acids and Triacylglycerols—2001 to 2011, *Analytical Sciences*, 28 (2012) 837-844.
- [79] M. Lísa, M. Holčapek, High-throughput and comprehensive lipidomic analysis using ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography–mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 7187-7195.
- [80] T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, K. Hirata, Y. Nakazawa, A. Kobayashi, E. Fukusaki, High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics, *Journal of bioscience and bioengineering*, 105 (2008) 460-469.
- [81] M. Lísa, M. Holčapek, T. Řezanka, N. Kabátová, High-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography–flame ionization detection characterization of $\Delta 5$ -polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils, *Journal of Chromatography A*, 1146 (2007) 67-77.
- [82] B. Fuchs, J. Schiller, Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (2009) 83-98.
- [83] G.M. Kirwan, E. Johansson, R. Kleemann, E.R. Verheij, Å.M. Wheelock, S. Goto, J. Trygg, C.E. Wheelock, Building multivariate systems biology models, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 7064-7071.
- [84] E. Cífková, M. Lísa, R. Hrstka, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, M. Holčapek, Correlation of lipidomic composition of cell lines and tissues of breast cancer patients using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and multivariate data analysis, *Rapid communications in mass spectrometry*, 31 (2017) 253-263.
- [85] E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, D. Vrána, B. Melichar, V. Študent, Lipidomic differentiation between human kidney tumors and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis, *Journal of Chromatography B*, 1000 (2015) 14-21.
- [86] E. Cífková, R. Hájek, M. Lísa, M. Holčapek, Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry of (lyso) phosphatidic acids, (lyso) phosphatidylserines and other lipid classes, *Journal of Chromatography A*, 1439 (2016) 65-73.
- [87] B. Domon, C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate journal*, 5 (1988) 397-409.
- [88] R. Jirásko, M. Holčapek, M. Khalikova, D. Vrána, V. Študent, Z. Prouzová, B. Melichar, MALDI Orbitrap Mass Spectrometry Profiling of Dysregulated Sulfoglycosphingolipids in Renal Cell Carcinoma Tissues, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28 (2017) 1562-1574.
- [89] E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, M.n. Ovčačíková, A.n. Lyčka, F.d.r. Lynen, P. Sandra, Nontargeted quantitation of lipid classes using hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry with single internal standard and response factor approach, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 10064-10070.

- [90] T. Hu, Z. Jia, J.-L. Zhang, Strategy for Comprehensive Profiling and Identification of Acidic Glycosphingolipids Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 7808-7816.
- [91] M. Ovčáčíková, M. Lísa, E. Cífková, M. Holčapek, Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1450 (2016) 76-85.
- [92] A. Fauland, H. Köfeler, M. Trötz Müller, A. Knopf, J. Hartler, A. Eberl, C. Chitraju, E. Lankmayr, F. Spener, A comprehensive method for lipid profiling by liquid chromatography-ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Journal of lipid research*, (2011) jlr. D016550.
- [93] J.E. Lee, D. Spiegelman, D.J. Hunter, D. Albanes, L. Bernstein, P.A. Van Den Brandt, J.E. Buring, E. Cho, D.R. English, J.L. Freudenheim, Fat, protein, and meat consumption and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100 (2008) 1695-1706.
- [94] P. Li, A. Znaor, I. Holcatova, E. Fabianova, D. Mates, M.B. Wozniak, J. Ferlay, G. Scelo, Regional geographic variations in kidney cancer incidence rates in European countries, *European urology*, 67 (2015) 1134-1141.
- [95] R. Bellocco, E. Pasquali, M. Rota, V. Bagnardi, I. Tramacere, L. Scotti, C. Pelucchi, P. Boffetta, G. Corrao, C. La Vecchia, Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis, *Annals of oncology*, 23 (2012) 2235-2244.
- [96] J.J. Hsieh, M.P. Purdue, S. Signoretti, C. Swanton, L. Albiges, M. Schmidinger, D.Y. Heng, J. Larkin, V. Ficarra, Renal cell carcinoma, *Nature reviews Disease primers*, 3 (2017) 17009.
- [97] N. Petejova, A. Martinek, Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors, *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 160 (2016).
- [98] R. Hájek, M. Lísa, M. Khalikova, R. Jirásko, E. Cífková, V. Študent, D. Vrána, L. Opálka, K. Vávrová, M. Matzenauer, HILIC/ESI-MS determination of gangliosides and other polar lipid classes in renal cell carcinoma and surrounding normal tissues, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410 (2018) 6585-6594.
- [99] C.f.M.P.f.H. Use, Guideline on bioanalytical method validation, *European Medicines Agency*, (2011).
- [100] U. DHHS, C. FDA, Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV), 2015 (2001).

Seznam publikovaných prací

1. PUBLIKACE V MEZINÁRODNÍCH ČASOPISECH

1/ E. Cífková, R. Hájek, M. Lísa, M. Holčapek, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Mass Spectrometry of (Lyso)Phosphatidic acids, (Lyso)Phosphatidylserines and Other Lipid Classes, *J. Chromatogr. A* 1439 (2016) 65-73.

Roman Hájek vyvinul metodu a aplikoval ji na biologické vzorky. Vypočítal chromatografické parametry a identifikoval jednotlivé lipidy. Připravil tabulky a obrázky pro psaní publikace.

2/ R. Hájek, R. Jirásko, M. Lísa, E. Cífková, M. Holčapek, Identification of Gangliosides in Biological Samples Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12425–12432.

Roman Hájek vyvinul metodu pro stanovení gangliosidů a aplikoval ji na biologické vzorky. Popsal retenční a fragmentační chování gangliosidů. Připravil grafické části a napsal článek.

3/ R. Hájek, M. Lísa, M. Khalikova, R. Jirásko, E. Cífková, V. Študent, D. Vrána, M. Matzenauer, L. Opálka, K. Vávrová, B. Melichar, M. Holčapek, HILIC/ESI-MS determination of gangliosides and other polar lipid classes in renal cell carcinoma and surrounding normal tissues, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6585-6594.

Roman Hájek vyvinul metodu a provedl validaci metody pro kvantifikaci gangliosidů a ostatních polárních lipidů nádorové a okolní zdravé tkáně u pacientů trpících karcinomem ledvin. Připravil grafické části a napsal článek.

4/ O. Peterka, R. Jirásko, M. Chocholoušková, D. Wolrab, R. Hájek, L. Kuchař, D. Vrána, M. Matzenauer, B. Melichar, M. Holčapek, Lipidomic comparison of exosomes and plasma by various mass spectrometry methods for kidney cancer patients and control healthy, v přípravě pro zaslání k publikaci.

Roman Hájek působil jako konzultant.

2. PŘEDNÁŠKY PREZENTOVANÉ NA MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

1/ M. Holčapek, M. Lída, E. Cífková, R. Jirásko, M. Khalikova, R. Hájek, R. Berkécz, B. Melichar, D. Vrána, Mass Spectrometry Based Methods in Lipid Cancer Biomarker Research, 6th Conference of the Brazilian Mass Spectrometry Society, Rio de Janeiro, Brazil, 10. - 14. 12. 2016.

2/ M. Holčapek, M. Khalikova, M. Lída, R. Jirásko, E. Cífková, R. Berkécz, R. Hájek, Dysregulated Lipids in Kidney Cancer Determined by UHPSFC/MS, UHPLC/MS and MALDI-MS, 11th Balaton Symposium, Hungary, 6. - 8.9.2017.

3/ M. Holčapek, M. Khalikova, M. Lída, R. Jirásko, E. Cífková, D. Wolrab, R. Hájek, M. Chocholoušková, D. Vrána, B. Melichar, Lipidomic Analysis in the Cancer Biomarker Research, HPLC 2017 Jeju, Korea, 5. - 9.11.2017.

3. POSTERY PREZENTOVANÉ NA MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

1/ R. Hájek, R. Jirásko, M. Lída, E. Cífková, M. Holčapek, HILIC-HPLC/ESI-MS Analysis of Acidic Glycosphingolipids in Animal and Human Tissues, HPLC 2016 San Francisco, USA, 19. - 24. 6. 2016.

2/ E. Cífková, R. Hájek, M. Lída, M. Holčapek, HILIC/ESI-MS separation of acidic and other lipid classes using hydride column, HPLC 2016 San Francisco, USA, 19. - 24. 6. 2016.

3/ R. Hájek, R. Jirásko, M. Lída, E. Cífková, M. Holčapek, HILIC-HPLC/ESI-MS analysis of gangliosides in biological samples, 31th International Symposium on Chromatography, Cork, Ireland, 28. 8. - 1. 9. 2016.

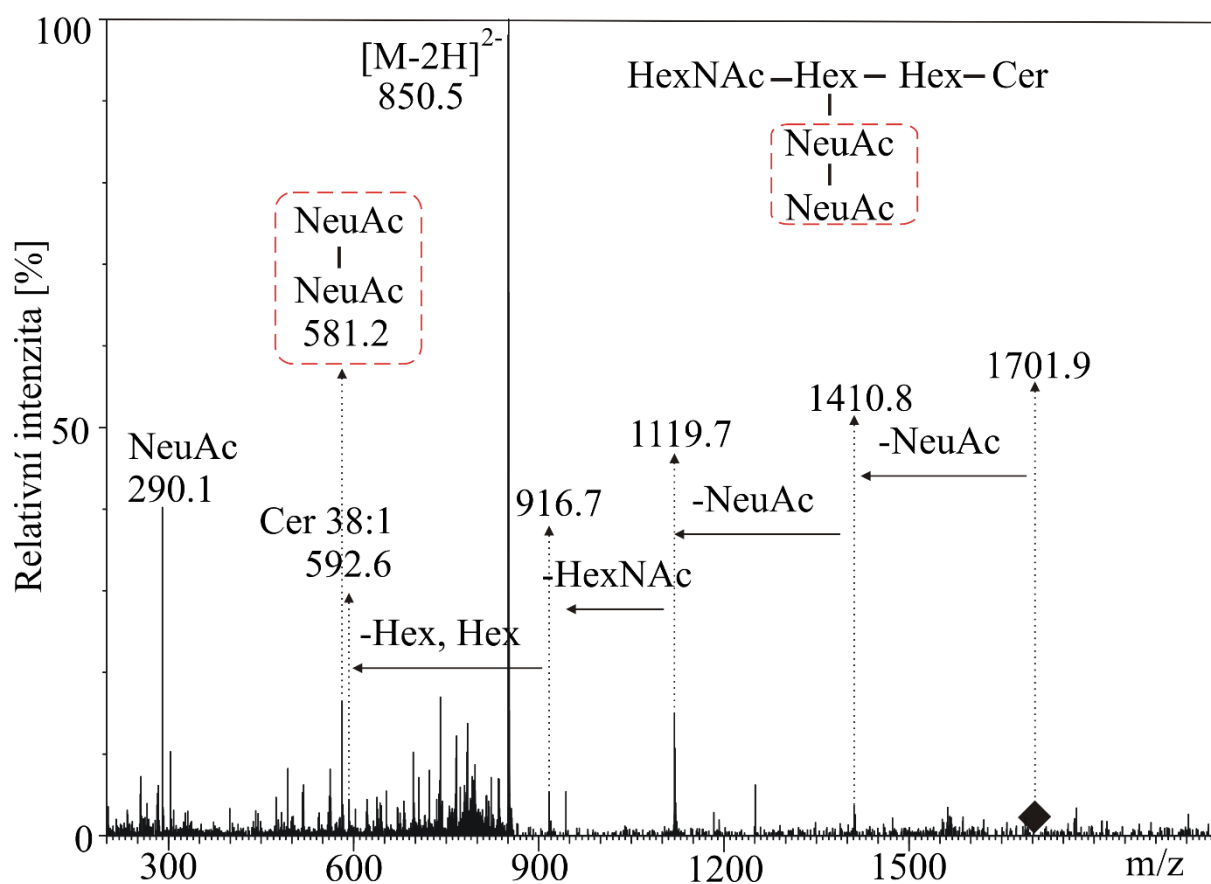
4/ R. Hájek, R. Jirásko, M. Lída, E. Cífková, M. Holčapek, HILIC-HPLC/ESI-MS analysis of gangliosides in biological samples, HPLC 2017 Prague, Czech Republic, 18. - 22.6. 2017.

4. POSTERY PREZENTOVANÉ NA NÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

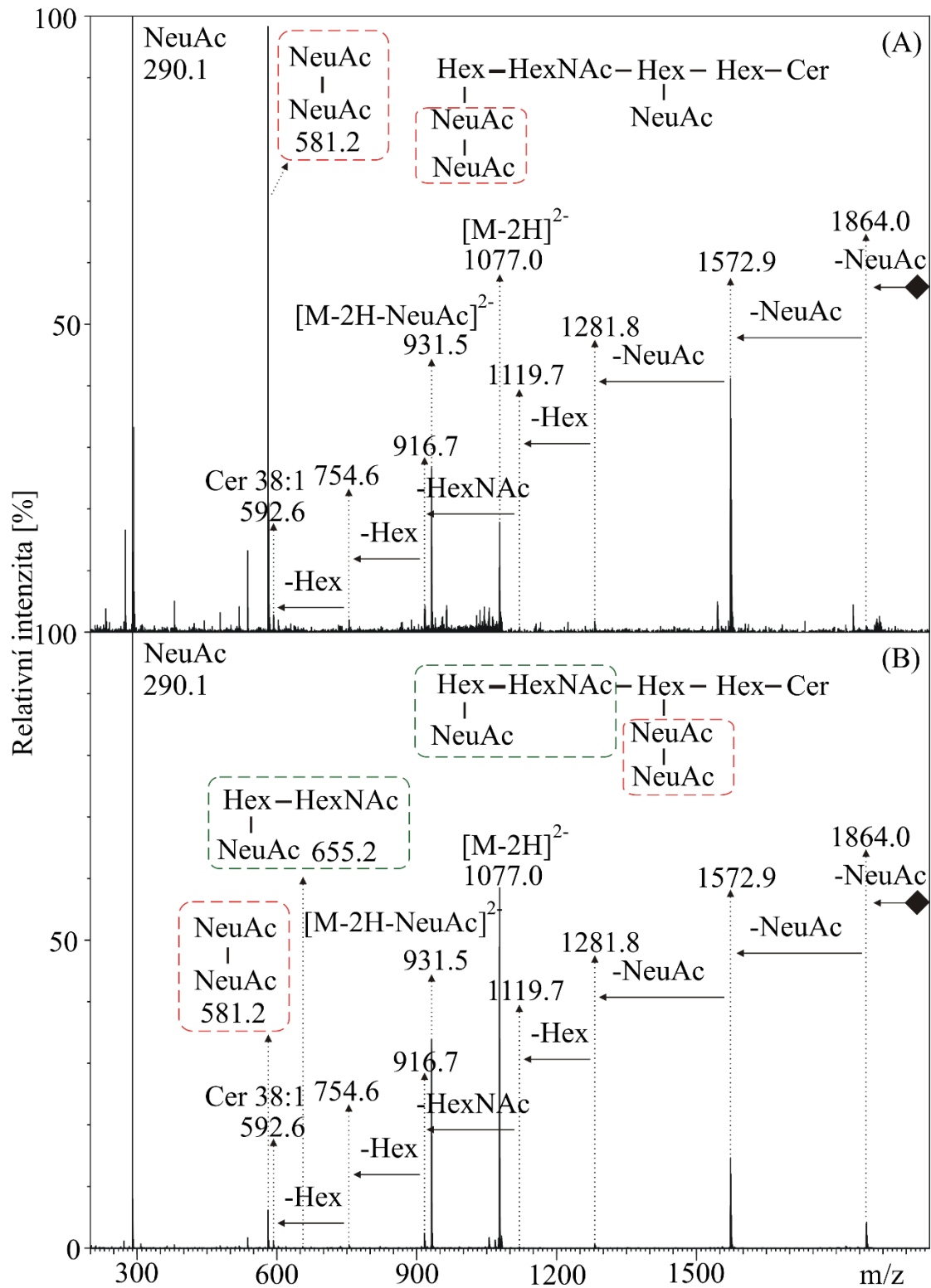
1/ R. Hájek, R. Jirásko, M. Lísa, E. Cífková, M. Holčapek, HILIC-HPLC/ESI-MS Analysis of Gangliosides in Biological Samples, 5. Česká lipidomická konference, Praha, 21. - 22. 4. 2016.

2/ R. Hájek, M. Lísa, M. Khalikova, R. Jirásko, E. Cífková, V. Študent, D. Vrána, L. Opálka, K. Vávrová, B. Melichar, M. Holčapek, Determination of Gangliosides and Other Polar Lipids Between Kidney Tumor and Surrounding Normal Tissues Using HILIC/ESI-MS. 6. Česká lipidomická konference, Praha, 14. - 15. 6. 2018.

Přílohy



Obrázek S 1: MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GD2 38:1 ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 850,5$).



Obrázek S 2 MS/MS spektrum při záznamu záporných iontů GT1a 38:1 (A) a GT1b 38:1 (B) ($[M-2H]^{2-}$ $m/z = 1077,0$).

Tabulka S 1: Porovnání asymetrie (tailing faktor) versus pH mravenčanu amonného (10 mmol/L AmFM) a pH octanu amonného (10 mmol/L AmAc) pro tyto individuální zástupce tříd gangliosidů GM1a 36:1 (RIC [M-H]⁻ m/z 1544,9), Fuc-GM1a 36:1 (RIC [M-H]⁻ m/z 1690,9), GD1a 36:1 (RIC [M-H]²⁻ m/z 917,5), GD1b 36:1 (RIC [M-H]²⁻ m/z 917,5) a GT1a 38:1 (RIC [M-H]²⁻ m/z 1077,0).

pH	10 mmol/L mravenčan amonný					10 mmol/L octan amonný				
	3,0	4,0	5,0	5,4	5,8	3,0	4,0	5,0	6,1	6,5
GM1a	1,07	1,06	1,17	1,24	1,21	1,36	1,19	1,27	1,27	1,21
FucGM1	0,95	1,02	1,25	1,43	1,69	1,22	0,97	1,31	1,21	1,38
GD1a	2,64*	1,28	1,17	1,15	1,14	1,21	1,39	1,17	1,34	1,36
GD1b	2,64*	1,57	1,57	1,24	1,02	1,65	1,43	1,35	1,28	1,05
GT1a	0,88	1,25	1,11	1,23	1,02	2,92	1,27	1,21	1,08	1,05

*GD1a a GD1b nejsou separovány při pH 3

Tabulka S 2 Porovnání šířky píku v polovině jeho maxima ($w_{0,5}$) [min] versus pH mravenčanu amonného a pH octanu amonného pro tyto individuální zástupce tříd gangliosidů GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ m/z 1544,9), Fuc-GM1a 36:1 (RIC $[M-H]^-$ m/z 1690,9), GD1a 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z 917,5), GD1b 36:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z 917,5) a GT1a 38:1 (RIC $[M-H]^{2-}$ m/z 1077,0).

pH	10 mmol/L mravenčan amonný					10 mmol/L octan amonný				
	3,0	4,0	5,0	5,4	5,8	3,0	4,0	5,0	6,1	6,5
GM1	0,28	0,23	0,25	0,28	0,28	0,31	0,27	0,42	0,36	0,46
FucGM1	0,28	0,25	0,29	0,25	0,30	0,39	0,29	0,27	0,43	0,39
GD1a	0,62*	0,31	0,29	0,30	0,28	0,50	0,36	0,32	0,42	0,42
GD1b	0,62*	0,34	0,36	0,31	0,28	0,36	0,37	0,31	0,42	0,33
GT	0,22	0,37	0,34	0,30	0,32	0,70	0,39	0,34	0,36	0,28

*GD1a a GD1b nejsou separovány při pH 3

Tabulka S 3: Seznam identifikovaných lipidů v lidských ledvinách, plicích, plasmě, erytrocytech a prasečím mozku.

Teoretická <i>m/z</i> pozorovaného iontu	CN:DB	Elementární složení	Prasečí mozek		Lidská ledvina		Lidské plice		Lidská plásma		Lidské erytrocyty	
			Správnost [ppm]	Relativní intenzita [%]	Správnost [ppm]	Relativní intenzita [%]	Správnost [ppm]	Relativní intenzita [%]	Správnost [ppm]	Relativní intenzita [%]	Správnost [ppm]	Relativní intenzita [%]
SulfoHexCer; 0,6-1,7 min; [M-H]												
750,4831	32:1	C38H72NO11S	-0,8	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
752,4988	32:0	C38H74NO11S	-5,7	0,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
766,4781	32:1 (OH)	C38H72NO12S	n.d.	-	n.d.	-	-2,6	7,5	n.d.	-	0,8	2,7
776,4988	34:2	C40H74NO11S	n.d.	-	-3,0	0,6	n.d.	-	n.d.	-	-2,7	1,2
778,5144	34:1	C40H76NO11S	-0,1	0,4	-3,9	8,7	0,0	48,7	n.d.	-	-0,3	17,1
780,5301	34:0	C40H78NO11S	-7,0	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
792,5301	35:1	C41H78NO11S	-1,5	0,0	n.d.	-	n.d.	-	-0,4	85,7	n.d.	-
794,5094	34:1 (OH)	C40H76NO12S	9,8	0,0	-5,3	2,9	-0,3	43,8	n.d.	-	1,1	78,9
804,5301	36:2	C42H78NO11S	-0,1	0,5	n.d.	-	n.d.	-	2,1	14,3	n.d.	-
806,5458	36:1	C42H80NO11S	1,4	23,1	-3,6	1,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
820,5614	37:1	C43H82NO11S	-16,5	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
822,5407	36:1 (OH)	C42H80NO12S	1,2	4,5	-6,3	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
832,5614	38:2	C44H82NO11S	-0,1	0,1	1,2	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
834,5770	38:1	C44H84NO11S	1,2	2,2	-1,2	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
836,5927	38:0	C44H86NO11S	-6,1	0,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
848,5563	38:2 (OH)	C44H82NO12S	15,0	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

848,5927	39:1	C45H86NO11S	n.d.	-	15,9	<0,01	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
850,5720	38:1 (OH)	C44H84NO12S	1,3	1,2	1,4	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
852,5876	38:0 (OH)	C44H86NO12S	-4,5	0,5	8,6	<0,01	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
858,5770	40:3	C46H84NO11S	0,9	0,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
860,5927	40:2	C46H86NO11S	1,0	1,6	-0,6	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
862,6083	40:1	C46H88NO11S	0,0	3,0	-1,9	2,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
864,6240	40:0	C46H90NO11S	-6,7	1,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
874,6083	41:2	C47H88NO11S	-1,9	0,4	2,2	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
876,5876	40:2 (OH)	C46H86NO12S	16,2	1,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
876,6240	41:1	C47H90NO11S	n.d.	-	-13,1	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
878,6033	40:1 (OH)	C46H88NO12S	3,0	5,4	0,5	1,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
880,6189	40:0 (OH)	C46H90NO12S	-2,4	3,4	-6,8	0,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
886,6083	42:3	C48H88NO11S	0,7	0,9	-0,6	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
888,6240	42:2	C48H90NO11S	0,6	20,4	-2,1	4,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
890,6396	42:1	C48H92NO11S	-5,3	9,9	-7,5	3,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
892,6284	41:1 (OH)	C47H91NO12P	n.d.	-	-5,3	1,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
902,6396	43:2	C49H92NO11S	-17,7	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
902,6033	42:3 (OH)	C48H88NO12S	n.d.	-	8,4	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
904,6189	42:2 (OH)	C48H90NO12S	2,1	8,7	-1,1	1,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
906,6346	42:1 (OH)	C48H92NO12S	-2,0	6,7	-3,3	65,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
914,6396	44:3	C50H92NO11S	-1,9	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
916,6553	44:2	C50H94NO11S	-2,5	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
918,6346	43:2 (OH)	C49H92NO12S	12,5	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
920,6502	43:1 (OH)	C49H94NO12S	-1,4	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
922,6295	42:1 (OH)	C48H92NO13S	n.d.	-	-6,0	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
924,6451	42:0 (OH)	C48H94NO13S	n.d.	-	-8,4	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
928,6189	44:4	C50H90NO12S	-0,6	0,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

930,6346	44:3 (OH)	C50H92NO12S	-1,2	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
932,6502	44:2 (OH)	C50H94NO12S	-0,3	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
934,6659	44:1 (OH)	C50H96NO12S	-5,7	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
SulfoHex₂Cer; 0,6-1,7 min; [M-H]												
938,5516	34:2	C46H84NO16S	n.d.	-	2,8	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
940,5673	34:1	C46H86NO16S	n.d.	-	<0,01	21,0	n.d.	-	n.d.	-	-9,4	46,4
954,5829	35:1	C47H88NO16S	n.d.	-	-2,3	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
956,5622	34:1 (OH)	C46H86NO17S	n.d.	-	0,7	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
966,5829	36:2	C48H88NO16S	n.d.	-	-3,0	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
968,5986	36:1	C48H90NO16S	n.d.	-	-0,9	5,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
982,6142	37:1	C49H92NO16S	n.d.	-	-9,2	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
984,5935	36:1 (OH)	C48H90NO17S	n.d.	-	-0,7	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
994,6142	38:2	C50H92NO16S	n.d.	-	-3,2	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
996,6299	38:1	C50H94NO16S	n.d.	-	-1,1	9,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1010,6455	39:1	C51H96NO16S	n.d.	-	-4,7	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1012,6248	38:1 (OH)	C50H94NO17S	n.d.	-	2,8	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1022,6455	40:2	C52H96NO16S	n.d.	-	-1,7	2,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1024,6612	40:1	C52H98NO16S	n.d.	-	-0,9	18,7	n.d.	-	n.d.	-	1,8	12,2
1036,6612	41:2	C53H98NO16S	n.d.	-	-3,4	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1038,6768	41:1	C53H100NO16S	n.d.	-	-3,7	2,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1040,6561	40:1 (OH)	C52H98NO17S	n.d.	-	8,4	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1042,6717	40:0 (OH)	C52H100NO17S	n.d.	-	-3,9	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1048,6612	42:3	C54H98NO16S	n.d.	-	-1,2	1,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1050,6768	42:2	C54H100NO16S	n.d.	-	-0,7	14,6	n.d.	-	n.d.	-	8,4	21,8
1052,6925	42:1	C54H102NO16S	n.d.	-	-3,6	16,9	n.d.	-	n.d.	-	6,6	19,6
1064,6561	42:3 (OH)	C54H98NO17S	n.d.	-	11,6	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1066,6717	42:2 (OH)	C54H100NO17S	n.d.	-	-0,1	1,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

1068,6874	42:1 (OH)	C54H102NO17S	n.d.	-	-4,0	1,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1084,6823	42:1 (2OH)	C54H102NO18S	n.d.	-	-3,7	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
PG; 1,0-1,5 min; [M-H]⁺												
721,5025	32:0	C38H74O10P	-3,6	4,7	n.d.	-	-1,4	15,5	n.d.	-	n.d.	-
745,5025	34:2	C40H74O10P	-2,1	4,7	n.d.	-	-0,3	9,6	n.d.	-	n.d.	-
747,5181	34:1	C40H76O10P	-0,8	71,5	-2,9	56,2	-0,9	52,1	n.d.	-	n.d.	-
769,5025	36:4	C42H74O10P	n.d.	-	-6,9	6,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
771,5181	36:3	C42H76O10P	n.d.	-	-7,1	13,2	-4,3	7,7	n.d.	-	n.d.	-
773,5338	36:2	C42H78O10P	-4,5	6,7	-5,8	23,6	0,0	15,0	n.d.	-	n.d.	-
775,5494	36:1	C42H80O10P	-3,9	4,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
795,5181	38:5	C44H76O10P	4,5	4,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
797,5338	38:4	C44H78O10P	-4,8	3,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
PI; 1,0-1,5 min; [M-H]⁺												
807,5029	32:1	C41H76O13P	n.d.	-	-3,1	0,3	-2,7	1,0	n.d.	-	0,7	2,5
809,5185	32:0	C41H78O13P	n.d.	-	-3,2	1,3	-2,8	1,6	n.d.	-	n.d.	-
833,5185	34:2	C43H78O13P	1,4	0,6	-2,9	1,3	0,0	3,7	-2,5	5,1	2,3	20,5
835,5342	34:1	C43H80O13P	3,7	4,0	-2,0	7,5	0,1	13,6	-3,1	6,1	0,7	11,6
837,5498	34:0	C43H82O13P	n.d.	-	-7,2	1,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
847,5342	35:2	C44H80O13P	n.d.	-	-6,7	0,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
849,5498	35:1	C44H82O13P	n.d.	-	-4,1	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
857,5185	36:4	C45H78O13P	0,8	11,2	-2,2	6,2	0,6	4,8	-1,4	5,1	3,6	27,4
859,5342	36:3	C45H80O13P	n.d.	-	-6,4	1,9	3,4	3,7	-3,4	2,7	-0,2	8,5
861,5498	36:2	C45H82O13P	7,3	1,4	-3,1	5,0	0,3	12,1	-0,6	14,6	3,2	15,2
863,5655	36:1	C45H84O13P	6,9	1,7	-3,1	9,0	-0,8	10,3	-3,8	5,5	1,4	7,2
871,5342	37:4	C46H80O13P	n.d.	-	0,3	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
873,5498	37:3	C46H82O13P	n.d.	-	-3,1	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

881,5185	38:6	C47H78O13P	n.d.	-	1,1	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
883,5342	38:5	C47H80O13P	0,8	10,1	-2,9	2,7	0,5	3,8	0,5	1,5	4,5	5,8
885,5498	38:4	C47H82O13P	0,6	69,3	-1,8	49,3	1,6	44,5	0,5	59,3	5,8	1,1
887,5655	38:3	C47H84O13P	n.d.	-	-7,4	12,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
909,5498	40:6	C49H82O13P	4,1	0,8	-1,4	0,2	5,1	0,3	n.d.	-	n.d.	-
911,5655	40:5	C49H84O13P	-3,4	0,4	-6,0	0,2	-0,7	0,4	n.d.	-	n.d.	-
913,5811	40:4	C49H86O13P	-2,3	0,3	-4,4	0,2	-0,3	0,5	n.d.	-	n.d.	-
LPI; 1,7-2,4 min; [M-H]												
569,2732	16:1	C25H46O12P	-1,6	0,1	0,0	0,1	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-
571,2889	16:0	C25H48O12P	-2,3	6,0	-1,4	6,6	2,6	5,5	n.d.	-	n.d.	-
583,3253	P-18:0	C27H52O11P	-4,8	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
585,3045	17:0	C26H50O12P	9,4	0,4	-0,3	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
595,2889	18:2	C27H48O12P	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-1,0	17,3	n.d.	-
597,3045	18:1	C27H50O12P	-1,3	8,7	-1,5	6,8	0,0	13,5	-1,7	13,2	n.d.	-
599,3202	18:0	C27H52O12P	-0,3	77,3	-1,3	66,6	-1,2	60,2	-1,0	16,2	n.d.	-
619,2889	20:4	C29H48O12P	-1,8	6,9	-1,0	17,0	-0,5	20,8	1,8	45,6	n.d.	-
621,3045	20:3	C29H50O12P	n.d.	-	-7,6	2,4	n,d	-	-2,7	7,7	n.d.	-
625,3358	20:1	C29H54O12P	-3,5	0,2	-7,8	0,2	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-
PS; 2,0-2,9 min; [M-H]												
744,5185	O-34:2; P-34:1	C40H75NO9P	-4,8	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
758,4977	34:2	C40H73NO10P	-0,1	0,2	-2,2	3,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
760,5134	34:1	C40H75NO10P	-1,8	3,9	-3,6	11,5	-1,8	5,6	n.d.	-	-2,5	1,0
762,5291	34:0	C40H77NO10P	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-3,4	1,6
770,5341	O-36:3; P-36:2	C42H77NO9P	-2,7	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
772,5498	O-36:2; P-36:1	C42H79NO9P	-15,7	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
774,5290	35:1	C41H77NO10P	-1,3	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

782,4977	36:4	C42H73NO10P	-4,1	0,1	-3,2	4,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
784,5134	36:3	C42H75NO10P	-4,2	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
786,5290	36:2	C42H77NO10P	-1,3	13,2	-2,8	12,5	-1,4	61,4	n.d.	-	-1,3	3,7
788,5447	36:1	C42H79NO10P	-1,0	47,1	-2,9	39,7	-1,0	8,7	n.d.	-	-1,3	6,3
808,5134	38:5	C44H75NO10P	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-0,1	3,0
810,5290	38:4	C44H77NO10P	-2,2	3,7	-1,2	22,3	-1,7	11,3	n.d.	-	1,1	64,3
812,5447	38:3	C44H79NO10P	-5,8	1,2	-5,2	6,2	-2,2	5,7	n.d.	-	n.d.	-
814,5603	38:2	C44H81NO10P	-4,2	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
832,5134	40:7	C46H75NO10P	1,2	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-1,1	1,7
834,5290	40:6	C46H77NO10P	-1,2	25,4	n.d.	-	-1,6	2,3	n.d.	-	1,3	10,0
836,5447	40:5	C46H79NO10P	n.d.	-	n.d.	-	-2,7	2,7	n.d.	-	-0,6	5,6
838,5603	40:4	C46H81NO10P	-3,1	2,6	n.d.	-	1,6	2,3	n.d.	-	-0,6	2,8
856,5134	42:9	C48H75NO10P	-4,2	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GM3; 1,9-2,5 min; [M-H]												
1123,6746	32:1	C55H99N2O21	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-3,8	3,5
1149,6902	34:2	C57H101N2O21	n.d.	-	2,3	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1151,7059	34:1	C57H103N2O21	n.d.	-	-2,5	14,5	0,3	19,6	0,2	19,2	-1,6	80,7
1167,7008	34:1 (OH)	C57H103N2O22	n.d.	-	-5,3	2,7	1,3	4,0	n.d.	-	-2,3	5,8
1177,7215	36:2	C59H105N2O21	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	4,0	3,5	n.d.	-
1179,7372	36:1	C59H107N2O21	-1,9	72,8	-3,1	3,3	0,8	2,9	0,8	9,1	-0,1	10,0
1195,7321	36:1 (OH)	C59H107N2O22	n.d.	-	n.d.	-	3,9	1,5	n.d.	-	n.d.	-
1205,7528	38:2	C61H109N2O21	n.d.	-	n.d.	-	-	-	3,3	2,4	n.d.	-
1207,7685	38:1	C61H111N2O21	-1,0	27,2	-1,7	3,8	1,6	2,4	1,4	6,4	n.d.	-
1223,7634	38:1 (OH)	C61H111N2O22	n.d.	-	n.d.	-	0,5	1,5	n.d.	-	n.d.	-
1233,7841	40:2	C63H113N2O21	n.d.	-	-4,6	1,7	-3,7	1,5	3,2	4,9	n.d.	-
1235,7998	40:1	C63H115N2O21	n.d.	-	-3,9	16,6	-0,4	8,1	-1,6	6,9	n.d.	-

1247,7998	41:2	C64H115N2O21	n.d.	-	0,8	1,3	n.d.	-	-3,0	2,1	n.d.	-
1249,8154	41:1	C64H117N2O21	n.d.	-	-6,6	2,4	-0,2	3,4	n.d.	-	n.d.	-
1251,7947	40:1 (OH)	C63H115N2O22	n.d.	-	-0,4	3,2	1,7	3,1	3,3	4,3	n.d.	-
1253,8104	40:0 (OH)	C63H117N2O22	n.d.	-	-11,0	1,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1259,7998	42:3	C65H115N2O21	n.d.	-	-3,3	2,5	-1,7	2,6	2,2	5,9	n.d.	-
1261,8154	42:2	C65H117N2O21	n.d.	-	-3,5	22,8	0,2	18,8	1,2	13,2	n.d.	-
1263,8311	42:1	C65H119N2O21	n.d.	-	-5,1	15,6	-2,5	19,4	-4,0	9,0	n.d.	-
1275,7947	42:3 (OH)	C65H115N2O22	n.d.	-	n.d.	-	-	-	3,5	2,2	n.d.	-
1277,8103	42:2 (OH)	C65H117N2O22	n.d.	-	-1,8	2,5	0,5	4,9	2,7	5,5	n.d.	-
1279,8260	42:1 (OH)	C65H119N2O22	n.d.	-	-2,4	4,6	-1,6	6,3	-0,9	5,5	n.d.	-
GD3-Ac; 2,8-3,8 min; [M-2H]²⁻												
741,9023	34:1	C70H121N3O30	-3,8	1,1	n.d.	-	n.d.	30,9	n.d.	-	n.d.	-
742,9101	34:0	C70H123N3O30	-4,0	2,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
754,9101	36:2	C72H123N3O30	-8,1	1,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
755,9179	36:1	C72H125N3O30	-3,2	68,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
764,9232	36:0 (OH)	C72H127N3O31	-3,1	1,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
768,9258	38:2	C74H127N3O30	-3,8	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
769,9336	38:1	C74H129N3O30	-3,5	11,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
782,9414	40:2	C76H131N3O30	-3,4	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
783,9492	40:1	C76H133N3O30	-4,5	3,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
789,9492	41:2	C77H133N3O30	-9,9	1,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
790,9570	41:1	C77H135N3O30	-5,4	3,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
795,9492	42:3	C78H133N3O30	-6,2	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
796,9571	42:2	C78H135N3O30	-4,6	4,3	n.d.	-	-4,0	26,0	n.d.	-	n.d.	-
797,9649	42:1	C78H137N3O30	n.d.	-	n.d.	-	-7,0	43,1	n.d.	-	n.d.	-
GM2; 3,3-4,1 min; [M-H]⁻												

1380,8009	36:2	C67H118N3O26	0,4	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1382,8166	36:1	C67H120N3O26	0,4	62,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1410,8479	38:1	C69H124N3O26	0,3	37,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1438,8792	40:1	C71H128N3O26	n.d.	-	-3,6	25,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1464,8948	42:2	C73H130N3O26	n.d.	-	-1,8	43,5	-9,0	52,4	n.d.	-	n.d.	-
1466,9105	42:1	C73H132N3O26	n.d.	-	-1,2	30,7	-1,6	47,6	n.d.	-	n.d.	-
GD3; 4,5-5,7 min; [M-2H]²⁻												
720,8970	34:1	C68H119N3O29	-3,1	1,1	-3,5	9,5	-3,7	7,8	n.d.	-	n.d.	-
733,9048	36:2	C70H121N3O29	-3,5	1,3	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
734,9127	36:1	C70H123N3O29	-3,4	73,2	-5,9	3,3	-3,8	2,3	n.d.	-	n.d.	-
741,9205	37:1	C71H125N3O29	-3,8	0,9	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
742,9101	36:1 (OH)	C70H123N3O30	2,2	1,2	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
747,9205	38:2	C72H125N3O29	-3,1	0,5	n,d	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
748,9283	38:1	C72H127N3O29	-3,9	17,3	-3,5	5,5	-4,5	2,3	n.d.	-	n.d.	-
761,9361	40:2	C74H129N3O29	-2,9	3,8	-5,6	2,9	-3,5	1,8	n.d.	-	n.d.	-
762,9440	40:1	C74H131N3O29	-3,9	0,7	-4,1	11,6	-3,8	10,5	n.d.	-	n.d.	-
768,9440	41:2	C75H131N3O29	n.d.	-	n,d	-	-4,4	1,1	n.d.	-	n.d.	-
769,9518	41:1	C75H133N3O29	n.d.	-	-3,4	4,5	-5,2	3,4	n.d.	-	n.d.	-
773,9302	42:4	C76H129N3O29	n.d.	-	n.d.	-	-7,6	<0,01	n.d.	-	n.d.	-
774,9440	42:3	C76H131N3O29	n.d.	-	-4,9	6,0	-3,2	3,9	n.d.	-	n.d.	-
775,9518	42:2	C76H133N3O29	n.d.	-	-5,0	29,3	-4,0	34,2	n.d.	-	n.d.	-
776,9596	42:1	C76H135N3O29	n.d.	-	-6,7	27,4	-5,9	29,0	n.d.	-	n.d.	-
782,9596	43:2	C77H135N3O29	n.d.	-	n.d.	-	5,0	<0,01	n.d.	-	n.d.	-
784,9571	42:1 (OH)	C76H135N3O30	n.d.	-	n,d	-	-3,3	3,7	n.d.	-	n.d.	-
GD1a-Ac; 4,8-5,5 min; [M-2H]²⁻												
937,4762	36:2	C86H146N4O40	-4,9	2,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

938,4840	36:1	C86H148N4O40	-3,8	46,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
952,4997	38:1	C88H152N4O40	-3,0	51,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GM1a; 4,9-5,8 min; [M-H]⁺												
1516,8381	34:1	C71H126N3O31	-0,3	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	0,5	5,1
1530,8537	35:1	C72H128N3O31	-1,2	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1542,8537	36:2	C73H128N3O31	-0,3	1,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1544,8694	36:1	C73H130N3O31	1,2	63,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1570,8850	38:2	C75H132N3O31	-0,7	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1572,9007	38:1	C75H134N3O31	1,3	32,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1598,9163	40:2	C77H136N3O31	-3,3	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1600,9320	40:1	C77H138N3O31	-2,9	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-0,8	9,7
1624,9320	42:3	C79H138N3O31	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	1,9	4,1
1626,9476	42:2	C79H140N3O31	-3,1	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	2,1	33,8
1628,9633	42:1	C79H142N3O31	-2,9	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	-0,4	47,4
Fuc-GM1a; 6,2-7,2 min; [M-H]⁺												
1662,8960	34:1	C77H136N3O35	-1,9	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1676,9117	35:1	C78H138N3O35	-2,8	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1688,9117	36:2	C79H138N3O35	-0,1	0,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1690,9273	36:1	C79H140N3O35	1,7	51,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1716,9430	38:2	C81H142N3O35	-3,2	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1718,9586	38:1	C81H144N3O35	1,9	45,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1746,9899	40:1	C83H148N3O35	-4,1	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GD1a; 6,3-7,1 min; [M-2H]²⁺												
916,4709	36:2	C84H144N4O39	-1,1	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
917,4788	36:1	C84H146N4O39	-0,3	46,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
924,4866	37:1	C85H148N4O39	-2,7	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

930,4866	38:2	C86H148N4O39	-2,1	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
931,4944	38:1	C86H150N4O39	-0,1	51,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
944,5022	40:2	C88H152N4O39	-6,9	0,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
945,5101	40:1	C88H154N4O39	-3,2	0,4	-2,9	19,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
957,5101	42:3	C90H154N4O39	n.d.	-	0,3	13,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
958,5179	42:2	C90H156N4O39	n.d.	-	-2,4	34,7	1,5	40,7	n.d.	-	n.d.	-
959,5257	42:1	C90H158N4O39	n.d.	-	-2,7	32,9	4,8	59,3	n.d.	-	n.d.	-
GT3-Ac; 6,3-7,3 min; [M-2H]²⁻												
900,4578	36:2	C83H140N4O38	-2,1	2,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
901,4657	36:1	C83H142N4O38	-1,9	31,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
903,4631	35:0 (OH)	C82H142N4O39	0,3	25,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
909,4631	36:1 (OH)	C83H142N4O39	-7,3	14,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
910,4709	36:0 (OH)	C83H144N4O39	-3,7	16,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
915,4813	38:1	C85H146N4O38	-4,4	9,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GD0a; 7,3-8,3 min; [M-2H]²⁻												
1018,0106	36:2	C92H157N5O44	-2,7	1,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1019,0185	36:1	C92H159N5O44	-2,0	50,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1032,0263	38:2	C94H161N5O44	-0,7	1,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1033,0341	38:1	C94H163N5O44	-1,5	45,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1040,0419	39:1	C95H165N5O44	-1,8	0,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1041,0316	38:1 (OH)	C94H163N5O45	0,7	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1047,0498	40:1	C96H167N5O44	-2,5	0,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GD2; 7,5-8,4 min; [M-2H]²⁻												
836,4524	36:1	C78H136N4O34	-2,4	45,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
850,4680	38:1	C80H140N4O34	-2,7	54,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Fuc-GD1-Ac; 8,3-9,0 min; [M-2H]²⁻												

1011,5130	36:1	C92H158N4O44	0,7	39,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1025,5286	38:1	C94H162N4O44	-0,5	54,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1039,5442	40:1	C96H166N4O44	4,7	6,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GD1b; 8,8-9,6 min; [M-2H]²⁻												
916,4709	36:2	C84H144N4O39	-1,1	0,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
917,4788	36:1	C84H146N4O39	-2,3	37,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
924,4866	37:1	C85H148N4O39	-3,2	0,9	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
926,4841	36:0 (OH)	C84H148N4O40	-3,8	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
928,4709	38:4	C86H144N4O39	-2,5	0,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
930,4866	38:2	C86H148N4O39	-2,1	0,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
931,4944	38:1	C86H150N4O39	-1,6	58,7	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
945,5101	40:1	C88H154N4O39	-2,6	1,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GT1b-Ac; 9,2-9,9 min; [M-2H]²⁻												
1084,0318	36:1	C97H165N5O48	-3,5	43,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1098,0474	38:1	C99H169N5O48	-2,7	50,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1109,0395	40:4	C101H167N5O48	-5,0	3,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1112,0631	40:1	C101H173N5O48	-5,7	3,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GQ1-Ac; 9,2-9,9 min; [M-3H]³⁻												
828,7276	38:1	C110H185N6O56	-5,9	65,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
819,3839	36:1	C108H181N6O56	-4,6	34,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GT1a; 9,3-9,9 min; [M-2H]²⁻												
1063,0265	36:1	C95H163N5O47	-3,8	37,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1076,0343	38:2	C97H165N5O47	-6,9	4,1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1077,0421	38:1	C97H167N5O47	-2,8	40,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1071,0239	38:1 (OH)	C95H163N5O48	-3,1	10,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

Fuc-GD1b; 10,3-11,3 min; [M-2H]²⁻												
990,5077	36:1	C90H156N4O43	-2,6	38,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
997,5156	37:1	C91H158N4O43	0,5	1,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1003,5156	38:2	C92H158N4O43	-0,5	1,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1004,5234	38:1	C92H160N4O43	-3,9	56,5	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1018,5390	40:1	C94H164N4O43	0,2	2,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GT1b; 10,8-12 min; [M-2H]²⁻												
1046,9952	34:3	C93H155N5O47	13,4	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1049,0108	34:1	C93H159N5O47	2,4	0,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1056,0186	35:1	C94H161N5O47	-2,4	0,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1062,0187	36:2	C95H161N5O47	3,1	1,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1063,0265	36:1	C95H163N5O47	-2,4	39,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1070,0343	37:1	C96H165N5O47	-3,7	1,0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1071,0239	36:1 (OH)	C95H163N5O48	5,5	0,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1074,0187	38:4	C97H161N5O47	-4,7	1,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1076,0343	38:2	C97H165N5O47	-5,3	1,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1077,0421	38:1	C97H167N5O47	-2,2	49,4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1088,0340	40:4	C99H165N5O47	-4,4	3,3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
1091,0578	40:1	C99H171N5O47	-5,8	1,6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
GQ1b; 12,4-13,5 min; [M-3H]³⁻												
805,3803	36:1	C106H179N6O55	-4,6	36,2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
814,7241	38:1	C108H183N6O55	-5,6	63,8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

Tabulka S 4: Validační výsledky smíšeného vzorku ledvinové tkáně u pacientů s ccRCC.

IS	Extrakční účinnost [%]		Přesnost [%]		RSD [%]	
	HL	LL	HL	LL	HL	LL
SulfoHexCer 30:1	70	55	80	96	5,5	2,7
GM3 30:1	103	106	83	117	4,4	5,6
PS 28:0	48	53	80	63	8,1	5,5

Tabulka S 5: Validační výsledky směšného vzorku ledvinové tkáně u pacientů s ccRCC.

IS	Přenos vzorku [%]	Selektivita [%]	LOD [nmol/ml]	LOQ [nmol/ml]
SulfoHexCer 30:1	0,5	97,9	2,63e-3	4,26e-3
GM3 30:1	0,1	98,7	6,4e-2	1,1e-1
PS 28:0	2,3	98	2,7e-1	4,5e-1

Tabulka S 6: Seznam pacientů.

Tkáň	Věk	Pohlaví	BMI	Typ
Ledviny	50	M	33,21	Clear cell
Ledviny	70	M	32,11	Clear cell
Ledviny	81	M	23,66	Clear cell
Ledviny	45	M	35,65	Clear cell
Ledviny	77	M	24,76	Clear cell
Ledviny	58	M	23,67	Clear cell
Ledviny	41	M	27,45	Clear cell
Ledviny	77	M	31,14	Clear cell
Ledviny	64	M	29,07	Clear cell
Ledviny	63	M	23,41	Clear cell
Ledviny	47	M	30,09	clear cell
Ledviny	64	M	22,09	clear cell
Ledviny	58	M	17,87	Clear cell
Ledviny	60	M	54,54	Clear cell
Ledviny	72	M	21,72	Clear cell
Ledviny	75	M	26,23	Clear cell
Ledviny	61	M	27,64	Clear cell
Ledviny	70	M	25,15	clear cell
Ledviny	50	M	33,77	Clear cell
Ledviny	50	M	34,48	clear cell

Tabulka S 7: Lipidy s největší koncentrační změnou.

Koncentračně zvýšené lipidy	Teoretická <i>m/z</i>	Fold change (F)	T-hodnota	p-hodnota
GM3 34:1	1151,7059	5,03	-2,3	2,0E-02
GM3 42:3	1259,7998	4,56	-1,7	6,7E-02
GM3 42:2	1261,8154	4,39	-2,8	5,8E-03
GM3 34:2	1149,6902	3,98	-1,5	1,0E-01
GM3 32:1	1123,6746	3,83	-1,4	1,3E-01
SulfoHexCer 42:3	886,6084	3,8	-2,3	1,9E-02
GM3 40:1	1235,7998	3,64	-3,3	1,6E-03
GM3 42:1	1263,8311	3,44	-2,9	3,9E-03
GM3 40:2	1233,7841	3,37	-2,3	1,7E-02
GM3 41:1	1249,8154	3,18	-3,2	2,0E-03
GM3 41:2	1247,7998	2,49	-2,7	6,6E-03
PI 40:4	913,5811	2,32	-3,6	7,6E-04
GM3 36:1	1179,7372	2,29	-2,4	1,3E-02
PI 40:5	911,5655	2,08	-4,8	2,2E-05
GM3 36:2	1177,7215	1,80	-3,1	2,0E-03
Koncentračně snížené lipidy	Teoretická <i>m/z</i>	Fold change (F)	T-hodnota	p-hodnota
SulfoHexCer 42:0 (2OH)	924,6451	0,01	2,1	2,9E-02
SulfoHexCer 41:0 (2OH)	910,6295	0,01	2,1	3,0E-02
SulfoHexCer 40:0 (2OH)	896,6138	0,01	2,0	3,4E-02
SulfoHexCer 41:1 (OH)	892,6189	0,01	3,4	1,3E-03
SulfoHexCer 42:1 (2OH)	922,6295	0,03	2,1	2,8E-02
PI 34:0	837,5498	0,03	6,6	7,0E-07
SulfoHexCer 38:1 (OH)	850,572	0,04	4,4	1,0E-04
SulfoHexCer 40:1 (OH)	878,6033	0,05	3,8	5,0E-04
PS 36:4	782,4977	0,06	5,2	1,7E-05
SulfoHexCer 42:1 (OH)	906,6346	0,07	3,6	8,3E-04
SulfoHexCer 36:1 (OH)	822,5407	0,12	3,8	4,9E-04
LPI 16:0	571,2889	0,18	7,3	1,0E-07
PI 32:0	809,5185	0,19	7,2	1,1E-08
PS 34:1	760,5134	0,2	6,9	1,6E-07
GM3 40:1 (OH)	1251,7947	0,46	1,5	1,0E-01