

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj RP-UHPSFC/MS metody pro stanovení nepochárních lipidů
v biologických vzorcích

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Šubrtová**
Osobní číslo: **C21422**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Vývoj RP-UHPSFC/MS metody pro stanovení nepolárních tříd lipidů v biologických vzorcích**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu nepolárních tříd lipidů s využitím hmotnostní spektrometrie.
2. V experimentální části zoptimalizujte metodiku pro extrakci a následnou analýzu vybraných nepolárních tříd lipidů s využitím techniky vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie s reverzními fázemi spojené s hmotnostní spektrometrií.
3. Zoptimalizovanou metodu aplikujte pro identifikaci nepolárních lipidů v různých typech biologických vzorků. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Zuzana Vaňková**
Katedra analytické chemie
Ing. Ondřej Peterka, Ph.D.
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Vývoj RP-UHPSFC/MS metody pro stanovení nepolárních lipidů v biologických vzorcích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Bc. Veronika Šubrtová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. Ing. Michalu Holčápkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Ing. Zuzaně Vaňkové, za konzultace a odborné rady při řešení problémů spojených s měřením a také Ing. Ondřeji Peterkovi, Ph.D. a Ing. Robertovi Jiráskovi, Ph.D. za praktické rady a pomoc při jejich realizaci. Poděkování dále patří i mým rodičům a blízkým za jejich podporu po dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody pro analýzu nepochárných lipidů, jmenovitě mastných kyselin, sterolů, cholesterol esterů a mono-, di- a triacylglycerolů, pomocí spojení ultravysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC) s hmotnostní spektrometrií (MS) v biologických vzorcích. V teoretické části jsou shrnuty základní informace o lipidech, lipidomické analýze, separačních technikách, zejména pak UHPSFC a MS. Cílem práce bylo zoptimalizovat metodu pro stanovení nepochárných lipidů a následně ji pak aplikovat na analýzu různých biologických vzorků a výsledná data mezi sebou porovnat.

KLÍČOVÁ SLOVA

hmotnostní spektrometrie; ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie; lipidomická analýza; acylglyceroly; mastné kyseliny; steroly

TITLE

Development of RP-UHPSFC/MS method for determination of nonpolar lipid classes in biological samples

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on the development and optimization of method for determination of nonpolar lipids in biological samples, namely fatty acids, sterols, cholesterol esters and mono-, di- and triacylglycerols, by using ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC) with mass spectrometry (MS). The theoretical part summarises the basic information about lipids, lipidomic analysis, chromatographic techniques, mostly UHPSFC and MS. The aim of this work was to optimize the method for determination of nonpolar lipids, and the application of the optimized method for biological samples, and the comparison of the resulting data.

KEYWORDS

mass spectrometry; ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography; lipidomic analysis; acylglycerols; fatty acids; sterols

OBSAH

ÚVOD.....	16
1. TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1. Lipidy	17
1.1.1. Biologický význam lipidů.....	17
1.1.2. Rozdělení lipidů.....	17
1.1.3. Mastné acyly	19
1.1.4. Glycerolipidy	20
1.1.4.1. Monoacylglyceroly a diacylglyceroly	21
1.1.4.2. Triacylglyceroly	21
1.1.5. Sterolové lipidy.....	22
1.1.6. Ostatní kategorie lipidů.....	23
1.2. Analýza nepolárních tříd lipidů.....	26
1.2.1. Příprava vzorku.....	26
1.3. Analytické přístupy v lipidomice	30
1.3.1. Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi...	31
1.3.2. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie.....	32
1.3.3. Superkritická fluidní chromatografie	33
1.3.3.1. Mobilní fáze v SFC	33
1.3.3.2. Stacionární fáze v SFC	35
1.3.3.3. Instrumentace v SFC	36
1.3.3.4. Retenční mechanismus v SFC	38
1.3.3.5. Využití SFC	38
1.3.4. Hmotnostní spektrometrie.....	41
1.3.4.1. Ionizační techniky	42
1.3.4.2. Hmotnostní analyzátory.....	44

1.3.5.	Spojení ultravysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií	49
1.4.	Identifikace lipidů	53
1.4.1.	Nomenklatura v lipidomice	53
1.4.2.	Databáze a softwary pro analýzu lipidů.....	55
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	56
2.1.	Seznam použitých chemikálií a standardů	56
2.2.	Přístroje a zařízení.....	56
2.3.	Pracovní postup.....	57
2.3.1.	Příprava zásobních roztoků standardů	57
2.3.2.	Příprava vzorků k analýze.....	58
2.3.2.1.	Příprava vzorků standardů k analýze	58
2.3.2.2.	Příprava vzorků séra a plazmy k analýze	59
2.4.	UHPSFC podmínky	59
2.5.	MS podmínky.....	60
2.6.	Zpracování naměřených dat	60
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	61
3.1.	Optimalizace UHPSFC	61
3.1.1.	Optimalizace mobilní fáze B	61
3.1.2.	Optimalizace teploty kolony.....	62
3.1.3.	Optimalizace aditiv do mobilní fáze B	62
3.1.4.	Optimalizace délky kolony	66
3.1.5.	Optimalizace gradientu	67
3.1.6.	Optimalizace zpětného tlaku.....	69
3.1.7.	Optimalizace průtoku mobilní fáze.....	69
3.2.	Optimalizace MS.....	71
3.2.1.	Optimalizace teploty iontového zdroje.....	72

3.2.2. Optimalizace desolvatační teploty	72
3.3. Optimalizace extrakčního protokolu	73
3.4. Separace lipidů	75
3.5. Identifikace.....	77
3.6. Analýza biologických vzorků zdravého člověka a pacienta s rakovinou	80
ZÁVĚR	82
POUŽITÁ LITERATURA	83
PŘÍLOHY	102

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Příklady lipidových kategorií a jejich jednotlivých zástupců.....	18
Obrázek 2: Příklad nasycené (kyselina palmitová), mononenasyčené (kyselina olejová) a polynenasycené (kyselina linolová) mastné kyseliny.	19
Obrázek 3: Fischerův vzorec triacyl-sn-glycerolu.	20
Obrázek 4: Struktura cholestanu včetně číslování cyklů a uhlíků.	23
Obrázek 5: Struktury výsledných produktů derivatizace nepolárních lipidů a mastných kyselin. Převzato z publikace.....	29
Obrázek 6: HILIC kombinuje vlastnosti těchto tří hlavních metod kapalinové chromatografie.	33
Obrázek 7: Fázový p-T diagram pro oxid uhličitý.	34
Obrázek 8: Schéma instrumentace SFC.	37
Obrázek 9: Porovnání rozsahu použití UHPSFC s ostatními druhy chromatografie.	41
Obrázek 10: Hmotnostní spektrometr a jeho základní části.	42
Obrázek 11: Schéma ESI se zobrazením principu vzniku iontů.	43
Obrázek 12: Schéma kvadrupólového analyzátoru.	45
Obrázek 13: Schéma analyzátoru doby letu (TOF).	46
Obrázek 14: Princip FT-ICR, znázorněný ve 3 krocích: 1. zachycení iontů v ICR cele, 2. excitace iontů pomocí RF pulzu na vyšší orbit, 3. detekce indukovaného proudu po vypnutí RF pulzu.	47
Obrázek 15: Schéma Orbitrapu.	48
Obrázek 16: Schéma spojení kvadrupólového analyzátoru s analyzátozem doby letu (QqTOF).	49
Obrázek 17: Přehled 5 dostupných rozhraní pro spojení SFC s MS. (A) přímé spojení, (B) dělič toku před UV detekcí a ABPR bez pomocného čerpadla, (C) rozhraní s pomocným čerpadlem před ABPR a s děličem toku, (D) rozhraní s pomocným čerpadlem řízené tlakem, (E) rozhraní s pomocným čerpadlem před ABPR bez dělice toku.	50
Obrázek 18: Efekt teplot (A) 40 °C, (B) 50 °C, (C) 60 °C nastavených v kolonovém termostatu UHPSFC na analýzu vzorku séra obsahujícího IS Mix (vyznačené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a jako MF B a pomocná kapalina byl použit čistý MeOH. Chromatogram s optimální teplotou je zvýrazněn zeleně.	63

- Obrázek 19:** Vliv přidavku deionizované vody (**(A)** 0 %, (**(B)** 1 %, (**(C)** 2 %, (**(D)** 3 %, (**(E)** 5 % do MF B (MeOH) na retenční časy při analýze vzorku séra obsahujícího IS Mix (vyznačené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s optimálním složením MF B je zvýrazněn zeleně.64
- Obrázek 20:** Optimalizace přidavku octanu amonného do MF B (MeOH) a jeho vliv na plochu píků IS Mixu ve vzorku séra. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C.65
- Obrázek 21:** Vliv přidavku kyseliny octové do MF B na plochu píků pro IS Mix ve vzorku séra. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C.66
- Obrázek 22:** Vliv délky kolony (**(A)** 15 cm, (**(B)** 25 cm na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: MF B MeOH + 0.1 % AAc, průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s optimální délkou kolony je zvýrazněn zeleně.67
- Obrázek 23:** Optimalizace gradientu a jeho vliv na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícího IS Mix (zobrazené v obr.). Gradient roste až (**(A)** do 20 % MF B, (**(B)** do 15 % MF B, (**(C)** do 13 % MF B. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), MF B MeOH + 0.1 % AAc, průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s ideálním gradientem je zvýrazněn zeleně.68
- Obrázek 24:** Vliv zpětného tlaku (**(A)** 2500 psi, (**(B)** 2100 psi, (**(C)** 2000 psi na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícího IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), MF B MeOH + 0.1 % AAc, průtok 1 ml/min, teplota kolony 40 °C a gradient: 0 min – 2 % B, 20 min – 15 % B, 20.8 min – 2 % B, 21.5 min – 2 % B. Chromatogram s optimálním BPR je zvýrazněn zeleně.70
- Obrázek 25:** Vliv průtoku MF (**(A)** 1 ml/min, (**(B)** 1.2 ml/min na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: kolony Viridis HSS C18 SB (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) a Viridis HSS C18 SB (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), ABPR 2000 psi (137.895 bar), teplota kolony 40 °C a MeOH + 0.1 % AAc jako MF B. Chromatogram s optimálním průtokem je zvýrazněn zeleně.71

Obrázek 26: Vliv teploty zdroje na absolutní plochy píků nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix. MS podmínky: desolvatační teplota 500 °C, pozitivní mód polarit, režim citlivosti s rozsahem m/z 150–1000 a skenovací rychlost 0.1 s.....	72
Obrázek 27: Optimalizace desolvatační teploty pro analýzu nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix. MS podmínky: desolvatační teplota 500 °C, pozitivní mód polarit, režim citlivosti s rozsahem m/z 150–1000 a skenovací rychlost 0.1 s.	73
Obrázek 28: Porovnání tří extrakčních protokolů pro extrakci nepolárních lipidů ze vzorku séra obsahujícího IS Mix. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), jako MF B byl použit MeOH s přidavkem 0.1 % AAc o průtoku 1 ml/min, ABPR 2000 psi (137.895 bar) a teplota kolony 40 °C.	74
Obrázek 29: Příklady závislosti retenčního času na délce acylového řetězce a počtu dvojných vazeb znázorněné pro jednotlivé třídy lipidů.....	76
Obrázek 30: Separace izobarických píků standardů FA 18:1. Rozdělení cis (Z) a trans (E) polohových izomerů dvojných vazeb v acylovém řetězci. Číslo znázorňuje polohu dvojných vazeb.....	77
Obrázek 31: Korelační grafy pro porovnání koncentrací [nmol/ml] nepolárních lipidů (A) v plazmě a séru a (B) pro zdravého a nemocného jedince s rakovinou.....	80
Tabulka 1: Přehled používaných stacionárních fází v UHPLC s příklady komerčně dostupných kolon.....	31
Tabulka 2: Vybrané příklady UHPSFC/MS analýzy lipidů v různých vzorcích.....	39
Tabulka 3: Výhody a nevýhody UHPSFC/MS v lipidomické analýze v porovnání s UHPLC/MS.....	52
Tabulka 4: Koncentrace standardů v IS Mixu.....	58
Tabulka 5: Porovnání stanovených lipidů naší optimalizovanou metodou s ostatními publikacemi.....	79

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-EP	2-ethylpyridinová
AA	octan amonný (z angl. Ammonium Acetate)
AAc	kyselina octová (z angl. Acetic Acid)
ABPR	automatický regulátor zpětného tlaku (z angl. Automatic Back Pressure Regulator)
ACN	acetonitril
AF	mravenčan amonný (u angl. Ammonium Formate)
BEH	(z angl. Bridged Ethyl Hybrid)
BUME	butanol-metanol
BzCl	benzoylchlorid
CE	cholesterolester
CN	celkový počet atomů uhlíku (z angl. Carbon Number)
CO₂	oxid uhličitý
CoA	koenzym A
DB	celkový počet dvojných vazeb (z angl. Double Bond)
DC	stejnoseměrné napětí (z angl. Direct Current)
DG	diacylglycerol
ECN	ekvivalentní počet uhlíkových atomů (z angl. Equivalent Carbon Number)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. Electrospray Ionization)
EtOH	ethanol
FA	mastné kyseliny (z angl. Fatty Acids)
FAc	kyselina mravenčí (z angl. Formic Acid)
FFA	volné mastné kyseliny (z angl. Free Fatty Acids)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier Transformation – Ion Cyclotron Resonance)
GC	plynová chromatografie (z angl. Gas Chromatography)
GL	glycerolipidy
GP	glycerofosfolipidy
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
ICR	iontová cyklotronová resonance
IPA	izopropylalkohol
IS	interní standard
IS Mix	zásobní roztok interních standardů
LC	kapalinová chromatografie (z angl. Liquid Chromatography)
LC/MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
LIPID MAPS	z angl. Lipid Metabolites and Pathways Strategy
LM_ID	LIPID MAPS identifikační číslo
LMSD	LIPID MAPS strukturní databáze
MALDI	ionizace/desorpce laserem za účasti matrice (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MG	monoacylglycerol
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl-terc-butylether
NARP-UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s nevodnými obrácenými fázemi (z angl. Non-Aqueous Reversed Phase – Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography)
NP	systém s normálními fázemi (z angl. Normal Phase)
PC	fosfatidylcholin (z angl. Phosphatidylcholine)
Q	kvadrupólový analyzátor (z angl. Quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu (z angl. Quadrupole Time of Flight analyser)
RF	vysokofrekvenční potenciál (z angl. Radio Frequency)
RP	systém s obrácenými fázemi (z angl. Reverse Phase)
scCO₂	superkritický oxid uhličitý
SE	sterolové estery

SF	stacionární fáze
SL	steroly (z angl. Sterol Lipids)
<i>sn</i>	stereochemické číslování (z angl. stereochemical numbering)
TG	triacylglyceroly
TOF	analyzátor doby letu (z angl. Time-of-Flight analyser)
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography)
UHPSFC	Ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (z angl. Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography)
UV	ultrafialový (z angl. Ultraviolet)

ÚVOD

Lipidomika je obor zabývající se stanovením lipidů v daném biologickém systému v určitém čase. Termín lipid zahrnuje velkou skupinu sloučenin obecně rozpustných v organických rozpouštědlech, které jsou chemicky a strukturně heterogenní. Jejich podskupinou jsou nepolární lipidy tvořící skupinu důležitých biomolekul, které jsou klíčové pro tvorbu a skladování energie ve všech buňkách. Do této skupiny lze zařadit triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly, steroly a jejich estery. Každý z těchto lipidů hraje také důležitou roli v buněčné homeostáze, nicméně význam jednotlivých lipidů v těchto procesech není dosud přesně popsán. Jejich analýza není jednoduchá a je proto zapotřebí vysoce účinných metod s dobrou schopností rozlišení jednotlivých lipidů vedle sebe v biologických matricích [1; 2].

Vzhledem ke své citlivosti a specifičnosti je hmotnostní spektrometrie nejlepší volbou pro stanovení velkých souborů lipidů. Využívají se zejména dva přístupy, a to hmotnostní spektrometrie s přímou infuzí nebo spojení hmotnostní spektrometrie s chromatografickými technikami. Velmi výhodným spojením pro analýzu nepolárních lipidů je ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie v systému s obrácenými fázemi, která je snadno kombinovatelná s ionizací elektrosprejem v hmotnostní spektrometrii. Tato metoda dokáže, jak separovat lipidy podle lipidových tříd na základě jejich polarit, tak také jednotlivé lipidy v závislosti na délce a počtu a pozici dvojných vazeb v acylovém řetězci [3; 4].

Hlavním cílem této práce bylo vyvinout novou, vysoce reprodukovatelnou metodu ultravysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie v systému s obrácenými fázemi pro stanovení nepolárních lipidů ve vzorcích plazmy a séra. Tato metoda využívající kolony se sub-2 μm částicemi byla spojena s hmotnostním spektrometrem využívajícím ionizaci pomocí elektrospreje a kvadrupólový analyzátor spojený s analyzátozem doby letu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Lipidy

Lipidy jsou všudypřítomnou, různorodou skupinou biologických molekul primárně se vyskytujícími v buněčných membránách, které mají jedinečné lipidové složení nezbytné pro plnění mnoha jejich životně důležitých biologických funkcí, které však nejsou všechny doposud plně známy a pochopeny [5; 6].

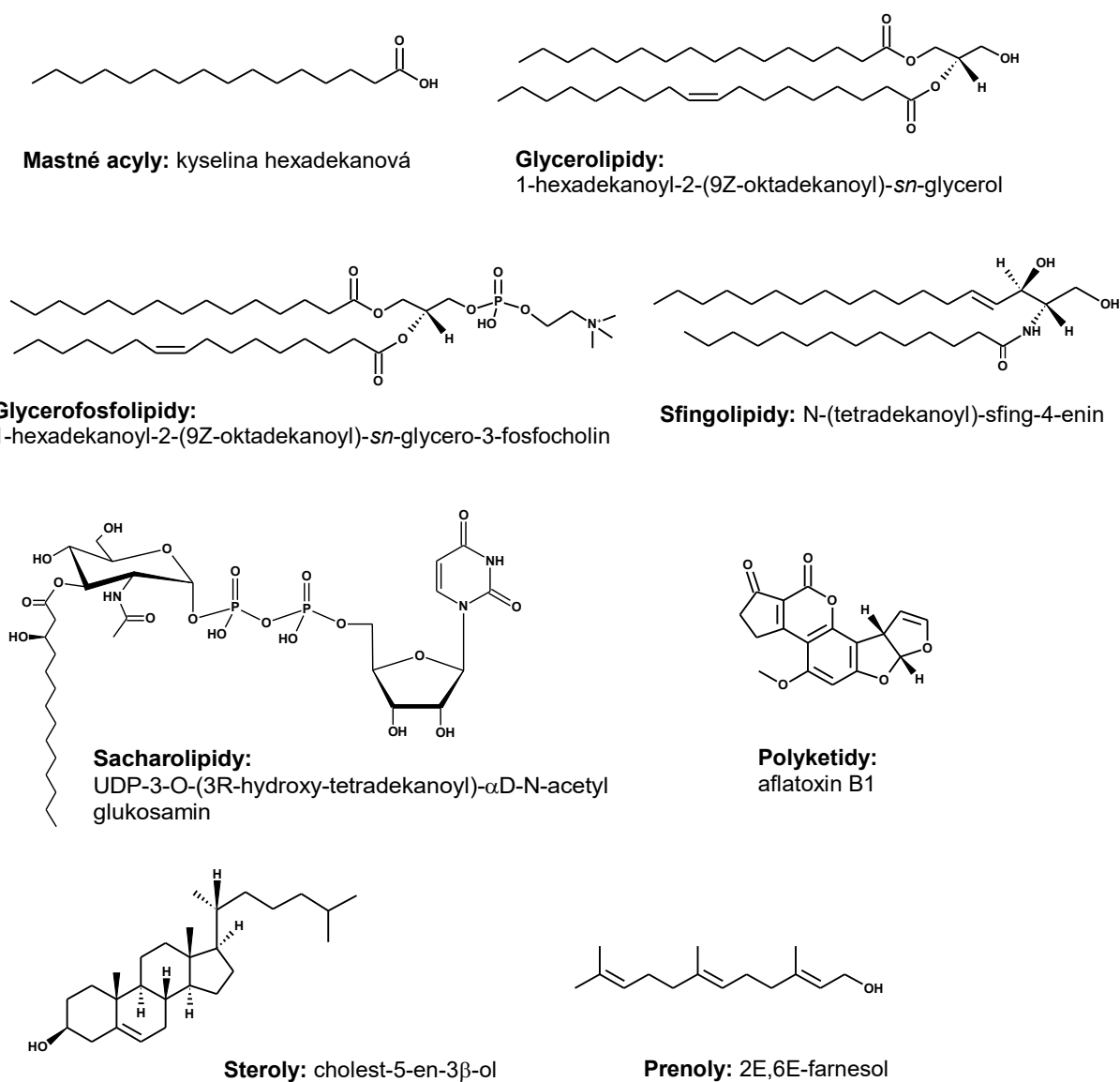
1.1.1. Biologický význam lipidů

Mezi klíčové biologické funkce lipidů patří ukládání energie, přenos signálu, jsou stavebními jednotkami buněčných membrán a účastní se mnoha biologických procesů, počínaje transkripcí genů až po regulaci životně důležitých metabolických drah a fyziologických odpovědí. Rozmanitost ve funkci lipidů se odráží v obrovské variabilitě jejich struktury. Narozdíl od genů a proteinů, které jsou primárně složené z lineárních kombinací 4 nukleových kyselin a 20 aminokyselin, jsou lipidové struktury mnohem více rozmanitější vzhledem k počtu různých biologických transformací, ke kterým dochází během jejich biosyntézy [5; 7]. V oblasti medicíny jsou lipidy zkoumány jako biomarkery onemocnění, které se projevují změnami nebo variacemi v jejich koncentraci. Mezi tato onemocnění patří např. rakovina, autoimunitní onemocnění, cukrovka a dědičná metabolická onemocnění [8].

1.1.2. Rozdělení lipidů

Termín „lipid“ byl volně definován jako jakákoliv organická látka nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v organických rozpouštědlech. Tyto chemické vlastnosti jsou charakteristické pro široké spektrum molekul, jako jsou mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, sfingolipidy, terpeny a další, avšak nespádají sem úplně všechny lipidy. Novější klasifikace dělí lipidy na hydrofobní a amfifilní malé molekuly, které vznikají zcela nebo zčásti karbanionovou kondenzací thioesterů a/nebo karbokationtovou kondenzací izoprenových jednotek [9]. Na základě toho jsou lipidy rozděleny do 8 kategorií: mastné acyly, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy, polyketidy (odvozené z kondenzace ketoacylové podjednotky), steroly a prenoly (odvozené od kondenzace izoprenových podjednotek). Každá z kategorií je dále ještě dělena do dalších tříd a podtříd a každému lipidu

je přiřazen 12 nebo 14místný identifikátor (LIPID MAPS ID nebo zkráceně „LM_ID“) založený na tomto klasifikačním rozdělení. Příklady jednotlivých zástupců těchto 8 tříd jsou zobrazeny na **obr. 1** [5; 9 – 12].



Obrázek 1: Příklady lipidových kategorií a jejich jednotlivých zástupců [10].

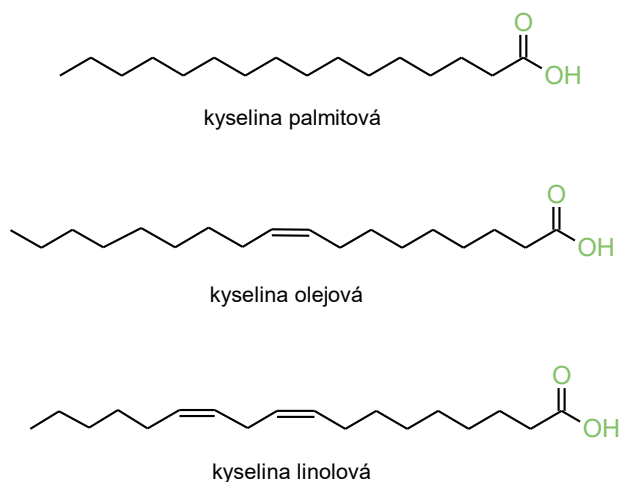
Struktury s glycerolovou skupinou jsou reprezentovány dvěma odlišnými skupinami: glycerolipidy, které zahrnují acylglyceroly, ale také alkylové a 1Z-alkenylové varianty a dále pak glycerofosfolipidy, které jsou definované přítomností fosfátu (resp. fosfonátu) esterifikovaného na jedné z glycerolhydroxylových skupin. Sterolové a prenelové lipidy sdílejí společnou biosyntetickou cestu, a to polymeraci dimethylallyl pyrofosfátu/isopentenylfosfátu, ale vykazují klíčové rozdíly, co se týče jejich struktury a funkce. Další kategorií jsou sfingolipidy, které jako základní strukturu obsahují dusíkatou bázi s dlouhým řetězcem.

Glykosylované deriváty dalších 7 kategorií jsou řazeny do tříd a podtříd jednotlivých kategorií a významně přispívají k strukturní rozmanitosti lipidů. Poslední kategorií jsou polyketidy, které jsou různorodou skupinou metabolitů z živočišných, rostlinných a mikrobiálních zdrojů [10].

1.1.3. Mastné acyly

Mastné acyly (FA) jsou hlavními stavebními kameny a nejzákladnější kategorií lipidů v biologickém systému. Lze je rozdělit do dvou hlavních podtříd – volné mastné kyseliny (FFA) a estery mastných kyselin. Ty mohou být dále děleny do několika skupin podle délky řetězců, stupňů nasycení a konjugátů [13].

FFA jsou karboxylové kyseliny s alifatickým řetězcem o různé délce a na základě této délky se dělí na krátké mastné kyseliny (C1 – C6), středně dlouhé mastné kyseliny (C7 – C12), dlouhé mastné kyseliny (C13 – C22) a velmi dlouhé mastné kyseliny (\geq C22). Mastné kyseliny různých délek mají i různé chemické vlastnosti [13; 14]. Na základě stupňů nasycenosti se mohou FFA dále dělit na nasycené (např. kyselina palmitová), mononenasycené (např. kyselina olejová) a polynenasycené mastné kyseliny (např. kyselina linolová), zobrazené na **obr. 2**. Kromě toho může být FFA také konjugována s různými funkčními skupinami. Patří sem hydroxy- (např. eikosanoidy), karboxy- (dikarboxylové kyseliny, např. kyselina adipová), oxo-, halogenované, nitro- a aminoskupiny. Další důležitou podtřídou jsou také výše zmíněné estery mastných kyselin jako jsou acylkarnitiny, N-acylglyciny a další mastné acylové aminokyseliny [13]. Dále pak jejich alkoholy a aldehydy [10].



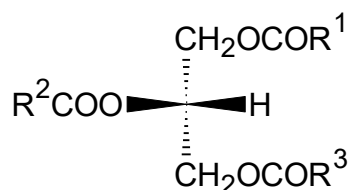
Obrázek 2: Příklad nasycené (kyselina palmitová), mononenasycené (kyselina olejová) a polynenasycené (kyselina linolová) mastné kyseliny [9].

Mastné acyly jsou tvořeny řetězovým prodloužením primeru acetyl-CoA se skupinou malonyl-CoA (nebo methylmalonyl-CoA) obsahující cyklus a/nebo heteroatom [10].

1.1.4. Glycerolipidy

Glycerolipidy (GL) zahrnují všechny lipidy obsahující glycerol. Nepatří sem ale glycerofosfolipidy, které jsou záměrně řazené do samostatné kategorie kvůli jejich velkému počtu a významu jako metabolického paliva, složek membrán a signálních molekul. Glycerolipidy přispívají k ukládání energie a hrají roli v energetickém metabolismu či přenosu signálu. Převládají zde mono-, di- a trisubstituované glyceroly, kde nejznámějšími jsou acylglyceroly, které obsahují glycerolový hlavní řetězec a mastné acylové řetězce připojené k hydroxylovým skupinám glycerolu esterovou vazbou. Tato skupina může být zpátky hydrolyzována na glycerol, neesterifikované FA a/nebo alkylované varianty. Další podtřídy jsou reprezentovány glyceroglykany, které se vyznačují výskytem jednoho nebo více připojených cukerných zbytků na glycerol přes glykosidickou vazbu [9; 15].

Pro označení stereochemie acylglycerolů, je molekula glycerolu nakreslena pomocí Fisherova vzorce se sekundární hydroxylovou skupinou nalevo od centrálního chirálního uhlíku a následně jsou uhlíky očíslovány 1, 2 a 3 od shora dolů (**obr. 3**). Molekuly, které jsou očíslovány tímto způsobem mají v názvu před pojmem glycerol pojem ‚sn‘ (stereochemické číslování; z angl. stereochemical numbering), což slouží k odlišení těchto sloučenin od ostatních molekul číslovaných konvenčním způsobem [16]. Jelikož molekula glycerolu nemá rotační symetrii, všechny atomy uhlíku jsou od sebe snadno odlišitelné [17].



Obrázek 3: Fischerův vzorec triacyl-*sn*-glycerolu [16].

Nutričně převládá skupina triacylglycerolů (TG) u nichž rozdíly v distribuci mastných kyselin na 3 pozicích glycerolové skupiny mají určité důsledky. Zejména pozice *sn*-2 má zvláštní význam, neboť tato poloha usnadňuje vstřebávání FA zde navázaných jako

2-monoacyl-*sn*-glycerolů, čehož se využívá při resyntéze TG a glycerofosfolipidů, která probíhá po absorpci tuku [16].

V 50. a 60. letech 20. století byly poprvé popsány 2 základní cesty biosyntézy TG: glycerolfosfátová nebo také Kennedyho dráha [18] a monoacylglycerolová (MG) dráha. Obě tyto cesty využívají mastné acyl-CoA „aktivované“ formy FA syntetizované intracelulárními acyl-CoA syntázami jako donory acylu. Glycerolfosfátová dráha je přítomna ve většině buněk. Naproti tomu dráha MG se nachází pouze ve specifických typech buněk, jako jsou enterocyty, hepatocyty a adipocyty, kde se také může podílet na reesterifikaci hydrolyzovaných TG. V závěrečné reakci obou drah je molekula mastného acyl-CoA kovalentně spojena s molekulou diacylglycerolu (DG) za vzniku TG. Tato reakce je katalyzována enzymy acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferázami [19].

1.1.4.1. Monoacylglyceroly a diacylglyceroly

Molekulární struktury MG a DG se liší od TG tím, že DG obsahuje jednu a MG dvě volné hydroxylové skupiny. MG obsahují pouze jednu mastnou kyselinu navázanou pomocí esterové vazby a DG dvě FA navázané stejným způsobem. Jedná se o neiontové molekuly, které obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní část. Tyto strukturní odlišnosti vedou k jejich rozdílným fyzikálním a chemickým vlastnostem ve srovnání s TG [20; 21]. Homology s delším řetězcem jsou amfipatické [22].

MG mají vynikající emulgační vlastnosti, které jsou široce využívány v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém a chemickém průmyslu. MG substituované v poloze *sn*-2 se vstřebávají přes střevní sliznici a využívají se přímo pro resyntézu TG. Kromě toho se také podílejí na syntéze a degradaci endokannabinodů, které mohou regulovat chuť k jídlu, pocit bolesti a metabolismus lipidů [21]. DG jsou součástí biologických membrán, kde slouží jako centrální meziprodukty v biosyntéze mnoha dalších lipidů obsahujících mastné acyly, včetně fosfolipidů, cholesterolesterů (CE) a TG [2; 23].

1.1.4.2. Triacylglyceroly

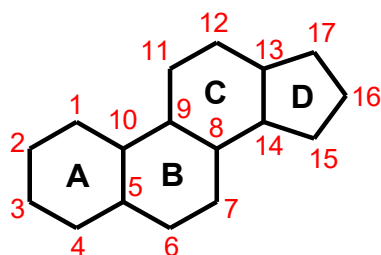
Triacylglyceroly jsou hlavním typem nepolárních lipidů vyskytujících se v olejích ze semen a v zásobním tuku živočišných tkání. Jedná se o heterogenní skupinu molekul s glycerolovou kostrou a třemi navázanými FA pomocí esterové vazby. Fyzikální a chemické vlastnosti TG se liší na základě délky řetězce FA a stupně jeho desaturace. V živých organismech plní několik životně důležitých funkcí a jsou jednou z hlavních zásobáren FA

pro jejich další energetické využití a syntézu membránových lipidů. Ačkoliv jsou TG nezbytné pro fyziologickou funkci organismu, jejich nadbytečná akumulace v lidských tukových tkání vede k obezitě a v netukových tkáních je pak spojená s disfunkcí orgánů [19]. TG v semenech se obvykle vyznačují převahou C18 nenasycenými a polynasycenými FA, což je odlišuje od živočišných tuků, které jsou obecně více nasycené [17].

1.1.5. Sterolové lipidy

Steroly jsou základními součástmi membrán všech eukaryotických organismů a mezi jejich funkce patří regulace fluidity a propustnosti membrány [24]. Hrají také kritickou roli v mnoha fyziologických procesech, jako je buněčná signalizace a energetická homeostáza, která je životně důležitá pro udržení správných buněčných a systematických funkcí živých organismů [25]. Mezi hlavními lipidy nalezenými v membránách eukaryotických buněk mají steroly nejobyčtější chemickou strukturu. Obsahují pouze jeden hydroxyl, který je jedinou polární složkou sterolů, téměř rovinnou sestavu čtyř kruhů a krátký alkylový řetězec. Tyto molekulární charakteristiky hrají velkou roli ve fyzikálně-chemických vlastnostech membrány, stejně jako schopnost rychle se pohybovat mezi dvěma membránovými vrstvami, jelikož mají ve srovnání s jinými lipidy nižší bariéru volné energie potřebnou k opuštění lipidové dvojvrstvy [26].

V buňkách savců je hlavním zástupcem sterolů cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol) (**obr. 1**), který se vyskytuje v buněčných membránách jater, erythrocytů a v myelinu [27]. Kromě cholesterolu tato třída zahrnuje látky jemu příbuzné, postavené na kostře cholestanu (**obr. 4**), včetně steroidů, mající zkrácený 8-uhlíkový postranní řetězec cholesterolu. Dále sem také patří např. sitosterol, campesterol, stigmasterol a další. Navázáním FA na volnou hydroxy- skupinu sterolů dochází ke vzniku sterol esterů (SE), kde nejznámějšími zástupci jsou cholesterol estery obsahující jako hlavní funkční strukturu cholesterol. Dále mohou být také přes hydroxy- skupinu cholesterolu navázány esterovou vazbou žlučové kyseliny, u kterých má koncový uhlík postranního řetězce karboxylovou funkci, oxysteroly, oxidované formy cholesterolu a struktury s otevřeným kruhem tzv. seko-steroly včetně vitamínu D3 [28; 29].



Obrázek 4: Struktura cholestanu včetně číslování cyklů a uhlíků [30].

Steroly jsou konečným produktem biosyntézy isoprenoidů za vzniku rozmanité skupiny cyklických a acyklických sloučenin z univerzálního stavebního C5 bloku isopentyldifosfátu vedoucího k C30 okysličenému isoprenoidu oxidosqualenu [24].

1.1.6. Ostatní kategorie lipidů

Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy (GP) jsou látky hrající důležitou roli v řadě buněčných funkcí. Jsou primárními složkami buněčných membrán, které jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou a působí jako polopropustné bariéry pro všechny buňky a orgány [9; 31]. Mají také signální funkci molekul a jsou nezbytné pro optimální fungování integrálních membránových proteinů, receptorů, transportérů a iontových kanálů. Dále jsou pak zásobárnou pro lipidové mediátory [31; 32].

Jedná se o amfipatické molekuly, jejichž obecná struktura zahrnuje tři hlavní složky: glycerolový skelet, funkcionalizovanou fosfátovou esterovou skupinu a mastné acylové (nebo alkyletherové) řetězce. Fosfátová část je esterifikována v poloze *sn*-3 glycerolového skeletu a je spojena s polární skupinou jako je např. cholin, ethanolamin, serin, inositol nebo glycerol [33]. Nepolární konec obsahuje dlouhé acylové řetězce FA, které jsou hydrofobní a ve vodném prostředí mají tendenci se agregovat. Polární konec je v důsledku ionizace fosfátové skupiny a dusíkaté báze nabitý a vykazuje hydrofilní vlastnosti [34]. Díky variabilitě v polárních skupinách a množství FA sem řadíme tisíce teoretických sloučenin [31]. Nejčastěji pozorovanou strukturou GP u eukaryot je pak diacylová (fosfatidylová) podtřída, ve které jsou esterifikovány FA v poloze *sn*-1 a *sn*-2 na glycerolu [33].

Prenolové lipidy

Prenoly jsou lineární alkoholy, difosfáty, atd., vznikající syntézou z 5-uhlíkových prekurzorů isopentyldifosfátu a dimethylalyldifosfátu, které jsou produkovány převážně prostřednictvím isoprenoidové dráhy (mevalonátové dráhy). Mezi jednoduché a důležité izoprenodiy patří např. karotenoidy, které fungují jako antioxidanty a některé i jako prekurzory vitamínu A. Další biologicky důležitou třídou jsou chinony a hydrochinony, které obsahují isoprenodini nepolární řetězec připojený k chinoidnímu jádru neisoprenoidního původu. Příkladem této třídy jsou vitamíny E, K a ubichinony. Struktury obsahující 40 a více uhlíků jsou pak známé jako polyterpeny [15; 16; 35].

Sfingolipidy

Sfingolipidy jsou charakteristické tím, že obsahují jako své jádro sfingoidní báze s dlouhým řetězcem. Vyskytují se v plazmatických membránách a podílejí se na buněčné signalizaci [15]. Jsou syntetizovány nejprve *de novo* ze serinu a mastného acyl CoA s dlouhým řetězcem za vzniku dihydrosfingosinu a poté dihydroceramidu, který se přeměňuje na ceramidy, fosfosfingolipidy, glykosfingolipidy a další. Polární části napojené na hydroxylovou skupinu sfingoidní báze v poloze C1, představují jednotlivé třídy sfingolipidů [35]. Nejhojněji vyskytující se sfingoidní bázi u savců je sfingosin a jeho hlavní podtřídou jsou ceramidy (N-acyl-sfingoidní báze), které mají mastnou kyselinu navázanou na amid. Mastné kyseliny zde zastupují zejména nasycené a mononasyčené FA s délkou řetězce od 14 do 26 uhlíků [16].

Sacharolipidy

Kategorie sacharolipidů byla vytvořena za účelem odlišení lipidů, ve kterých jsou mastné acylové skupiny přímo spojeny s páteří cukru [10]. U sacharolipidů chodí k náhradě glycerolové kostry (vyskytující se u GL a GP) cukrem. Mezi nejznámější zástupce této lipidové kategorie patří acylované glukosaminové prekurzory složky lipidu A lipopolysacharidů v gramnegativních bakteriích. Typickými molekulami lipidu A jsou disacharidy glukosaminu, které jsou derivatizovány až 7 mastnými kyselinami [16]. Sacharidolipidy se dále vyskytují ve formě glykanů či fosforylovaných derivátů [15].

Polyketidy

Polyketidy jsou strukturně rozmanitá skupina sekundárních metabolitů z živočišných, rostlinných a bakteriálních zdrojů [35]. Jsou syntetizovány polymerací acetylové

a propionylové podjednotky klasickými enzymy nebo i iterativními a multimodulárními enzymy, které sdílejí mechanické vlastnosti se syntázami mastných kyselin. Mnoho polyketidů jsou cyklické molekuly, jejichž skeletony jsou dále modifikovány glykosylací, methylací, hydroxylací, oxidací a/nebo jinými procesy. Velké množství běžně používaných antimikrobiálních látek, antiparazitických a protinádorových činidel jsou právě polyketidové deriváty [16].

1.2. Analýza nepolárních tříd lipidů

Lipidomika je vědní obor zabývající se analýzou lipidů. Jedná se o disciplínu studující strukturu a funkci celkového souboru lipidů (tzv. lipidomu) v dané buňce, tkáni nebo organismu a také jejich interakce s jinými buněčnými složkami [36]. Lipidom je podmnožinou metabolomu, který dále zahrnuje tři hlavní třídy biologických molekul: aminokyseliny, sacharidy a nukleotidy [5]. Poprvé se obor lipidomika objevil v roce 2003 [37] a v posledních letech značně pokročil zejména díky rozvoji hmotnostní spektrometrie [36]. Komplexní analýza lipidů je v kontextu genomiky a proteomiky rozhodující pro pochopení buněčné fyziologie a patologie a je považována za základní nástroj pro vyšetřování mnoha nemocí jako je např. ateroskleróza, Alzheimerova choroba, rakovina, a další. V důsledku toho se stala jedním z hlavních výzkumných cílů postgenomické revoluce a systémové biologie [5; 38].

1.2.1. Příprava vzorku

Pro získání spolehlivých výsledků je před vlastní analýzou lipidů důležitá úprava vzorku a jeho samotný odběr. Při přípravě vzorku je nutné postupovat nanejvýš opatrně, aby došlo k dosažení co nejvyšší reprodukovatelnosti a také pečlivě zvážit vhodný výběr rozpouštědel, činidel, množství vzorku, lipidových interních standardů a protokolů [39].

Pro analýzu biologického materiálu je nejvhodnější zpracování čerstvých vzorků, což však není vždy reálně proveditelné vzhledem k praktickým okolnostem, např. při odběru krevních vzorků v nemocnici a jejich lipidomické analýze prováděné na jiném místě. Při odběru je důležité, aby byly vzorky uchovány v nejvhodnějších nádobkách a udržovány při podmínkách, které neovlivní kvalitu vzorku. Nejlepší je bleskové zmrazení v kapalném dusíku a skladování při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího kroku zpracování [40]. Tímto způsobem mohou být některé biologické matrice bezpečně uchovávány až po dobu několika let [41]. Stabilita vzorku může být také prodloužena uchováváním vzorků v prostředí bez kyslíku, kovových iontů a peroxidů nebo přidáním antioxidantů, např. butylhydroxytoluenu, které by měli potlačit degradaci lipidů (per)oxidací [40]. Vzorky by také měly být alikvotovány, aby se zabránilo mrazicím a rozmrazovacím cyklům, které potenciálně stimulují hydrolýzu některých tříd lipidů [42; 43]. U krevních vzorků se ještě využívá přídatku antikoagulačního činidla, nejčastěji ethylendiamintetraoctové kyseliny nebo heparinu [44; 45].

U biologických vzorků je nezbytné rozložit buňky biologického materiálu, aby se zlepšil přenos hmoty do extrakčního rozpouštědla. K narušení této tuhé buněčné stěny

olejnaté biomasy se používá několik fyzikálních, mechanických, chemických a biologických (enzymatických) předúprav. Těmi se rozumí např. použití ultrazvuku či mikrovlnných, vysokorychlostních nebo vysokotlakých homogenizátorů, použití laseru, hydrodynamické kavitace a pulzního elektrického pole [46].

Další úprava vzorku zahrnuje zejména extrakci lipidů z komplexních biologických matric. Cílem tohoto kroku je odstranění interferujících látek jako jsou proteiny, sacharidy nebo jiné malé molekuly. Obecně existují dva způsoby, které se v lipidomické analýze nejvíce využívají, a to extrakce kapalinou a extrakce tuhou fází [38]. V případě extrakce kapalinou je nejkritičtější faktorem účinné extrakce lipidů výběr organického rozpouštědla. Nepolární lipidy se dobře rozpouštějí v nepolárních organických rozpouštědlech a polární lipidy naopak v polárních rozpouštědlech. Aby měla extrakce z biologických tekutin a tkání co nejvyšší rozsah, je zapotřebí použití směsi rozpouštědel obsahující jak polární, tak nepolární složku. Tento koncept byl poprvé zaveden Folchem a kol. [47], kteří vyvinuli extrakční metodu za použití směsi rozpouštědel chloroform/methanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) v poměru 2:1 (v/v) a následně tento postup modifikovali Bligh a Dyer [48], kteří použili opačný poměr rozpouštědel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2; v/v) a došlo tak k získání rychlé metody pro celkovou extrakci lipidů z biologických tkání. Tyto postupy mohou být dále upravovány pro zefektivnění extrakcí a za použití méně toxických rozpouštědel [46]. Mezi další extrakční metody patří např. protokol používající methyl-terc-butylether (MTBE) [49] nebo butanol-methanol (BUME) [50]. Pokud je však matrice vzorku nová, postup by měl být pečlivě vyhodnocen a zvážen. V případě extrakce pouze nepolárních lipidů, není zapotřebí používat směsi polárního a nepolárního rozpouštědla, ale pro takovouto extrakci postačí využití čistě nepolárního činidla, kde se s výhodou využívá např. hexanu [51; 52].

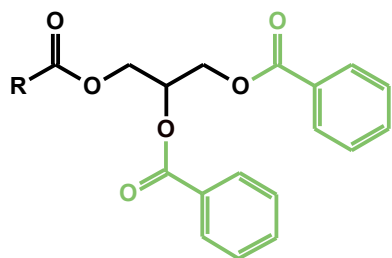
Často využívaným přístupem je také srážení bílkovin ve vzorcích pomocí organického rozpouštědla ještě před samotnou extrakcí, tzv. proteinová precipitace. Tyto metody jsou velmi jednoduché a rychlé [39]. Jako precipitační činidla se používají různá organická rozpouštědla, např. Satomi a kol. [53] ve své studii použili různé druhy alkoholů, jmenovitě izopropylalkohol (IPA), ethanol (EtOH), a MeOH. Antonelli a kol. [54] ve své studii využili směsi MeOH:EtOH (1:1; v/v) pro analýzu pokrývající široký rozsah polarit a Huynh a kol. [55] ve své studii používal směs BUME (1:1).

Stanovení nepolárních lipidů vedle sebe je velmi obtížné, neboť lipidy jako jsou TG a SE jsou v biologických vzorcích zastoupeny ve velmi vysokých koncentracích, na rozdíl od lipidů jako jsou MG, DG, FA a sterolů, které se zde vyskytují v řádově nižších koncentracích. Aby bylo možné stanovit tyto málo zastoupené lipidy vedle TG a SE v jedné

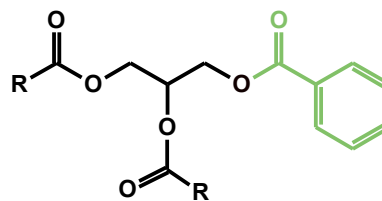
analýze, využívá se úpravy vzorku derivatizací, díky které se podstatně zvýší odezva signálu těchto tříd a zlepší se i účinnost extrakce [56]. Účinný, jednoduchý a vysoce reprodukovatelný způsob takovéto derivatizace vyvinul Peterka a kol. [57]. Jedná se o reakci s benzoylchloridem (BzCl), jakožto neškodným derivatizačním činidlem, prováděnou v přítomnosti pyridynu za pokojových podmínek. Benzoylchlorid je vysoce reaktivní činidlo, které snadno reaguje s hydroxylovými, primárními a částečně i se sekundárními aminoskupinami za vzniku odpovídajících esterů a také s karboxylovými kyselinami, kde vznikají příslušné anhydridy. TG a sterolestery se této reakce neúčastní, neboť neobsahují volnou funkční skupinu, která by mohla s BzCl reagovat a zůstanou tak v nezměněném stavu. Benzoylace těchto polárních funkčních skupin mění polaritu reakčních produktů na méně polární molekuly, neboť počáteční polární funkční skupina je pokryta nepolární benzoylovou částí. MG a DG vždy reagují ve všech polohách a jejich výsledná polarita se pak blíží nepolárním TG s krátkými mastnými acylovými řetězci. Snadno reaguje také hydroxylová skupina ve sterolech a karboxylová skupina v mastných kyselinách, přičemž mastné kyseliny tvoří anhydridy. Struktury výsledných produktů derivatizace jsou znázorněny na **obr. 5**.

Správná lipidomická analýza také zahrnuje přidání lipidových interních standardů (IS) před samotnou extrakcí, aby se usnadnilo sledování výtěžnosti a absolutní kvantifikace. IS je analyzován současně s analytem, čímž se kompenzují změny ve zpracování vzorku během celého procesu přípravy a samotné analýzy vzorků (např. změny v účinnosti extrakce či matricové efekty). Základním předpokladem lipidomické kvantitativní analýzy je použití nejméně jednoho IS, který se nevyskytuje ve vzorku, pro jednu lipidovou třídu. V ideálním případě by IS a analyt měly být strukturně podobné a měly poskytovat shodné fragmenty, což splňuje využití stabilního izotopu příslušného analytu. Nejčastěji se jedná o látky značené izotopem deuteria či ^{13}C . Izotopicky značený IS ale nemusí být vždy komerčně dostupný. Používají se tedy také lipidy obsahující kratší acylové řetězce (např. 12:0) nebo řetězce s lichým počtem uhlíků (např. 17:0, 19:0) [39; 58]. Nyní jsou komerčně nabízeny už předem připravené směsi IS, např. pro kvantitativní analýzu lidské plazmy je dostupná směs IS zvaná SPLASH[®]LIPIDOMIX[®] od společnosti Avanti Polar Lipids [59].

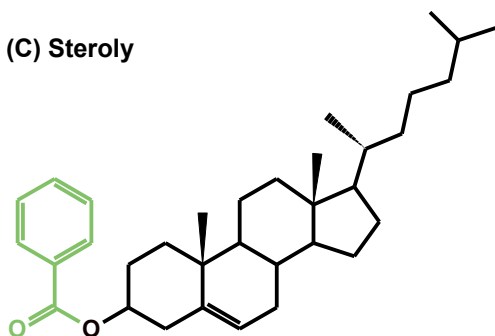
(A) Monoacylglyceroly



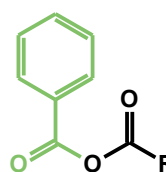
(B) Diacylglyceroly



(C) Steroly



(D) Mastné kyseliny



Obrázek 5: Struktury výsledných produktů derivatizace nepolárních lipidů a mastných kyselin. Převzato z publikace [57].

1.3. Analytické přístupy v lipidomice

Lipidomická analýza přináší díky různorodosti lipidů obrovskou výzvu v oblasti analytické chemie. Velmi účinnými přístupy v této oblasti jsou zejména hmotnostní spektrometrie (MS), nukleární magnetická rezonance a další spektrální techniky. Strategie MS s přímou infúzí bez předchozí separace je velmi rychlou metodou umožňující identifikaci lipidů s vysokou citlivostí a robustností. Každopádně tyto metody nejsou tak účinné pro analýzu komplexních biologických vzorků. Proto se v lipidomice hojně využívá spojení různých chromatografických metod jako jsou tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a kapilární elektroforéza s MS jako detekcí, které zajišťují analýzu lipidů s vysokým rozlišením. I přesto, že je použití MS ve spojení se separačními technikami časově náročnější, lze tímto způsobem získat komplexní informace o velkém množství lipidů ve vzorku [38]. V současné době jsou v lipidomice nejvíce využívány metody kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s MS či tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) a metody přímé infúze ve spojení s MS(/MS) [60].

V dnešní době byla klasická HPLC metoda téměř nahrazena ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC), která oproti konvenční HPLC (kolony o velikosti částic 3–5 μm) využívá kolony s částicemi menšími než 2 μm (tzv. sub-2 μm). Díky tomu UHPLC nabízí schopnost dosáhnout rychlejší separace a vyššího rozlišení za použití nižších objemů rozpouštědel, než je tomu u HPLC [61; 62]. Využívané typy stacionárních fází jsou shrnuty v **tabulce 1**.

Tabulka 1: Přehled používaných stacionárních fází v UHPLC s příklady komerčně dostupných kolon.

typ stacionární fáze	velikost částic	příklad kolony	
porézní částice	1.6 μm	Luna Omega Column (Phenomenex)*	[63]
povrchově porézní částice s pevným jádrem („fused-core“, „core-shell“)	1.3 a 1.7 μm	Kinetex® (Phenomenex)*	[64]
zcela porézní hybridní částice (BEH)	1.7 μm	Acquity BEH C18 (Waters)*	[62]
hybridní částice s nabitým povrchem	1.7 μm	Acquity CSH C18 Acquity CSH Phenyl- Hexyl (Waters)*	[65]
monolytické kolony			
monolytický silikagel	4.6–2 mm	Chromolith® PerformanceRP-18 endcapped (Supelco)*	[66]
kapilární kolony			
všechny výše zmíněné druhy	1–2 μm		[67; 68]

* příklady kolon převzaty z oficiálních webových stránek distributorů kolon.

1.3.1. Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi

UHPLC v systému s obrácenými fázemi (RP-UHPLC) ve spojení s MS detekcí je velmi využívaný přístup v lipidomické analýze jednotlivých lipidů v různých biologických vzorcích. Jako mobilních fází (MF) se zde využívá vodných směsí obsahujících polární organická rozpouštědla, jmenovitě acetonitril (ACN), MeOH a IPA s přidavkem aditiv, např. octanu nebo mravenčanu amonného (5–10 mM) s kyselinou octovou či mravenčí (0.05–0.1 %), které zlepšují jak separaci, tak ionizaci lipidů v iontovém zdroji. Stacionární fáze (SF) má nepolární charakter a využívá se silikagelu modifikovaného nejčastěji C18 či C8 částicemi [60; 69]. Další možností je použití kapilárních kolon, které zvyšují citlivost měření [70]. Režim RP umožňuje separaci polárních lipidových druhů [69], zatímco UHPLC v systému s nevodnými obrácenými fázemi (NARP-UHPLC) je preferována pro nepolární lipidy jako jsou TG [71; 72].

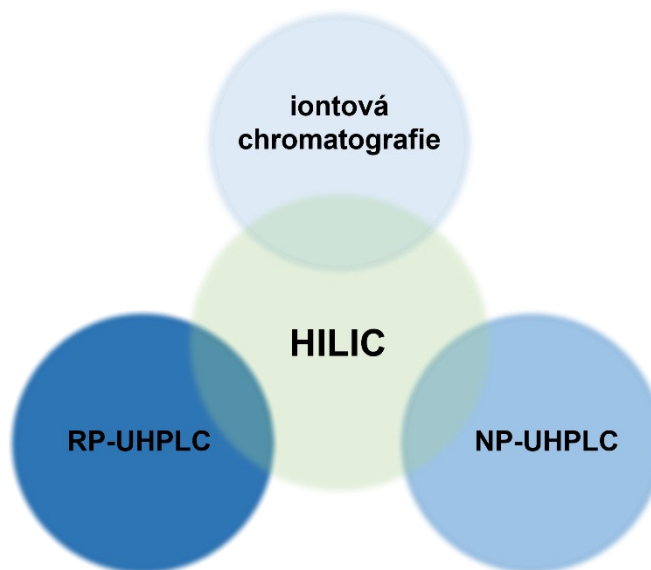
V RP systémech se lipidy dělí na základě délky mastného acylového řetězce (CN) a počtu dvojných vazeb (DB), což lze definovat jako ekvivalentní počet uhlíkových atomů

(ECN). Tato hodnota je vypočítaná jako celkový počet atomů uhlíku v mastné kyselině minus dvojnásobek dvojných vazeb, které daná FA obsahuje ($ECN = CN - 2DB$). Původně bylo ECN vyvinuto pro TG a ostatní nepolární lipidy [51; 73], ale je aplikovatelné i pro polární třídy [74]. Lipidy obsahující delší acylové řetězce jsou z kolony eluovány později než lipidy s kratším řetězcem a stejně tak nasycené struktury jsou eluovány později než nenasycené [60; 69]. Nepolární lipidy mají v RP režimu nejvyšší retenci, zatímco polární lipidy jako např. fosfolipidy jsou zadržovány méně [69].

1.3.2. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), je alternativní způsob UHPLC pro separaci polárních a iontových látek. HILIC využívá hydrofilních SF jako je silikagel a jeho modifikace, např. amino či kyano, ale také iontoměničové, zwitterionové, monolitické či amidové (např. BEH) stacionární fáze. MF obsahuje organické rozpouštědlo, nejčastěji se jedná o ACN, a přídavek vody v rozsahu obvykle 5–40 %. Použití vody jako silně eluujícího rozpouštědla poskytuje této metodě řadu výhod oproti konvenční UHPLC s normálními fázemi (NP-UHPLC), např. příprava mobilní fáze, která je zde méně komplikovaná, neboť odpadá kontrola množství vody v rozpouštědle. Do vodné MF se také v případě spojení s MS přidávají aditiva, a to obvykle mravenčan či octan amonný [75; 76].

V HILIC chromatografii jsou molekuly vody z MF přitahovány polárními skupinami SF a vzniká tak imobilizovaná vrstva. Retence je dána pohybem polárních analytů mezi touto imobilizovanou vrstvou a protékající MF (čím více polární, tím delší retence na koloně) [77; 78]. Do děje se mohou zapojit i další typy interakcí, např. adsorpce nebo elektrostatické a dipól-dipól interakce [78; 79]. HILIC také umožňuje analýzu nabitých látek, stejně jako iontová chromatografie. **Obr. 6** znázorňuje, jak HILIC doplňuje iontovou chromatografii, NP-UHPLC a RP-UHPLC a rozšiřuje tak rozsah možností separace polárních a iontových analytů [80].



Obrázek 6: HILIC kombinuje vlastnosti těchto tří hlavních metod kapalinové chromatografie [80].

RP-UHPLC ... Ultravysokoučinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi
 a NP-UHPLC ... Ultravysokoučinné kapalinové chromatografie v systému s normálními fázemi

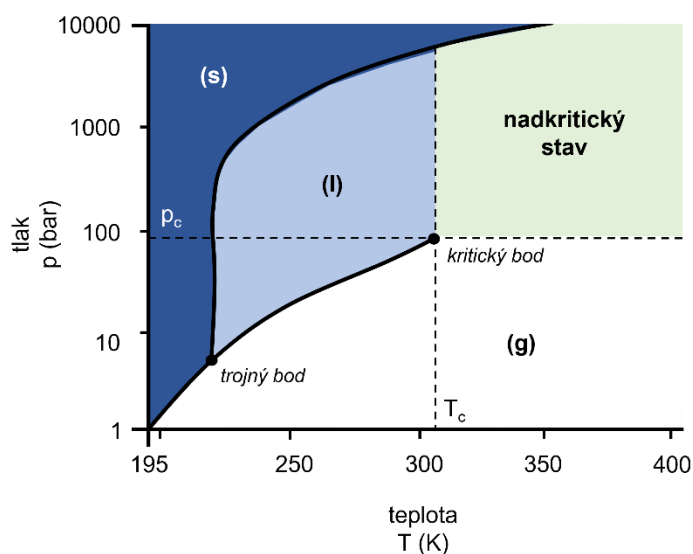
1.3.3. Superkritická fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie je stále oblíbenější separační technikou používanou v lipidomice. Považuje se za hybrid GC a LC a má mnoho výhod, mezi které patří vysoká účinnost separace, nízká spotřeba organického rozpouštědla a krátká doba analýzy. Doba analýzy pomocí SFC je až čtyřnásobně kratší při srovnání LC a SFC se stejnými parametry kolony (vnitřní průměr, délka a velikost částic), potřebnými pro vysoce výkonnou separaci [8]. Tento chromatografický mód je vhodný zejména pro analýzu málo polárních sloučenin, jelikož nadkritický oxid uhličitý ($scCO_2$), využívaný jako MF, je nepolární rozpouštědlo, často srovnávané polaritou s hexanem.

1.3.3.1. Mobilní fáze v SFC

Mobilní fázi v SFC tvoří tekutiny v nadkritickém stavu. Jedná se o látky, které se vyskytují ve stavu při vyšší teplotě a tlaku, než jsou její kritické hodnoty. V kritickém bodě jsou si hodnoty hustoty kapaliny a plynu rovny a dochází ke vzniku nadkritické tekutiny jako jedné fáze bez fázového rozhraní. Nejběžnější definice superkritického stavu je založena na p-T diagramu zobrazujícího rovnovážné chování sloučeniny ve fázi pára-kapalina (**obr. 7**) [81 – 83]. Nadkritická tekutina kombinuje užitečné vlastnosti plynů a kapalin a její využití jako MF proto přináší několik výhod. Mezi tyto vlastnosti patří vysoká solvatační síla kapalin

umožňující analyzovat široké spektrum látek, nízká viskozita, která je typická pro plyny, a umožňuje použití delších kolon naplněných malými částicemi, při nižších systémových tlacích a při vyšších rychlostech průtoku než je tomu v UHPLC. Dále také vysoké difúzní koeficienty rozpuštěných látek v nadkritické tekutině, které vedou k rychlejší eluci látek z kolony a tím ke kratší analýze a vysoké separační účinnosti. Rychlejší je i ekvibrace chromatografické kolony, což umožní kratší analýzy i při gradientové eluci a v neposlední řadě je nižší i vznikající zpětný tlak [84; 82; 81].



Obrázek 7: Fázový p-T diagram pro oxid uhličitý [81].

(s) ... pevné, (l) ... kapalné, (g) ... plynné skupenství, p_c ... kritický tlak, T_c ... kritická teplota

Dnes je jako nejpoužívanější MF v SFC oxid uhličitý v nadkritickém stavu, který je také jedinou tekutinou, pro kterou jsou dnes dostupné komerční chromatografické systémy [85]. Tento stav CO_2 popsal jako „kritický“ poprvé v roce 1869 Andrews [86], který určil hodnoty pro jeho kritickou teplotu 31°C a kritický tlak 74 bar. Poprvé však scCO_2 použil jako mobilní fázi v SFC až v roce 1966 Sie a kol. [87].

Velkou výhodou scCO_2 je, že v nízkých koncentracích není toxický pro člověka, je chemicky inertní vůči většině chemických sloučenin, nehořlavý, bez zápachu a levný [8]. Je také mísitelný s organickými rozpouštědly v širokém rozmezí polarit, tlaků a teplot, chemicky stabilní a lze snadno dosáhnout jeho kritických parametrů [82].

Solvatační síla nadkritické mobilní fáze je parametr, který závisí na hustotě tekutiny, a proto je hustota často považována za nejdůležitější parametr v SFC, zejména při použití čistého scCO_2 . Hustota je definována dvěma veličinami, teplotou a tlakem v systému. Díky tomu byly

tyto dva parametry používány jako hlavní faktory ovlivňující eluci v původním uspořádání SFC s plně nadkritickou mobilní fází. Nicméně se změnou teploty nebo tlaku se polarita CO₂ příliš nemění. CO₂ vykazuje vysoce lipofilní vlastnosti, podobné vlastnostem hexanu či heptanu, což omezuje použití čistého scCO₂ pro analýzu pouze lipofilních sloučenin a je tedy téměř nemožné analyzovat polární látky. V případě moderních SFC přístrojů se proto využívá přídavku organického modifikátoru pomocí izokratické či gradientové eluce. Nejčastěji se využívá MeOH, EtOH, ACN a IPA s možností přídavku malého procenta vody (v řádech jednotek %). Díky tomu je SFC velmi všestrannou technikou, která umožňuje rozdělení velmi široké škály sloučenin pouze jedním systémem kombinujícím MF obsahující scCO₂ a SF založenou buď na polárním či nepolárním charakteru. Důležitou připomínkou je, že přídavkem organického modifikátoru se zvýší eluční síla, ale dojde k posunu kritických hodnot teploty a tlaku. Např. při obsahu 30 % MeOH jako organického modifikátoru dojde k nárůstu kritických hodnot na $T_c = 135\text{ °C}$ a $p_c = 168\text{ bar}$. V současných SFC kolonových termostatech ($T = 40\text{ °C}$) však nelze takto vysokou teplotu nastavit, a proto při vyšším obsahu organického modifikátoru se již nepohybujeme striktně v nadkritickém stavu. Při takovýchto podmínkách klesá významnost vlivu teploty a tlaku na eluční sílu mobilní fáze, ale i tak je nadále důležité je kontrolovat, aby nebyla ovlivněna stabilita retenčních časů. I přesto, že binární mobilní fáze scCO₂ s organickým modifikátorem není v nadkritickém stavu, ale pouze v tzv. subkritickém stavu, její výhodné vlastnosti pro separaci zůstávají zachovány. Podobně jako v UHPLC, zde můžeme také eluci acidobazicky aktivních látek dále podpořit přídavkem aditiv jako jsou kyseliny, báze nebo soli rozpustné v dané mobilní fázi [81; 82; 88].

1.3.3.2. Stacionární fáze v SFC

SFC technika je s výhodou užívána jak pro chirální, tak achirální separace. Na rozdíl od UHPLC, kde jsou využívány různé separační módy od NP přes RP, HILIC a iontově výměnnou chromatografii, v SFC lze separovat široké spektrum látek s různými polaritami s použitím jedné mobilní fáze (scCO₂) v kombinaci s různými polárními i nepolárními SF [89; 90]. Nejvíce se využívají SF na bázi silikagelu nebo hybridní. V podstatě lze říci, že většinu stacionárních fází využívaných v UHPLC lze využít také v SFC, a to jak při chirálních separacích, tak i achirálních. Výjimku tvoří kolony optimalizované pro RP-UHPLC, které nemusí být pro SFC optimální [81; 82]. Neexistuje zde univerzální stacionární fáze jako je tomu v RP-UHPLC v případě C18 a volba je proto mnohem složitější. Klasifikací a popisem stacionárních fází se detailněji zabývá ve svých pracích West a kol. [91 – 93], která dělí SF

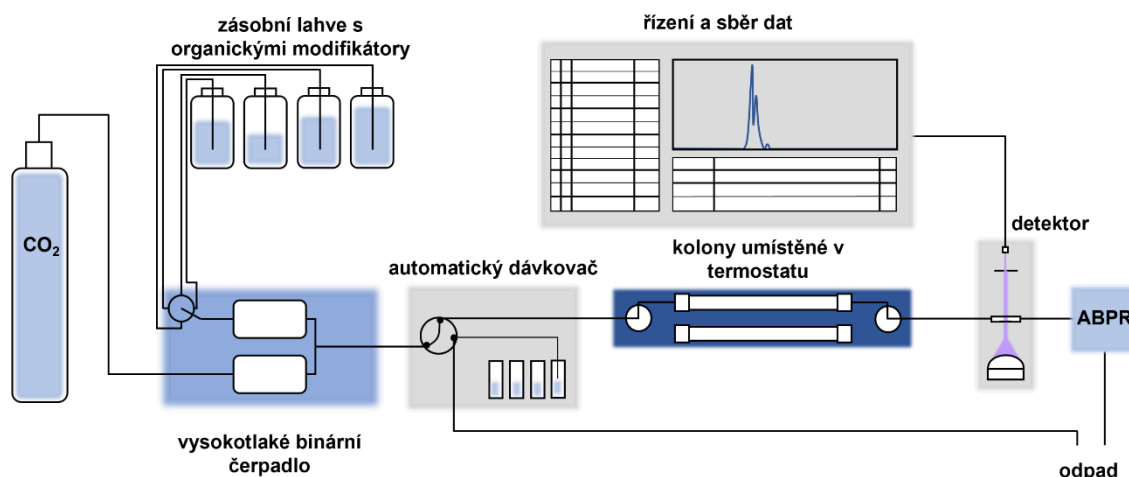
pro SFC na (1) polární, (2) nepolární, (3) aromatické, (4) polární s vloženou funkční skupinou a (5) vícemodální [82].

Existuje několik stacionárních fází, které byly vyvinuty speciálně pro SFC, a to konkrétně pro achirální separace. První takovou stacionární fází byla 2-ethyl-pyridinová (2-EP) fáze vázaná na silikagelový nosič v roce 2001 od firmy Princeton Chromatography [82; 90]. Za ní následovaly další jako 4-ethylpyridin, pyridin-amid, morfolin, propylacetamid, benzamid, aminofenyl, diethylamin, 2-pikolyamin, 1-aminoantracen představené známými výrobci chromatografických kolon jako jsou Phenomenex, Waters a ES Industries [81; 82; 90; 94]. SF pro SFC chirální separace jsou stejné s fázemi pro UHPLC, nicméně výrobci mohou použít například odlišnou technologii plnění kolon, rozměry samotných kolon či doporučit jiný způsob uchovávání fází. Většina chirálních separací ať už na SFC či UHPLC je nyní prováděna s využitím stacionárních fází na bázi polysacharidů včetně široké škály derivátů amylozy a celulózy [82; 95; 96].

1.3.3.3. Instrumentace v SFC

Moderní SFC přístroje jsou velmi podobné přístrojům UHPLC a liší se pouze několika částmi. Externě se jedná hlavně o přidavek regulátoru zpětného tlaku, nejčastěji je to automatický regulátor zpětného tlaku (ABPR). Toto zařízení slouží jako regulační ventil, který udržuje nastavený tlak uvnitř systému. [89]. Významnými rozdíly jsou také podoba binárního čerpadla, úpravy automatického dávkovače a přidavek odplyňovače rozpouštědla. Dále pak SFC přístroje obsahují kolonový termostat a detektor. Celá SFC instrumentace je znázorněna na **obr. 8**. Ovládací software je totožný se softwarem používaným v UHPLC, s výjimkou přídatné regulační veličiny výstupního tlaku kolony [97].

V SFC jsou binární čerpadla nezbytná, jelikož obě složky mobilní fáze, scCO_2 a organický modifikátor, mají naprosto odlišné vlastnosti, co se týče hustoty a stlačitelnosti. CO_2 je většinou dodáván v ocelových lahvích obsahující zkapalněný CO_2 s plynným prostorem nad kapalinou a modifikátor je kapalina při laboratorních podmínkách. Tento nesoulad tlaků vyžaduje samostatná čerpadla. Čerpání CO_2 probíhá vždy v kapalném stavu a je proto nutné čerpadlo CO_2 ještě ochladit, a to zhruba na 2–5 °C [81; 97].



Obrázek 8: Schéma instrumentace SFC [81].

CO₂ ... tlaková láhev s CO₂, ABPR ... automatický regulátor zpětného tlaku

Regulace zpětného tlaku je nejdůležitějším úkolem v systémech SFC kvůli významnému dopadu změn tlaku na robustnost přístroje. Přestože tlak je až sekundární kontrolní proměnnou a má jen malý vliv na retenci a selektivitu v moderní SFC, výsledné změny retenčních časů v důsledku nerovnoměrnosti tlaku jsou nežádoucí. Moderní ABPR mohou mít různé konstrukce a umožňují nastavení a kontroly tlaku přímo v softwaru s přesností ± 0.05 bar. Přesná regulace tlaku tak umožňuje získání opakovatelných retenčních časů a stabilní základní linie. Zásadním rozdílem od UHPLC je umístění regulátoru. V UHPLC mobilní fáze vstupuje do kolony při vysokém tlaku a z kolony vystupuje při tlaku výrazně nižším, což neplatí pro SFC. V SFC je regulátor umístěný za chromatografickým systémem a mobilní fáze je tak po celou dobu pod kontrolou tlaku. Výsledný celkový tlak v SFC je pak dán součtem tlaku nastaveného na ABPR a tlaku generovaného jednotlivými komponentami systému [81; 82; 97].

Stejně jako u LC dalo použití menších částic sorbentu vznik metody UHPLC, tak v SFC použití částic menších než $2 \mu\text{m}$ odpovídá ultravysokoúčinné superkritické fluidní chromatografii (UHPSFC). Tato strategie se dá využít pro vysoceúčinnou analýzu s vysokým rozlišením, je ale nutné mít přístroje, které odolávají vysokým tlakovým ztrátám (ideálně 600 bar) a to zejména jsou-li vyžadovány separace s vysokým rozlišením [98]. Stále častěji jsou nabízeny komerční SFC kolony s částicemi sub- $2 \mu\text{m}$, což tuto techniku významně pozvedlo nad ostatní techniky pro vysoce výkonné analýzy [84; 92; 99]. Spolu s použitím těchto částic se také velmi rozšířilo použití povrchově porézních částic (například tzv. „core-shell“), s cílem

dosažení podobné účinnosti, ale při mnohem vyšší rychlosti a bez vyšších tlakových ztrát [92; 98; 100; 101].

1.3.3.4. Retenční mechanismus v SFC

V UHPSFC se uplatňují dva retenční mechanismy na základě použitých chromatografických podmínek. Jedná se o separaci tříd lipidů a separaci jednotlivých druhů lipidů. Pro separace tříd lipidů se využívá polárních SF a dochází k dělení na základě rozdílných polarit tříd a složení mastných acylů (retenční čas roste s množstvím dvojných vazeb). U druhů lišících se délkou mastného řetězce je pozorován další způsob separace, který je pro jednotlivé třídy různý. U TG a ostatních nepolárních tříd zahrnujících CE, FA, MG, DG, mastné amidy a ceramidy se retenční čas zvyšuje s délkou řetězce. Naopak pro polární třídy, zahrnující například fosfolipidy, se retenční časy s rostoucí délkou mastného řetězce zkracují. Obecně retenční mechanismus v UHPSFC vzájemně souvisí s UHPLC v režimu HILIC či NP-HPLC. Retenční časy nepolárních lipidů se zvyšují s rostoucím množstvím DB jak v UHPSFC, tak v NP-HPLC, nicméně v UHPSFC se navíc částečně separují na základě délky acylového řetězce. V režimu HILIC není pozorována žádná separace na základě 0–3 dvojných vazeb, pokud ale látka obsahuje 4 a více DB, je systémem čím dál tím méně zadržována, což je opakem UHPSFC. Na druhé straně jsou pozorovány v režimu HILIC nižší retenční časy pro delší acylové řetězce, což je stejné i pro UHPSFC. Ukazuje to, že retenční mechanismus v UHPSFC je smíšený a přechází z NP mechanismu pro nepolární lipidy na HILIC mechanismus pro lipidy polární [102].

Separace jednotlivých druhů lipidů je méně obvyklý přístup separace lipidů, který využívá hydrofobních SF a retenční mechanismus je porovnatelný s bezvodým RP-UHPLC. Na rozdíl od klasické UHPSFC, kde jsou lipidy z jedné třídy eluovány v jednom píku, probíhá v UHPSFC, s retenčním mechanismem podobným RP, separace jednotlivých lipidů. Retence je způsobena na základě ECN, kde lipidy s vysokým ECN eluují později než lipidy s nižším ECN, které jsou systémem zadržovány méně. Tento specifický RP režim v UHPSFC je omezen na úzký aplikační rozsah a není vhodný pro středně polární až polární analyty [103].

1.3.3.5. Využití SFC

SFC a zejména pak UHPSFC ukazuje veliký potenciál jako komplexní a vysoce výkonná screeningová metoda pro velký počet vzorků v různých oblastech jako je farmaceutický výzkum, bioanalýza, analýza potravin a rostlinného materiálu, omické

analýzy, včetně lipidomiky a mnoho dalších [102; 104]. V **tabulce 2** je zobrazen výběr využití UHPSFC pro analýzu lipidů v různých vzorcích.

Tabulka 2: Vybrané příklady UHPSFC/MS analýzy lipidů v různých vzorcích [103].

vzorek	kolona (rozměry)	modifikátor + aditiva	pomocné rozpuštědlo	lipidové třídy	polarita měření
separace tříd lipidů (podobná HILIC)					
borovicová kůra [105]	Torus 2-PIC (3 × 50 mm; 1.7 μm)	MeOH/ACN (1:1; v/v) + 25 mM AF	MeOH/IPA/H ₂ O (7:2:1; v/v/v)	TG, DG, MG, ST, SE, FFA, WE	(+) a (-)
semena Slzovky obecné [106]	Torus 2-PIC (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/ACN (9:1; v/v)	MeOH + 0.2 mM AA	TG, DG	(+)
králičí plazma [107]	Torus DEA (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/H ₂ O (95:5; v/v) + 0.1 % AA	MeOH/H ₂ O (95:5; v/v) + 0.1 % AA	PC, PE, PI, LPC, LPE, SM, Cer, SE, MG, DG, TG, FFA	(+) a (-)
kravské, bůvolí, kozí a lidské mléko [108]	Torus DIOL (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH + 30 mM AA + 0.3 % FAc	MeOH + 1 % H ₂ O	TG, DG, MG, FA, PC, PE, PI, PS, PG, SM, LPC, LPE	(+) a (-)
prasečí plicní tepna [109]	Torus DIOL (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH + 10 mM AF	MeOH + 10 mM AF	TG, MG, FA, ST, PC, SM	(+) a (-)
lidská plazma a sérum [110]	BEH (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v) + 30 mM AA	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v) + 30 mM AA	SE, TG, DG, MG, Cer, PC, LPC, SM	(+)
prasečí mozek [102]	BEH (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v) + 30 mM AA	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v)	SE, TG, DG, MG, FA, Cer, HexCer, PG, PE, LPE, LPI, CL, PC, LPC, PS, SM	(+) a (-)
semena bavlny [111]	BEH (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/ACN (7:3; v/v) + 8 mM AF + 0.5 % FAc	MeOH + 0.1 % FAc	TG, DG, NAPE, PC	(+)
kryší mozek [112]	BEH (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v) + 30 mM AA	MeOH/H ₂ O (99:1; v/v)	FA, PC, LPC, PE, LPE	(+) a (-)

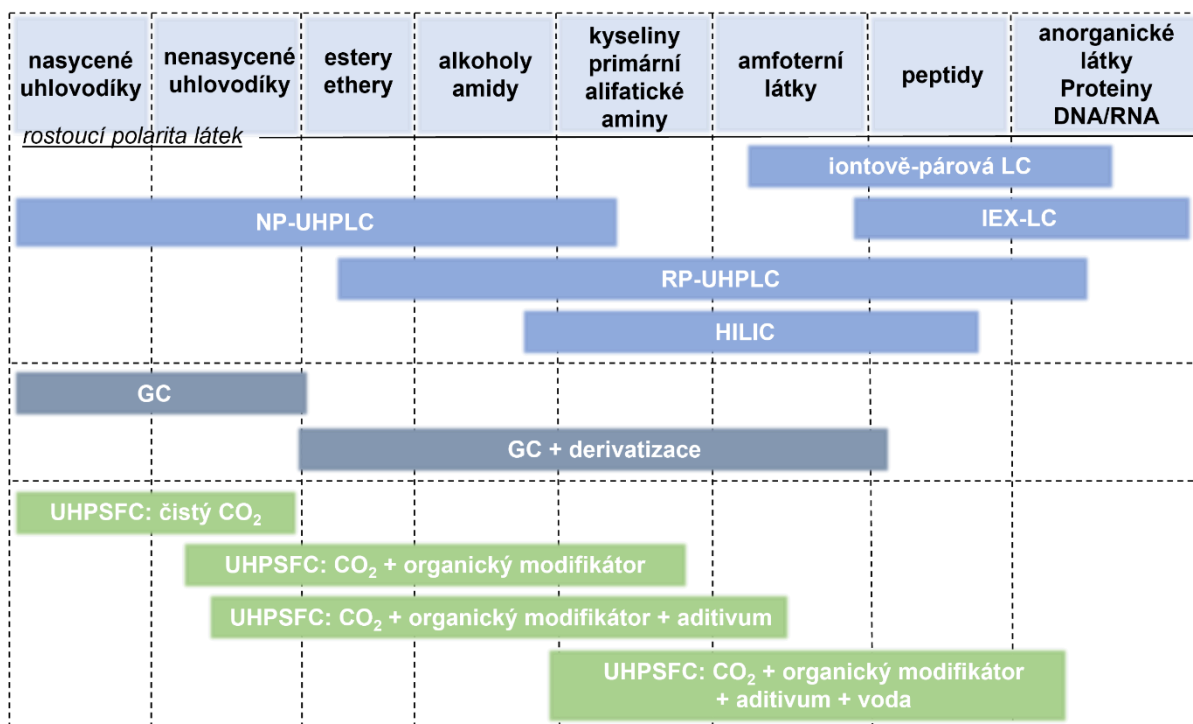
Tabulka 2: pokračování...

vzorek	kolona (rozměry)	modifikátor + aditiva	pomocné rozpouštědlo	lipidové třídy	polarita měření
separace jednotlivých druhů lipidů (podobná RP)					
borůvky [113]	HSS C18 SB (3 × 100 mm; 1.8 μm)	MeOH + 32 mM AF	-	TG, DG, WE, SE, ASG, FFA, PC, PE, PI, PS, LPG	(+) a (-)
rybí olej [114]	HSS C18 SB (3 × 100 mm; 1.8 μm)	MeOH + 0.1 % FAc	MeOH + 10 mM AA	FAME, TG, DG, MG, FFA	(+) a (-)
semena bavlny [111]	HSS C18 SB (3 × 100 mm; 1.8 μm)	MeOH + 32 mM AF	MeOH + 0.1 % FAc	TG, FFA	(+)
Ženšen pravý [115]	Torus 2-PIC (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH	MeOH + 0.2 mM AA	TG, DG, MG, SI, PC, FA	(+) a (-)
lidská plazma [116]	Torus 1-AA (3 × 100 mm; 1.7 μm)	MeOH + 0.1 % AAc	MeOH	Oxylipiny	(-)
lidský mléčný tuk [117]	BEH-2EP (3 × 150 mm; 1.7 μm)	EtOH/ACN (1:1; v/v)	10 mM AF	TG	(+)
jedlé oleje [118]	CHIRALPAK® IG (3 × 150 mm; 1.6 μm)	MeOH/ACN (1:9; v/v)	MeOH + 0.1 % AF	TG	-

Vysvětlení symbolů: (+) pozitivní mód, (-) negativní mód

AA ... octan amonný, AAc ... kyselina octová, ACN ... acetonitril, AF ... mravenčan amonný, ASG ... acylované sterolové glukosidy, Cer ... ceramidy, CL ... kardiolipiny, DG ... diacylglyceroly, FAc ... kyselina mravenčí, FAME ... methyl estery mastných kyselin, FFA ... volné mastné kyseliny, HexCer ... hexosylceramidy, HILIC ... hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, H₂O ... voda, IPA ... izopropylalkohol, LPC ... lysofosfatidylcholin, LPE ... lysofosfatidylethanolamin, LPG ... lysofosfatidylglycerol, LPI ... lysofosfatidylinositol, MeOH ... methanol, MG ... monoacylglyceroly, mM ... milimolární, NAPE ... *N*-acyllysofosfatidylethanolamin, PC ... fosfatidylcholin, PE ... fosfatidylethanolamin, PG ... fosfatidylglycerol, PI ... fosfatidylinositol, PS ... fosfatidylserin, RP ... systém s obrácenými fázemi, SE ... sterol estery, SI ... sitosterol, SM ... sfingomyelin, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly, WE ... estery vosků

Na **obr. 9** je znázorněno shrnutí látek, které dokáže SFC účinně analyzovat ve srovnání s ostatními druhy separačních technik



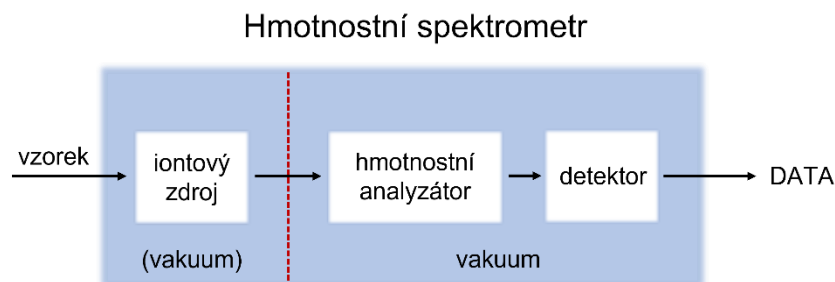
Obrázek 9: Porovnání rozsahu použití UHPSFC s ostatními druhy chromatografie [104].

CO₂ ... oxid uhličitý, GC ... plynová chromatografie, HILIC ... hydrofilní interakční chromatografie, IEX-LC ... iontově výměnná kapalinová chromatografie, NP-UHPLC ... ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi, RP-UHPLC ... ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi, UHPSFC ... ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie

1.3.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je vhodnou volbou pro širokou škálu aplikací zahrnujících stanovení stopových sloučenin v komplexních maticích a je systematicky využívána v oblasti biologické analýzy, reakčního monitorování, farmaceutických studií, analýzy rostlinných extraktů a omických studií, zahrnujících metabolomiku, proteomiku a lipidomiku [119]. Pro lipidomickou analýzu se stala klíčovou technikou a její propojení se separačními technikami umožňuje identifikaci stovek lipidů, včetně izomerních a izobarických forem [103]. Jedná se o analytickou metodu, která slouží k převedení látek na ionty s následujícím rozlišením na základě poměru hmotnosti ku náboji, m/z , a záznamu jejich intenzit. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (**obr. 10**). Kromě molekulové hmotnosti a informace o množství složek ve vzorku můžeme

touto technikou také získat informace o strukturním uspořádání atomů, což ve spojení s vysokou citlivostí a rychlostí dělá z této techniky velmi účinnou metodu analýzy [120].



Obrázek 10: Hmotnostní spektrometr a jeho základní části [121].

1.3.4.1. Ionizační techniky

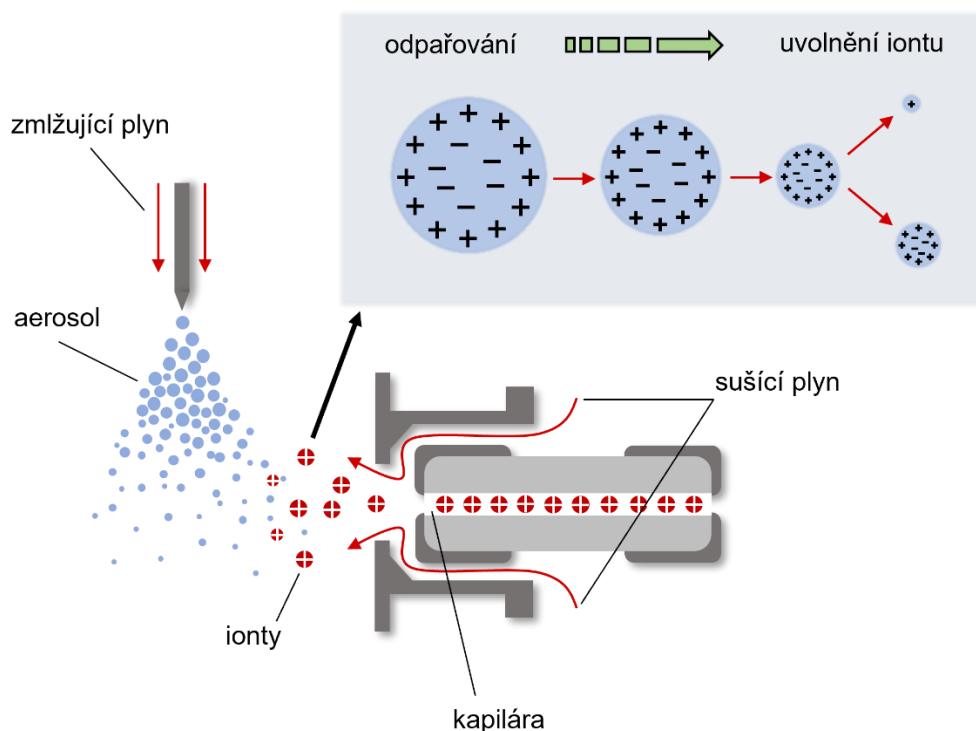
Ionizace neboli převedení sledovaných analytů na ionty v plynné fázi je jedním z nejdůležitějších procesů v MS. Historicky nejčastěji používané ionizační techniky (např. elektronová nebo chemická ionizace) probíhají ve dvou krocích: odpaření a následná ionizace vzorku. Tento způsob je však omezen na analyty, které mají relativně malou molekulovou hmotnost a jsou tepelně stabilní. Vzhledem k tomu, že většina biologických sloučenin má relativně vysokou molekulovou hmotnost a jejich vysoké polarizability výrazně snižují jejich těkavost, bylo jejich použití pro analýzu biologického materiálu značně omezeno. V posledních desetiletích však došlo k vývoji několika nových ionizačních technik, umožňujících ionizaci téměř jakkoliv velké, netěkavé a tepelně labilní sloučeniny. Mezi v současnosti nejpoužívanější techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI) a laserová ionizace/desorpce za přítomnosti matrice (MALDI) [120].

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem je dnes nejpoužívanější technikou pro analýzu vzorků v kapalně fázi, patřící spolu s chemickou ionizací a fotoionizací mezi ionizační techniky prováděné při atmosférickém tlaku [122]. Jedná se o měkkou ionizační techniku, při které téměř nevznikají fragmentové ionty a pomocí které lze ionizovat středně polární až iontové molekuly s hmotností až v řádech 10–100 tisíců Da. Díky tomu, že ionizace látky probíhá přímo z kapalně formy, je kompatibilní s tradičními chromatografickými technikami široce využívanými v analytické chemii. Ionty vzniklé touto ionizací jsou velmi stabilní, neboť se nevyskytují v excitovaném stavu, což zabraňuje jejich rychlému rozpadu. Velkou výhodou je možnost tvorby vícenásobně nabitých iontů u biopolymerů, čehož se využívá zejména

v proteomice. Pro malé molekuly jsou produkovány protonované $[M + H]^+$ či deprotonované $[M - H]^-$ ionty podle zvolené polaritě záznamu, případně adukty se sodným či draselným iontem, atd. [104; 123].

Schéma klasického ESI je zobrazeno na **obr. 11**. Vzorek je přiváděn do sprejovací kapiláry (nejčastěji nerezové), na kterou je vloženo vysoké napětí (zpravidla 3–4 kV). Tato kapilára se chová jako anoda a katodou k ní je vstup do hmotnostního spektrometru. Působením elektrostatických sil a podpůrného sprejovacího mechanismu, kterým je nejčastěji pneumatické zmlžování pomocí zmlžovacího plynu (většinou dusík), dojde ke vzniku tzv. Taylorova kužele, z jehož vrcholu jsou sprejovány mnohonásobně nabitě kapičky roztoku vzorku. Odpařováním rozpouštědla, díky zvýšené teplotě ve sprejovacím prostoru (zpravidla se využívá sušícího plynu s teplotou nad 300 °C), dochází ke zmenšování kapiček, což má za následek zvyšování odpuzivých sil mezi totožně nabitými molekulami vzorku. Mez, kdy se tyto síly vyrovnají, se označuje jako Rayleighův limit. Po jeho překročení dochází k tzv. Coulombické explozi, kdy se kapička rozpadne na řadu menších a proces je opakován až do uvolnění individuálních iontů [104; 122].



Obrázek 11: Schéma ESI se zobrazením principu vzniku iontů [121].

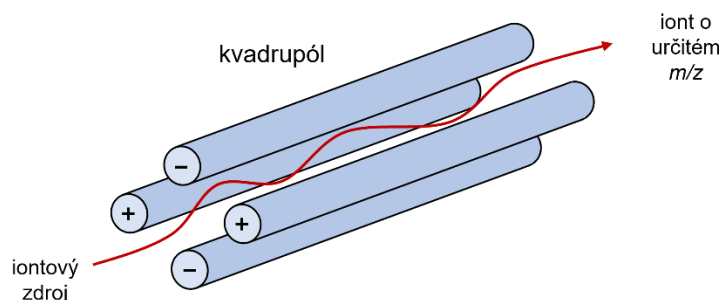
1.3.4.2. Hmotnostní analyzátoři

Hmotnostní analyzátoři je základní složkou hmotnostního spektrometru a slouží k rozlišení jednotlivých iontů na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji, tzv. m/z [124]. Zatímco ionizační metody určují, jaké látky můžeme analyzovat, kombinace hmotnostního analyzátoři s detektorem určuje kvalitu a spolehlivost analýzy. Vývoj v chemickém a biologickém výzkumu přitahuje velkou pozornost k měření látek s nízkou koncentrací ve vzorcích, jako jsou biomarkery a jednobuněčné metabolity. K analýze těchto látek je zapotřebí přesných a citlivých technik a v důsledku toho je kladen důraz na zvyšování citlivosti hmotnostních spektrometrů [125]. Hmotnostní analyzátoři mohou nabývat různých konstrukcí, kde spolu s jejich schopností rozlišit ionty, umí některé analyzátoři tyto ionty také zachytit. Mezi nejběžnější typy analyzátoři v komerční výrobě náleží kvadrupól (Q), iontová past, analyzátoři doby letu (TOF) a analyzátoři s Fourierovou transformací, jmenovitě elektrostatická orbitální past (Orbitrap) a iontová cyklotronová rezonance (ICR). Volba hmotnostního analyzátoři záleží na různých faktorech a experimentálních podmínkách. Neexistuje však žádný analyzátoři, který by se dal považovat za univerzální, a proto se často využívá jejich kombinací nebo hybridů [124].

Kvadrupólový analyzátoři

Kvadrupólový hmotnostní analyzátoři je jedním z nejčastěji používaných hmotnostních analyzátoři, zejména díky jeho jednoduchosti, spolehlivosti, dlouhé životnosti a nízké ceně v porovnání s ostatními modely. Často se používá při tandemové hmotnostní spektrometrii ve spojení s dalším analyzátoři, a to nejčastěji s dalšími kvadrupóly – trojitý kvadrupól (QqQ) nebo s TOF za vzniku spojení kvadrupólu s analyzátoři doby letu (QqTOF). Kvadrupól (**obr. 12**) je díky své schopnosti rozlišovat a filtrovat ionty o různých m/z v podstatě hmotnostní filtr. Skládá se ze čtyř válcových nebo hyperbolických tyčí, kde na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí (DC) a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny 4 je pak superponován vysokofrekvenční potenciál (RF). Kombinace RF a DC způsobuje oscilaci iontů procházejících uprostřed mezi tyčemi kvadrupólu. V závislosti na poměru RF a DC budou mít pouze ionty určitého m/z stabilní trajektorie a projdou kvadrupólem, ostatní zůstanou zachyceny na tyčích. Změnou tohoto poměru mohou být ionty různých m/z buď skenovány nebo „filtrovány“. Po zapojení pouze vysokofrekvenčního potenciálu se kvadrupól používá jako zařízení pro zaostřování iontů a k jejich přepravě

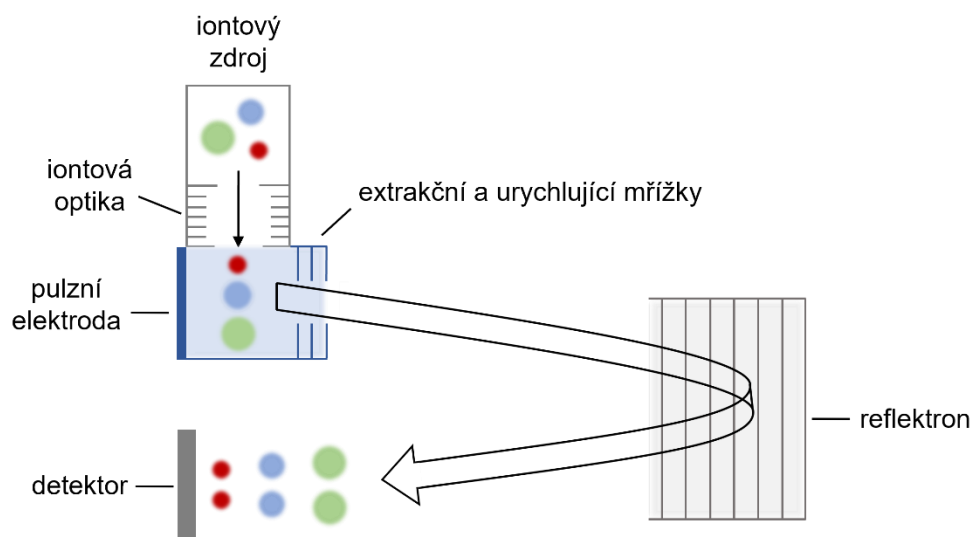
z jednoho místa na druhé. Nevýhodou tohoto typu analyzátoru je ovšem jeho malý hmotnostní rozsah (do 4 000 Da) a nízké rozlišení [124 – 126].



Obrázek 12: Schéma kvadrupólového analyzátoru [124].

Analyzátor doby letu

Ačkoliv analyzátor doby letu se již nějakou dobu na trhu objevují, příchod MALDI je posunul do popředí. Jedná se totiž o pulsní techniku, podobně jako v případě MALDI, a díky tomu je jejich spojení velmi výhodné. TOF analyzátor (obr. 13) mají jednoduchou konstrukci, skládají se z letové trubice a urychlovací mřížky, která urychluje svazek iontů z ionizačního zdroje přímo do detektoru. Ionty vzniklé v iontovém zdroji získávají počáteční kinetickou energii a při příchodu do letové trubice, která neobsahuje žádné pole, se pohybují na základě různých m/z . Ionty s malým m/z dorazí k MS detektoru dříve než ionty s velkým m/z . Vzhledem k tomu, že kinetická energie iontů a délka letové trubice zůstávají během analýzy konstantní, hmotnost je striktně funkcí času potřebného k detekci iontů po počátečním zrychlení. Během zrychlovacího pulsu může ovšem docházet ke vzniku iontů s lehce rozdílnými kinetickými energiemi, což zhoršuje rozlišení analyzátoru. Zavedlo se proto použití iontového zrcadla, tzv. reflektoru, který slouží k vyrovnání různých kinetických energií. Čím větší kinetickou energii má iont, tím hlouběji pronikne do iontového zrcadla a prodlouží se tak jeho dráha letu, oproti iontu s nižší kinetickou energií, čímž dojde k vyrovnání doby letu pro ionty se stejným m/z , ale rozdílnými kinetickými energiemi. Další metodou zvyšující rozlišení TOF je opožděná extrakce iontů, ke které dochází u MALDI. Ionty jsou ze zdroje extrahovány s malým zpožděním, kde v tomto mezičase dochází ke srovnání kinetických energií jednotlivých iontů, které jsou následně elektrickým pulsem urychleny do letové trubice [124 – 126].

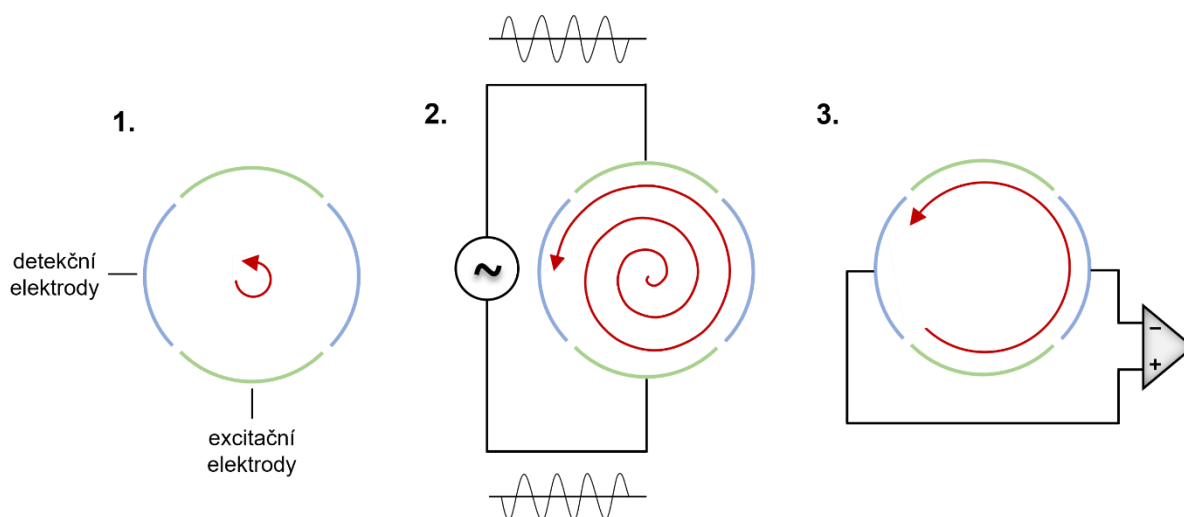


Obrázek 13: Schéma analyzátoru doby letu (TOF) [121].

Výhodami TOF je rychlost analýzy a velký hmotnostní rozsah umožňující separaci iontů s hmotností od několika až do 100 tisíců Da. Proto je zvláště vhodný pro velkokapacitní, rychlou analýzu biologických makromolekul jako jsou proteiny [125].

Iontová cyklotronová rezonance

Iontová cyklotronová rezonance je široce využívaným analyzátozem k řešení analytických problémů komplexních analýz směsí v mnoha oborech a zejména pak v proteomické a petroleomické analýze [127]. Pro zachycení iontů do pastí se používá elektrického a silného magnetického pole. Zachycené ionty se odrážejí podél magnetického pole a rotují s libovolnými trajektoriemi v rovině kolmé k magnetickému poli s frekvencemi blízkými cyklotronovým frekvencím. Pro získání signálu z těchto iontů je jejich synchronní cyklotronový pohyb excitován na vyšší orbit pomocí RF pulzu o určité frekvenci, vloženého na budící elektrody. Po vypnutí RF napětí detekují detekční elektrody indukovaný obraz. Změnami frekvencí RF pulzu jsou takto postupně proměřeny ionty o různých m/z . Tento mechanismus je znázorněn na **obr. 14**. Výsledný ICR signál ve formě závislosti frekvence na čase je přeměněn pomocí Fourierovy transformace, a proto se tato technika též nazývá iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Frekvence je pomocí této transformace převedena na m/z , čímž vznikne výsledné hmotnostní spektrum [127; 128].



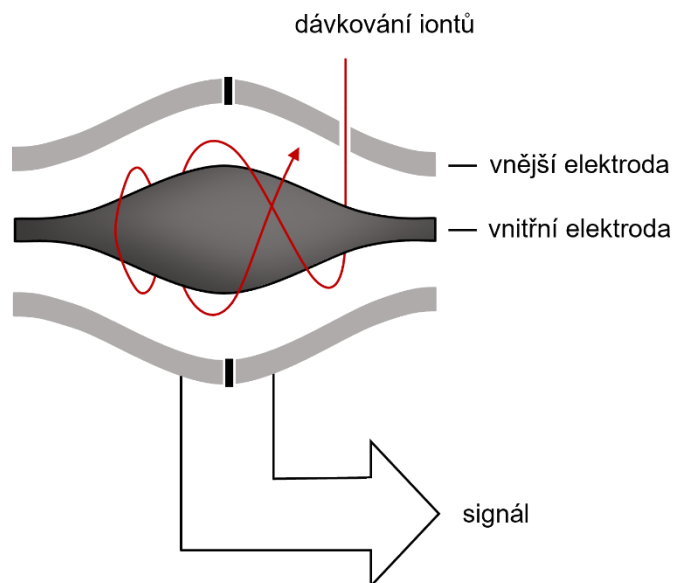
Obrázek 14: Princip FT-ICR, znázorněný ve 3 krocích: **1.** zachycení iontů v ICR cele, **2.** excitace iontů pomocí RF pulzu na vyšší orbit, **3.** detekce indukovaného proudu po vypnutí RF pulzu [121].

FT-ICR se stala díky její vysoké rozlišovací schopnosti (v řádech milionů), přesnosti a hmotnostnímu rozsahu možnou volbou pro podrobnou a spolehlivou chemickou charakterizaci komplexních směsí a velkých biomolekul [129]. Přístroj ovšem vyžaduje silné magnetické pole a extrémně vysoké vakuum, což zvyšuje náklady na jeho provoz a omezuje tak jeho rozšíření [125].

Elektrostatická orbitální past

Elektrostatická orbitální past neboli Orbitrap (**obr. 15**), je analyzátor skládající se ze tří hlavních částí, vnitřní vřetenové elektrody obklopené dvěma dutými vnějšími konkávními elektrodami proti sobě. Dvě vnější elektrody jsou odděleny kroužkem dielektrického materiálu. Napěťový potenciál je aplikován mezi vnitřní a vnější elektrody, čímž mezi nimi vzniká elektrické pole, které je lineární podél osy a oscilace budou vždy čistě harmonické. Současně ale radiální složka pole silně přitahuje ionty k centrální elektrodě. Proto jsou trajektorie iontů, přiváděných tangenciálně do Orbitrapu mezi vnitřní a vnější elektrodu otvorem v jedné z vnějších elektrod, ohýbány radiálním elektrickým polem směrem k vnitřní elektrodě, zatímco tangenciální rychlost vytváří opačnou odstředivou sílu. Při správné volbě parametrů zůstávají ionty uvnitř pasti na téměř kruhové spirále, podobně jako je tomu u planet ve sluneční soustavě. Současně axiální elektrické pole, způsobené speciálním tvarem vnitřní elektrody, vypuzuje ionty do nejširší části pasti a iniciuje harmonické axiální oscilace. Vnější elektrody jsou pak využity jako přijímací desky pro detekci indukovaného proudu těchto axiálních kmitů. Zachycený signál v závislosti na čase je pak transformován pomocí Fourierovy transformace

do frekvenční domény a následně je převeden na hmotnostní spektrum stejně jako je tomu u ICR [124; 130; 131].



Obrázek 15: Schéma Orbitrapu [124].

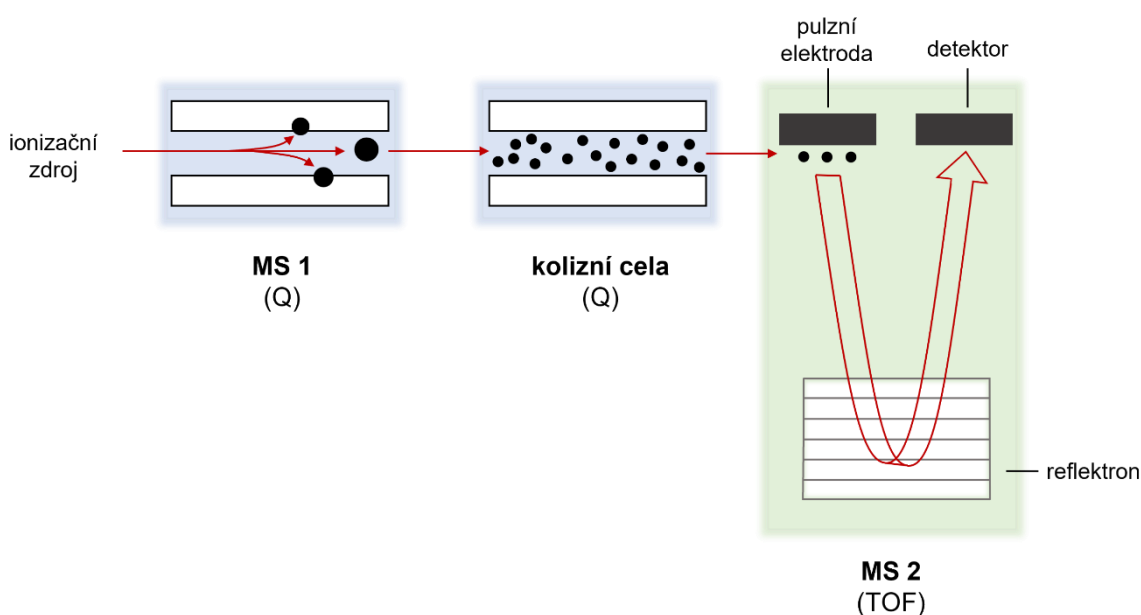
Orbitrap se stal velmi účinným hmotnostním analyzátozem s vysokou selektivitou a spolehlivostí. Jedna z hlavních výhod je jeho vysoká rozlišovací schopnost. Ta má za následek jeho použití jako náhrady za FT-ICR pro mnoho aplikací, počínaje rutinní identifikací sloučenin až po analýzu stopových složek ve složitých směsích. Toho se využívá např. v proteomice, metabolismu léčiv, dopingové kontrole a detekci kontaminantů v potravinách a krmivech. Další výhodou je také jeho velikost a operační náklady, neboť je mnohem menší než FT-ICR a vyžaduje méně údržby. I přes významná zlepšení je ovšem Orbitrap pomalejším analyzátozem, než je tomu u TOF. Další nevýhodou je také jeho náchylnost k účinku prostorového náboje, díky čemuž musí být množství vstupujících iontů monitorováno MS softwarem, aby bylo možné podchytit případné přeplnění pasti [124; 130].

Tandemové hmotnostní analyzátozem

Tandemovými hmotnostními analyzátozem jsou označována spojení dvou nebo více hmotnostních analyzátozem za sebou. Toto spojení přináší několik hlavních výhod. Jmenovitě se jedná o separaci, fragmentaci a analýzu iontů (tzv. MS/MS), při které můžeme získat více strukturních informací o analyzovaných látkách, zabránit vznikajícím interferencím a snížit šum detektoru. Je zvláště vhodná pro složité vzorky a hraje zásadní roli v biologické a chemické analýze [125; 132].

Spojení kvadrupólu s analyzátelem doby letu

Spojení kvadrupólu s analyzátelem doby letu je variací spojení tří kvadrupólů, tzv. QqQ, kde je místo třetího kvadrupólu zařazen TOF. Tento hybridní analyzátor disponuje rychlostí, citlivostí a správností určení m/z jako TOF a má podobné kvantifikační schopnosti jako QqQ. Tyto vlastnosti ho činí velmi oblíbeným a hojně používaným analyzátelem. Jak je znázorněno na **obr. 16**, první kvadrupól (Q) slouží jako hmotnostní filtr a druhý kvadrupól (q) se využívá jako kolizní cela, která vybraný prekursorový iont rozbije na dané fragmenty, které přecházejí do TOF, kde jsou rozděleny a zanalyzovány. Tímto je umožněna MS/MS analýza, která v samotném TOF není proveditelná [125; 133].

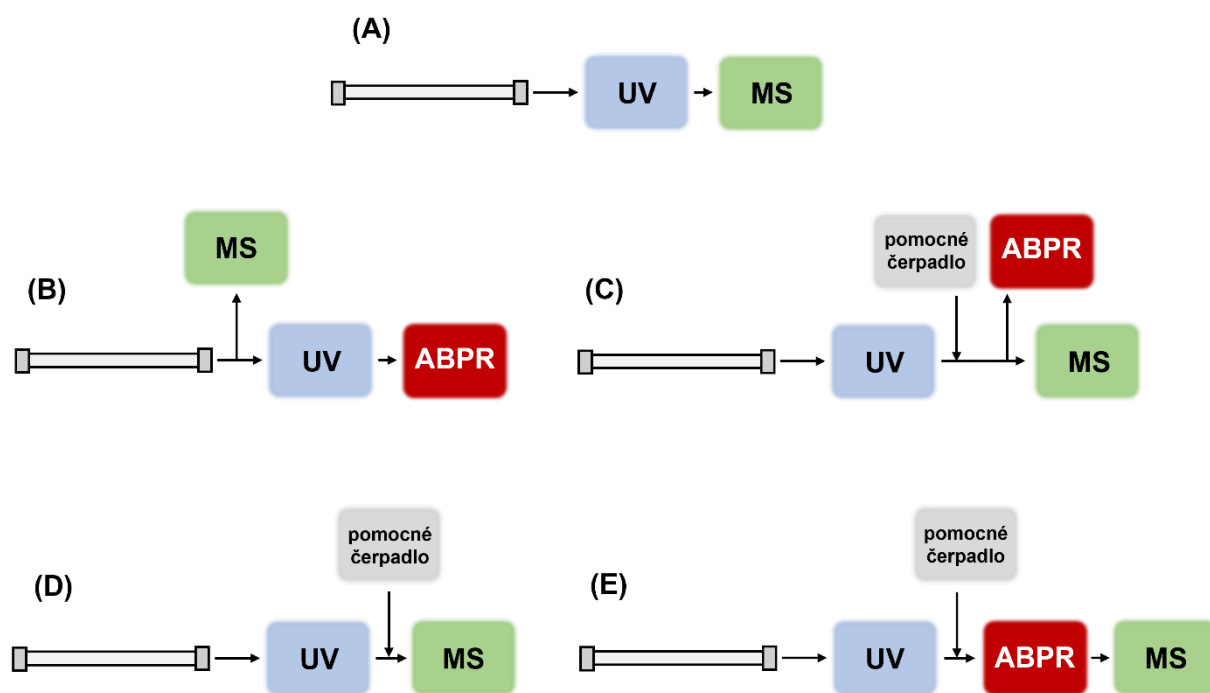


Obrázek 16: Schéma spojení kvadrupólového analyzátoru s analyzátelem doby letu (QqTOF) [121].

1.3.5. Spojení ultravysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení UHPSFC/MS, zejména v ESI režimu, představuje výkonný nástroj pro citlivou identifikaci a kvantifikaci ve složitých směsích [134]. V porovnání s UHPLC/MS však není potenciál UHPSFC/MS ještě plně prozkoumán, nicméně díky jeho komplementaritě, zvýšené citlivosti a sníženému matričnímu efektu, které toto spojení přináší, lze s výhledem do budoucna očekávat větší rozšíření [119]. Toto spojení je daleko náročnější než v případě UHPLC/MS, a to zejména z hlediska MF. CO₂ má daleko vyšší stlačitelnost než kapalina a je tedy nutné ji monitorovat, zejména pokud není pod kontrolou zpětného tlaku. Dochází zde k dekompresi

a scCO_2 přechází do plynného stavu, což může vést k rozšiřování píků a srážení analytů. Rozhraní mezi UHPSFC a MS by mělo kromě regulace tlaku také napomoci zlepšit ionizaci v ESI, a to tehdy, obsahuje-li MF vysoký obsah scCO_2 . V neposlední řadě by také ve spojení s MS detekcí měla být zachována integrita separace neboli retence, selektivita a účinnost [135]. Z tohoto důvodu měl vývoj a optimalizace speciálního rozhraní mezi UHPSFC a MS zásadní význam. Nyní jsou již komerčně dostupná řešení rozhraní pro UHPSFC/MS (**obr. 17**) nejméně od tří dodavatelů, Waters, Agilent Technologies a Shimadzu [103; 119]. Co se týče problému se srážením analytů, jako dobré řešení se ukázalo použití pomocné kapaliny (tzv. „*make-up*“), která je nepřetržitě dodávána pomocnou izokratickou pumpou, čímž se silně omezuje srážení polárních analytů, aniž by byla obětována příliš velká část výkonu UHPSFC a MS. Nejčastěji se využívá MeOH, MeOH s přidavkem pufru, nebo MeOH obsahující malé procento vody. Přidání pomocného rozpouštědla však může vést k potenciálnímu problému, kterým je faktor ředění. Ten by mohl negativně ovlivnit citlivost MS, zejména při ionizacích závislých na koncentraci, jak je tomu v případě ESI. Nicméně faktor zředění zůstává zanedbatelný, bez ohledu na použité MF a pomocného rozpouštědla, a to díky použití ABPR. Pokud jde o řízení dekomprese CO_2 , řešením je úprava rozhraní mezi UHPSFC a MS [135].



Obrázek 17: Přehled 5 dostupných rozhraní pro spojení SFC s MS. (A) přímé spojení, (B) dělič toku před UV detekcí a ABPR bez pomocného čerpadla, (C) rozhraní s pomocným čerpadlem před ABPR a s děličem toku, (D) rozhraní s pomocným čerpadlem řízené tlakem, (E) rozhraní s pomocným čerpadlem před ABPR bez děliče toku [104; 119].

ABPR ... automatický regulátor zpětného tlaku, MS ... hmotnostní spektrometr, UV ... detektor absorbující světlo v ultrafialové oblasti záření

Nejpoužívanějším rozhraním je rozhraní s pomocným čerpadlem před ABPR a děličem toku (**obr. 17 C**). U tohoto přístupu je UV detektor umístěn hned za výstupem z kolony a vedle něj se nachází rozhraní, které je složeno ze dvou T-jednotek s nulovým mrtvým objemem umístěných před MS detektorem. První T-jednotka umožňuje přidání pomocného rozpouštědla mísitelného s CO₂ pomocí izokratické pumpy. Tento dodatečný průtok se pak smísí s příchozím průtokem z chromatografu, zvýší se tak ionizační výtěžnost při nízkém procentu spolurozpouštědla a zabrání se srážení analytů během dekomprese CO₂. Druhá T-jednotka funguje jako rozdělovač průtoku, kde část celkového proudu je směřována do ABPR, zatímco zbytek míří do MS. Díky ABPR umístěnému za kolonou lze zachovat chromatografické vlastnosti. Jedná se o jedno z nejspolehlivějších rozhraní z hlediska reprodukovatelnosti retenčních časů a vzhledem ke své robustnosti, citlivosti a linearitě se tato konfigurace doporučuje jak pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzy [119].

UHPSFC/MS nyní vstupuje do další fáze vývoje díky rostoucím zkušenostem s touto technologií a jeho čím dál hojnější využívání vede výrobce k vývoji robustnějších a plně integrovaných systémů, které umožňují získat ekvivalentní a často i lepší výkon než UHPLC/MS [119]. Dnes lze UHPSFC/MS považovat za doplňkovou techniku k UHPLC/MS, se schopností rozlišení polohových izomerů a diastereoizomerů s vysokým stupněm ortogonalita k UHPLC [135]. Porovnání výhod a nevýhod těchto dvou technik je shrnuto v **tabulce 3**.

Tabulka 3: Výhody a nevýhody UHPSFC/MS v lipidomické analýze v porovnání s UHPLC/MS [103].

parametr	UHPSFC/MS		UHPLC/MS	
	separace jednotlivých tříd lipidů (podobné HILIC)	separace jednotlivých druhů lipidů (podobné RP)	separace jednotlivých tříd lipidů (HILIC)	separace jednotlivých druhů lipidů (RP)
čas analýzy	+++	++	++	+
identifikace	+++	++	+++	++
kvantita	+++	+	+++	+
dávkovaný objem	+	++	+	+++
saturace detektoru	++	+++	++	+++
reprodukovatelnost	+++	+++	++	+++
separace izomerů	+	+++	+	+++
nepolární lipidy	+++	+++	+	++
polární lipidy	++	++	+++	+++

Vysvětlení symbolů: +++ výborný, ++ průměrný, + nižší výkon

HILIC ... interakční hydrofilní kapalinová chromatografie, RP ... systém s obrácenými fázemi, UHPLC/MS ... spojení ultravysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, UHPSFC/MS ... spojení ultravysokoučinné superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií

1.4. Identifikace lipidů

Hmotnostní spektrometrie je klíčovou technikou pro identifikaci lipidů, většinou ve spojení s ESI. Obecným mechanismem tvorby iontů z nepolárních lipidů je připojení nabitě částice (např. H^+ , Na^+ , NH_4^+) nebo odstraněním protonu v iontovém zdroji. V případě využití ESI je to pak hlavně $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$, či neutrální ztráta vody $[M + H - H_2O]^+$. Jedná se o relativně účinný proces v závislosti na kationtech přítomných v pomocné kapalině, mobilní fázi nebo v extraktu vzorku. Tyto nabitě kationty mohou být přidány jak po separaci, tak přímo do infuzních rozpouštědel. Strukturní informace, jako je složení mastných acylů a jejich přesná poloha v molekule lze získat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) těchto molekulárních aduktů [102; 136; 137].

Spektra pozitivních iontů MS/MS identifikovaných tříd poskytují fragmentové ionty a neutrální ztráty, které jsou dobře známé z UHPLC/MS. Jedná se například o $m/z = 369$ ($[M + H - H_2O]^+$) pro cholesterol a CE či neutrální ztráty mastných acylů pro TG, DG a MG. Pro nepolární třídy acylglycerolů (TG, DG a MG) pak platí, že ztráta mastného acylu z *sn*-2 polohy po kolizní aktivaci je méně pravděpodobná než ztráta z polohy *sn*-1 a *sn*-3 [102; 136; 137].

1.4.1. Nomenklatura v lipidomice

V roce 2013 byl na základě terminologie LIPID MAPS navržen systém pro zkrácené názvosloví lipidových struktur pro MS analýzu („Shorthand Notation for Lipid Structures Derived from MS“) [138]. Klíčovým rysem tohoto systému je, že jsou anotovány pouze experimentálně jednoznačně prokázané strukturální detaily. Pokud jsou přítomny strukturální nejednoznačnosti (např. typ vazby, počet hydroxylových skupin), pak anotace druhu může být založena na předpokladech, které však musí být přiloženy s výsledkem. Základním požadavkem na tento systém pak je, aby byly lipidy definovány jednak svou nominální hmotností (v Da), tak také svou třídou [39].

Mezi základní pravidla pro zkrácené názvosloví patří:

- zkratka lipidové třídy popisuje každý druh,
- proměnlivé složky lipidu, jako jsou například mastné kyseliny, jsou znázorněny pomocí jejich hmotnosti vyjádřené počtem atomů uhlíků a dvojných vazeb (CN : DB),

- pouze experimentálně dokázané strukturální detaily složek mastných kyselin jsou přiřazeny podle pravidel definovaných pro mastné acyly,
- když jsou přítomny strukturální nejasnosti (typ vazby, hydroxylové skupiny, rozvětvené řetězce) jsou druhy přiřazeny jedním z následujících pravidel:
 - a) lipidová třída s (nenabitou) molekulovou hmotností (v Da) v závorkách (tento způsob je preferován pro hledání v databázích – úroveň lipidové třídy na základě hmoty), pro substituenty v podobě mastných acylů se použije hmotnost odpovídající volným mastným kyselinám.
 - b) anotace na základě předpokladů musí být jasně viditelná (preferováno pro publikace – úroveň na základě lipidových tříd).
- detailní struktury včetně stereochemie jsou pokryty názvoslovím LIPID MAPS

Zde jsou pak zobrazena pouze hlavní pravidla pro GL, pravidla pro ostatní třídy jsou podrobně popsána v práci Liebische a kol. [138].

- zkrácený zápis: zkratku lipidové třídy následuje celkový počet atomů uhlíku mastného acylu a celkový počet dvojných vazeb v tomto acylu, oddělený dvojtečkou, např. MG 18:1 pro monoacylglycerol s navázanou mastnou kyselinou obsahující 18 uhlíku a jednu dvojnou vazbu,
- mastné acyly vázané na glycerol jsou značeny:
 - a) pomocí podtržítka “_“, což znázorňuje, že pozice *sn*-mastných acylů nejsou známy, např. TG 18:1_18:2_18:0
 - b) pomocí lomítka “/“, což znamená, že *sn*-pozice mastného acylu na glycerolu je přesně prokázána, např. u TG 18:1/18:1/18:2 můžeme říct, že v poloze *sn*-1 a *sn*-2 leží mastný acyl s 18 atomy uhlíku a 1 dvojnou vazbou a v pozici *sn*-3 leží mastný acyl s 18 atomy uhlíku a dvěma dvojnými vazbami
 - c) nepřítomnost mastného acylu se anotuje jako 0:0
- jiné typy vazeb, než jsou esterové, jsou označovány písmenkem před sumou atomů uhlíku mastného acylu, např. O značí O-alkylovou vazbu nebo P, které značí O-alkyl-1-enylovou vazbu (etherová vazba), důležité je poznamenat, že O za počtem atomů uhlíku označuje keto vazbu v mastných acylech

1.4.2. Databáze a softwary pro analýzu lipidů

K dosažení úplného pochopení účasti lipidů ve fyziologických procesech a pro vývoj sloučenin terapeutického zájmu je důležité nejen identifikovat a charakterizovat stávající a nové lipidy, ale také kvantifikovat změny jejich metabolitů a rozvoj biochemických drah látek či map interakčních sítí zahrnujících lipidy. Je proto nutná databáze, která musí zahrnovat klasifikaci a názvosloví lipidů, znázornění jejich struktury, definice lipidů, související biologické/biofyzikální vlastnosti, křížové odkazy a strukturní prvky všech objektů uložených v této databázi. Díky dlouhodobému multiinstitucionálnímu úsilí byla proto vyvinuta strategie lipidických metabolitů a jejich drah, tzv. LIPID MAPS [12].

Na základě této strategie a již existujících databází jako jsou LIPID BANK [139], LIPID DAT [140], Lipid Library [141] a Cyberlipid [142] byla vyvinuta velká, veřejně dostupná a komplexní databáze, která se nazývá LIPID MAPS Structure Database (LMSD) [12]. LMSD, podobně jako existující on-line zdroje, také obsahuje struktury lipidů a další související informace, nicméně zde jsou všechny lipidy systematicky klasifikované pomocí souhrnného klasifikačního schématu navrženého LIPID MAPS sdružením a všechny struktury jsou kresleny konzistentním způsobem na základě definovaného schématu. Navíc obsahuje také charakterizaci na základě hmotnostní spektrometrie, ale pouze tehdy, je-li u dané molekuly k dispozici [12]. Obsahuje nyní více než 45 000 molekul lipidů charakterizovaných identifikátorem LM_ID, který poskytuje systematický prostředek pro přiřazení jedinečné identifikace každému jednomu lipidu a umožňuje také přidání nových klasifikačních prvků do budoucna. Databáze je přístupná prostřednictvím libovolného webového prohlížeče nebo rozhraní a zahrnuje textové a strukturované dotazovací nástroje [11; 143].

Ruční zpracování dat pro identifikaci a kvantifikaci stovek lipidů je časově náročné, proto je žádoucí jejich automatizace. V posledních letech bylo vyvinuto několik softwarů, které usnadňují zpracování dat a zajišťují tak spolehlivost zpracování údajů [144]. Jedná se např. o Lipid Data Analyser [145], LipidMatch [146], LipidCreator [147], LipidQuant 1.0 [144] nebo MZMine 2 [148].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Seznam použitých chemikálií a standardů

Použité chemikálie:

- 1-butanol (BuOH) – HPLC čistota, $\geq 99,7$ %; Honeywell (Seelze, Německo)
- 2-propanol (IPA) – LC-MS čistota, $\geq 99,9$ %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Acetonitril (ACN) – LC-MS čistota, $\geq 99,9$ %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Benzoylchlorid (BzCl) – 99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Deionizovaná voda – Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, Francie)
- Hexan (Hex) – LC-MS čistota, Honeywell (Seelze, Německo)
- Chloroform (CHCl₃) – LC čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí (FAc) – Honeywell (Seelze, Německo)
- Kyselina octová (AAc) – čistota $\geq 9,99$ %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Methanol (MeOH) – LC-MS čistota, $\geq 99,9$ %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Mravenčan amonný (AF) – LC-MS čistota, $\geq 99,99$ %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Octan amonný (AA) – čistota $\geq 99,99$ %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Pyridyn (Pyr) – HPLC čistota, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Uhličitan amonný ((NH₄)₂CO₃) – $\geq 30,0$ % NH₃, Honeywell (Seelze, Německo)

Použité standardy:

- Použité standardy (viz **příloha A**) – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Nuchek Prep (Elysian, MN, USA)
- Použité interní standardy (viz **tabulka 4**) - Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Nuchek Prep (Elysian, MN, USA)

2.2. Přístroje a zařízení

- Analytická váha *ABT 120-5DM* – Kern & Sohn GmbH (Balingen, Německo)
- Dávkovač *Multipipette® M4* – Eppendorf (Hamburg, Německo)

- Filtry na injekční stříkačku *Syringe Filters, R. cellulose 0,2 μm, 13 mm∅, pk/100* – OlimPeak® Certified Filters by Teknokrome® (Barcelona, Španělsko)
- Hmotnostní spektrometr *Synapt G2-Si QTOF* – Waters™ (Milford, MA, USA)
- Injekční stříkačka *Injekt® Luer Solo 2 ml* – Braun (Hessen, Německo)
- Laminární box *MSC-Advantage II. třídy* – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Sartorius (Goettingen, Německo)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Koncentrátor *NDK200-2* – MIULAB (Hangzhou, Zhejiang, Čína)
- Odstředivka *Hettich EBA 20* – Hettich (Tuttlingen, Německo)
- Pasteurovy skleněné pipety *Fisherbrand®* – Thermo Fisher Scientific (Bremen, Německo)
- Třepačka *KS 130 basic* – IKA® (Staufen, Německo)
- Ultravysokoúčinný superkritický chromatograf *Acquity UPC²* – Waters™ (Milford, MA, USA)
- Ultrazvuková lázeň *Fisherbrand® 15061H* – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- *Vortex lab dancer* – IKA® (Staufen, Německo)

2.3. Pracovní postup

2.3.1. Příprava zásobních roztoků standardů

Jednotlivé lipidové standardy (CE, MG, DG, TG, ST a FA) byly připraveny v požadovaných koncentracích navážením a rozpuštěním v příslušném objemu CHCl₃/MeOH (1:1, v/v). Zásobní roztoky směsí standardů byly připraveny pro každou třídu lipidů zvlášť smícháním příslušných objemů jednotlivých standardů (viz **příloha A**) se směsí CHCl₃/MeOH (1:1, v/v).

Zásobní roztok interních lipidových standardů (IS Mix) přidávaný do plazmy a séra byl připraven stejným způsobem a jejich konečná koncentrace je znázorněna v **tabulce 4**.

Tabulka 4: Koncentrace standardů v IS Mixu.

lipidová třída	standard	konc. zásob. roztok [μg/μl]	pipetovaný objem [μl]	konc. v IS Mixu [μg/ml]	konc. v plazmě [μg/ml]	konc. v plazmě [nmol/ml]
CE	CE 19:0	6	55.5	333	266	400
	CE 16:0 d7	6	45	270	216	342
MG	MG 18:1 d7	2	2.6	5	4	11.4
	MG 19:1	2	2.8	6	4	12.1
DG	DG 14:0/14:0	2	1.8	4	3	5.6
	DG 36:2 d5	1	4.5	4.5	4	5.8
	DG 33:1 d7	1	4.2	4	3	5.7
TG	TG 19:1/19:1/19:1	6	11	66	53	57.0
	TG 48:1 d7	1	58	58	46	57.2
FA	FA 19:1	2	5	10	8	27.0
	FA 18:1 d9	2	5	10	8	27.5
ST	Cholesterol d7	6	19	114	91	231.6
rozpouštědlo		CHCl ₃ /MeOH (1:1)	785.6			
celkový objem			1000			

CE ... cholesterol estery, CHCl₃ ... chloroform, DG ... diacylglyceroly, FA ... mastné kyseliny, konc. ... koncentrace, MeOH ... methanol, MG ... monoacylglyceroly, rozp. ... rozpouštědlo, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly, zásob. ... zásobní

2.3.2. Příprava vzorků k analýze

Analýza lipidů byla prováděna nejprve na vzorcích standardů a následně na biologických materiálech, plazmě a séru. Příprava vzorku se skládala z proteinové precipitace, chemické derivatizace a následné extrakce. Po ukončení extrakce byly vzorky před samotnou analýzou zředěny.

2.3.2.1. Příprava vzorků standardů k analýze

Ze zásobního roztoku lipidových standardů bylo odebráno 20 μl (pro každý zásobní roztok lipidové třídy zvlášť) do 4ml vialky. Toto množství bylo odpařeno pod mírným proudem dusíku a následně k němu bylo pipetováno 335 μl směsi Pyr/ACN (1:9, v/v). Roztokem bylo

třepáno 5 min při 320 rpm. Poté bylo přidáno 120 μl reakční směsi BzCl/ACN (1:9, v/v) a roztok byl třepán při 320 rpm po dobu 60 min.

Po uplynulých 60 minutách bylo do směsi pipetováno 2000 μl Hex a 600 μl $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ a přidáním organického rozpouštědla došlo k ukončení derivatizační reakce. Směs byla třepána po dobu 5 min při 640 rpm a následně centrifugována při 3000 rpm po dobu 3 min. Tím se zajistil dokonalý přechod všech nepolárních lipidů do organické (hexanové) vrstvy, která byla oddělena pomocí pipety do nové 4ml vialky. Hexanová vrstva byla odpařena a poté rozpuštěna v 250 μl směsi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Takto připravené roztoky byly uchovány při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Směsi CE, MG, DG a TG byly před samotnou analýzou 5 \times zředěny, vzorky FA a ST se dále již neředily.

2.3.2.2. Příprava vzorků séra a plazmy k analýze

Z jednotlivých vzorků plazmy a séra bylo odebráno 25 μl do 1.5ml vialek. Následně bylo ke vzorkům přidáno 20 μl IS Mixu a 250 μl směsi BUME (1:1, v/v). Tímto přidavkem došlo k vysrážení proteinů. Směs byla dále promíchávána 1 min na vortexu, vložena na 15 min do ultrazvukové lázně při ambientní teplotě a následně centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 min. Poté byla přefiltrována do nové 4ml vialky a filtr byl promyt dalšími 500 μl BUME (1:1, v/v). Nakonec byl celý objem odpařen.

Derivatizace a extrakce byla prováděna stejným způsobem jako u vzorků standardů (viz kapitola 2.3.2.1)

2.4. UHPSFC podmínky

Pro analýzu připravených vzorků byl použit chromatograf Acquity UPC² s kolonami Viridis HSS C18 SB (100 \times 3.0 mm; 1.8 μm , Waters) a Viridis HSS C18 SB (150 \times 3.0 mm; 1.8 μm , Waters), spojenými za sebou kovovou kapilárou a vyhřívány na $40\text{ }^\circ\text{C}$. Jako MF A byl použit scCO_2 a modifikátorem (MF B) byl MeOH s přidavkem 0.1 % AAc. Bylo využito gradientové eluce: 0 min – 98 % A (2 % B); 17 min – 87 % A (13 % B); 17.1 min – 98 % A (2 % B); 18 min – 98 % A (2 % B). Celkový čas analýzy byl 18 min včetně ekvilibrace kolony (1 min). Automatický regulátor zpětného tlaku byl nastavený na 2000 psi (137.895 bar), průtok MF byl 1 ml/min a nástřik vzorku 1 μl . Dávkovací jehla byla po každém nástřiku omývána směsí IPA/Hex/ H_2O (2:1:0.5, $v/v/v$) a teplota v autosampleru byla nastavena na $6\text{ }^\circ\text{C}$.

2.5. MS podmínky

UHPSFC byl spojen s hmotnostním spektrometrem, obsahujícím ESI jako ionizační zdroj a QTOF jako analyzátor, pomocí komerčně dostupného rozhraní. Jako pomocná kapalina zde byla využita stejná směs jako pro MF B (MeOH + 0.1 % AAc) o průtoku 0.25 ml/min. Pro záznam analýzy byl zvolený kontinuální mód se skenovacím časem 0.1 s a jako referenční hmota (Lock Mass) byl použit roztok Leucin Enkefalinu. Analyzátor měřil v módu citlivosti s rozsahem hodnot m/z od 150–1000 a všechna měření byla prováděna v pozitivním módu polarity. Teplota zdroje byla nastavena na 150 °C a desolvatační teplota na 500 °C. Napětí na kapiláře bylo 3 kV, napětí na vstupní elektrodě 20 V a zdrojový offset byl nastaven na 90 V. Tok plynu ve zdroji byl 50 l/h a tok sušícího plynu 1000 l/h. Tlak zamlžujícího plynu byl nastaven na 4 bary.

2.6. Zpracování naměřených dat

Data z analýz pro jednotlivé vzorky byla interpretována pomocí programu MassLynx. V první řadě byl redukován šum pomocí nástroje Waters Compression Tool, což vedlo ke snížení velikosti souboru dat a také ke snížení pravděpodobnosti chybné identifikace. Následně byla provedena korekce dat na Lock Mass za účelem lepší přesnosti hmot pomocí nástroje Accurate Mass Measure v MassLynx, který rovněž převedl kontinuální spektra na čárová. Identifikace byla provedena porovnáním jednotlivých hodnot m/z s databází LIPID MAPS. Dále byla provedena integrace dat pomocí nástroje TargetLynx pro vyhodnocení vlivu jednotlivých parametrů na intenzity a plochy píků. Plochy píků pro porovnání jednotlivých biologických vzorků byly získány pomocí programu Lipid Data Analyzer.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této práce byl vývoj a optimalizace metody pro stanovení nepolárních lipidů v biologických vzorcích. Nejdříve byla provedena optimalizace parametrů v UHPSFC a následně optimalizace MS. Dále byly optimalizovány různé extrakční protokoly, které byly vyhodnoceny za použití již finální zoptimalizované metody. Nakonec byly proměřeny vzorky séra a plazmy zdravého jedince a pacienta s rakovinou slinivky břišní a byla provedena identifikace nepolárních lipidů v těchto vzorcích.

3.1. Optimalizace UHPSFC

V této práci byla pro separaci komplexních směsí nepolárních lipidů použita ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie s gradientovou elucí. Cílem optimalizace UHPSFC bylo získat co možná nejvyšší rozlišovací schopnost úpravou separačních podmínek, jako je gradient, složení mobilní fáze a její průtok, teplota v kolonovém termostatu a délka kolony. Celá optimalizace byla prováděna za použití kolony Viridis HSS C18 SB (150 mm × 3.0; 1.8 μm, Waters) na směsi jednotlivých lipidových standardů a vzorku séra s obsahem interních standardů. Gradient byl zvolen: 0 min – 2 % B; 12 min – 20 % B; 12.5 min – 2 % B; 13 min – 2 % B, kde celková doba analýzy byla 13 min.

3.1.1. Optimalizace mobilní fáze B

Prvním krokem optimalizace UHPSFC/MS metody bylo zvolení vhodného rozpouštědla jakožto modifikátoru. Jako vybraná rozpouštědla pro MF B byly, na základě literatury a předchozích zkušeností pracoviště, vybrány MeOH, MeOH/ACN (1:1; v/v), MeOH/ACN (1:9; v/v) a IPA. Při použití MeOH/ACN (1:9; v/v) a IPA se prodloužila retence FA, které se při námi zvolených podmínkách zadržovaly na koloně bez znatelného zlepšení separace. V případě porovnání čistého MeOH a směsi MeOH/ACN (1:1; v/v), byly naměřené absolutní intenzity vyšší pro čistý MeOH a z toho důvodu byl zvolen jakožto rozpouštědlo pro MF B.

3.1.2. Optimalizace teploty kolony

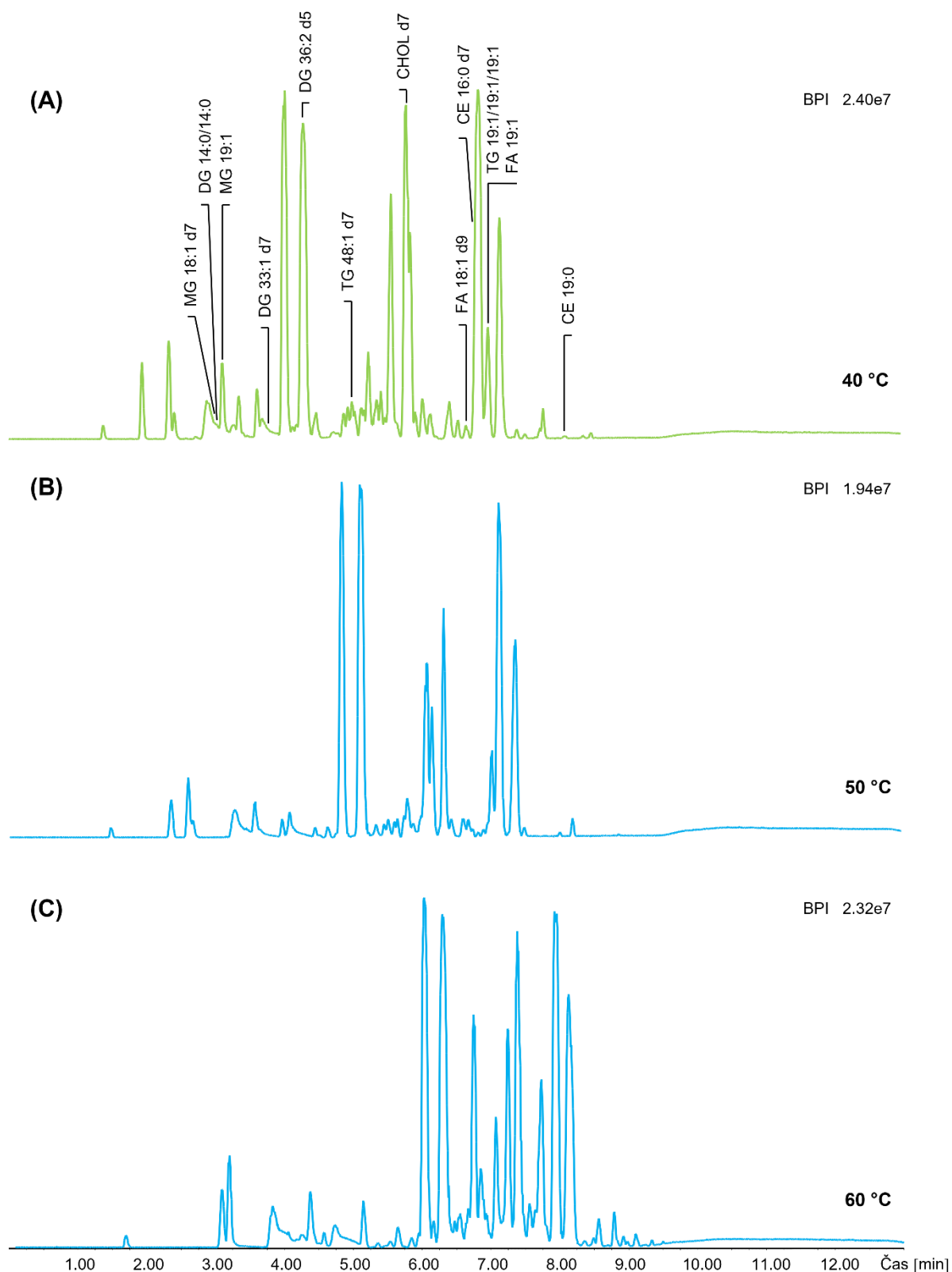
Dalším parametrem, který má vliv na separaci je teplota kolony. Její optimalizace byla provedena s nastavením teplot 40, 50 a 60 °C za použití čistého MeOH jako MF B. Nejvhodnějším se ukázalo použití 40 °C. Se vzrůstající teplotou kolony docházelo k posunu retenčních časů a také docházelo k většímu smývání píků a celkovému zhoršení separace jednotlivých lipidů, jak je znázorněno na **obr. 18**. Kvůli subkritickému stavu CO₂ (31 °C) bylo 40 °C zvoleno jako hranice a z toho důvodu nebyli nižší teploty testovány. Změna teploty kolony neměla vliv na ionizaci měřených analytů.

3.1.3. Optimalizace aditiv do mobilní fáze B

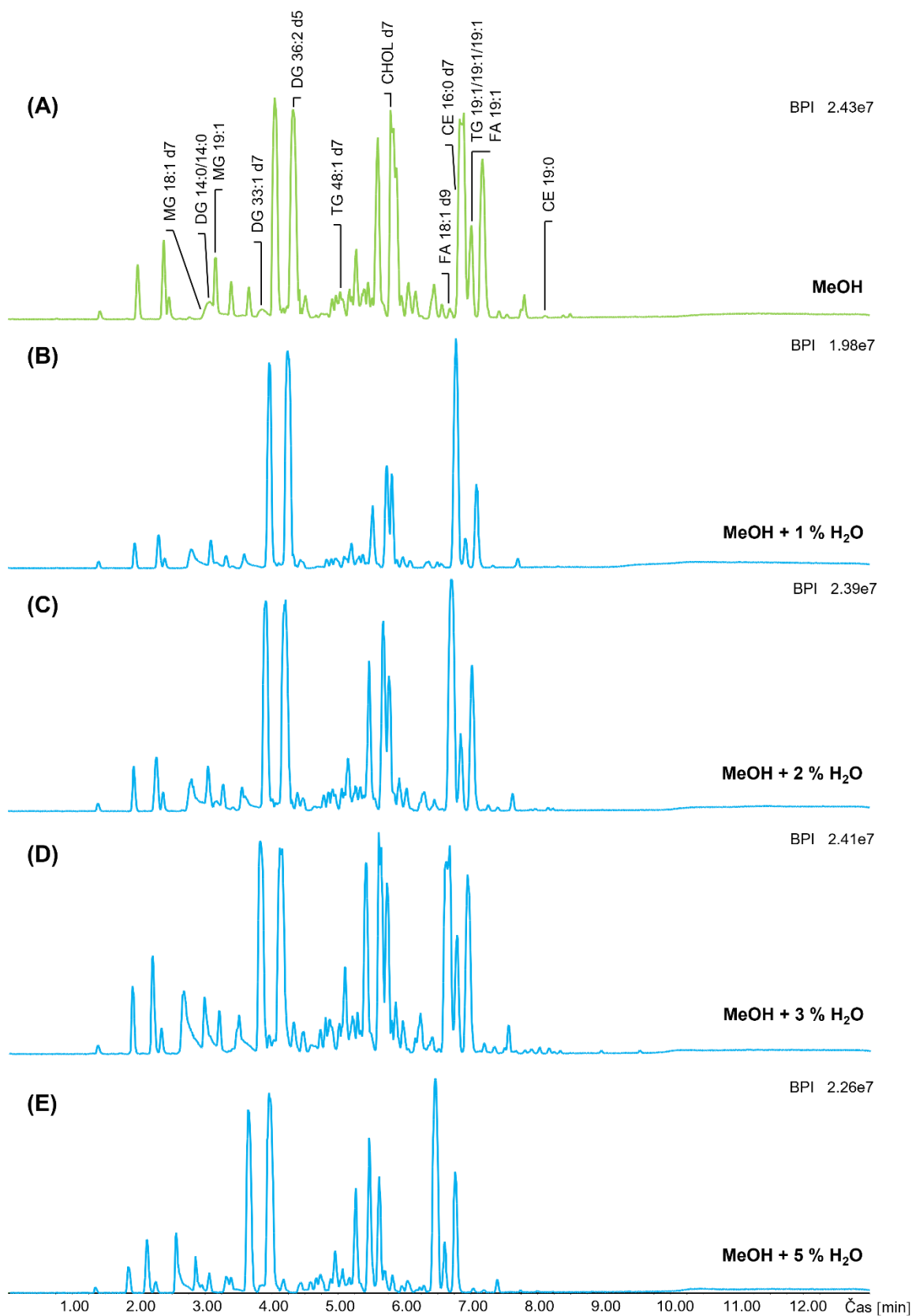
Parametrem ovlivňujícím jak retenci, tak intenzity analytů, je přídavek aditiv do MF B. V UHPSFC se využívá přídavku malého procenta vody, ovlivňujícího hlavně retenci, a amonných solí octanu nebo mravenčanu či samotných kyselin těchto solí, které mají vliv na účinnost ionizace v MS. V této práci byl nejprve zkoušen přídavek vody, následně přídavek octanu amonného a také kyseliny octové.

Přídavek vody

Přidání malého množství vody do MeOH jakožto MF B bylo optimalizováno s využitím přídavku 1, 2, 3 a 5 % ultra čisté vody a následně byl sledován vliv na změnu retenčních časů analytů a ionizaci. Jak je znázorněno na **obr. 19**, s většími přídavky vody docházelo ke smývání píků a ztrátě rozlišení. Z toho důvodu byl zvolen jako ideální čistý MeOH bez přídavku vody. Intenzita píků jednotlivých standardů se změnou množství přidané vody byla bez výrazných rozdílů.



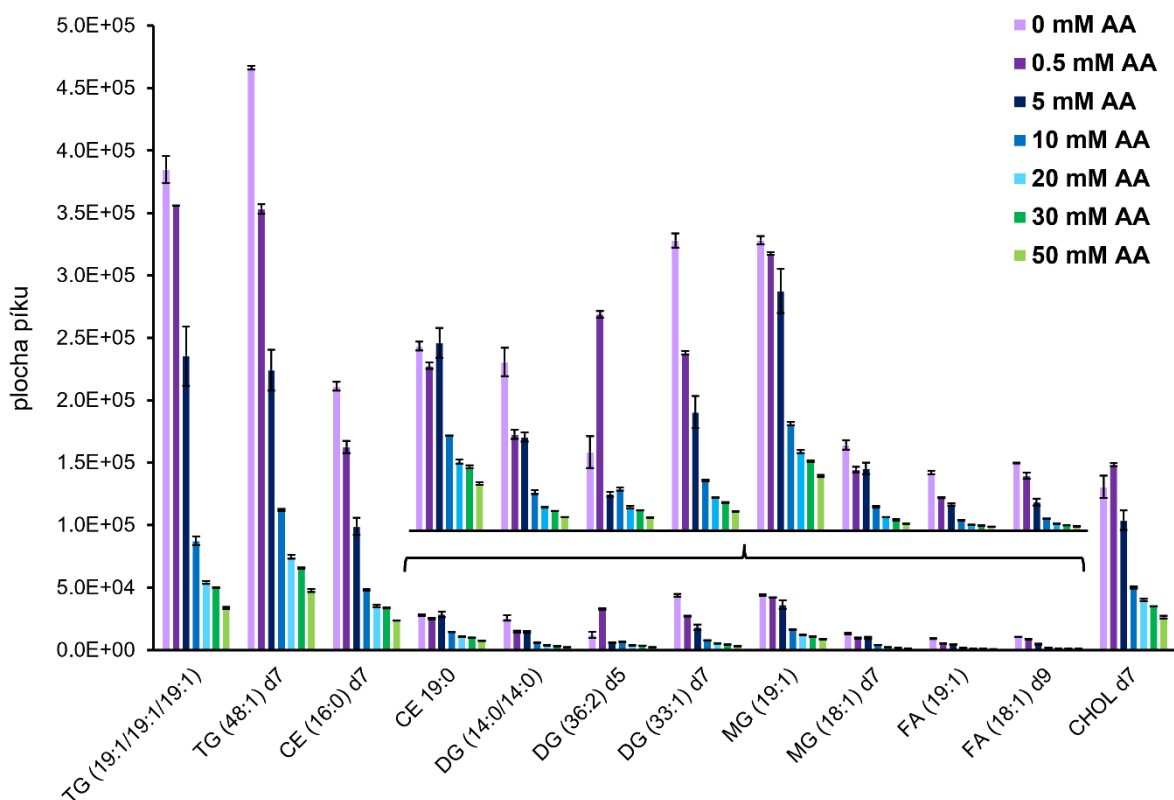
Obrázek 18: Efekt teplot (A) 40 °C, (B) 50 °C, (C) 60 °C nastavených v kolonovém termostatu UHPSFC na analýzu vzorku séra obsahujícího IS Mix (vyznačené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a jako MF B a pomocná kapalina byl použit čistý MeOH. Chromatogram s optimální teplotou je zvýrazněn zeleně.



Obrázek 19: Vliv přidavku deionizované vody (**A**) 0 %, (**B**) 1 %, (**C**) 2 %, (**D**) 3 %, (**E**) 5 % do MF B (MeOH) na retenční časy při analýze vzorku séra obsahujícího IS Mix (vyznačené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s optimálním složením MF B je zvýrazněn zeleně.

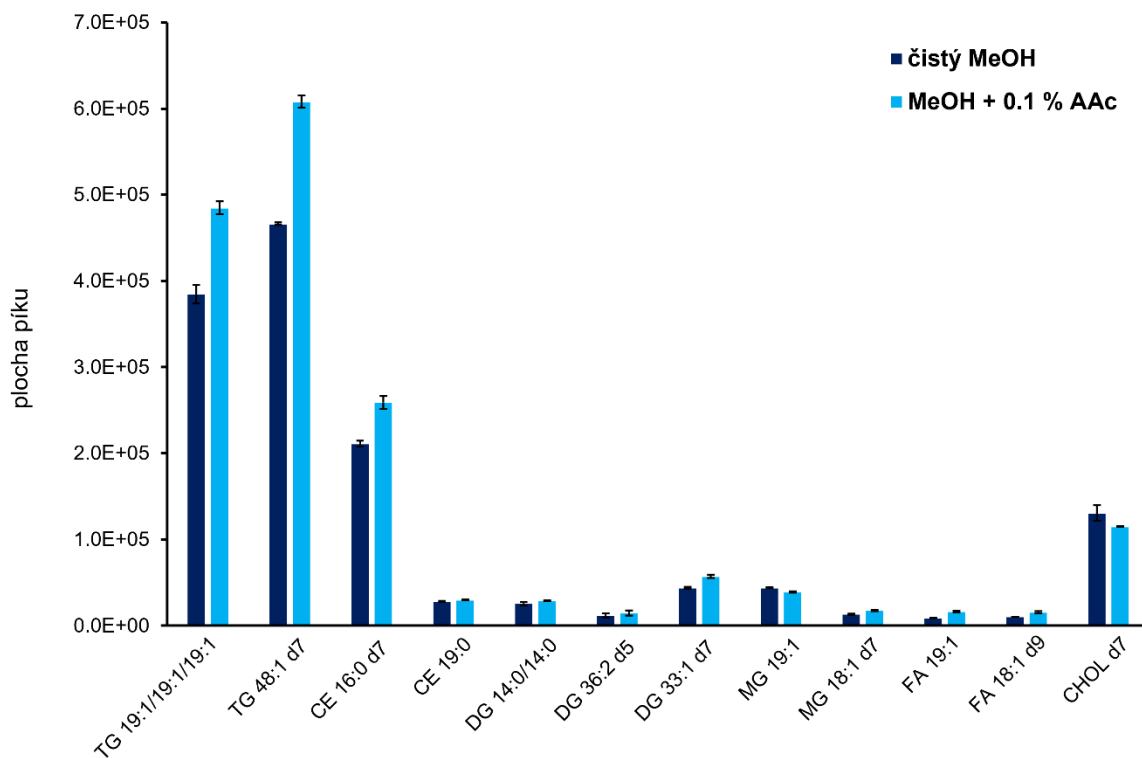
Přídavek aditiv

Při optimalizaci přídavku aditiv do MF B byl nejprve testován octan amonný, a to v postupných přídavcích o koncentracích 0.5; 5; 10; 20; 30 a 50 mM. Jak je znázorněno na **obr. 20**, ve většině případech bylo dosaženo nejlepší ionizace při použití čistého MeOH. S každým dalším přídavkem AA se snižovala intenzita signálu, což bylo bráno jako nežádoucí efekt. Separace látek se přídavkem AA nijak neměnila.



Obrázek 20: Optimalizace přídavku octanu amonného do MF B (MeOH) a jeho vliv na plochu píků IS Mixu ve vzorku séra. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C.

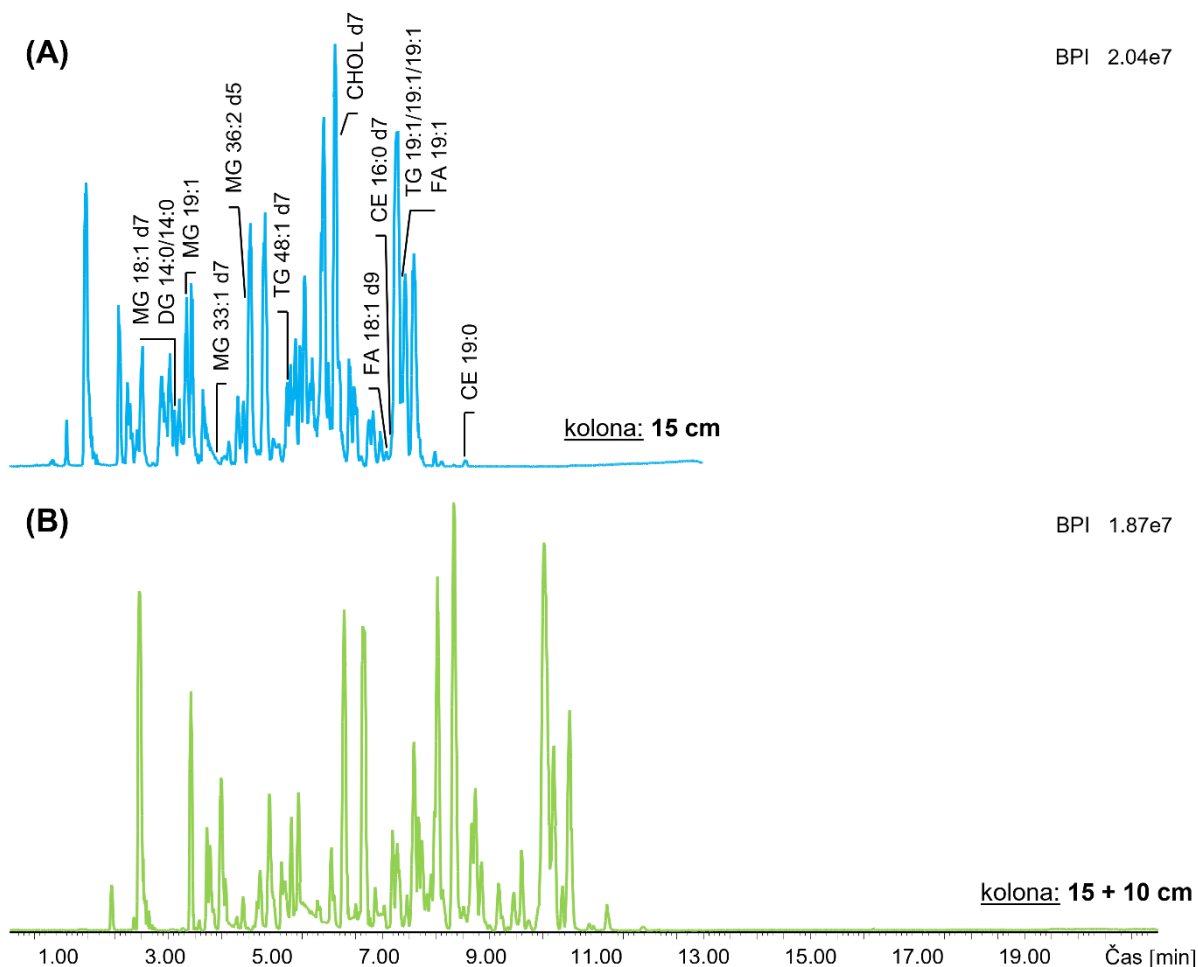
Dále byl zkoušen přídavek kyseliny octové. Pro testování byla využita v hmotnostní spektrometrii běžně používaná koncentrace 0.1 % AAc. Výsledkem byla znatelně vyšší intenzita signálu a plocha píku pro analyty ve vzorku séra. **Obr. 21** názorně ukazuje, jak se liší účinnost čistého MeOH a MeOH s přídavkem 0.1 % AAc a potvrzuje tedy, že v případě analýzy TG je nejlepší volbou použití mobilní fáze obsahující MeOH s přídavkem 0.1 % AAc. U ostatních zkoumaných tříd lipidů má množství přidané kyseliny jen malý vliv, většinou se jedná o mírné zvýšení odezvy s výjimkou cholesterolu d7 a MG 19:1.



Obrázek 21: Vliv přidavku kyseliny octové do MF B na plochu píků pro IS Mix ve vzorku séra. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C.

3.1.4. Optimalizace délky kolony

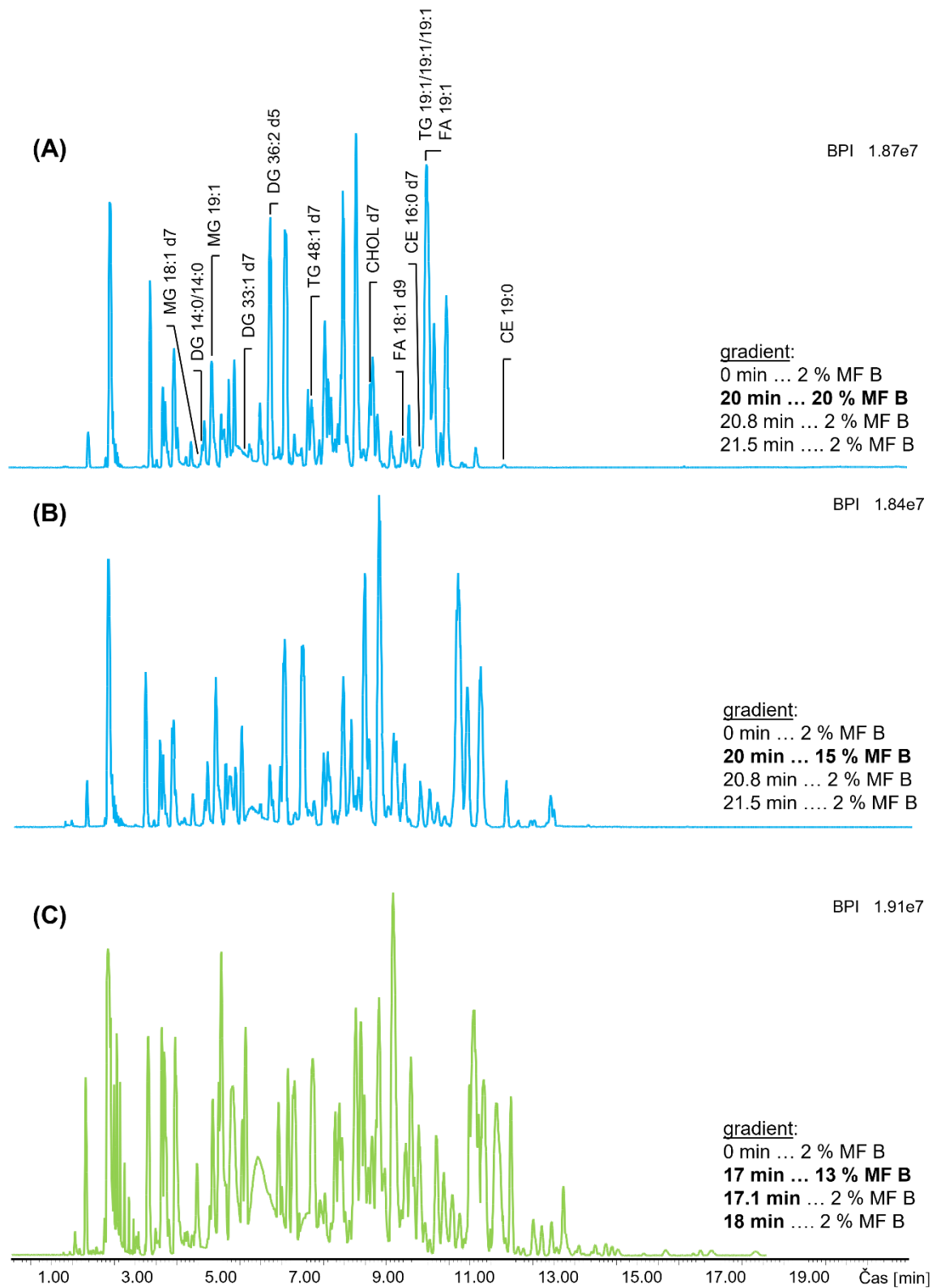
Pro další zlepšení separace lipidů, zejména izobarických píků, byla také optimalizována délka kolony. K dispozici byly dvě kolony stejného typu, první o délce 15 cm, která byla doposud používána pro optimalizaci a druhá o délce 10 cm. Tyto kolony byly pro analýzu spojeny pomocí krátké kovové kapiláry se zvoleným gradientem přepočítaným tak, aby jeho strmost zůstala stejná: 0 min – 2 % B, 20 min – 20 % B, 20.8 min – 2 % B, 21.5 min – 2 % B. Celkový čas separace se tak prodloužil z dosavadních 13 min na 21.5 min. Jak znázorňuje **obr. 22**, eluce nepolárních lipidů se prodloužila a separace mírně zlepšila, nicméně bylo stále zapotřebí docílit ještě lepšího rozdělení izobarických molekul. Jelikož cílem bylo vyvinout jak účinnou, tak i rychlou metodu nepřipadalo v úvahu další prodlužování kolony a ani instrumentace kolonového termostatu v případě UHPSFC by zapojení další kolony neumožnila. Řešením tedy bylo změnit strmost gradientu (viz kapitola **3.1.5.**).



Obrázek 22: Vliv délky kolony (A) 15 cm, (B) 25 cm na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: MF B MeOH + 0.1 % AAc, průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s optimální délkou kolony je zvýrazněn zeleně.

3.1.5. Optimalizace gradientu

V případě využití spojení dvou kolon a původního gradientu došlo k prodloužení času analýzy, který však nebyl zcela efektivně využit a nejdéle zadržovaný analyzovaný lipid na koloně (FA 26:0), byl eluován z kolony v 14 min. Z toho důvodu bylo provedeno upravení gradientu MF na následující finální podmínky: 0 min – 2 % B, 17 min – 13 % B, 17.1 min – 2 % B, 18 min – 2 % B. Jednotlivé námi testované změny gradientu MF jsou znázorněny na **obr. 23**.



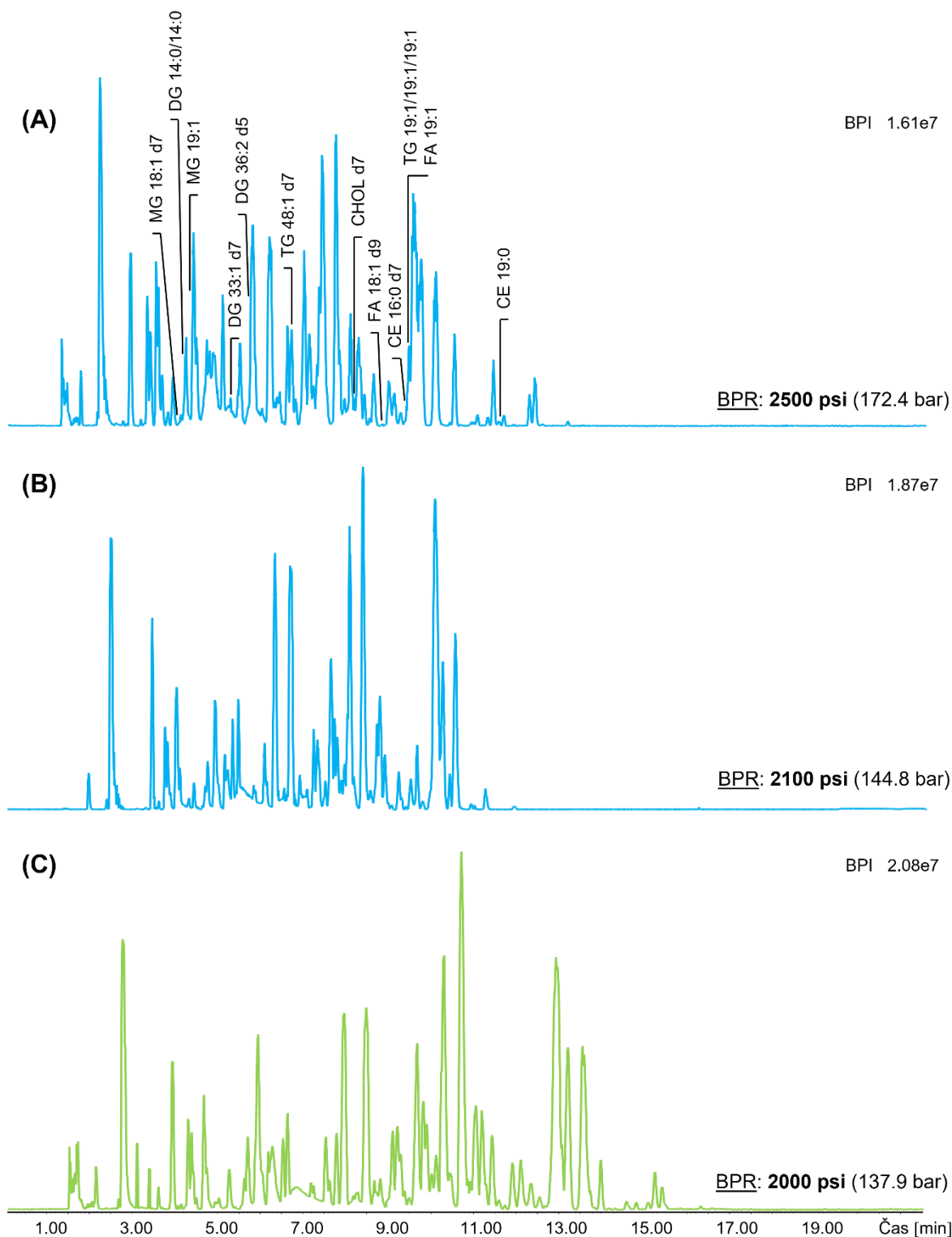
Obrázek 23: Optimalizace gradientu a jeho vliv na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícího IS Mix (zobrazené v obr.). Gradient roste až **(A)** do 20 % MF B, **(B)** do 15 % MF B, **(C)** do 13 % MF B. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), MF B MeOH + 0.1 % AAc, průtok 1 ml/min, ABPR 2100 psi (144.79 bar) a teplota kolony 40 °C. Chromatogram s ideálním gradientem je zvýrazněn zeleně.

3.1.6. Optimalizace zpětného tlaku

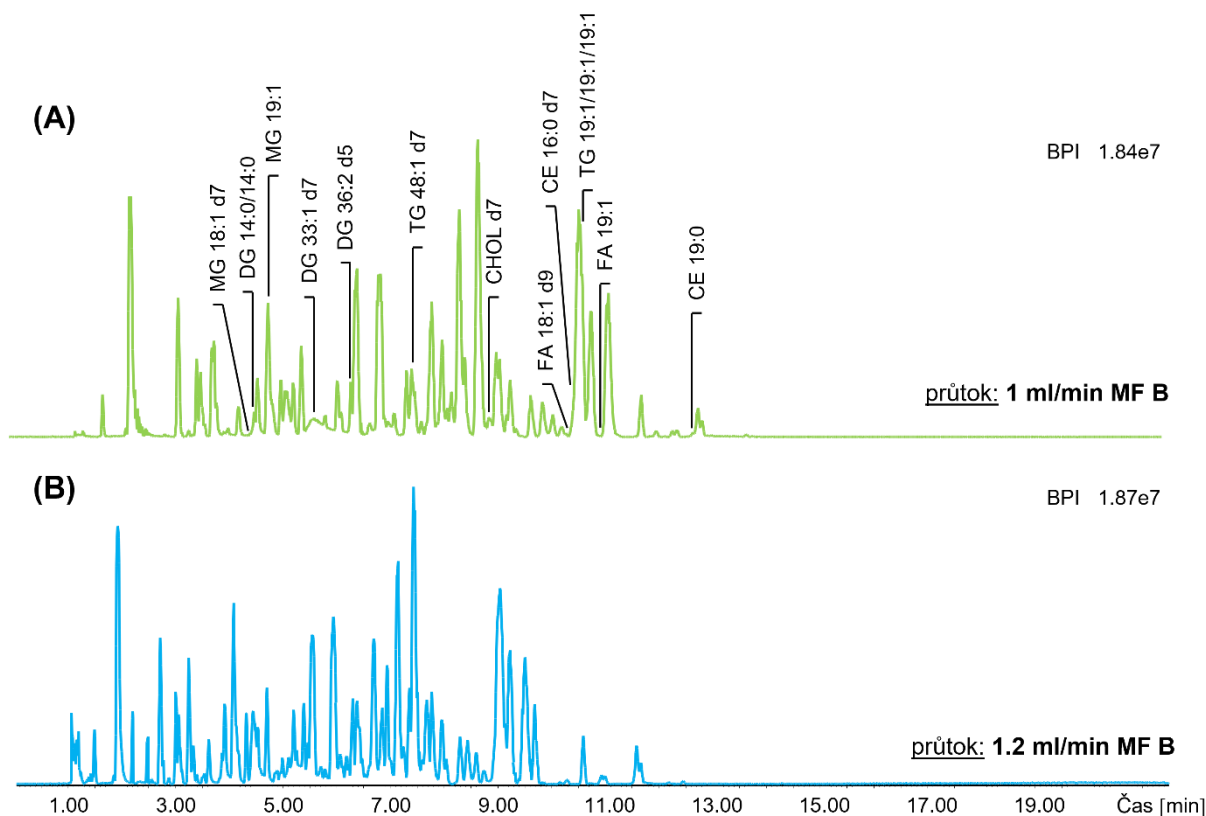
Zpětný tlak má vliv na retenci látek a bylo tedy zapotřebí jeho optimalizace. Kromě tlaku 2100 psi (144.79 bar), který byl využíván po dobu celé optimalizace bylo také zkoušeno 2500 psi (172.369 bar) a 2000 psi (137.895 bar). Při použití 2500 psi se separace zhoršila a docházelo ke značnému smývání píků. Naopak použití tlaku 2000 psi se ukázalo jako lepší řešení, než používání dosavadního tlaku 2100 psi. Separace se zlepšila a bylo tak dosaženo vyššího rozlišení látek. Porovnání všech tří použitých zpětných tlaků je zobrazeno na **obr. 24**. Byl také testován tlak 1900 psi (131 bar), který měl ale za následek tlakové přetěžování přístroje a z toho důvodu byl zavrhnut.

3.1.7. Optimalizace průtoku mobilní fáze

Průtok patří mezi důležité parametry ovlivňující retenci. Cílem bylo mít co nejrychlejší separaci zajišťující kvalitní rozdělení látek. Z toho důvodu byly porovnávány různé průtoky MF. S dosud používaným 1 ml/min byl dále testován průtok 1.2 ml/min a 1.4 ml/min. Průtok 1.4 ml/min měl za následek zhoršení rozlišení jednotlivých píků, které se v systému s použitím průtoku 1 ml/min dělily. Spolu s tím se významně zvyšoval tlak v systému, což vedlo k přetěžování přístroje a zvýšení rizika dosažení tlakového limitu kolony. Při průtoku 1.2 ml/min MF již nedocházelo ke vzniku příliš vysokých tlaků v systému, ale rozlišení jednotlivých píků se jeví horší, než při použití průtoku 1 ml/min MF. Z toho důvodu byl jako ideální ponechán průtok 1 ml/min MF. Porovnání průtoku 1 ml/min a 1.2 ml/min je znázorněno na **obr. 25**. Testování menšího průtoku nebylo prováděno. Došlo by sice ke zlepšení separace, ale za cenu prodloužení analýzy což nebylo záměrem této optimalizace.



Obrázek 24: Vliv zpětného tlaku (A) 2500 psi, (B) 2100 psi, (C) 2000 psi na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícího IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), MF B MeOH + 0.1 % AAC, průtok 1 ml/min, teplota kolony 40 °C a gradient: 0 min – 2 % B, 20 min – 15 % B, 20.8 min – 2 % B, 21.5 min – 2 % B. Chromatogram s optimálním BPR je zvýrazněn zeleně.



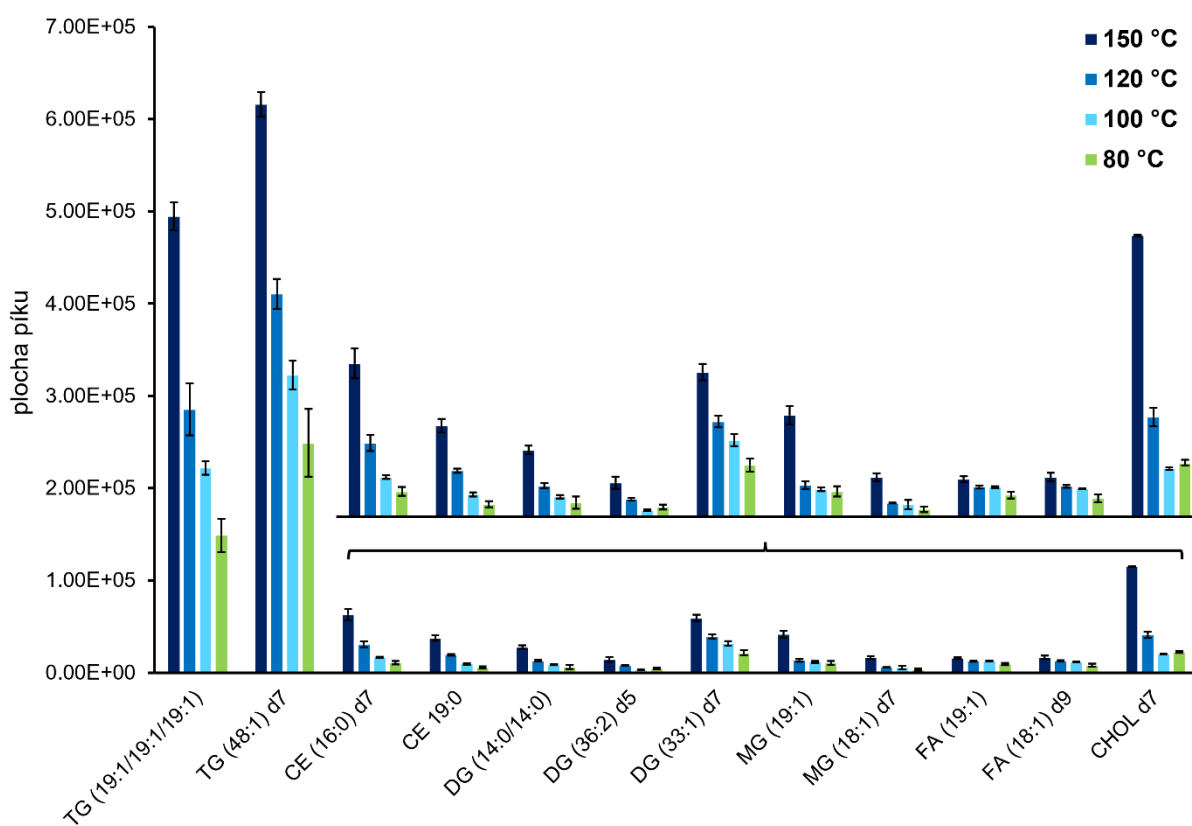
Obrázek 25: Vliv průtoku MF (A) 1 ml/min, (B) 1.2 ml/min na separaci nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix (zobrazené v obr.). UHPSFC podmínky: kolony Viridis HSS C18 SB (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) a Viridis HSS C18 SB (100 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters), ABPR 2000 psi (137.895 bar), teplota kolony 40 °C a MeOH + 0.1 % AAc jako MF B. Chromatogram s optimálním průtokem je zvýrazněn zeleně.

3.2. Optimalizace MS

Pro analýzu nepolárních lipidů byla v této práci použita hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a kvadrupólovým analyzátozem spojeným s analyzátozem doby letu. Cílem optimalizace MS bylo získat co možná nejvyšší citlivost a rozlišení pomocí výběru vhodných parametrů pro analýzu jako je teplota iontového zdroje a desolvatační teplota. Optimalizace byla prováděna za využití kolony Viridis HSS C18 SB (150 × 3.0 mm; 1.8 μm, Waters) s teplotou 40 °C, ABPR byl nastavený na 2100 psi (144.79 bar), jako MF B byl použit MeOH s přidavkem 0.1 % AAc o průtoku 1 ml/min v gradientu: 0 min – 2 % B, 12 min – 20 % B, 12.5 min – 2 % B, 13 min – 2 % B. Celkový čas analýzy byl 13 min a jako pomocná kapalina byla zvolena stejná směs jako pro MF B.

3.2.1. Optimalizace teploty iontového zdroje

Teplota iontového zdroje má vliv zejména na efektivnost ionizace. Vedle doposud používané teploty 150 °C byla pro optimalizaci využita dále teplota 120, 100 a 80 °C. Z **obr. 26** je zřejmé, že při využití 150 °C docházelo k nejučinnější ionizaci. S klesající teplotou klesaly i absolutní intenzity a plochy píků všech měřených nepolárních lipidů. Největší vliv byl zaznamenán při ionizaci sterolů, jejichž intenzita a plocha píků v případě 150 °C vzrostla násobně více než tomu bylo u ostatních tříd. Z toho důvodu bylo ponecháno původní nastavení teploty ionizačního zdroje 150 °C, což odpovídá i doporučení výrobce přístroje.

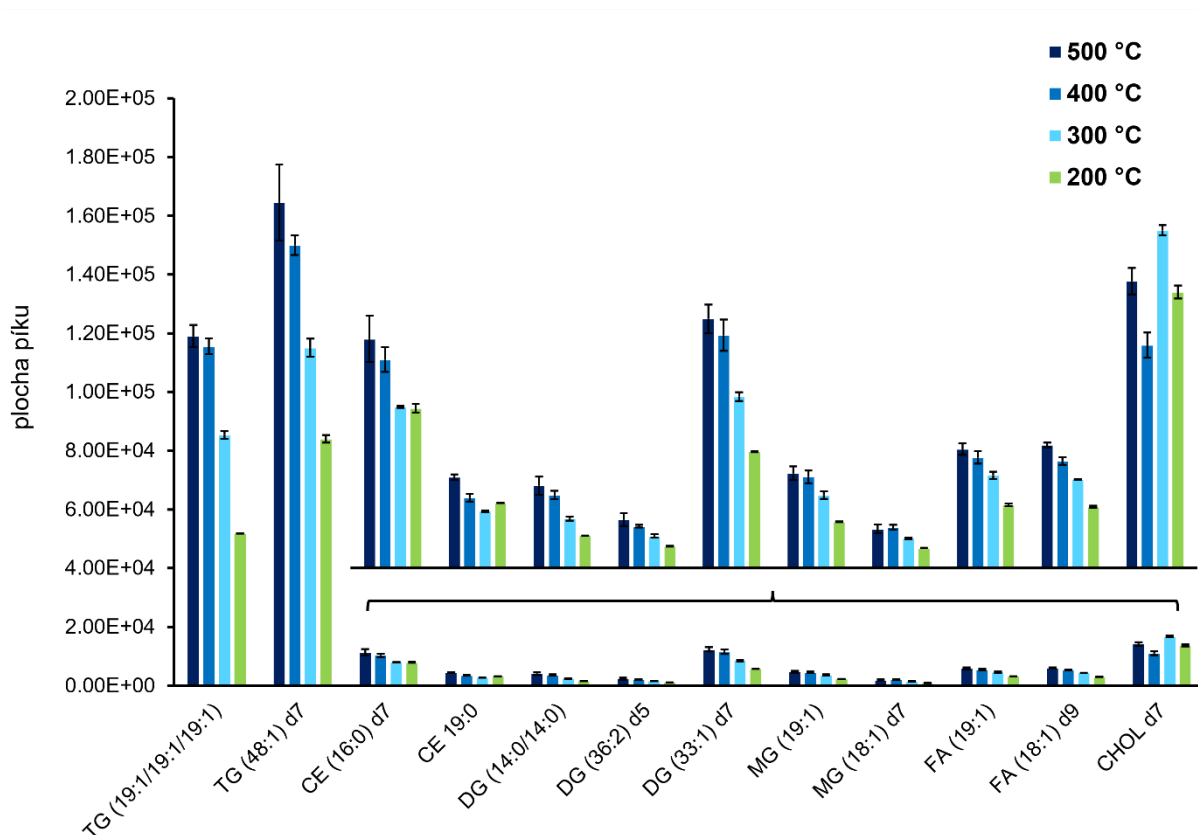


Obrázek 26: Vliv teploty zdroje na absolutní plochy píků nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix. MS podmínky: desolvatační teplota 500 °C, pozitivní mód polarity, režim citlivosti s rozsahem m/z 150–1000 a skenovací rychlost 0.1 s.

3.2.2. Optimalizace desolvatační teploty

Další optimalizovanou veličinou byla desolvatační teplota, doposud nastavená na 500 °C, která byla porovnávána dále s 400, 300 a 200 °C. Na **obr. 27** je jasně znázorněn trend, který úměrně klesá s klesající desolvatační teplotou pro všechny nepolární lipidy. Výjimku tvoří steroly, u kterých nebyl zaznamenán jednoznačný trend aplikované teploty. Jako

optimální desolvatační teplota byla proto zvolena doposud využívaná hodnota 500 °C. Vzhledem ke zvýšení rizika rozkladu biomolekul nebyla vyšší teplota testována.



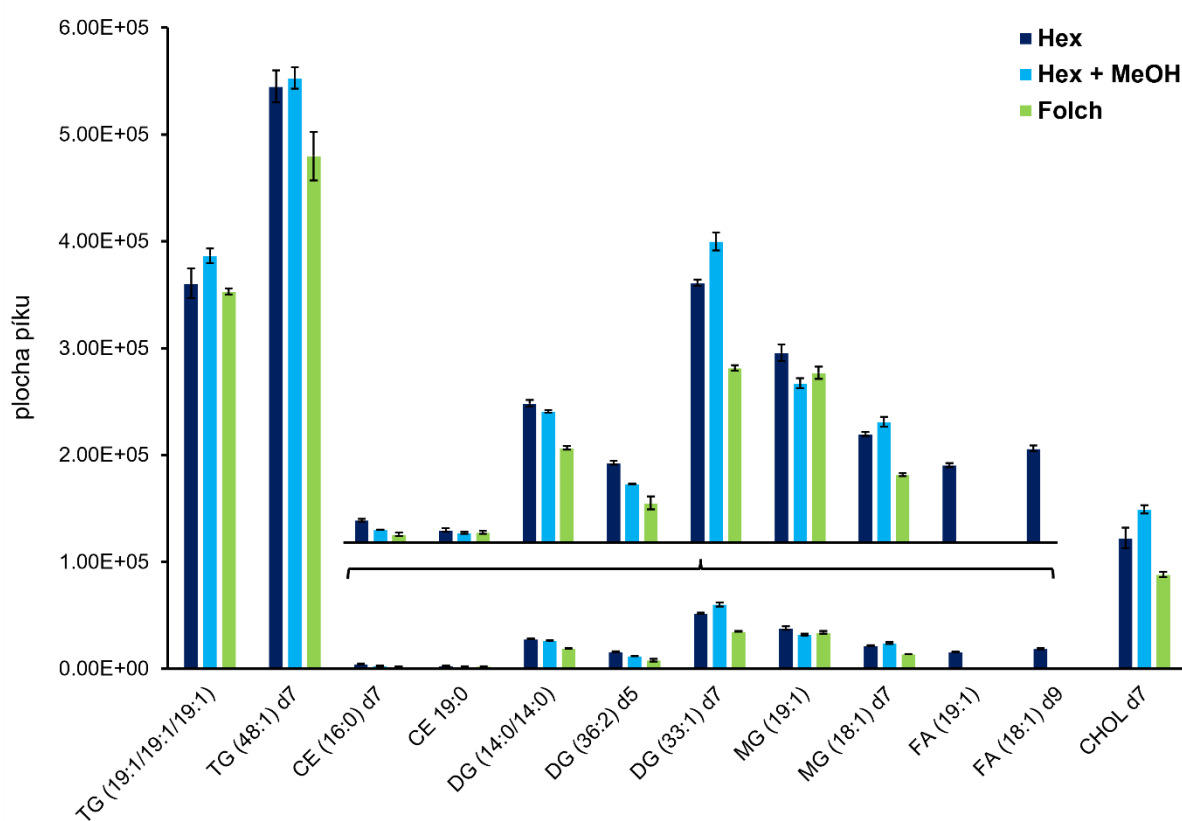
Obrázek 27: Optimalizace desolvatační teploty pro analýzu nepolárních lipidů ve vzorku séra obsahujícím IS Mix. MS podmínky: desolvatační teplota 500 °C, pozitivní mód polaritě, režim citlivosti s rozsahem m/z 150–1000 a skenovací rychlost 0.1 s.

3.3. Optimalizace extrakčního protokolu

S ohledem na stanovení vybraných nepolárních tříd lipidů (SE, MG, DG, TG, FA a ST) byly vybrány 3 extrakční protokoly využívané v lipidomice, které byly navzájem porovnány při extrakci lipidů ze vzorku séra. Vedle klasické extrakce lipidů podle Folche [47] byla testována také modifikace této metody, kde byl používaný chloroform nahrazen hexanem a dále extrakce čistým hexanem. Extrakce podle Folche byla provedena následujícím způsobem. Ke zderivatizovanému vzorku séra obsahujícímu IS bylo přidáno 2000 μl CHCl_3 , 1000 μl MeOH a 600 μl $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Vzorkem bylo třepáno po dobu 5 min při 640 rpm a následně byl vložen na 3 min do centrifugy, při otáčkách 3000 rpm. Pomocí Pasteurovi skleněné pipety byla izolována spodní vrstva, která byla nechána následně odpařit pod proudem dusíku. Extrakce pomocí směsi Hex (2000 μl) a MeOH (1000 μl) a čistým hexanem (2000 μl)

byly provedeny obdobným způsobem. Odpařené vzorky různých extrakčních protokolů byly rozpuštěny ve 250 μl $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1; v/v) a dále 5 \times zředěny před vlastní analýzou. Každý vzorek byl třikrát nadávkován pro získání reprezentativních výsledků. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí integrace dat a znázorněna sloupcovým grafem (**obr. 28**). Detailní popis finálního extrakčního protokolu je popsán v kapitole 2.3.2.

Pro zajištění lepší citlivosti detekce a snížení bodu detekce nepolárních lipidů byla použita chemická derivatizace vyvinutá Peterkou a kol. [57]. Tato derivatizace využívá benzoylchlorid, který se váže na volnou OH-skupinu dané molekuly. Touto metodou mohou být derivatizované třídy MG, DG, ST a FA.



Obrázek 28: Porovnání tří extrakčních protokolů pro extrakci nepolárních lipidů ze vzorku séra obsahujícího IS Mix. UHPSFC podmínky: Viridis HSS C18 SB kolona (150 \times 3.0 mm; 1.8 μm , Waters) + Viridis HSS C18 SB kolona (100 \times 3.0 mm; 1.8 μm , Waters), jako MF B byl použit MeOH s přidavkem 0.1 % AAC o průtoku 1 ml/min, ABPR 2000 psi (137.895 bar) a teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$.

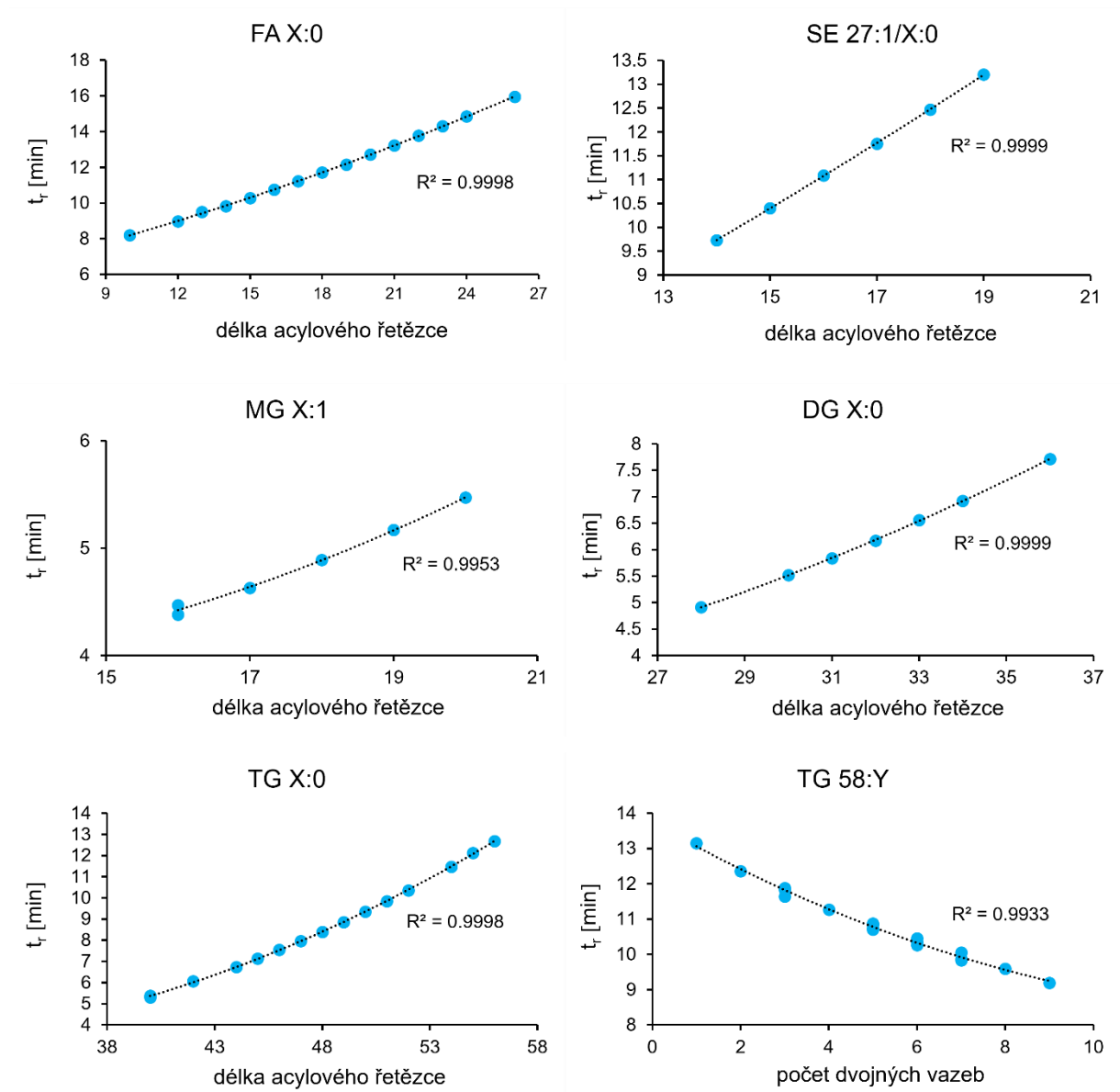
Extrakce podle Folche se ukázala jako nejméně efektivní pro extrakci nepolárních lipidů, a proto nebyla dále zvažována. Dalším negativem se jevila přítomnost nežádoucích tříd polárních lipidů, jelikož tato extrakce není selektivní pouze na nepolární analyty. V případě zbylých dvou extrakčních protokolů zahrnujících Hex byly výsledky srovnatelné, v některých

případech mírně lepší pro extrakci Hex s MeOH. Zásadní problém však nastal při extrakci FA, které přecházely do organické vrstvy méně ochotně než tomu bylo u čistého Hex. Z tohoto důvodu byla extrakce čistým Hex vybrána jako optimální volba.

3.4. Separace lipidů

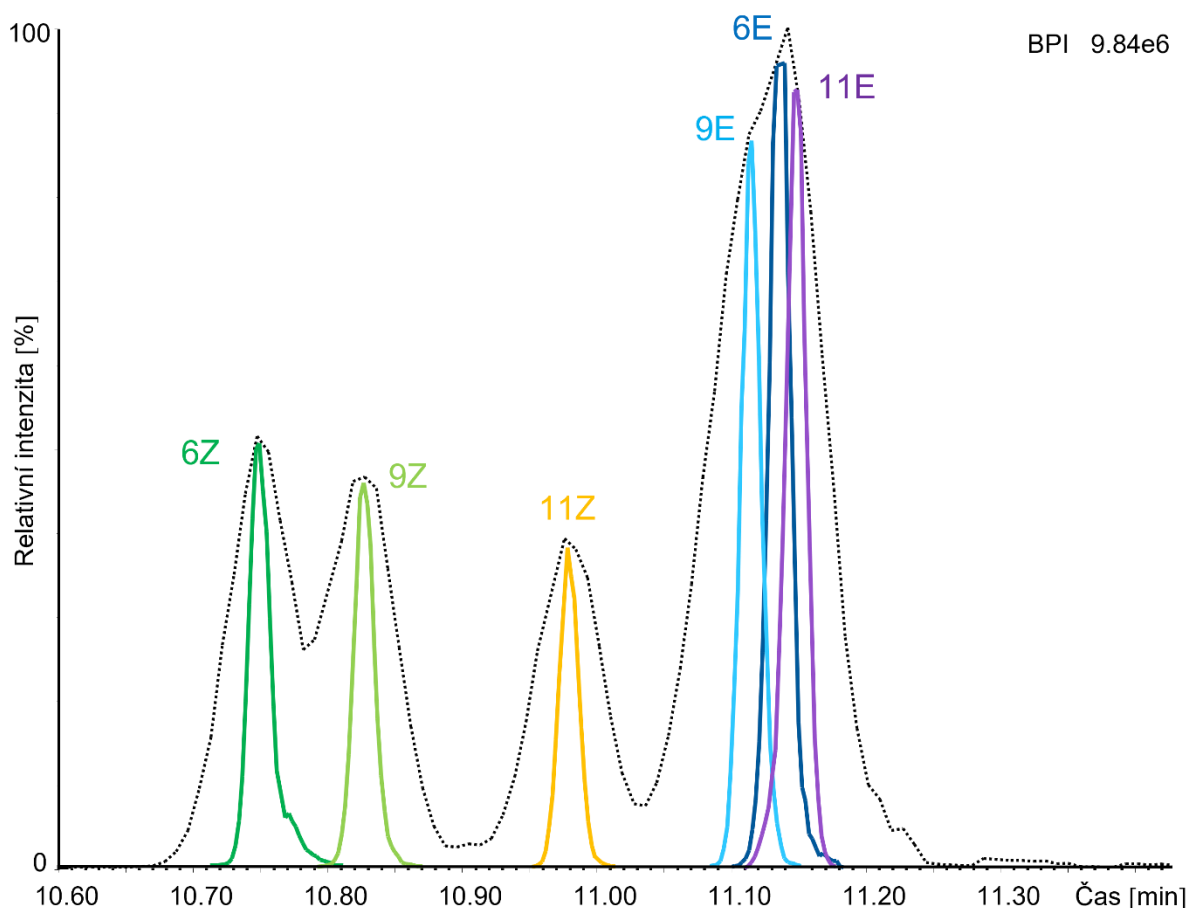
Separace lipidů v UHPSFC probíhá na základě polarity, čím více je látka polární, tím méně je systémem zadržována. Jako první eluují ze systému MG následované DG, potom SE a nakonec FA. TG eluují v celém rozsahu v závislosti na délce acylových řetězců. Separace jednotlivých lipidů v dané třídě probíhá na základě ECN. Látky s větším ECN jsou zadržovány více než látky s nižším ECN. Tyto principy jsou znázorněny na obrázcích v **příloze B** pro CE, FA a ST a v **příloze C** pro MG, DG a TG. Retenční časy separovaných látek se stejným počtem násobných vazeb lineárně narůstají s počtem uhlíků v mastných acylech nepolárních lipidů. Obdobný princip platí pro lipidy obsahující stejný počet uhlíků v acylech, ale rozdílné množství dvojných vazeb, kdy retenční čas klesá. Pro vizualizaci tohoto chování bylo využito sestavení grafů závislosti retenčního času na délce acylového řetězce nebo počtu dvojných vazeb proložených polynomickou regresí druhého stupně. Tyto závislosti byly vytvořeny pro všechny třídy a byla tak ověřena správnost identifikace. Vybrané příklady grafů jsou znázorněny na **obr. 29**. V mnoha případech byla hodnota korelačního koeficientu R^2 lepší než 0.999. V některých případech je hodnota R^2 ovlivněna výskytem různých izomerů dané látky, které mají rozdílné retenční časy. Tyto grafy je také možné využít k dopočítání teoretických retenčních časů nedetekovaných lipidů v dané řadě.

Tato zoptimalizovaná UHPSFC/MS metoda umožňuje i rozdělení izobarických látek, kdy dochází k rozlišení jednotlivých izomerů se stejnou nominální hmotou. Tento jev je zobrazen na **obr. 30**, kde je ukázána separace jednotlivých polohových izomerů s jednou dvojnou vazbou u mastné kyseliny FA 18:1. Z obrázku je patrné, že *cis* izomery eluují dříve a jsou lépe separované než *trans* izomery, které jsou díky své „lineární“ struktuře systémem zadržovány déle a svým retenčním časem se více blíží k retenčnímu času FA 18:0. Podobné retenční chování vykazovaly i standardy FA 18:3, kde FA 18:3 s dvojnými vazbami v polohách 6Z,9Z,12Z eluovala dříve než s polohami 9Z,12Z,15Z. Ve vzorku séra byly s jistotou určeny následující polohové izomery: FA 18:1 9Z, FA 18:1 11Z, FA 18:1 E, FA 18:3 6Z,9Z,12Z a FA 18:3 9Z,12Z,15Z.



Obrázek 29: Příklady závislostí retenčního času na délce acylového řetězce a počtu dvojných vazeb znázorněné pro jednotlivé třídy lipidů.

X:číslo ... znázorňuje měnící se počet uhlíků v acylovém řetězci s konstantním počtem dvojných vazeb,
 číslo:Y ... znázorňuje konstantní počet uhlíků v acylovém řetězci s měnícím se počtem dvojných vazeb.



Obrázek 30: Separace izobarických píků standardů FA 18:1. Rozdělení *cis* (Z) a *trans* (E) polohových izomerů dvojné vazby v acylovém řetězci. Číslo znázorňuje polohu dvojné vazby.

3.5. Identifikace

Identifikace jednotlivých nepolárních lipidů byla provedena na základě určení přesné hmoty s využitím databáze LIPID MAPS, specifických fragmentů získaných pomocí MS/MS fragmentace a závislosti retenčního chování. V případě SE, FA a ST bylo provedeno pouze MS měření. Pro SE byly zaznamenávány jako nejintenzivnější $[M + Na]^+$ adukty a dále také $[M + NH_4]^+$ adukty. Zároveň byly identifikované lipidy ze třídy SE ověřeny přítomností fragmentu 369 (vznikající již při měření MS), který je charakteristický pro tuto skupinu látek obsahující cholesterolovou nebo lathosterolovou část. V případě FA a ST byl nejintenzivnějším iontem ve spektru fragment $[M - 122 + H]^+$. Ztráta m/z 122 značí odštěpení benzoové kyseliny ze zderivatizované molekuly. U MG, DG a TG byla nejprve provedena MS analýza, kde mezi nejintenzivnější ionty ve spektrech byli $[M + NH_4]^+$ a $[M + Na]^+$ adukty. MS analýza ovšem neposkytuje informace o acylovém složení acylglycerolů a proto bylo zapotřebí provedení MS/MS analýzy. Jako prekurzorový iont byl vybrán $[M + NH_4]^+$ adukt, který byl rozštěpen

na příslušné fragmenty. V případě MG a DG vznikaly převážně fragmenty acylových zbytků ($[\text{RC}=\text{O} + 74 + \text{benzoyl}]^+$ se ztrátou H_2O) a pro DG navíc prekurzorový ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ se ztrátou vody. U TG byla zaznamenávána neutrální ztráta $\text{RCOOH} + \text{NH}_3$ z prekurzorového iontu $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$.

Ve vzorku séra obsahujícího IS Mix proměřeného touto zoptimalizovanou metodou bylo identifikováno 389 nepolárních lipidů, z čehož 40 bylo FA, 34 SE, 14 MG, 86 DG, 214 TG a jeden ST. Všechny identifikované lipidy jsou zobrazeny v tabulce (viz **příloha D**) spolu s retenčními časy a zaznamenanými m/z příslušných aduktů a fragmentů.

Získané výsledky byly porovnány s dalšími publikacemi zaměřenými na stanovení lipidů v plazmě. Práce Vaňkové a kol. [149] a Ovčáčkové a kol. [69] byly zaměřené na identifikaci molekul různých lipidových tříd za využití RP-UHPLC/MS. Touto metodou jsou lipidy separovány podle lipidových druhů (stejně jako při RP-UHPSFC/MS) a pomocí MS/MS mohou být zaznamenány jednotlivé mastné acyly přítomné ve zkoumaných analytech. Metodu RP-UHPLC/MS využil také Peterka a kol. [57], který vyvinul robustní a citlivou derivatizační metodu. Díky nově vzniklé RP-UHPSFC/MS metodě, která je zaměřená pouze na nepolární lipidy a dochází tak k mnohem lepší separaci izobarických píků, bylo dosaženo daleko vyšších počtů molekul pro všechny zkoumané třídy. Dalším přínosem této metody je rychlost analýzy (18 min vs. 25 a 160 min), což umožňuje měření většího množství vzorků za 1 den (80 vzorků vs. 57 a 9 vzorků).

Mezi další publikace zkoumající lipidy v biologických vzorcích patří např. práce od Quehenbergera a kol. [150], Bowdena a kol. [151] a Lísy a kol. [152], kteří použili pro identifikaci a kvantifikaci různé analytické přístupy. Tyto metody zahrnují převážně separaci podle lipidových tříd. Jejich výhodou je poměrně snadná kvantifikace, kde interní standard koeluje spolu s ostatními lipidy z dané třídy a tím je zabráněno vlivu matričního efektu. Nevýhodou je ale nižší počet identifikovaných látek, jelikož tyto metody nejsou schopny rozlišit jednotlivé izobarické píky. Při separaci lipidových druhů je kvantifikace složitější. Ideálním řešením je použití IS pro každou zkoumanou molekulu, to je ovšem velmi finančně náročné, proto se využívá alespoň 2 IS pro třídu. Porovnání počtu identifikovaných a kvantifikovaných molekul jednotlivých prací je zobrazeno v **tabulce 5**.

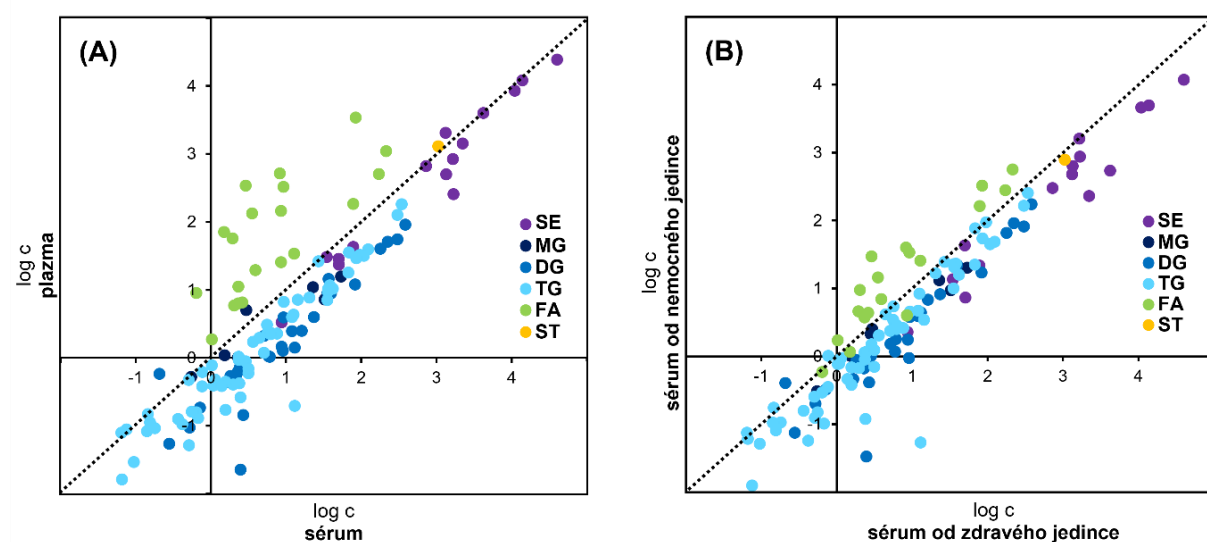
Tabulka 5: Porovnání stanovených lipidů naší optimalizovanou metodou s ostatními publikacemi

lipidová třída	naše metoda	Zuzana Vaňková [149]	Magdaléna Ovčáčiková [69]	Oswald Quehenberger [150]	Miroslav Lísa [152]	Ondřej Peterka [57]	John A. Bowden [151]
SE	34	13	21	22	15	0	0
MG	14	4	0	0	4	5	0
DG	86	20	15	55	22	40	5
TG	214	94	139	18	72	0	42
FA	40	0	31	31	0	8	5
ST	1	1	1	14	1	1	0

DG ... diacylglyceroly, ECN ... ekvivalentní počet uhlíkových atomů, FA ... mastné kyseliny, MG ... monoacylglyceroly, SE ... sterol estery, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly

3.6. Analýza biologických vzorků zdravého člověka a pacienta s rakovinou

Úkolem této diplomové práce bylo také porovnat různé biologické vzorky mezi sebou. Pro tento účel byl vybrán vzorek séra a plazmy od zdravého člověka a nemocného pacienta s rakovinou slinivky břišní. Pro zautomatizování integrace jednotlivých píků byla data vyhodnocena pomocí programu Lipid Data Analyser. Nutno podotknout, že počty nalezených molekul pomocí LDA programu se výrazně liší od počtu manuálně identifikovaných molekul. Reportované plochy píků analytů byly pomocí interních standardů přepočítány na koncentrace a shrnuty do tabulky (viz **příloha E**). Porovnání jednotlivých rozdílů koncentrací lipidů je ukázáno pomocí korelačních grafů (**obr. 31**).



Obrázek 31: Korelační grafy pro porovnání koncentrací [nmol/ml] nepolárních lipidů (A) v plazmě a séru a (B) pro zdravého a nemocného jedince s rakovinou.

Závislosti dekadických logaritmů koncentrací jsou používány pro vizualizaci různých typů korelací, v tomto případě konkrétně pro zobrazení závislosti mezi vzorkem plazmy a séra a také mezi vzorkem séra zdravého a nemocného člověka. První korelační graf (**obr. 31 A**) týkající se porovnání plazmy a séra jasně ukazuje, že koncentrace SE, MG, DG a TG je vyšší v séru, zatímco koncentrace FA je vyšší v plazmě. Co se týče cholesterolu, jakožto jediného sterolu, který bylo možné pomocí této metody s jistotou identifikovat, lze říci, že jeho koncentrace je vyšší ve vzorku plazmy, ovšem pouze nepatrně. Druhý korelační graf (**obr. 31 B**) zobrazuje závislost mezi zdravým a nemocným jedincem s rakovinou. V séru zdravého jedince je vyšší koncentrace pro téměř všechny MG, DG, TG, SE a pro cholesterol. Naopak vyšší koncentrace FA je ve vzorku nemocného jedince.

Pro zobecnění těchto počátečních měření bude nezbytné dokončit vývoj kvantitativního stanovení včetně analytické validace metody a následně změřením rozsáhlejšího souboru pacientů a zdravých kontrol.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje vývoji nové RP-UHPSFC/MS metody pro analýzu nepolárních lipidů v biologických vzorcích. V rámci diplomové práce byla nejprve provedena optimalizace separačních podmínek, kde byl zkoumán vliv jak na změnu retence jednotlivých nepolárních lipidů, tak i na intenzity jejich signálů. Mezi optimalizované parametry byly zařazeny: průtok a složení MF B, přídavek aditiv (H₂O, octan amonný a kyselina octová), teplota a délka kolony (porovnání separace na jedné a dvou kolonách), zpětný tlak a finální gradient. Následovala optimalizace MS, kde zkoumanými podmínkami byla desolvatační teplota a teplota zdroje, které ovlivňovali převážně účinnost ionizace a také optimalizace extrakčního postupu. Pro zajištění větší citlivosti metody byl do kroku extrakce zařazen derivatizační krok s využitím benzoyl chloridu. Z naměřených dat bylo zjevné, že nejvhodnější extrakcí pro nepolární lipidy je extrakce do čistého hexanu.

Další částí diplomové práce byla aplikace vyvinuté metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu nepolárních lipidů v biologických vzorcích. Identifikace byla provedena na základě přesných hmot v porovnání s databází LIPID MAPS, použití tandemové hmotnostní spektrometrie a sestavení grafů závislosti retenčních časů na délce acylového řetězce nebo počtu dvojných vazeb jednotlivých analytů. Celkem bylo identifikováno 389 nepolárních lipidů, z čehož 40 bylo FA, 34 SE, 14 MG, 86 DG, 216 TG a cholesterol. Výhodou separace podle lipidových druhů je rozlišení jednotlivých izobarických píků. Metoda je schopná rozlišit jak lipidy s rozdílným složením acylových řetězců, tak i lipidy s rozdílnou polohou dvojně vazby (pozorováno u FA, kde byly jednotlivé polohy ověřeny pomocí standardů).

Získané výsledky byly porovnány s vybranými publikacemi zaměřenými na analýzu lipidů v biologických vzorcích a bylo zjištěno, že při využití této nově vyvinuté metody je rozsah identifikovaných lipidů výrazně vyšší až na ST.

Pro analýzu biologických vzorků byly vybrány vzorky plazmy a séra od zdravého člověka a pacienta s rakovinou slinivky břišní. Ukázalo se, že koncentrace nepolárních lipidů nabývá vyšších hodnot ve vzorcích séra. Výjimku tvoří FA a ST, u kterých je tento trend opačný.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že RP-UHPSFC/MS je vhodnou metodou pro identifikaci a kvantifikaci nepolárních lipidů. Tato metoda přináší díky separaci lipidových druhů možnost daleko vyšších počtů identifikovaných lipidů za krátký čas, než metody využívající separaci podle lipidových tříd. Do budoucna je vhodné pokračovat s její validací a následným využitím pro kvantitativní analýzu většího souboru biologických vzorků.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Wang J, Wang Ch, Han X. Tutorial on lipidomics. *Analytica Chimica Acta*. **2019**, *1061*, 28-41. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.01.043
- [2] Hutchins P, Barkley R, Murphy R. Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. **2008**, *49*(4), 804-813. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M700521-JLR200
- [3] Triebel A, Hartler J, Trötz Müller M, Köfeler, CH. Lipidomics: Prospects from a technological perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2017**, *1862*(8), 740-746. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2017.03.004
- [4] Laboureur L, Ollero M, Touboul D. Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography. *International Journal of Molecular Sciences*. **2015**, *16*(12), 13868-13884. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160613868
- [5] Muro E, Atilla-Gokcumen GE, Eggert US, Bement W. Lipids in cell biology: how can we understand them better?. *Molecular Biology of the Cell*. **2014**, *25*(12), 1819-1823. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e13-09-0516
- [6] Ekroos K. *Lipidomics: Technologies and Applications* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag a Co, 2012 [cit. 2022-11-14]. ISBN 978-3-527-65597-7.
- [7] Gurr M, Harwood J, Fryan K, Murphy D, Michell R. *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health* [online]. Sixth edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley, 2016 [cit. 2022-11-14]. ISBN 9781118501085.
- [8] Chollet C, Boutet-Mercey S, Laboureur L *et al.* Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry for lipidomics. *Journal of Mass Spectrometry*. **2019**, *54*(10), 791-801. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.4445
- [9] Fahy E, Subramaniam S, Brown H *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. **2005**, *46*(5), 839-861. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200

- [10] Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2011**, *1811*(11), 637-647. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009
- [11] Fahy E, Subramaniam S, Murphy R *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. **2009**, *50*, 9-14. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
- [12] Sud M, Fahy E, Cotter D *et al.* LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*. **2007**, *35*(1), 527-532. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl838
- [13] Xiang L, Zhu L, Huang Y, Cai Z. Application of Derivatization in Fatty Acids and Fatty Acyls Detection: Mass Spectrometry-Based Targeted Lipidomics. *Small Methods*. **2020**, *4*(8), 2000160. ISSN 2366-9608. Dostupné z: doi:10.1002/smt.202000160
- [14] Layden B, Angueira A, Brodsky M, Durai V, Lowe W. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Translational Research*. **2013**, *161*(3), 131-140. ISSN 19315244. Dostupné z: doi:10.1016/j.trsl.2012.10.007
- [15] Qin C, Han X, Pan M, ed. Lipid Metabolism and Lipidomics Applications in Cancer Research. In: LI, Yongsheng. *Lipid Metabolism in Tumor Immunity* [online]. Volume 1316. New Delhi, India: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2021, s. 1 - 24 [cit. 2022-11-27]. ISBN 978-981-33-6785-2.
- [16] Ratnayake WM, Galli C. Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*. **2009**, *55*(1-3), 8-43. ISSN 1421-9697. Dostupné z: doi:10.1159/000228994
- [17] Stobarth, AK, Stymne S, ed. 8 - Triacylglycerol Biosynthesis. In: STUMPF, P. *Lipids: Structure and Function* [online]. Volume 9. Davis, California: Academic Press, 1987, s. 175 - 214 [cit. 2022-11-28]. ISBN 978-0-12-675409-4. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-675409-4.50014-9
- [18] Kennedy EP. Metabolism of Lipides. *Annual Review of Biochemistry*. **1957**, *26*(1), 119-148. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.26.070157.001003

- [19] Yen Ch-L, Stone S, Koliwad S, Harris Ch, Farese R. Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*. **2008**, 49(11), 2283-2301. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R800018-JLR200
- [20] Chen B, McClements D, Decker E. Impact of diacylglycerol and monoacylglycerol on the physical and chemical properties of stripped soybean oil. *Food Chemistry*. **2014**, 142, 365-372. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.070
- [21] Feltes M, de Oliveira D, Block J, Ninow J. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. *Food and Bioprocess Technology*. **2013**, 6(1), 17-35. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-012-0836-3
- [22] Clogston J, Rathman J, Tomasko D, Walker H, Caffrey M. Phase behavior of a monoacylglycerol. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2000**, 107(2), 191-220. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-3084(00)00182-1
- [23] Carrasco S, Mérida I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends in Biochemical Sciences*. **2007**, 32(1), 27-36. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2006.11.004
- [24] Volkman J. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2003**, 60(5), 495-506. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-002-1172-8
- [25] Li T, Yin Y, Zhou Z *et al.* Ion mobility-based sterolomics reveals spatially and temporally distinctive sterol lipids in the mouse brain. *Nature Communications*. **2021**, 12(1), 1-13. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-24672-x
- [26] Mesmin B, Maxfield F. Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2009**, 1791(7), 636-645. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2009.03.002
- [27] Demel RA, De Kruyff B. The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. **1976**, 457(2), 109-132. ISSN 03044157. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4157(76)90008-3

- [28] Griffiths W, Wang Y. Sterolomics in biology, biochemistry, medicine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, *120*, 115280. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.10.016
- [29] Lichtenstein A, Deckelbaum R. Stanol/Sterol Ester-Containing Foods and Blood Cholesterol Levels. *Circulation*. **2001**, *103*(8), 1177-1179. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.103.8.1177
- [30] Goad J, Akihisa T. *Analysis of Sterols* [online]. First edition. London: Springer Science & Business Media, 2012 [cit. 2023-03-30]. ISBN 978-94-009-1447-6. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-94-009-1447-6
- [31] Pham H, Maccarone A, Thomas M, Campbell J, Mitchell T, Blanksby S. Structural characterization of glycerophospholipids by combinations of ozone- and collision-induced dissociation mass spectrometry: the next step towards “top-down” lipidomics. *The Analyst*. **2014**, *139*(1), 204-214. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C3AN01712E
- [32] Frisardi V, Panza F, Seripa D, Farooqui T, Farooqui A. Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A complex meshwork in Alzheimer’s disease pathology. *Progress in Lipid Research*. **2011**, *50*(4), 313-330. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2011.06.001
- [33] Randolph C, Blanksby S, Mcluckey S. Toward Complete Structure Elucidation of Glycerophospholipids in the Gas Phase through Charge Inversion Ion/Ion Chemistry. *Analytical Chemistry*. **2020**, *92*(1), 1219-1227. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b04376
- [34] Farooqui A, Horrocks L, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2000**, *106*(1), 1-29. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-3084(00)00128-6
- [35] Han X. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. 1st edition. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2016. ISBN 9781118893128.

- [36] Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends in Biochemical Sciences*. **2016**, *41*(11), 954-969. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2016.08.010
- [37] Han X, Gross R. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*. **2003**, *44*(6), 1071-1079. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R300004-JLR200
- [38] Li M, Yang L, Bai Y, Liu H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Analytical Chemistry*. **2014**, *86*(1), 161-175. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac403554h
- [39] Holčapek M, Liebisch G, Ekroos K. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*. **2018**, *90*(7), 4249-4257. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b05395
- [40] Zivkovic A, Wiest M, Nguyen U, Davis R, Watkins S, German J. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics*. **2009**, *5*(4), 507-516. ISSN 1573-3882. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-009-0174-2
- [41] Matthan N, Ip B, Resteghini N, Ausman L, Lichtenstein A. Long-term fatty acid stability in human serum cholesteryl ester, triglyceride, and phospholipid fractions. *Journal of Lipid Research*. **2010**, *51*(9), 2826-2832. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D007534
- [42] Pizarro C, Arenzana-Rámila I, Pérez-Del-Notario N, Pérez-Matute P, González-Sáiz J. Thawing as a critical pre-analytical step in the lipidomic profiling of plasma samples: New standardized protocol. *Analytica Chimica Acta*. **2016**, *912*, 1-9. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.01.058
- [43] Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochimica Medica*. **2013**, *23*(1), 70-77. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2013.009
- [44] Hammad S, Pierce J, Soodavar F *et al.* Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *Journal of Lipid Research*. **2010**, *51*(10), 3074-3087. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D008532

- [45] Burla B, Arita M, Arita M *et al.* MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. *Journal of Lipid Research*. **2018**, 59(10), 2001-2017. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.S087163
- [46] Saini R, Prasad P, Shang X, Keum Y-S. Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(24), 1-19. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222413643
- [47] Folch J, Lees M, Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497–509.
- [48] Bligh E, Dyer W. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1959**, 37(8), 911-917. ISSN 0576-5544. Dostupné z: doi:10.1139/o59-099
- [49] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*. **2008**, 49(5), 1137-1146. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D700041-JLR200
- [50] Löfgren L, Ståhlman M, Forsberg G-B, Saarinen S, Nilsson R, Hansson G. The BUMÉ method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *Journal of Lipid Research*. **2012**, 53(8), 1690-1700. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D023036
- [51] Lísa M, Holčapek M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1198-1199, 115-130. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.05.037
- [52] Holčapek M, Lísa M, Jandera P, Kabátová N. Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of Separation Science*. **2005**, 28(12), 1315-1333. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200500088

- [53] Satomi Y, Hirayama M, Kobayashi H. One-step lipid extraction for plasma lipidomics analysis by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **2017**, *1063*, 93-100. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.08.020
- [54] Antonelli M, Holčapek M, Wolrab D. Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography – mass spectrometry for the qualitative analysis of metabolites covering a large polarity range. *Journal of Chromatography A*. **2022**, *1665*, 462832. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2022.462832
- [55] Huynh K, Barlow, Ch, Jayawardana K *et al.* High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chemical Biology*. **2019**, *26*(1), 71-844. ISSN 24519456. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2018.10.008
- [56] Wang M, Hayakawa J, Yang K, Han X. Characterization and Quantification of Diacylglycerol Species in Biological Extracts after One-Step Derivatization: A Shotgun Lipidomics Approach. *Analytical Chemistry*. **2014**, *86*(4), 2146-2155. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac403798q
- [57] Peterka O, Jirásko R, Vaňková Z, Chocholoušková M, Wolrab D, Kulhánek J, Bureš F a Holčapek M. Simple and Reproducible Derivatization with Benzoyl Chloride: Improvement of Sensitivity for Multiple Lipid Classes in RP-UHPLC/MS. *Analytical Chemistry*. **2021**, *93*(41), 13835-13843. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c02463
- [58] Mullangi R, Addepalli R. A concise review on lipidomics analysis in biological samples. *ADMET and DMPK*. **2020**, *9*(1), 1-22. ISSN 1848-7718. Dostupné z: doi:10.5599/admet.913
- [59] SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard. In: *Avanti Polar Lipids* [online]. Alabama: Croda International Plc., 1967 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/330707>
- [60] Čajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, *61*, 192-206. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.04.017

- [61] Fekete S, Schappler J, Veuthey J-L, Guillarme D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, *63*, 2-13. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.007
- [62] Walter T, Andrews R. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, *63*, 14-20. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.07.016
- [63] Mazzeo J, Neue U, Kele M, Plumb R. A new separation technique takes advantage of sub-2- μm porous particles. *Analytical Chemistry*. **2005**, *77*, 460-467.
- [64] González-Ruiz V, Olives A, Martín M. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2015**, *64*, 17-28. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.008
- [65] Nováková L, Vlčková H, Petr S. Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives. *Talanta*. **2012**, *93*, 99-105. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.01.054
- [66] El Deeb S. Monolithic Silica for Fast HPLC: Current Success and Promising Future. *Chromatographia*. **2011**, *74*(9-10), 681-691. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-011-2133-0
- [67] Blue L, Franklin E, Godinho J, Grinias J, Grinias K, Lunn D, Moore S. Recent advances in capillary ultrahigh pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2017**, *1523*, 17-39. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.05.039
- [68] Fanali Ch, Rocco A, Aturki Z, Mondello L, Fanali S. Analysis of polyphenols and methylxantines in tea samples by means of nano-liquid chromatography utilizing capillary columns packed with core-shell particles. *Journal of Chromatography A*. **2012**, *1234*, 38-44. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.12.103
- [69] Ovčáčíková M, Lisa M, Cífková E, Holčápek M. Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2016**, *1450*, 76-85. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.04.082

- [70] Gao X, Zhang Q, Meng D *et al.* A reversed-phase capillary ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry (UPLC-MS) method for comprehensive top-down/bottom-up lipid profiling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, *402*(9), 2923-2933. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-5773-5
- [71] Cvačka J, Hovorka O, Jiroš P, Kindl J, Stránský K, Valterová I. Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*. **2006**, *1101*(1-2), 226-237. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.10.001
- [72] Řezanka T, Kolouchová I, Nedbalová L, Sigler K. Enantiomeric separation of triacylglycerols containing very long chain fatty acids. *Journal of Chromatography A*. **2018**, *1557*, 9-19. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.04.064
- [73] Holčapek M, Jandera P, Zderadička P, Hrubá L. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, *1010*(2), 195-215. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(03)01030-6
- [74] Holčapek M, Ovčáčíková M, Lísa M, Cífková E, Hájek T. Continuous comprehensive two-dimensional liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of complex lipidomic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2015**, *407*(17), 5033-5043. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8528-2
- [75] Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*. **2006**, *29*(12), 1784-1821. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600199
- [76] Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*. **2011**, *692*(1-2), 1-25. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.02.047
- [77] Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. **1990**, *499*, 177-196. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)96972-3

- [78] Tang D-Q, Zou L, Yin X-X, Ong Ch. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrometry Reviews*. **2016**, 35(5), 574-600. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21445
- [79] Guo Y. Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *The Analyst*. **2015**, 140(19), 6452-6466. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C5AN00670H
- [80] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, 402(1), 231-247. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [81] Jakubec P, Nováková L, ed., Plachká K. Chapter 12 - Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry. In: Holčapek M, Byrdwell W. *Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques* [online]. First edition. Academic Press and AOCS Press, 2017, s. 445-487 [cit. 2023-01-30]. ISBN 978-0-12-811732-3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811732-3.00012-1>
- [82] Nováková L, Douša M, Česla P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2.* přepracované a rozšířené vydání. Brno, Česká republika: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [83] Guiochon G, Tarafder A. Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218(8), 1037-1114. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.12.047
- [84] Nováková L, Perrenoud AG-G, Francois I, West C, Lesellier E, Guillarme D. Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. **2014**, 824, 18-35. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.03.034
- [85] Nováková L, Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 1.* vydání. Brno, Česká republika: Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

- [86] Andrews T. XVIII. The Bakerian Lecture .—On the continuity of the gaseous and liquid states of matter. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **1869**, 159(159), 575-590. ISSN 0261-0523. Dostupné z: doi:10.1098/rstl.1869.0021
- [87] Sie ST, Van Beersum W, Rijnders GWA. High-Pressure Gas Chromatography and Chromatography with Supercritical Fluids. I. The Effect of Pressure on Partition Coefficients in Gas-Liquid Chromatography with Carbon Dioxide as a Carrier Gas. *Separation Science*. **1966**, 1(4), 459-490. ISSN 0037-2366. Dostupné z: doi:10.1080/01496396608049460
- [88] Roy D, Tarafder A, Miller L. Effect of water addition to super/sub-critical fluid mobile-phases for achiral and chiral separations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2021**, 145, 1-8. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2021.116464
- [89] Tarafder A. Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2016**, 81, 3-10. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.01.002
- [90] Lesellier E, West C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1382, 2-46. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.12.083
- [91] West C, Lesellier E. A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1191(1-2), 21-39. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.02.108
- [92] West C, Lemasson E, Bertin S, Hennig P, Lesellier E. An improved classification of stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2016**, 1440, 212-228. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.02.052
- [93] West C, Lesellier E. Chemometric methods to classify stationary phases for achiral packed column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chemometrics*. **2012**, 26(3-4), 52-65. ISSN 08869383. Dostupné z: doi:10.1002/cem.1414

- [94] Poole CF. Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2012**, *1250*, 157-171. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.12.040
- [95] Galea Ch, Mangelings D, Heyden YV. Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta*. **2015**, *886*, 1-15. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.04.009
- [96] Nováková L, Douša M. General screening and optimization strategy for fast chiral separations in modern supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. **2017**, *950*, 199-210. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.11.002
- [97] Berger TA. Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2015**, *1421*, 171-183. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.07.062
- [98] Perrenoud AG-G, Veuthey J-L, Guillaume D. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography A*. **2012**, *1266*, 158-167. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.10.005
- [99] Perrenoud AG-G, Veuthey J-L, Guillaume D. The use of columns packed with sub-2 μm particles in supercritical fluid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, *63*, 44-54. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.06.023
- [100] Lesellier E. Efficiency in supercritical fluid chromatography with different superficially porous and fully porous particles ODS bonded phases. *Journal of Chromatography A*. **2012**, *1228*, 89-98. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.11.058
- [101] Perrenoud AG-G, Farrell W, Aurigemma Ch, Aurigemma N, Fekete S, Guillaume D. Evaluation of stationary phases packed with superficially porous particles for the analysis of pharmaceutical compounds using supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2014**, *1360*, 275-287. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.07.078

- [102] Lída M, Holčapek M. High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2015**, 87(14), 7187-7195. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b01054
- [103] Wolrab D, Peterka O, Chocholoušková M, Holčapek M. Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography / mass spectrometry in the lipidomic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2022**, 149, 116546. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116546
- [104] Čáslavský J, Ševčík J. *Organická analýza*. 1. vydání. Český Těšín: 2 Theta, 2022. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [105] Barbini S, Sriranganadane D, Orozco SE, Kabrelian A, Karlström K, Rosenau T, Potthast A. Tools for Bark Biorefineries: Studies toward Improved Characterization of Lipophilic Lignocellulosic Extractives by Combining Supercritical Fluid and Gas Chromatography. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2021**, 9(3), 1323-1332. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.0c07914
- [106] Hou J-J, Cao Ch-M, Xu Y-W *et al.* Exploring lipid markers of the quality of coix seeds with different geographical origins using supercritical fluid chromatography mass spectrometry and chemometrics. *Phytomedicine*. **2018**, 45, 1-7. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2018.03.010
- [107] Takeda H, Izumi Y, Takahashi M *et al.* Widely-targeted quantitative lipidomics method by supercritical fluid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. **2018**, 59(7), 1283-1293. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D083014
- [108] Tang Y, Ali M, Sun X, Debrah A, Wang M, Hou H, Guo Q, Du Z. Development of a high-throughput method for the comprehensive lipid analysis in milk using ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2021**, 1658, 1-15. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462606

- [109] Gil-Ramirez A, Al-Hamimi S, Rosmark O, Hallgren O, Larsson-Callerfelt A-K, Rodríguez-Meizoso I. Efficient methodology for the extraction and analysis of lipids from porcine pulmonary artery by supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2019**, 1592, 173-182. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.01.064
- [110] Wolrab D, Chocholoušková M, Jirásko R, Peterka O, Holčapek M. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography–mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2020**, 412(10), 2375-2388. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-020-02473-3
- [111] Salazar C, Jones M, Sturtevant D *et al.* Development and application of sub-2- μ m particle CO₂-based chromatography coupled to mass spectrometry for comprehensive analysis of lipids in cottonseed extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2017**, 31(7), 591-605. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.7825
- [112] Yang Y, Zhong Q, Zhang H, Mo C, Yao J, Huang T, Zhou T, Tan W. Lipidomics study of the protective effects of isosteviol sodium on stroke rats using ultra high-performance supercritical fluid chromatography coupling with ion-trap and time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, 157, 145-155. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.05.022
- [113] Jumaah F, Sandahl M, Turner Ch. Supercritical Fluid Extraction and Chromatography of Lipids in Bilberry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2015**, 92(8), 1103-1111. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-015-2680-x
- [114] Ashraf-Khorassani M, Isaac G, Rainville P, Fountain K, Taylor LT. Study of UltraHigh Performance Supercritical Fluid Chromatography to measure free fatty acids with out fatty acid ester preparation. *Journal of Chromatography B*. **2015**, 997, 45-55. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.05.031
- [115] Shi X, Yang W, Qiu S, Hou J, Wu W, Guo D. Systematic profiling and comparison of the lipidomes from *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and *P. notoginseng* by ultrahigh performance supercritical fluid chromatography/high-resolution mass spectrometry and

- ion mobility-derived collision cross section measurement. *Journal of Chromatography A*. **2018**, *1548*, 64-75. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.03.025
- [116] Berkecz R, Lída M, Holčápek M. Analysis of oxylipins in human plasma: Comparison of ultrahigh-performance liquid chromatography and ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2017**, *1511*, 107-121. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.06.070
- [117] Zhang X, Qi C, Zhang Y, Wei W, Jin Q, Xu Z, Tao G, Wang X. Identification and quantification of triacylglycerols in human milk fat using ultra-performance convergence chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry with supercritical carbon dioxide as a mobile phase. *Food Chemistry*. **2019**, *275*, 712-720. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.150
- [118] Masuda K, Abe K, Murano Y. A Practical Method for Analysis of Triacylglycerol Isomers Using Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2021**, *98*(1), 21-29. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1002/aocs.12432
- [119] Guillaume D, Desfontaine V, Heinisch S, Veuthey J-L. What are the current solutions for interfacing supercritical fluid chromatography and mass spectrometry?. *Journal of Chromatography B*. **2018**, *1083*, 160-170. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.03.010
- [120] Glish G, Vachet R. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2003**, *2*(2), 140-150. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd1011
- [121] Jirásko R. Hmotnostní spektrometrie (C855) a Hmotnostní spektrometrie v organické analýze (C876). In: *Michal Holčápek Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice* [online]. Pardubice: University of Pardubice, 2006 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>

- [122] Konermann L, Ahadi E, Rodriguez A, Vahidi S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*. **2013**, 85(1), 2-9. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac302789c
- [123] Wilm M. Principles of Electrospray Ionization. *Molecular a Cellular Proteomics*. **2011**, 10(7), 1-8. ISSN 15359476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.009407
- [124] Haag AM, ed. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: Mirzaei H, Carrasco M. *Modern Proteomics - Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* [online]. 1st edition. Switzerland: Springer Cham, 2016, s. 157 - 169 [cit. 2023-03-27]. ISBN 978-3-319-41448-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7
- [125] Li Ch, Chu S, Tan S *et al.* Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. *Frontiers in Chemistry*. **2021**, 9, 1-21. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2021.813359
- [126] El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2009**, 44(3), 210-230. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920902717872
- [127] Nikolaev E, Kostyukevich Y, Vladimirov G. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. *Mass Spectrometry Reviews*. **2016**, 35(2), 219-258. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21422
- [128] Marshall A, Hendrickson Ch, Jackson G. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*. **1998**, 17(1), 1-74. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-K
- [129] Smith D, Podgorski D, Rodgers R, Blakney G, Hendrickson Ch. 21 Tesla FT-ICR Mass Spectrometer for Ultrahigh-Resolution Analysis of Complex Organic Mixtures. *Analytical Chemistry*. **2018**, 90(3), 2041-2047. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b04159
- [130] Zubarev R, Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2013**, 85(11), 5288-5296. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac4001223

- [131] Makarov A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*. **2000**, 72(6), 1156-1162. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac991131p
- [132] de Hoffman E. Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*. **1996**, 31(2), 129-137. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T
- [133] Gross JH. Tandem Mass Spectrometry. In: Gross JH. *Mass Spectrometry* [online]. Third Edition. Switzerland: Springer Cham, 2017, s. 539 - 612 [cit. 2023-03-28]. ISBN 978-3-319-54398-7. Dostupné z: doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7_9
- [134] Holčápek M, Lída M, ed. UHPSFC/ESI-MS Analysis of Lipids. In: Giera M. *Clinical Metabolomics. Methods in Molecular Biology* [online]. Vol. 1730. New York, NY: Humana Press, 2018, s. 73-82 [cit. 2023-02-02]. ISBN 978-1-4939-7592-1. Dostupné z: doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_5
- [135] Losacco G, Veuthey J-L, Guillarme D. Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry: Recent evolution and current trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, 118, 731-738. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.07.005
- [136] Murphy RC, Leiker T, Barkley R. Glycerolipid and cholesterol ester analyses in biological samples by mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2011**, 1811(11), 776-783. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.019
- [137] Murphy RC. Challenges in mass spectrometry-based lipidomics of neutral lipids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2018**, 107, 91-98. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.07.023
- [138] Liebisch G, Vizcaíno J, Köfeler H, Trötz Müller M, Griffiths W, Schmitz G, Spener F, Wakelam M. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. **2013**, 54(6), 1523-1530. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M033506

- [139] Watanabe K, Yasugi E, Oshima M. How to Search the Glycolipid data in "LIPIDBANK for Web" the Newly Developed Lipid Database in Japan. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **2000**, 12(65), 175-184. ISSN 0915-7352. Dostupné z: doi:10.4052/tigg.12.175
- [140] Caffrey M, Hogan J. LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1992**, 61(1), 1-109. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(92)90002-7
- [141] *Lipid Library* [online]. Urbana, USA: The American Oil Chemists' Society [cit. 2022-11-15]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org>.
- [142] *CYBERLIPID* [online]. Strasbourg: GERLI [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <http://cyberlipid.gerli.com/>
- [143] LIPID MAPS® Structure Database (LMSD). In: *LIPID MAPS®* [online]. 2003 [cit. 2022-11-29]. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/overview>
- [144] Wolrab D, Cífková E, Čáň P *et al.* LipidQuant 1.0: automated data processing in lipid class separation–mass spectrometry quantitative workflows. *Bioinformatics*. **2021**, 37(23), 4591-4592. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btab644
- [145] Hartler J, Trötz Müller M, Chitraju Ch, Spener F, Köfeler H, Thallinger G. Lipid Data Analyzer: unattended identification and quantitation of lipids in LC-MS data. *Bioinformatics*. **2011**, 27(4), 572-577. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btq699
- [146] Koelmel J, Cochran J, Ulmer C *et al.* Software tool for internal standard based normalization of lipids, and effect of data-processing strategies on resulting values. *BMC Bioinformatics*. **2019**, 20(1), 1-13. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-019-2803-8
- [147] Peng B, Kopczynski D, Pratt B *et al.* LipidCreator workbench to probe the lipidomic landscape. *Nature Communications*. **2020**, 11(1), 1-14. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-15960-z

- [148] Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. **2010**, *11*(1), 1-11. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2105-11-395
- [149] Vaňková Z, Peterka O, Chocholoušková M, Wolrab D, Jirásko R, Holčapek M. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2022**, *414*(1), 319-331. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-021-03492-4
- [150] Quehenberger O, Armando A, Brown A *et al.* Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research*. **2010**, *51*(11), 3299-3305. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M009449
- [151] Bowden J, Heckert A, Ulmer C *et al.* Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950–Metabolites in Frozen Human Plasma. *Journal of Lipid Research*. **2017**, *58*(12), 2275-2288. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M079012
- [152] Lída M, Cífková E, Khalikova M, Ovčačíková M, Holčapek M. Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. *Journal of Chromatography A*. **2017**, *1525*, 96-108. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.10.022

PŘÍLOHY

Příloha A: Tabulka koncentrací standardů v zásobních roztocích	103
Příloha B: Separace standardů (A) CE, (B) FA, (C) ST pomocí zoptimalizované UHPSFC/MS metody	106
Příloha C: Separace standardů (A) MG, (B) DG, (C) TG pomocí zoptimalizované UHPSFC/MS metody	107
Příloha D: Tabulka identifikovaných nepolárních lipidů ve vzorku séra.....	108
Příloha E: Tabulka vypočtených koncentrací v nmol/ml pro lipidy identifikované ve vzorku séra a plazmy pro zdravého a nemocného jedince s rakovinou	119

Příloha A: Tabulka koncentrací standardů v zásobních roztocích

lipidová třída	standard	konc. v ZR [µg/µl]	pipetovaný objem [µl]	konc. v IS Mixu [µg/ml]	konc. v plazmě [µg/ml]	konc. v plazmě [nmol/ml]
CE	CE 10:0	2	17	34	27	50
	CE 12:0	2	17.8	36	28	50
	CE 14:0	2	18.5	37	30	50
	CE 16:0	2	19.5	39	31	50
	CE 16:1	2	19.5	39	31	50
	CE 17:0	6	6.7	40	32	50
	CE 18:0	1	41	41	33	50
	CE 18:1	2	20.2	40	32	50
	CE 18:2	2	20.1	40	32	50
	CE 18:3	2	20.1	40	32	50
	CE 20:0	2	21.1	42	34	50
	CE 20:1	2	21	42	34	50
	CE 20:2	2	21	42	34	50
	CE 20:3	2	21	42	34	50
	CE 20:4	2	21	42	34	50
	CE 20:5	2	21	42	34	50
	CE 22:0	2	22	44	35	50
	CE 22:1	2	22	44	35	50
	CE 19:0	6	7	42	34	50
	CE 16:0 d7	6	6.6	40	32	50
rozpouštědlo	CHCl ₃ /MeOH (1:1)		615.9			
celkový objem			1000			
MG	MG 16:0	2	10.3	21	16	49.9
	MG 18:0	2	11.2	22	18	50
	MG 18:1	2	11.15	22	18	50
	MG 18:2	2	11.1	22	18	50.1
	MG 19:1	2	11.6	23	19	50.1
rozpouštědlo	CHCl ₃ /MeOH (1:1)		944,65			
celkový objem			1000			
DG	DG 16:0/16:0	2	17.8	36	28	50.1
	DG 17:0/17:0	2	18.6	37	30	49.9
	DG 18:0/18:0	2	19.5	39	31	50
	DG 18:1/18:1	2	19.4	39	31	50
	DG 18:2/18:2	2	19.3	39	31	50.1
	DG 18:3/18:3	2	19.2	38	31	50
	DG 19:0/19:0	2	20.4	41	33	50
	DG 20:0/20:0	2	21.3	43	34	50.1
	DG 14:0/14:0	2	16	35	26	50
DG 36:2 d5	1	39.1	39.1	31	50	

Příloha A: pokračování...

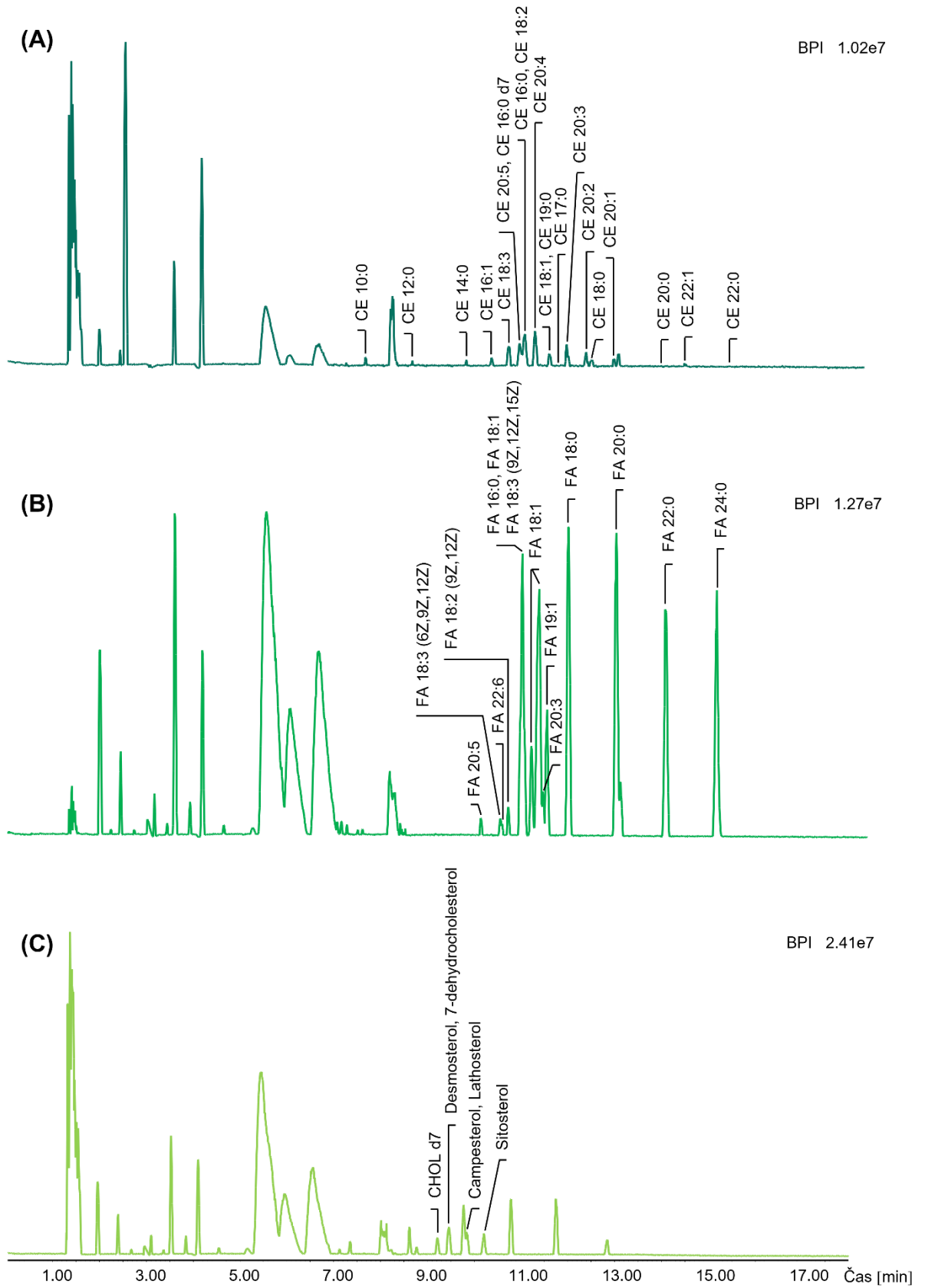
lipidová třída	standard	konc. v ZR [µg/µl]	pipetovaný objem [µl]	konc. v IS Mixu [µg/ml]	konc. v plazmě [µg/ml]	konc. v plazmě [nmol/ml]
DG	DG 33:1 d7	1	36.7	37	29	50
rozpouštědlo		CHCl ₃ /MeOH (1:1)		752.7		
celkový objem				1000		
TG	TG 12:0/12:0/12:0	2	20	40	32	50.1
	TG 13:0/13:0/13:0	2	21.3	43	34	50.1
	TG 14:0/14:0/14:0	2	22.6	45	36	50
	TG 15:0/15:0/15:0	2	23.9	48	38	50
	TG 16:0/16:0/16:0	2	25.2	50	40	50
	TG 16:1/16:1/16:1	2	25	50	40	50
	TG 17:0/17:0/17:0	2	26.5	53	42	50
	TG 17:1/17:1/17:1	2	26.4	53	42	50.1
	TG 18:0/18:0/18:0	2	27.9	56	45	50.1
	TG 18:1/18:1/18:1	2	27.7	55	44	50.1
	TG 18:2/18:2/18:2	2	27.5	55	44	50.1
	TG 18:3/18:3/18:3	2	27.3	55	44	50.1
	TG 20:0/20:0/20:0	2	30.5	61	49	50.1
	TG 20:1/20:1/20:1	2	30.3	61	48	50
	TG 20:2/20:2/20:2	2	30.1	60	48	50
	TG 20:3/20:3/20:3	2	29.9	60	48	50
	TG 20:4/20:4/20:4	2	29.7	59	48	50
	TG 20:5/20:5/20:5	2	29.5	59	47	50
	TG 22:1/22:1/22:1	2	33	66	53	50.1
	TG 22:6/22:6/22:6	2	32	64	51	50.1
TG 19:1/19:1/19:1	2	29	58	46	50.1	
TG 48:1 d7	1	50.7	51	41	50	
rozpouštědlo		CHCl ₃ /MeOH (1:1)		380.4		
celkový objem				1000		
FA	FA 16:0	5	3.2	16	13	50
	FA 18:0	5	3.55	18	14	50
	FA 18:1 (6E)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:1 (6Z)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:1 (9E)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:1 (9Z)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:1 (11E)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:1 (11Z)	5	3.53	18	14	50
	FA 18:2 (9Z, 12Z)	5	3.5	18	14	50
	FA 18:3 (6Z, 9Z, 12Z)	5	3.47	17	14	49.9
	FA 18:3 (9Z, 12Z, 15Z)	5	3.47	17	14	49.9
	FA 19:1	5	3.7	19	15	50
	FA 20:0	5	3.9	20	16	50
	FA 20:3	5	3.83	19	15	50

Příloha A: pokračování...

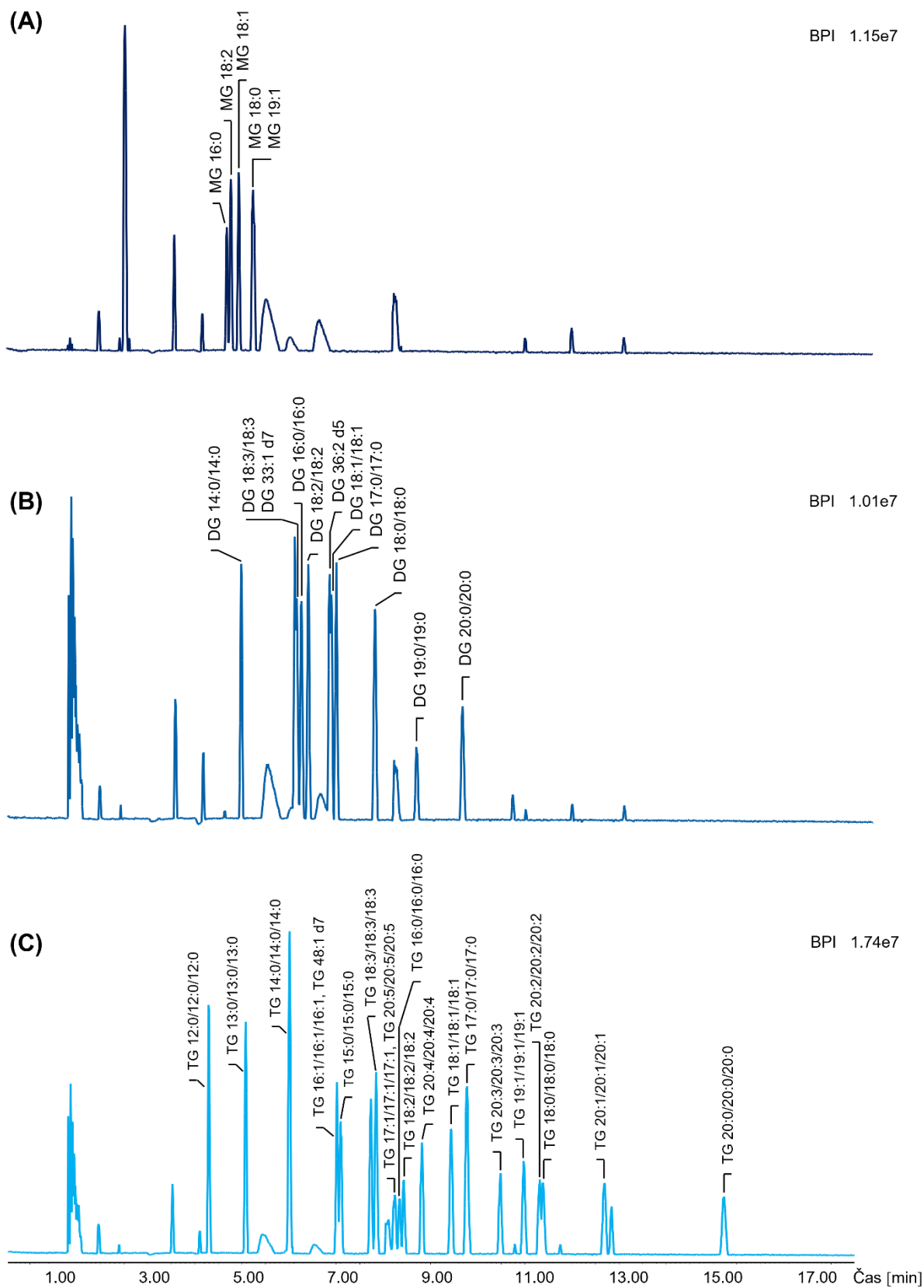
lipidová třída	standard	konc. v ZR [µg/µl]	pipetovaný objem [µl]	konc. v IS Mixu [µg/ml]	konc. v plazmě [µg/ml]	konc. v plazmě [nmol/ml]
FA	FA 20:5	5	3.78	19	15	50
	FA 22:0	5	4.25	21	7	50
	FA 22:6	5	4.1	21	16	50
	FA 24:0	5	4.6	23	18	50
rozpouštědlo	CHCl ₃ /MeOH (1:1)		933.47			
celkový objem			1000			
ST	Desmosterol	2	12	24	19	50
	7-dehydrocholesterol	2	12	24	19	49.9
	Lathosterol	1	24.2	24	19	50.1
	Cholestanol	1	24.3	24	19	50
	Campesterol	1	25.1	25	20	50.1
	Stigmasterol	1	25.8	26	21	50
	Sitosterol	1	25.9	26	21	50
	Lanosterol	1	26.7	27	21	50.1
	Dihydrolanosterol	1	26.8	27	21	50
	Cholesterol d7	1	24.6	25	20	50
rozpouštědlo	CHCl ₃ /MeOH (1:1)		760.5			
celkový objem			1000			

CE ... cholesterol estery, CHCl₃ ... chloroform, DG ... diacylglyceroly, FA ... mastné kyseliny, konc. ... koncentrace, MeOH ... methanol, MG ... monoacylglyceroly, rozp. ... rozpouštědlo, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly, ZR ... zásobní roztok

Příloha B: Separace standardů **(A)** CE, **(B)** FA, **(C)** ST pomocí zoptimalizované UHPSFC/MS metody



Příloha C: Separace standardů (A) MG, (B) DG, (C) TG pomocí zoptimalizované UHPSFC/MS metody



Příloha D: Tabulka identifikovaných nepolárních lipidů ve vzorku séra

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
sterolestery^a									
SE 27:1/14:0		14	9.73	619.5424	619.5400	3.87			
SE 27:1/15:0		15	10.4	633.5581	633.5576	0.79			
SE 27:1/16:2		12	9.34	643.5425	643.5469	-6.91			
			9.96		643.5447	-3.49			
			10.05		643.544	-2.40			
SE 27:1/16:1		14	10.31	645.5581	645.5592	-1.70			
SE 27:1/16:0			11.09		647.5743	-0.93			
SE 27:1/17:2		13	10.39	657.5581	657.5562	2.89			
SE 27:1/17:1		15	10.9	659.5737	659.5734	0.45			
			10.93		659.575	-1.97			
SE 27:1/17:0		17	11.75	661.5894	661.5916	-3.33			
SE 27:1/18:4		10	10.22	667.5424	667.5433	-1.35			
SE 27:1/18:3		12	10.51	669.5581	669.5589	-1.19			
			10.7		669.5593	-1.79			
SE 27:1/18:2		14	11.02	671.5737	671.5743	-0.89			
			11.18		671.5743	-0.89			
			11.287		671.5738	-0.15			
			11.42		671.5739	-0.30			
SE 27:1/18:1		16	11.29	673.5894	673.589	0.59			
			11.56		673.5895	-0.15			
SE 27:1/18:0			12.47	675.6050	675.6062	-1.78			
SE 27:1/20:5		10	10.91	693.5581	693.5591	-1.44			
SE 27:1/20:4		12	11.26	695.5737	695.5737	0,00			
			11.41		695.5746	-1.29			
SE 27:1/20:3		14	11.64	697.5894	697.5903	-1.29			
			11.785		697.5904	-1.43			
SE 27:1/20:2		16	12.3	699.6050	699.6068	-2.57			
SE 27:1/20:1		18	12.96	701.6207	701.6199	1.14			
SE 27:1/22:6		10	11.67	719.5737	719.5745	-1.11			
			11.766		719.5748	-1.53			
			11.847		719.5755	-2.50			
SE 27:1/22:5		12	11.98	721.5894	721.5909	-2.08			
			12.213		721.5908	-1.94			
SE 27:1/22:4		14	12.3	723.605	723.6052	-0.28			
monoacylglyceroly^b									
MG 14:0	MG 14:0_0:0_0:0	14	4.13	528.3309	528.3342	-6.25	389.2687		
MG 16:1	MG 16:1_0:0_0:0	14	4.38	554.3466	554.3492	-4.75	415.2843		

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
monoacylglyceroly^b									
MG 16:1	MG 16:1_0:0_0:0	14	4.47	554.3466	554.3452	2.47	415.2843		
MG 16:0	MG 16:0_0:0_0:0	16	4.63	556.3622	556.3644	-4.01	417.2999		
MG 17:1	neidentifikováno	15	4.63	568.3622	568.3657	-6.16			
MG 18:3	MG 18:3_0:0_0:0	12	4.61	578.3466	578.3459	1.21	439.3469		
MG 18:2	MG 18:2_0:0_0:0	14	4.71	580.3622	580.3647	-4.36	441.2999		
MG 18:1	MG 18:1_0:0_0:0	16	4.89	582.3779	582.3799	-3.49	443.3156		
MG 18:0	MG 18:0_0:0_0:0	18	5.2	584.3935	584.3956	-3.65	445.3312		
MG 20:4	MG 20:4_0:0_0:0	12	4.81	604.3622	604.3648	-4.30	465.2999		
MG 20:3	MG 20:3_0:0_0:0	14	5.02	606.3799	606.3789	1.65	467.3156		
MG 20:1	neidentifikováno	18	5.47	610.4092	610.4113	-3.44			
MG 22:6	MG 22:6_0:0_0:0	10	5.06	628.3622	628.3649	-4.30	489.2999		
MG 22:5	MG 22:5_0:0_0:0	12	5.23	630.3779	630.3798	-3.01	491.3156		
diacylglyceroly^b									
DG 30:1	DG 16:1_14:0	28	5.2	660.5191	660.5189	0.30	415.2843	389.2687	
	DG 16:0_14:1		5.29		660.5189	0.30	417.2999	387.2530	
DG 30:0	DG 16:0_14:0	30	5.52	662.5348	662.5358	-1.51	417.2999	389.2687	
DG 31:0	DG 16:0_15:0	31	5.84	676.5504	676.5524	-2.96	417.2999	403.2843	
	DG 17:0_14:0		5.84				431.3156	389.2687	
DG 32:3	neidentifikováno	26	5.34	684.5192	684.5173	2.78			
DG 32:2	DG 18:2_14:0	28	5.58	686.5348	686.5375	-3.93	441.2999	389.2687	
DG 32:1	DG 18:1_14:0	30	5.81	688.5504	688.5529	-3.63	443.3156	389.2687	
	DG 16:1_16:0		5.86				415.2843	417.2999	
	neidentifikováno		6.11		688.5525	-3.05			
DG 32:0	DG 16:0/16:0	32	6.17	690.5661	690.5679	-2.61	417.2999	417.2999	
	DG 18:0_14:0		6.66		690.5679	-2.61	445.3312	389.2687	
DG 33:2	DG 17:2_16:0	29	5.8	700.5504			427.2843	417.2999	
	DG 18:1_15:1		5.86				443.3156	401.2687	
	DG 18:2_15:0		5.9		700.5546	-5.99	441.2999	403.2843	
DG 33:1	DG 18:1_15:0	31	6.12	702.5661			443.3156	403.2843	
	DG 17:0_16:1		6.12				431.3156	415.2843	
	DG 17:1_16:0		6.13		702.5679	-2.56	429.2999	417.2999	
DG 33:0	DG 17:0_16:0	33	6.56	704.5817	704.5831	-1.99	431.3156	417.2999	
DG 34:4	DG 18:3_16:1	26	5.8	710.5348	710.5352	-0.56	439.2843	415.2843	
DG 34:3	DG 18:2_16:1	28	5.91	712.5504	712.5529	-3.51	441.2999	415.2843	
	DG 18:3_16:0		5.98		712.5536	-4.49	439.2843	417.2999	
DG 34:2	DG 18:1_16:1	30	6.12	714.5661	714.5686	-3.50	443.3156	415.2843	
	DG 18:2_16:0		6.23		714.5687	-3.64	441.2999	417.2999	

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS				
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3		
diacylglyceroly^b											
DG 34:1	DG 18:1_16:0	32	6.47	716.5817	716.5844	-3.77	443.3156	417.2999			
	neidentifikováno		6.59		716.5834	-2.37					
DG 34:0	DG 18:0_16:0	34	6.92	718.5974	718.5994	-2.78	445.3312	417.2999			
DG 35:3	DG 18:2_17:1	29	6.21	726.5661	726.5676	-2.06	441.2999	429.2999			
DG 35:2	DG 18:1_17:1	31	6.44	728.5817	728.5865	-6.59	443.3156	429.2999			
	DG 18:2_17:0		6.59		728.5869	-7.14	441.2999	431.3156			
DG 35:1	DG 18:1_17:0	33	6.85	730.5974	730.6006	-4.38	443.3156	431.3156			
	DG 19:1_16:0		6.86				457.3312	417.2999			
	DG 19:1_16:0		6.92				457.3312	417.2999			
	DG 18:0_17:1		6.92				445.3312	429.2999			
DG 36:5	neidentifikováno	26	6.04	736.5505	736.5508	-0.41					
	DG 16:1_20:4		6.11			415.2843	465.2999				
	DG 18:2_18:3		6.17		736.5486	2.58	441.2999	439.2843			
	DG 16:0_20:5		6.23				417.2999	463.2843			
DG 36:4	DG 18:2/18:2	28	6.31	738.5661	738.5688	-3.66	441.2999	441.2999			
	DG 20:3_16:1		6.31				467.3156	415.2843			
	DG 16:0_20:4		6.31				417.2999	465.2999			
	DG 18:1_18:3		6.4				443.3156	439.2843			
	DG 16:0_20:4		6.4				738.5681	-2.71	417.2999	465.2999	
DG 36:3	DG 18:0_18:3	30	6.36	740.5817			445.3312	439.2843			
	DG 18:1_18:2		6.54				740.5851	-4.59	443.3156	441.2999	
	DG 16:0_20:3		6.66						417.2999	467.3156	
	DG 16:1_20:2		6.66						415.2843	469.3312	
DG 36:2	DG 18:1/18:1	32	6.81	742.5974	742.5995	-2.83	443.3156	443.3156			
	DG 20:1_16:1		6.81				471.3469	415.2843			
	DG 18:0_18:2		6.96				742.5994	-2.69	445.3312	441.2999	
	DG 16:0_20:2		6.98				417.2999	469.3312			
DG 36:1	DG 18:0_18:1	34	7.26	744.6130	744.6154	-3.22	445.3312	443.3156			
	DG 16:0_20:1		7.26				417.2999	471.3469			
DG 36:0	DG 18:0/18:0	36	7.71	746.6287	746.6296	-1.21	445.3312	445.3312			
	DG 16:0_20:0		7.71				417.2999	473.3655			
DG 37:4	neidentifikováno	29	6.73	752.5817	752.5849	-4.25					
DG 37:3	neidentifikováno	31	6.89	754.5974	754.6023	-6.49					
	neidentifikováno		6.94		754.5989	-1.99					
DG 37:1	neidentifikováno	35	7.59	758.6287	758.6261	3.43					
DG 38:6	DG 18:2_20:4	26	6.42	762.5661	762.5674	-1.70	441.2999	465.2999			

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
diacylglyceroly^b									
DG 38:6	DG 16:2_22:4	26	6.42	762.5661	762.5674	-1.70	413.2686	493.3312	
	DG 16:1_22:5		6.48				415.2843	491.3156	
	DG 18:1_20:5		6.54				443.3156	463.2843	
	DG 16:0_22:6		6.66				417.2999	489.2999	
DG 38:5	DG 18:1_20:4	28	6.67	764.5817	764.5842	-3.27	443.3156	465.2999	
	DG 18:2_20:3		6.67				441.2999	467.3156	
	DG 16:0_22:5		6.85				417.2999	491.3156	
DG 38:4	DG 18:1_20:3	30	6.94	766.5974	766.5969	0.65	443.3156	467.3156	
	neidentifikováno		7.08		766.5998	-3.13			
	DG 18:0_20:4		7.12				445.3312	465.2999	
	DG 16:0_22:4		7.12				417.2999	493.3312	
	DG 16:1_22:3		7.12				415.2843	495.3469	
DG 38:3	neidentifikováno	32	7.29	768.613	768.6167	-4.81			
	DG 18:1_20:2		7.32			443.3156	469.3312		
	DG 18:2_20:1		7.32			441.2999	471.3469		
	DG 18:0_20:3		7.38			445.3312	467.3156		
DG 38:2	DG 18:2_20:0		7.58	770.6287	770.6323	-4.67	441.2999	473.3655	
	DG 18:1_20:1		7.58				443.3156	471.3469	
DG 38:1	DG 18:1_20:0	36	8.07	772.6443	772.6487	-5.69	443.3558	473.3655	
	DG 18:0_20:1		8.07				445.3312	471.2355	
DG 40:7	DG 18:1_22:6	26	6.94	788.5817	788.5805	1.52	443.3156	489.2999	
	DG 18:2_22:5		6.94				441.2999	491.3160	
DG 40:6	DG 18:1_22:5	28	7.1	790.5974	790.6006	-4.04	443.3156	491.3156	
	DG 18:3_22:3		7.14		790.6001	-3.42	439.2843	495.3469	
DG 40:5	DG 18:1_22:4	30	7.35	792.6130	792.6147	-2.14	443.3156	493.3312	
	DG 18:2_22:3		7.38			441.2999	495.3469		
triacylglyceroly^c									
TG 40:4	neidentifikováno	32	6.54	704.5824	704.5829	-0.71			
TG 40:2	neidentifikováno	36	6.08	708.6137	708.6070	8.89			
TG 40:0	neidentifikováno	40	5.295	712.6450	712.6478	-3.93			
TG 42:1	TG 18:1_12:0_12:0	40	5.7	738.6606	738.6624	-2.44	439.3782	521.4564	521.4564
TG 42:0	TG 16:0_14:0_12:0	42	6.07	740.6763	740.6787	-3.24	467.4095	495.4408	523.4721
TG 44:2	TG 18:2_14:0_12:0	40	6.09	764.6763	764.6805	-5.49	467.4095	519.4408	547.4721
TG 44:1	TG 18:1_14:0_12:0	42	6.34	766.6919	766.6910	1.17	467.4095	521.4564	549.4877
	TG 18:1_16:0_10:0		6.34				467.4095	493.4251	577.5190
	TG 18:0_16:1_10:0		6.34				465.3938	495.4408	577.5190
	TG 16:1_14:0_14:0		6.34				495.4408	521.4564	521.4564
TG 44:0	TG 16:0_16:0_12:0	44	6.74	768.7076	768.7122	-5.98	495.4408	495.4408	551.5034

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS				
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3		
triacylglyceroly ^c											
TG 44:0	TG 16:0_14:0_14:0	44	6.74	768.7076	768.7122	-5.98	495.4408	523.4721	523.4721		
TG 45:0	TG 16:0_15:0_14:0	45	7.13	782.7232	782.7281	-6.26	509.4564	523.4721	537.4877		
	TG 15:0_15:0_15:0		7.13				523.4721	523.4721	523.4721		
TG 46:3	TG 18:2_18:1_10:0	40	6.41	790.6919	790.6888	3.92	493.4251	491.4095	601.519		
	TG 18:2_16:1_12:0		6.41				493.4251	519.4408	573.4877		
TG 46:4	TG 18:1_18:1_10:0	42	6.68	792.7076	792.7077	-0.13	493.4251	493.4251	603.5347		
	TG 18:1_16:1_12:0		6.68				493.4251	521.4564	575.5034		
	TG 18:2_14:0_14:0		6.81				792.7100	-3.03	495.4408	547.4721	547.4721
	TG 18:2_16:0_12:0		6.81					495.4408	519.4408	575.5034	
TG 46:1	TG 18:1_16:0_12:0	44	7.08	794.7232	794.7253	-2.64	495.4408	521.4564	577.5190		
	TG 18:1_14:0_14:0		7.08				495.4408	549.4877	549.4877		
	TG 16:1_16:0_14:0		7.08				523.4721	521.4564	549.4877		
TG 46:0	TG 18:0_16:0_12:0	46	7.55	796.7389	796.7419	-3.77	495.4408	523.4721	579.5347		
	TG 18:0_14:0_14:0		7.55				495.4408	551.5034	551.5034		
	TG 16:0_16:0_14:0		7.55				523.4721	523.4721	551.5034		
TG 47:2	neidentifikováno	43	7.04	806.7232	806.7272	-4.94					
TG 47:1	TG 18:1_15:0_14:0	45	7.46	808.7389	808.7433	-5.44	509.4877	549.4877	563.5034		
	TG 17:1_15:0_15:0		7.46				523.4721	549.4877	549.4877		
	TG 17:1_16:0_14:0		7.46				523.4721	535.4721	563.5034		
	TG 16:1_16:0_15:0		7.46				537.4877	535.4721	549.4877		
TG 47:0	TG 17:0_16:0_14:0	47	7.96	810.7545	810.7575	-3.70	523.4721	537.4877	565.5190		
	TG 16:0_16:0_15:0		7.96				537.4877	537.4877	551.5034		
TG 48:4	TG 18:2_18:2_12:0	40	6.84	816.7076	816.7077	-0.16	519.4408	519.4408	599.5034		
	TG 18:3_16:1_14:0		6.94		816.7059	2.04	521.4564	545.4564	571.4721		
TG 48:3	TG 18:2_18:1_12:0	42	7.12	818.7232	818.7260	-3.42	521.4564	519.4408	601.5190		
	TG 18:3_16:0_14:0		7.12				523.4721	545.4564	573.4877		
	TG 18:2_16:1_14:0		7.12				521.4564	547.4721	573.4877		
	neidentifikováno		7.25		818.7234	-0.24					
	TG 18:3_16:0:14:0		7.38		818.7238	-0.73	523.4721	545.4564	573.4877		
TG 48:2	TG 18:1_18:1_12:0	44	7.42	820.7389	820.7430	-4.50	521.4564	521.4564	603.5347		
	TG 18:1_16:1_14:0		7.42				521.4564	549.4877	575.5034		
	TG 18:1_16:1_14:0		7.56		820.7406	-2.07	521.4564	549.4877	575.5034		
	TG 18:2_16:0_14:0		7.56				523.4721	547.4721	575.4721		
TG 48:1	TG 18:1_18:0_12:0	46	7.88	822.7545	822.7579	-4.13	523.4721	521.4564	605.5503		
	TG 18:1_16:0_14:0		7.88				523.4721	549.4877	577.519		
	TG 16:1_16:0_16:0		7.88				551.5034	549.4877	549.4877		
TG 48:0	TG 18:0_16:0_14:0	48	8.39	824.7702	824.7736	-4.12	523.4721	551.5034	579.5347		
	TG 16:0/16:0/16:0		8.39				551.5034	551.5034	551.5034		

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
triacylglyceroly ^c									
TG 49:3	TG 18:2_16:1_15:0	43	7.52	832.7389	832.7393	-0.48	535.4721	561.4877	573.4877
TG 49:2	TG 18:1_16:1_15:0	45	7.78	834.7545	834.7571	-3.11	535.4721	563.5034	575.5034
	TG 19:2_15:0_15:0		7.78				523.4056	575.5034	575.5034
	neidentifikováno		7.97				834.7579	-4.07	
TG 49:1	TG 18:1_16:0_15:0	47	8.3	836.7702	836.7742	-4.78	537.4877	563.5034	577.5190
	TG 19:1_15:0_15:0		8.3				523.6140	577.5190	577.5190
TG 49:0	TG 18:0_16:0_15:0	49	8.86	838.7858	838.7896	-4.53	537.4877	565.519	579.5347
	TG 17:0_16:0_16:0		8.86				551.5034	565.519	565.519
TG 50:5	TG 20:4_16:1_14:0	40	7.28	842.7232	842.7258	-3.07	521.4564	571.4721	597.4877
	TG 18:3_18:2_14:0		7.28				547.4721	545.4564	597.4877
TG 50:4	TG 20:4_16:0_14:0	42	7.59	844.7389	844.7411	-2.60	523.4721	571.4721	599.5034
	TG 20:3_16:1_14:0		7.59				521.4564	573.4877	599.5034
	TG 18:2_18:2_14:0		7.59				547.4721	547.4721	599.5034
	TG 18:3_16:1_16:0		7.59				549.4877	571.4721	573.4877
	TG 18:2_16:1_16:1		7.59				547.4721	573.4877	573.4877
TG 50:3	TG 18:2_18:1_14:0	44	7.9	846.7545	846.7591	-5.43	549.4877	547.4721	601.519
	TG 18:3_16:0_16:0		7.9				551.5034	573.4877	573.4877
	TG 18:2_16:1_16:0		7.9				549.4877	573.4877	575.5034
	TG 18:1_16:1_16:1		7.9				547.4721	575.5034	575.5034
	neidentifikováno		8.04				846.7571	-3.07	
TG 50:2	TG 18:1_18:1_14:0	46	8.24	848.7702	848.7750	-5.66	549.4877	549.4877	603.5347
	TG 18:1_16:1_16:0		8.24				549.4877	577.5190	575.5034
	TG 18:2_16:0_16:0		8.41				848.7741	-4.59	551.5034
TG 50:1	TG 18:1_18:0_14:0	48	8.73	850.7858	850.7891	-3.88	551.5034	549.4877	605.5503
	TG 18:1_16:0_16:0		8.73				551.5034	577.5190	577.5190
	neidentifikováno		8.92				850.7900	-4.94	
TG 50:0	TG 18:0_18:0_14:0	50	9.34	852.8015	852.8047	-3.75	551.5034	551.5034	607.566
	TG 18:0_16:0_16:0		9.34				551.5034	579.5347	579.5347
TG 51:5	neidentifikováno	41	7.67	856.7389	856.7338	5.95			
TG 51:4	TG 18:2_18:2_15:0	43	8	858.7545	858.7567	-2.56	561.4877	561.4877	599.5034
	TG 18:2_18:1_15:1		8				561.4877	559.4721	601.5190
	neidentifikováno		8.11				858.7563	-2.10	
TG 51:3	TG 18:2_18:1_15:0	45	8.32	860.7702	860.7738	-4.18	563.5034	561.4877	601.5190
	TG 18:2_17:1_16:0		8.32				563.5034	575.5034	587.5034
TG 51:2	TG 18:1_18:1_15:0	47	8.66	862.7858	862.7888	-3.48	563.5034	563.5034	603.5347
	TG 18:1_17:1_16:0		8.66				563.5034	577.5190	589.5190
	TG 18:2_17:0_16:0		8.86				862.7908	-5.80	565.5190
TG 51:1	neidentifikováno	49	8.96	864.8015	864.8055	-4.63			

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
triacylglyceroly ^c									
TG 51:1	TG 18:1_18:0_15:0	49	9.22	864.8015	864.8054	-4.51	565.5190	563.5034	605.5503
	TG 18:1_17:0_16:0		9.22				565.5190	577.5190	591.5347
TG 51:0	TG 18:0_17:0_16:0	51	9.84	866.8171	866.8198	-3.11	565.5190	579.5347	593.5503
TG 52:6	neidentifikováno	40	7.64	868.7389	868.7378	1.23			
	TG 18:3_18:2_16:1		7.79		868.7339	5.72	573.4877	571.4721	597.4877
TG 52:5	TG 18:2_18:2_16:1	42	7.97	870.7545	870.7571	-2.99	573.4877	573.4877	599.5034
	TG 18:3_18:1_16:1		8.09		870.7578	-3.79	575.5034	571.4721	599.5034
	TG 18:3_18:2_16:0		8.22		870.7417	14.70	575.5034	573.4877	597.4877
	TG 18:4_18:1_16:0		8.22				577.5190	571.4721	597.4877
TG 52:4	TG 18:2_18:1_16:1	44	8.29	872.7702	872.7731	-3.32	575.5034	573.4877	601.5190
	TG 18:2_18:2_16:0		8.43		872.7739	-4.24	575.5034	575.5034	599.5034
	TG 20:4_16:0_16:0		8.54		872.7733	-3.55	551.5034	599.5034	599.5034
TG 52:4	TG 18:3_18:1_16:0	44	8.54	872.7702	872.7733	-3.55	577.5190	573.4877	599.5034
TG 52:3	TG 18:1_18:1_16:1	46	8.61	874.7858	874.7893	-4.00	575.5034	575.5034	603.5347
	TG 18:2_18:1_16:0		8.76		874.7900	-4.80	577.5190	575.5034	601.5190
	TG 20:3_16:0_16:0		8.92		874.7889	-3.54	551.5034	601.5190	601.5190
TG 52:2	TG 18:1_18:1_16:0	48	9.11	876.8015	876.8069	-6.16	577.519	577.5190	603.5347
	TG 20:2_16:0_16:0		9.32		876.8051	-4.11	551.5034	603.5347	603.5347
	TG 18:2_18:0_16:0		9.32				579.5347	575.5034	603.5347
	neidentifikováno		9.56		876.8051	-4.11			
TG 52:1	TG 18:1_18:0_16:0	50	9.71	878.8171	878.8202	-3.53	579.5347	577.5190	605.5503
	TG 20:1_16:0_16:0		9.71				551.5034	605.5503	605.5503
	neidentifikováno		9.9		878.8208	-4.21			
TG 52:0	TG 18:0_18:0_16:0	52	10.36	880.8328	880.8368	-4.54	579.5347	579.5347	607.5660
	TG 20:0_16:0_16:0		10.36				551.5034	607.5660	607.5660
TG 53:4	TG 18:2_18:1_17:1	45	8.69	886.7858	886.7901	-4.83	589.5190	587.5034	601.5190
	TG 18:2_18:2_17:0		8.88		886.7906	-5.39	589.5190	589.5190	599.5034
TG 53:3	TG 18:1_18:1_17:1	47	9.04	888.8015	888.8058	-4.84	589.5190	589.5190	603.5347
	TG 18:2_18:1_17:0		8.23		888.8055	-4.50	591.5347	589.5190	601.5190
TG 53:2	TG 18:1_18:1_17:0	49	9.32	890.8171	890.8219	-5.39	591.5347	591.5347	603.5347
	TG 18:2_18:0_17:0		9.6		890.8207	-4.04	593.5503	589.5190	603.5347
	TG 18:1_18:1_17:0		9.6				591.5347	591.5347	603.5347
TG 53:1	TG 18:1_18:0_17:0	51	10.22	892.8328	892.8378	-5.60	593.5503	591.5347	605.5503
TG 54:7	TG 20:4_18:3_16:1	40	8.11	894.7545	894.7545	0.02	571.4721	597.4877	621.4877
TG 54:6	TG 18:2/18:2/18:2	42	8.46	896.7702	896.7692	1.12	599.5034	599.5034	599.5034
	TG 20:4_18:1_16:1		8.54				575.5034	597.4877	625.5190
	TG 20:5_18:1_16:0		8.59		896.7651	5.69	577.5190	597.4877	623.5034
	TG 20:4_18:2_16:0		8.59				575.5034	599.5034	623.5034

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
triacylglyceroly ^c									
TG 54:6	TG 18:3_18:2_18:1		8.59				601.5190	599.5034	597.4877
TG 54:5	TG 18:2_18:2_18:1	44	8.82	898.7858	898.7888	-3.34	601.5190	601.5190	599.5034
	TG 20:3_18:1_16:1		8.85				575.5034	599.5034	627.5347
	TG 20:4_18:1_16:0		8.9		898.7892	-3.78	577.5190	599.5034	625.5190
	TG 20:3_18:2_16:0		8.9				575.5034	601.5190	625.5190
	TG 18:3_18:1_18:1		8.9				603.5347	599.5034	599.5034
	neidentifikováno		9.01				898.7855	0.33	
TG 54:4	TG 18:2_18:1_18:1	46	9.15	900.8015	900.8052	-4.11	603.5347	601.5190	601.5190
	TG 20:4_18:0_16:0		9.21				579.5347	599.5034	627.5347
	TG 22:4_16:0_16:0		9.34		900.8049	-3.77	551.5034	627.5347	627.5347
	TG 20:2_18:2_16:0		9.34				575.5034	603.5347	627.5347
	TG 18:2_18:2_18:0		9.34				603.5347	603.5347	599.5034
	neidentifikováno		9.46				900.8055	-4.44	
TG 54:3	TG 18:1/18:1/18:1	48	9.5	902.8171	902.8213	-4.65	603.5347	603.5347	603.5347
	TG 20:2_18:1_16:0		9.72				577.5190	603.5347	629.5503
	TG 20:1_18:2_16:0		9.72		902.8214	-4.76	575.5034	605.5503	629.5503
	TG 18:2_18:1_18:0		9.72				605.5503	603.5347	601.5190
	neidentifikováno		9.9		902.8184	-1.44			
TG 54:2	TG 20:1_18:1_16:0	50	10.1	904.8328	904.8381	-5.86	577.5190	605.5503	631.5660
	TG 18:1_18:1_18:0		10.1				605.5503	605.5503	603.5503
	TG 20:0_18:2_16:0		10.33		904.8366	-4.20	575.5034	607.566	631.566
TG 54:1	TG 20:1_18:0_16:0	52	10.74	906.8484	906.8527	-4.74	579.5347	605.5503	633.5816
	TG 20:0_18:1_16:0		10.74				577.5190	607.566	633.5816
	TG 18:1_18:0_18:0		10.74				607.5660	605.5503	605.5503
TG 54:0	TG 20:0_18:0_16:0	54	11.47	908.8641	908.8691	-5.50	579.5347	607.5660	635.5973
	TG 18:0/18:0/18:0		11.47				607.5660	607.5660	607.5660
TG 55:3	neidentifikováno	49	9.99	916.8328	916.8364	-3.96			
TG 55:2	neidentifikováno	51	10.64	918.8484	918.8492	-0.87			
TG 55:1	neidentifikováno	53	11.32	920.8641	920.8637	0.43			
TG 55:0	neidentifikováno	55	12.12	922.8797	922.8818	-2.28			
TG 56:9	neidentifikováno	38	8.41	918.7545	918.7505	4.37			
TG 56:8	TG 22:6_18:2_16:0	40	8.72	920.7702	920.7740	-4.16	575.5034	623.5034	647.5034
TG 56:7	neidentifikováno	42	8.93	922.7858	922.7847	1.19			
	neidentifikováno		9.06		922.7886	-3.03			
	TG 22:6_18:1_16:0		9.1				577.5190	623.5034	649.5190
	TG 22:5_18:2_16:0		9.1				575.5034	625.5190	649.5190
TG 56:6	TG 22:4_18:2_16:0	44	9.27	924.8015	924.8043	-3.03	575.5034	627.5347	651.5347
	TG 20:4_18:2_18:0		9.27				603.5347	627.5347	623.5034

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
triacylglyceroly^c									
TG 56:6	TG 22:5_18:1_16:0	44	9.33	924.8015	924.7975	4.33	577.5190	625.5190	651.5347
	neidentifikováno		9.46						
TG 56:5	neidentifikováno	46	9.62	926.8171	926.8184	-1.40	577.5190	627.5347	653.5503
	TG 22:4_18:1_16:0		9.74						
	TG 20:1_18:2_18:1		9.78						
	TG 20:4_18:1_18:0		9.83						
TG 56:4	TG 20:2_18:1_18:1	48	10.13	928.8328	928.8309	2.01	603.5347	629.5503	629.5503
	neidentifikováno		10.21						
	neidentifikováno		10.33						
TG 56:3	TG 20:1_18:1_18:1	50	10.52	930.8484	930.8528	-4.73	603.5347	631.5660	631.5660
	TG 20:1_18:1_18:1		10.75						
TG 56:2	TG 22:2_18:0_16:0	52	11.17	932.8641	932.8679	-4.07	579.5347	631.5660	659.5973
	TG 22:1_18:1_16:0		11.17						
	TG 20:1_18:1_18:0		11.17						
	TG 22:0_18:2_16:0		11.42						
TG 56:1	TG 22:0_18:1_16:0	54	11.88	934.8797	934.8839	-4.49	577.5190	635.5973	661.6129
	TG 20:0_18:1_18:0		11.88						
	TG 24:1_16:0_16:0		11.97						
TG 56:0	neidentifikováno	56	12.68	936.8954	936.8943	1.17			
TG 57:2	neidentifikováno	53	11.76	946.8797	946.8798	-0.11			
TG 58:9	neidentifikováno	40	9.19	946.7858	946.7890	-3.36			
TG 58:8	neidentifikováno	42	9.59	948.8015	948.7983	3.34			
TG 58:7	neidentifikováno	44	9.87		950.8167	0.42			
TG 58:6	neidentifikováno	46	10.26	952.8328	952.8317	1.12			
	neidentifikováno		10.35						
	neidentifikováno		10.45						
TG 58:5	neidentifikováno	48	10.7	954.8484	954.8448	3.77			
	neidentifikováno		10.84						
	neidentifikováno		10.87						
TG 58:4	neidentifikováno	50	11.27	956.8641	956.8630	1.15			
TG 58:3	TG 22:1_18:1_18:1	52	11.64	958.8797	958.8798	-0.10	603.5347	659.5973	659.5973
	TG 24:1_18:2_16:0		11.83						
	TG 22:0_18:2_18:1		11.88						
TG 58:2	neidentifikováno	54	12.33	960.8954	960.8996	-4.37	577.5190	661.6129	687.6286
	TG 24:1_18:1_16:0		12.36						
	TG 22:0_18:1_18:1		12.36						
	TG 24:0_18:2_16:0		12.36						
	neidentifikováno		12.63						
				960.8994	960.8994	-4.16	603.5347	661.6129	661.6129
							575.5034	663.6286	687.6286
					960.8931	2.39			

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
triacylglyceroly^c									
TG 58:1	neidentifikováno	56	13.15	962.9110	962.9113	-0.31			
TG 60:11	neidentifikováno	38	9.4	970.7858	970.7855	0.31			
TG 60:10	neidentifikováno	40	9.65	972.8015	972.8062	-4.83			
TG 60:9	neidentifikováno	42	10.12	974.8171	974.8130	4.21			
TG 60:8	neidentifikováno	44	10.46	976.8328	976.8318	1.02			
	neidentifikováno		10.58		976.8318	1.02			
TG 60:5	neidentifikováno	50	11.996	982.8797	982.8798	-0.10			
	neidentifikováno		12.11		982.8788	0.92			
TG 60:4	neidentifikováno	52	12.38	984.8954	984.8909	4.57			
TG 60:3	neidentifikováno	54	12.81	986.9110	986.9108	0.20			
	neidentifikováno		13.1		986.9096	1.42			
TG 60:2	neidentifikováno	56	13.59	988.9267	988.9251	1.62			
TG 60:1	neidentifikováno	58	14.46	990.9423	990.9487	-6.46			
mastné kyseliny^d									
FA 10:0		10	8.19	172.1463	172.1705	-140.40			
FA 12:0		12	8.97	200.1776	200.2017	-120.24			
FA 13:0		13	9.51	214.1933	214.2184	-117.28			
FA 14:0		14	9.83	228.2089	228.2330	-105.47			
FA 15:0		15	10.28	242.2246	242.2482	-97.51			
FA 16:1		14	9.88	254.2246	254.2489	-95.66			
			10.02		254.2485	-94.09			
			10.22		254.2487	-94.88			
FA 16:0		16	10.75	256.2402	256.2646	-95.11			
FA 17:1		15	10.41	268.2403	268.2647	-91.15			
FA 17:0		17	11.23	270.2559	270.2792	-86.29			
FA 18:3	6Z. 9Z. 12Z	12	10.29	278.2246	278.2487	-86.69			
	9Z. 12Z. 15Z		10.75		278.2460	-76.99			
FA 18:2		14	10.46	280.2402	280.2648	-87.67			
			10.75		280.2652	-89.10			
FA 18:1	9Z	16	10.79	282.2559	282.2799	-85.10			
	11Z		10.94		282.2800	-85.45			
	E		11.06		282.2798	-84.75			
FA 18:0		18	11.72	284.2715	284.2959	-85.73			
FA 19:0		19	12.14	298.2872	298.3116	-81.87			
FA 20:5		10	10.45	302.2246	302.2459	-70.54			
FA 20:4		12	10.78	304.2402	304.2610	-68.27			
FA 20:3		14	11.72	306.2559	306.2777	-71.25			
FA 20:2		16	11.38	308.2715	308.2962	-80.03			

Příloha D: pokračování...

název lipidu	acylové složení lipidu	ECN	t _R [min]	MS			MS/MS		
				m/z teoret.	m/z experim.	správnost určení hmoty	neutrální ztráta FA 1	neutrální ztráta FA 2	neutrální ztráta FA 3
mastné kyseliny^d									
FA 20:1		18	11.77	310.2872	310.3116	-78.70			
			11.94		310.3120	-79.99			
FA 20:0		20	12.72	312.3028	312.3277	-79.63			
FA 21:0		21	13.23	326.3185	326.3434	-76.37			
FA 22:6		10	10.33	328.2402	328.2626	-68.15			
FA 22:5		12	10.88	330.2559	330.2853	-89.08			
FA 22:4		14	11.76	332.2715	332.2878	-48.97			
FA 22:2		18	12.4	336.3028	336.3275	-73.36			
FA 22:1		20	12.82	338.3185	338.3427	-71.59			
FA 22:0		22	13.77	340.3341	340.3586	-7190			
FA 23:0		23	14.3	354.3498	354.3695	-55.65			
FA 24:6		12	10.91	356.2715	356.2931	-60.54			
FA 24:4		16	12.82	360.3028	360.3242	-59.31			
FA 24:1		22	13.93	366.3498	366.3750	-68.84			
FA 24:0		24	14.85	368.3654	368.3907	-68.60			
FA 26:0		26	15.95	396.3967	396.4150	-46.17			
steroly^d									
CHOL			9.4	369.3516	369.3531	-4.06			

^a identifikováno na základě [M + Na]⁺

^b identifikováno na základě [M + NH₄]⁺ pro MS a na základě fragmentu ([RC=O + 74 + benzoyl]⁺ se ztrátou vody) pro MS/MS

^c identifikováno na základě [M + Na]⁺ pro MS a na základě neutrální ztráty RCOOH + NH₃ z [M + NH₄]⁺ pro MS/MS

^d identifikováno na základě fragmentu [M - 122 + H]⁺

DG ... diacylglyceroly, E ... *trans*, ECN ... ekvivalentní počet uhlíkových atomů, FA ... mastné kyseliny, CHOL ... cholesterol, MG ... monoacylglyceroly, MS ... hmotnostní spektrometrie, MS/MS ... tandemová hmotnostní spektrometrie, m/z ... poměr hmotnosti ku náboji, SE ... sterol estery, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly, Z ... *cis*

Příloha E: Tabulka vypočtených koncentrací v nmol/ml pro lipidy identifikované ve vzorku séra a plazmy pro zdravého a nemocného jedince s rakovinou

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		nemocný jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
CE ^a	SE 27:1/14:0	34.83	30.40	13.72	47.63
	SE 27:1/15:0	-	5.37	-	-
	SE 27:1/16:2	-	-	-	-
	SE 27:1/16:1	1645.32	839.40	1602.47	3464.26
	SE 27:1/16:0	724.35	661.07	300.33	849.03
	SE 27:1/17:2	-	-	-	-
	SE 27:1/17:1	49.89	28.66	43.09	99.02
	SE 27:1/17:0	-	-	-	-
	SE 27:1/18:4	50.60	23.56	7.35	12.65
	SE 27:1/18:3	1673.80	257.11	872.32	1614.79
		2218.55	1418.95	228.65	357.32
	SE 27:1/18:2	40114.29	24312.57	11855.00	40698.76
	SE 27:1/18:1	10906.81	8495.87	4628.20	12089.09
	SE 27:1/18:0	94.83	-	23.51	45.77
	SE 27:1/20:5	4197.36	3990.00	540.33	1131.46
	SE 27:1/20:4	13767.03	12049.61	4958.25	11320.42
	SE 27:1/20:3	1338.33	503.45	630.68	1310.82
	SE 27:1/20:2	8.70	3.32	2.29	4.72
	SE 27:1/20:1	-	-	-	-
	SE 27:1/22:6	1323.30	2037.99	476.86	990.54
SE 27:1/22:5	78.29	42.83	21.82	24.24	
SE 27:1/22:4	13.64	16.52	-	-	
MG ^b	MG 14:0	1.52	1.09	1.02	1.89
	MG 16:1	2.81	0.73	2.14	6.05
	MG 16:0	22.90	10.97	13.28	35.25
	MG 17:1	-	-	-	0.22
	MG 18:3	1.33	-	-	-
	MG 18:2	32.39	7.20	9.44	26.31
	MG 18:1	53.69	15.69	20.13	52.72
	MG 18:0	2.96	5.06	2.53	3.95
	MG 20:4	2.30	1.02	0.86	4.08
	MG 20:3	-	-	-	-
	MG 20:1	-	-	-	-
	MG 22:6	0.55	0.53	0.31	1.76
	MG 22:5	0.41	-	0.04	-

Příloha E: pokračování...

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		nemocný jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
DG ^b	DG 30:1	2.29	0.63	0.66	0.59
	DG 30:0	9.28	3.93	3.80	3.38
	DG 31:0	-	0.19	0.22	0.37
	DG 32:3	0.86	-	-	-
	DG 32:2	8.76	1.46	1.76	1.52
	DG 32:1	39.64	8.91	22.23	12.70
	DG 32:0	35.58	9.09	22.53	15.58
	DG 33:2	0.72	0.14	-	0.24
	DG 33:1	2.46	0.75	1.17	1.03
	DG 33:0	-	-	0.17	0.24
	DG 34:4	-	-	0.12	-
	DG 34:3	13.08	1.41	4.44	3.21
		9.09	1.27	0.94	0.54
	DG 34:2	223.49	51.20	91.27	62.31
	DG 34:1	384.12	91.38	174.62	102.43
	DG 34:0	16.11	2.49	6.85	4.28
	DG 35:3	0.69	-	0.17	-
	DG 35:2	2.85	0.68	1.01	0.77
	DG 35:1	2.18	0.56	0.89	1.11
	DG 36:5	-	2.03	1.66	1.26
	DG 36:4	83.01	11.96	17.07	12.58
	DG 36:3	302.51	55.20	81.69	53.00
	DG 36:2	178.38	40.20	65.78	59.09
	DG 36:1	23.40	3.95	8.18	7.33
	DG 36:0	1.83	0.54	0.88	0.56
	DG 37:4	0.21	0.58	0.41	0.51
	DG 37:3	0.52	0.09	0.20	0.30
	DG 37:1	2.47	0.02	0.03	0.13
	DG 38:6	5.91	1.05	1.18	1.08
	DG 38:5	12.02	2.47	3.92	3.34
	DG 38:4	6.07	1.04	1.79	0.46
	DG 38:3	2.69	0.14	0.41	0.31
	DG 38:2	36.61	14.39	20.39	14.15
	DG 38:1	0.28	0.05	0.08	0.03
DG 40:7	5.15	2.12	1.52	1.32	
DG 40:6	1.65	0.45	0.46	0.33	
DG 40:5	0.72	0.18	0.33	0.17	

Příloha E: pokračování...

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		nemocný jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
TG ^b	TG 40:4	-	-	0.05	0.13
	TG 40:2	-	-	-	-
	TG 40:0	-	-	-	-
	TG 42:1	-	0.09	-	-
	TG 42:0	12.98	0.20	0.05	0.08
	TG 44:2	0.18	0.09	0.11	0.08
	TG 44:1	0.51	0.47	0.25	0.28
	TG 44:0	0.16	0.11	0.08	0.21
	TG 45:0	-	0.04	0.03	0.04
	TG 46:3	0.18	-	0.11	-
	TG 46:2	0.76	0.38	0.35	0.45
	TG 46:1	3.62	1.71	2.04	1.87
	TG 46:0	1.04	0.78	0.77	0.90
	TG 47:2	-	-	-	0.01
	TG 47:1	0.15	0.15	0.18	0.21
	TG 47:0	0.06	0.08	0.07	0.09
	TG 48:4	0.68	0.13	0.10	-
	TG 48:3	3.16	0.60	0.70	0.71
		0.23	0.15	-	0.06
	TG 48:2	12.52	4.30	8.38	7.18
	TG 48:1	20.46	7.68	16.84	15.37
	TG 48:0	5.68	2.34	5.43	4.59
	TG 49:3	-	-	0.08	-
	TG 49:2	27.10	26.27	24.62	27.31
	TG 49:1	0.77	0.62	1.02	0.89
	TG 49:0	0.14	0.08	0.11	0.09
	TG 50:5	0.42	0.11	0.06	-
	TG 50:4	7.59	2.28	2.60	2.10
	TG 50:3	38.15	11.65	23.14	20.65
	TG 50:2	95.81	32.83	94.19	86.93
	TG 50:1	68.64	35.44	76.87	79.12
	TG 50:0	5.09	1.18	2.37	2.13
	TG 51:5	-	-	-	-
TG 51:4	0.23	0.11	-	-	
TG 51:3	2.34	0.94	1.14	0.84	
TG 51:2	4.44	1.96	4.15	3.00	
TG 51:1	-	0.25	0.49	0.39	
	1.14	0.48	0.95	0.82	
TG 51:0	0.06	-	-	-	

Příloha E: pokračování...

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		nemocný jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
TG ^b	TG 52:6	2.40	2.40	0.42	0.12
	TG 52:5	6.20	6.20	2.35	2.54
		18.69	18.69	-	-
	TG 52:4	123.86	123.86	39.37	48.92
	TG 52:3	303.28	303.28	126.98	165.84
	TG 52:2	342.80	342.80	181.91	255.92
	TG 52:1	36.13	36.13	9.49	22.80
	TG 52:0	1.57	1.57	0.17	0.38
	TG 53:4	1.05	1.05	-	0.24
	TG 53:3	1.09	1.09	0.39	0.78
		1.98	1.98	0.40	0.67
	TG 53:2	2.90	2.90	0.88	1.51
	TG 53:1	0.24	0.24	-	0.09
	TG 54:7	2.87	2.87	-	1.76
	TG 54:6	35.43	35.43	7.11	10.05
	TG 54:5	67.50	67.50	17.95	22.47
	TG 54:4	108.19	108.19	31.67	44.75
	TG 54:3	5.59	5.59	3.06	3.47
		85.85	85.85	29.11	54.39
		41.71	41.71	10.36	15.98
	TG 54:2	35.88	35.88	10.29	20.62
	TG 54:1	2.47	2.47	0.26	1.17
	TG 54:0	0.17	0.17	-	0.04
	TG 55:3	0.07	0.07	0.02	0.06
	TG 55:2	0.10	0.10	0.03	0.05
	TG 55:1	-	-	-	-
	TG 55:0	-	-	-	-
	TG 56:9	0.88	0.88	-	0.01
	TG 56:8	-	-	-	-
	TG 56:7	-	-	0.86	-
		9.31	9.31	6.65	4.58
	TG 56:6	6.24	6.24	2.23	2.88
14.28		14.28	7.19	3.43	
TG 56:5	12.03	12.03	3.96	4.71	
TG 56:4	3.16	3.16	0.69	1.24	
TG 56:3	1.56	1.56	0.44	0.69	
	0.51	0.51	0.05	0.12	
TG 56:2	0.64	0.64	0.16	0.29	
TG 56:1	0.12	0.12	-	-	

Příloha E: pokračování...

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
TG ^b	TG 56:0	-	-	-	-
	TG 57:2	-	-	-	-
	TG 58:9	0.88	0.99	-	-
	TG 58:8	2.35	1.04	0.90	0.74
	TG 58:7	1.39	0.39	0.46	0.35
	TG 58:6	0.37	0.13	0.16	0.12
		0.56	0.16	0.15	0.11
	TG 58:5	0.19	-	0.08	0.06
	TG 58:4	0.08	0.09	0.01	-
	TG 58:3	0.07	-	0.02	0.01
	TG 58:2	0.08	-	0.03	-
	TG 58:1	0.05	-	-	-
	TG 60:11	0.11	0.08	-	-
	TG 60:10	-	-	-	-
	TG 60:9	-	-	-	-
	TG 60:8	-	-	-	-
	TG 60:4	-	-	-	-
	TG 60:3	-	-	-	-
		0.01	0.004	-	-
TG 60:2	0.03	-	-	-	
TG 60:1	-	-	-	-	
FA ^c	FA 10:0	2.04	5.89	9.46	12.26
	FA 12:0	2.33	6.30	3.99	5.65
	FA 13:0	-	-	-	-
	FA 14:0	8.53	145.38	3.99	42.51
	FA 15:0	8.53	25.56	4.03	15.16
	FA 16:1	2.89	340.76	29.80	45.71
	FA 16:0	214.51	1104.12	568.05	636.77
	FA 17:1	1.50	71.26	1.16	5.45
	FA 17:0	-	27.56	3.63	5.02
	FA 18:3	0.64	9.00	0.59	1.24
	FA 18:2	9.21	326.73	33.87	33.26
	FA 18:1	84.38	3443.47	325.36	392.39
		-	289.93	-	-
	FA 18:0	171.70	506.81	278.57	281.40
	FA 19:0	-	2.19	0.38	-
	FA 20:5	3.52	133.56	14.58	13.88
	FA 20:4	8.25	517.86	39.87	46.66
FA 20:3	3.91	19.51	6.99	6.61	

Příloha E: pokračování...

lipidová třída	lipid	zdravý jedinec		jedinec s rakovinou	
		koncentrace [nmol/ml]		koncentrace [nmol/ml]	
		sérum	plazma	sérum	plazma
FA ^c	FA 20:2	-	8.04	-	-
	FA 20:1	1.94	57.40	4.61	5.66
	FA 20:0	2.33	11.18	3.74	3.69
	FA 21:0	-	-	-	-
	FA 22:6	-	0.78	1.00	0.98
	FA 22:5	-	-	0.15	0.28
	FA 22:4	-	8.07	-	-
	FA 22:2	-	0.60	0.59	-
	FA 22:1	78.42	183.58	162.55	80.62
	FA 22:0	2.61	6.51	4.39	3.21
	FA 23:0	-	0.78	0.60	0.59
	FA 24:6	-	-	-	-
	FA 24:4	12.80	33.96	25.65	11.75
	FA 24:1	1.03	1.86	1.72	1.10
	FA 24:0	-	-	-	-
FA 26:0	0.47	-	0.88	0.95	
ST ^c	CHOL	1050.92	1296.45	783.85	832.52

hodnoty koncentrací jsou vypočteny z ploch píků, "-" znamená, že program LDA tento signál nezaznamenal, neboť jeho intenzita byla příliš nízká

^a plocha pod [M + Na]⁺

^b plocha pod [M + NH₄]⁺

^c plocha pod [M - 122 + H]⁺

DG ... diacylglyceroly, FA ... mastné kyseliny, CHOL ... cholesterol, MG ... monoacylglyceroly, SE ... sterol estery, ST ... steroly, TG ... triacylglyceroly