



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Využití retenčních závislostí při charakterizaci izomerních forem fosfatidylcholinů v lidské plazmě metodou RP-UHPLC/MS

Věra Málková

Gymnázium, Pardubice, Mozartova 449
Mozartova 449, 530 02, Pardubice

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití retenčních závislostí při charakterizaci izomerních forem fosfatidylcholinů v lidské plazmě metodou RP-UHPLC/MS

Using of retention dependencies for the characterization of isomeric forms of phosphatidylcholines in human plasma by RP-UHPLC/MS method

Autoři: Věra Málková

Škola: Gymnázium, Pardubice, Mozartova 449, 530 09 Pardubice

Kraj: Pardubický kraj

Konzultant: Ing. Ondřej Peterka, Ph.D., prof. Ing. Michal Holčápek, Ph.D.

Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická, Katedra analytické chemie

Pardubice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Pardubicích dne 18.03.2023

Věra Málková

Poděkování

Obzvláště ráda bych poděkovala mému konzultantovi Ing. Ondřejovi Peterkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při provádění experimentů, velmi cenné rady, jeho ochotu a trpělivost při tvorbě a zpracování mé práce.

Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Michalu Holčapkovi, Ph.D. za mimořádně zajímavé téma. Děkuji také jeho celému týmu na Katedře analytické chemie, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice za poskytnutí zázemí pro moji práci a velmi přátelskou atmosféru.

Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za přítomnosti atmosférického tlaku
CI	chemická ionizace
CN	počet uhlíků
DB	dvojná vazba
ECN	ekvivalentní počet uhlíků
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	mastné kyseliny
GL	glycerolipidy
GP	glycerofosfolipidy
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LPC	lysofosfatidylcholin
MALDI	laserová desorpční ionizace s asistencí matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	hmotnostní poměr
NP	normální fáze
O-	etherová vazba
P-	plasmalogen (alkenylová vazba)
PC	fosfatidylcholin
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu
PK	polyketidy
PR	prenoly
RP	chromatografie s obrácenými fázemi
Rt	retenční čas
SM	sfingomyelin
SL	sacharolipidy
SP	sfingolipidy

ST steroly
UHPLC ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC/MS ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní
 spektrometrií

Seznam obrázků a tabulek

<i>Obrázek 1: Kategorie lipidů a jejich struktura podle klasifikace LIPID MAPS</i>	10
<i>Obrázek 2: Znázornění jednotlivých zápisů lipidů na základě lokalizace dvojných vazeb, sn- pozic a dalších kritérií [5]</i>	11
<i>Obrázek 3: Obecná struktura fosfatidylcholinu [9]</i>	12
<i>Obrázek 4: Části hmotnostního spektrometru [16]</i>	14
<i>Obrázek 5: Princip ionizace elektrosprejem [20]</i>	15
<i>Obrázek 6: Chromatogram a jeho popis [21]</i>	15
<i>Obrázek 7: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu [23]</i>	16
<i>Obrázek 8: Kapalinový chromatogram Agilent 1290 series (Agilent technologies Waldbrook, Německo)</i>	19
<i>Obrázek 9: Hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS QTOF (Waters Milford MA, USA)</i>	20
<i>Obrázek 10: Chromatogram směsi všech standardů měřených metodou RP-UHPLC/MS v pozitivním (A) a negativním (B) iontovém módu</i>	22
<i>Obrázek 11: Frangentační spektrum PC 16:0/18:1 v pozitivním (A) a negativním (B) iontovém módu</i>	23
<i>Obrázek 12: Extrahované iontové chromatogramy pro PC 18:1/18:1 s rozdílnými polohami dvojných vazby v konformaci cis</i>	23
<i>Obrázek 13: Extrahované iontové chromatogramy pro PC 18:1/18:1 s dvojnou vazbou v poloze 9 s konformací cis a trans</i>	24
<i>Obrázek 14: Fragmentační spektrum PC 18:1/16:0 v pozitivním (A) a negativním (B) a PC 16:0/18:1 v pozitivním (C) a negativním (D) iontovém módu</i>	25
<i>Obrázek 15: Graf znázorňující retenční chování v různých délkách acylového řetězce a chování dvojných vazby v pozicích cis-9 a trans-9</i>	26
<i>Obrázek 16: Graf znázorňující retenční chování pro PC 18:1/18:1 s rozdílnou pozicí dvojných vazby (Z) v konformaci cis</i>	27
<i>Obrázek 17: Graf sledující závislosti retenčního času na ECN jednotlivých standardů PC, PC O- a PC P-</i>	28
<i>Obrázek 18: Extrahovaný iontový chromatogram pro PC 34:3</i>	29
<i>Obrázek 19: Chromatogram znázorňující retenční chování látek se stejným hmotnostním poměrem</i>	30
<i>Obrázek 20: Graf znázorňující závislost retenčního času na počtu dvojných vazeb</i>	31

<i>Obrázek 21: Graf znázorňující retenční chování fosfatidylcholinu plasmalogenu na počtu dvojných vazeb</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 22: Graf znázorňující délku acylového řetězce jednotlivých vzorků v závislosti na retenčním čase</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 23: Znázorňuje závislosti délky acylového řetězce na retenčním čase</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 1: Standardy fosfatidylcholinů s teoretickými m/z pro pozitivní a negativní iontový mód a určené retenční časy</i>	<i>21</i>
<i>Tabulka 2: Tabulka znázorňující identifikované látky a jejich retenční časy</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 3: Tabulka lineárních regresí získaných ze závislosti v Obrázku 20</i>	<i>31</i>

Anotace

Předložená práce se zabývá lipidomickou analýzou založenou na chromatografické separaci v kombinaci s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. V rámci metody jsem se zaměřila na studium retenčního a fragmentačního chování fosfatidylcholinů, což bylo použito pro rozlišení různých typů izomerů z této třídy lipidů, jako je geometrie a pozice dvojných vazeb nebo pozice a typ vazby mastných kyselin na glycerolový skelet. Poznatky získané na standardech byly převedeny do praxe při identifikaci fosfatidylcholinů v lidské plazmě, kde bylo jednoznačně identifikováno 95 fosfatidylcholinů pomocí retenčního chování, hmotnostní spektrometrie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Tato práce ukázala potenciál kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií pro rozlišení izomerních forem lipidů a je základem pro navazující studii zkoumající rozdílné složení mastných kyselin produkované alternativními metabolickými cestami rakovinových buněk.

Klíčová slova: Kapalinová chromatografie, Hmotnostní spektrometrie, Lipidy, Izomerie, Lidská plazma

Annotation

The present work deals with lipidomic analysis based on chromatographic separation combined with high-resolution mass spectrometry. The method of analysis was focused on the study of the retention and fragmentation behavior of phosphatidylcholines, which was used to distinguish among different types of isomers from this class of lipids, on the basis of differences in the geometry and position of double bonds or the position and type of fatty acid linkage to the glycerol skeleton. The knowledge gained on the standard behavior was translated into practice in the identification of phosphatidylcholines in human plasma, where 95 phosphatidylcholines were uniquely identified by retention behavior, mass spectrometry and tandem mass spectrometry. This work has demonstrated the potential of liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the resolution of isomeric forms of lipids and provides the basis for a follow-up study investigation the different fatty acid composition produced by alternative metabolic pathways in growing cancer cells.

Keywords: Liquid chromatography, Mass spectrometry, Lipids, Isomerism, Human plasma

Obsah

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. LIPIDY	10
2.1.1. <i>Charakteristika, terminologie a základní vlastnosti lipidů</i>	10
2.1.2. <i>Glycerofosfolipidy</i>	12
2.1.3. <i>Funkce</i>	12
2.1.4. <i>Lipidy v diagnostice onemocnění</i>	12
2.2. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	13
2.2.1. <i>Části přístroje</i>	14
2.2.2. <i>Ionizační techniky</i>	14
2.3. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	15
2.3.1. <i>Spojení MS-LC</i>	17
2.3.2. <i>Příprava vzorku</i>	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1. CHEMIKÁLIE A STANDARDY	18
3.1.1. <i>Lipidové standardy</i>	18
3.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ	18
3.3. RP-UHPLC/ESI-MS PODMÍNKY	19
3.4. ZPRACOVÁNÍ DAT	20
4. DISKUSE A VÝSLEDKY	21
4.1. STANDARDY	21
4.2. REÁLNÝ VZOREK LIDSKÉ PLAZMY	28
5. ZÁVĚR	35
6. POUŽITÁ LITERATURA	36
7. PŘÍLOHY	39

1. ÚVOD

Lipidy jsou přírodní látky, které jsou důležité pro existenci živých organismů a plní zásadní buněčné funkce. Slouží jako zdroj energie, chrání orgány, tvoří izolační vrstvu a jsou základem buněčných membrán. Účastní se také buněčné signalizace, jejichž studium je důležité pro porozumění mechanismu závažných nemocí. Vědní obor, který se zabývá analýzou lipidů se nazývá lipidomika. Ta využívá různé analytické techniky. Klíčovou roli však představuje hmotnostní spektrometrie umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu.

Analýza lipidů je mladý, ale perspektivní vědní obor ve výzkumu lipidových biomarkerů nádorových, kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních onemocnění. Účinné analytické metody umožňují studium buněčného metabolismu. Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie je možné identifikovat různé formy izomerů jako např. pozici mastných kyselin. Avšak běžná MS/MS analýza určení pozice a geometrie dvojných vazeb neumožňuje. Proto se tato technika využívá ve spojení se separačními technikami, jako je kapalinová chromatografie, kterou lze tyto izomery rozlišit.

Tato práce se zabývá studiem retenčního a fragmentačního chování jednotlivých izomerních forem fosfatidylcholinů s využitím kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Cílem je rozlišení typu vazby a pozice mastného řetězce, pozice a geometrie dvojných vazeb s využitím rozdílného retenčního chování a MS nebo tandemové MS/MS analýzy. Výsledky této práce přispívají k rozsáhlému studiu lipidomického profilu lidské plazmy na Univerzitě Pardubice, kde je výzkum zaměřen na vývoj diagnostické metody využívané k časné diagnostice na základě srovnání lipidového profilu zdravých jedinců a pacientů s karcinomem pankreatu a dalších nádorových onemocnění.

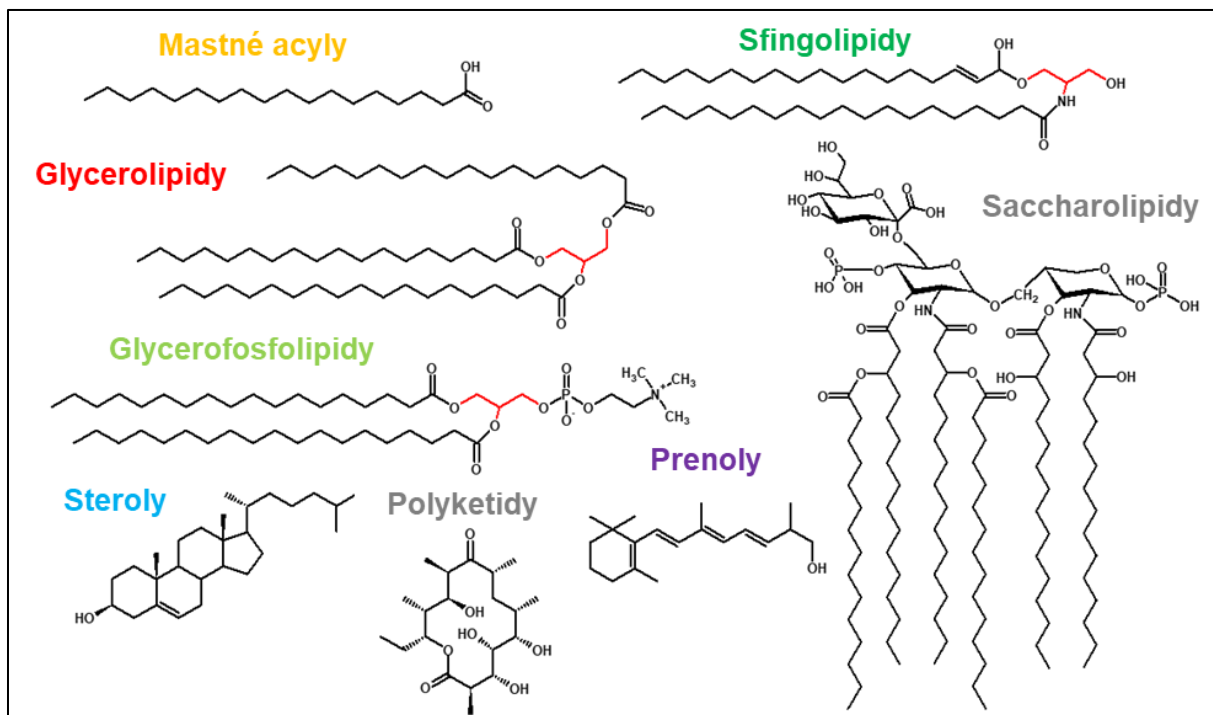
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Lipidy

2.1.1. Charakteristika, terminologie a základní vlastnosti lipidů

Lipidy plní důležité funkce v lidském organismu, jako složky buněčných membrán a podílejí se na různých buněčných funkcích jako jsou skladování energie či buněčné signalizace. Nejčastěji jsou popisovány jako mastné kyseliny, jejich deriváty a látky, které s těmito sloučeninami souvisejí biosynteticky nebo funkčně. [1]

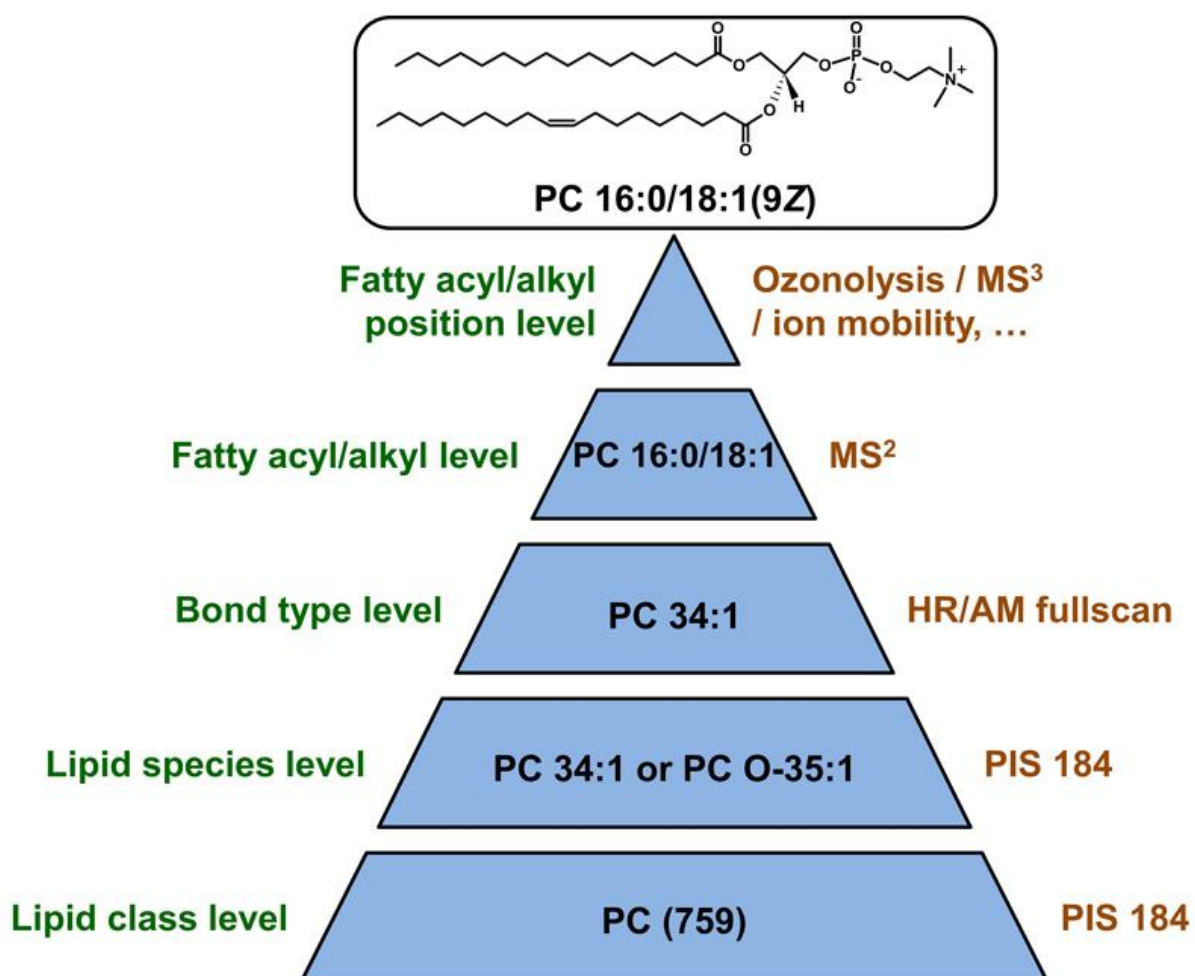
Lipidy řadíme do osmi základních kategorií, jejichž zkratky odvozujeme od anglických názvů. Mezi osm skupin (viz. Obr. 1) patří mastné kyseliny (FA), glycerolipidy (GL), glycerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), steroly (ST), prenoly (PR), sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK). Tyto jednotlivé skupiny se dále rozdělují na třídy a podtřídy. Všechny jednotlivé kategorie, třídy a podtřídy shrnuje databáze LIPID MAPS, která eviduje 43 636 lipidů. [2] Databáze LIPID MAPS je neustále aktualizována, přičemž poslední aktualizace proběhla v roce 2022 a zahrnuje komplexní klasifikaci, názvosloví a chemickou charakterizaci lipidů. [3]



Obrázek 1: Kategorie lipidů a jejich struktura podle klasifikace LIPID MAPS

Lipidy se v jednotlivých třídách od sebe liší počtem uhlíků (CN) a dvojných vazeb (DB). Jsou známy však také různé regioizomery, enantiomery nebo *cis/trans* izomery. Existuje několik zápisů, a to podle toho, jak je známé uspořádání lipidu na základě experimentálních dat (např. *sn*-pozici, umístění dvojných vazeb či jiné specifikace). Nejprve se zapisuje zkratka lipidové skupiny, počet uhlíků a dvojná vazba, která je od počtu uhlíků oddělena dvojtečkou. Například pro fosfatyldylcholin s 36 uhlíky a 2 dvojnými vazbami je daný zápis následující PC 36:2.

Pokud je známo, že fosfatydylocholin se skládá ze dvou mastných kyselin 18:0 a 18:2, ale je neznámá daná *sn*-pozice mastných kyselin, zapíše se to následovně PC 18:0_18:2. Pokud jsou však jednotlivé kyseliny odděleny „/“ znamená to, že známe pozici (*sn*-1/*sn*-2/*sn*-3 nebo *sn*-1/*sn*-2 či *sn*-2/*sn*-3). Například pro PC 18:0/18:2 je pak 18:0 v pozici *sn*-1 a 18:2 v pozici *sn*-2. Je-li známá geometrie i místo dvojné vazby zapisuje se za vzorec do závorky například (9Z). Pokud je mastná kyselina vázaná jinou vazbou než acylovou, alkenylová (plasmalogen) se značí P – nebo etherová O-. Musí se pak však důsledně dbát na jednotlivý zápis, aby koreloval se skutečnou získanou informací a nedošlo k záměně lipidů. [4]

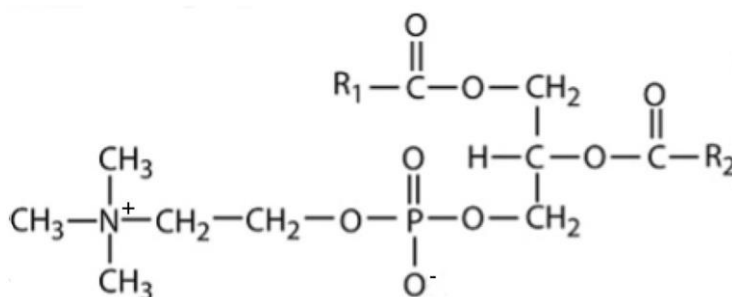


Obrázek 2: Znázornění jednotlivých zápisů lipidů na základě lokalizace dvojných vazeb, *sn*-pozic a dalších kritérií [5]

2.1.2. Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy tvoří hlavní složku lipidů v buněčné membráně. Na struktuře se však podílejí také sfingolipidy. Glycerofosfolipidy jsou tvořeny glycerolem s dvěma navázanými mastnými kyselinami a fosfátovou skupinou, na kterou se může vázat cholin (fosfatidylcholin), ethanolamin (fosfatidylethanolamin) a serin (fosfatidylserin).[6, 7]

Podskupina glycerofosfolipidů, které se nejvíce podílí na struktuře buněčných membrán jsou glycerofosfatidylcholiny (PC) s triviálním názvem leucitiny. Ty zastupují až polovinu celkového množství lipidů v membránách. Ve své struktuře obsahují molekulu cholinu, která je nezbytná pro přenos nervových informací. [8] Glycerofosfatidylcholiny jsou lipidy, s kterými jsem se v této práci zabývala.



Obrázek 3: Obecná struktura fosfatidylcholinu [9]

2.1.3. Funkce

Lipidy mají v lidském organismu hned několik zásadních funkcí. Jednou z nejvýznamnějších funkcí je tvorba fosfolipidové dvojvrstvy a složení mastných kyselin v jednotlivých lipidech určujících vlastnosti membrány. Další funkcí je například zásobní, kterou plní triacylglyceroly. Dříve byla přiřazována lipidům převážně funkce stavební, ochranná a zásobní. Detailnější studium ukázalo, že také plní důležitou signální funkci. Mezi ně patří především přenos informací mezi organelami a ostatními buňkami. Glykosfingolipidy mají zásadní úlohu v imunitním systému. Obecně jsou lipidy spojeny s různými lidskými nemocemi. [10]

2.1.4. Lipidy v diagnostice onemocnění

Lipidomika je velmi významný obor identifikující biomarkery pomocí nichž lze detekovat různá onemocnění. Asi nejznámějším lipidovým biomarkerem je cholesterol, jehož hladina se sleduje ve vztahu k ucpávání cév a zvyšování krevního tlaku. Dalším ukazatelem kardiovaskulárních onemocnění je celková hladina triacylglycerolů v krvi.

Nejdůležitější lipidy v metabolismu u většiny eukaryot jsou sfingolipidy, glycerofosfolipidy, glycerolipidy a neesterifikované mastné kyseliny. Sfingolipidy jsou důležitou součástí buněčné membrány a podílejí se na buněčných funkcích. Jejich poruchy metabolismu souvisejí s lysozomálními nemocemi, jako je například Gaucherova nemoc, [11] Niemann-Pickova nemoc [12] nebo Pompeho choroba.[13]

Hromadění triacylglycerolů, především v netukových tkáních, je markerem lipotoxicity a souvisí s inzulínovou rezistencí. Klíčové stavební kameny lipidů jsou mastné kyseliny. Struktura mastných kyselin a intracelulární koncentrace je užitečným ukazatelem jejich metabolismu.[6] Lipidy jsou také asociovány s abnormálním metabolismem u mnoha onemocnění jako je například diabetes mellitus 2. typu, ischemická srdeční porucha, ztukovatěním jater nezapříčiněné alkoholem, ale také například s Alzheimerovou chorobou. [8] Nádorové onemocnění je další velmi rozšířenou civilizační nemocí, která při pozdní diagnostice vykazuje vysokou úmrtnost. I u tohoto onemocnění byla sledována dysregulace lipidů, a to téměř pro všechny druhy nádorových onemocnění. Napříč literaturou se tyto deregulované lipidy nejen shodují, ale občas i liší. Převážně se ale jedná o lipidy z kategorie fosfolipidů a sfingolipidů. V rámci jedné třídy mohou mít jednotlivé lipidy zvýšenou koncentraci, zatímco jiné zase sníženou. Z tohoto důvodu je nutné analyzovat lipidy co nejpodrobněji. Detailnější strukturní znalost poté může vést k pochopení vzniku daného onemocnění. Nejnovější publikace poukazují právě na význam pozice dvojných vazeb u mastných kyselin, které vznikají poruchou metabolických drah vlivem daného onemocnění.

Na Univerzitě Pardubice byly týmem profesora Holčapka vyvinuty analytické metody využívající kvalitativní a kvantitativní lipidomickou analýzu biologických vzorků z tělních tekutin (plazma a sérum) pro včasnou diagnostiku některých zhoubných nádorů. Na základě detailnějších výsledků lze s vysokou úspěšností (více než 90 %) rozlišit skupiny pacientů a zdravých dobrovolníků, což lze v budoucnu využít v klinické praxi.

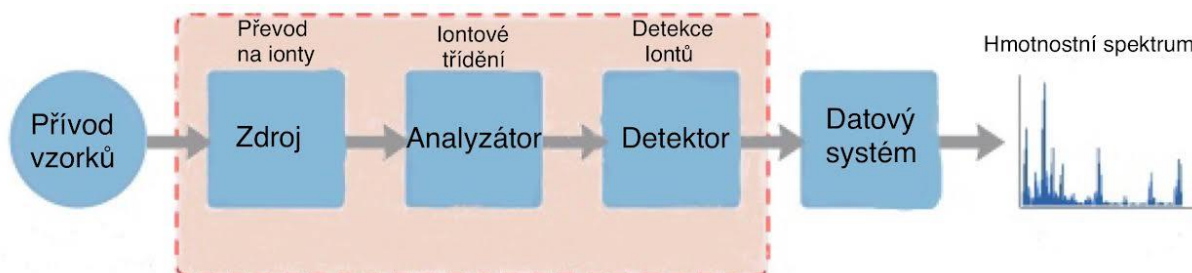
Velmi slibná je metoda pro včasnou detekci pankreatického duktálního adenokarcinomu (PDAC).[14] PDAC jednoznačně patří do skupiny velmi obtížně zjištělných zhoubných onemocnění s bezpříznakovými projevy a neexistuje pro ni žádný screeningový program. Obvykle tedy bývá diagnostikována v pozdních stádiích, kdy je úspěšnost léčby pouze 10 %. Ukazuje se, že lipidomická analýza založená na chromatografické separaci v kombinaci s MS a následnou statistickou analýzou lipidomických dat je velmi slibnou metodou, jejíž diagnostická citlivost předčila dosud používané diagnostické postupy.

2.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) patří mezi analytické techniky, při níž se chemické látky identifikují tříděním iontů v elektrickém nebo magnetickém poli podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a zaznamenává se jejich intenzita. Přístroj poté nazýváme hmotnostní spektrometr a záznam hmotnostní spektrum. [15]

2.2.1. Části přístroje

Přístroj se skládá ze tří hlavních částí. Zdroje iontů, kde dochází k převodu neutrálního analytu na ion. Z analyzátoru, který rozděljuje ionty podle poměru m/z a detektoru, který slouží k detekci iontů a zaznamenávání relativního zastoupení jednotlivých iontů pomocí elektronásobiče, fotonásobiče nebo Faradayovy klece. [8]



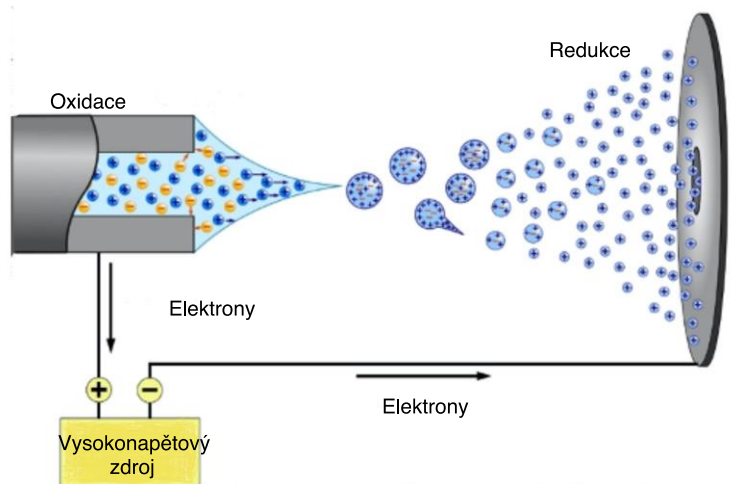
Obrázek 4: Části hmotnostního spektrometru [16]

2.2.2. Ionizační techniky

V metodách hmotnostní spektrometrie se v dnešní době využívá mnoho typů ionizačních technik. Nejčastěji se dělí na ionizační techniky za sníženého tlaku, kam se řadí elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). Tyto techniky se používají ve spojení s plynovou chromatografií. Jejich frekvence využití je však nízká. Výjimkou je laserová desorpční ionizace s asistencí matrice (MALDI), která představuje výhody pro zobrazovací hmotnostní spektrometrii.

V současné době jsou výše uvedené techniky nahrazeny modernějšími ionizačními technikami za atmosférického tlaku, například chemické ionizace za přítomnosti atmosférického tlaku (APCI) nebo ionizace elektrosprejem (ESI). Právě vyvinutí elektrospreje přineslo průlom pro analýzu biomolekul, za kterou obdržel J.B. Fenn Nobelovu cenu. [17] Princip je založen na zmlžení kapaliny na výstupu z kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí přenášející náboj na povrch kapiček. Odpařováním rozpouštědla dochází ke kumulaci povrchového náboje následovanou coulombickou explozí. [18] Opakováním tohoto procesu dochází ke vzniku iontu (viz. obrázek 5). Důvodem upřednostňování některých technik je skutečnost, že jsou zcela kompatibilní s populární kapalinovou chromatografií (LC).

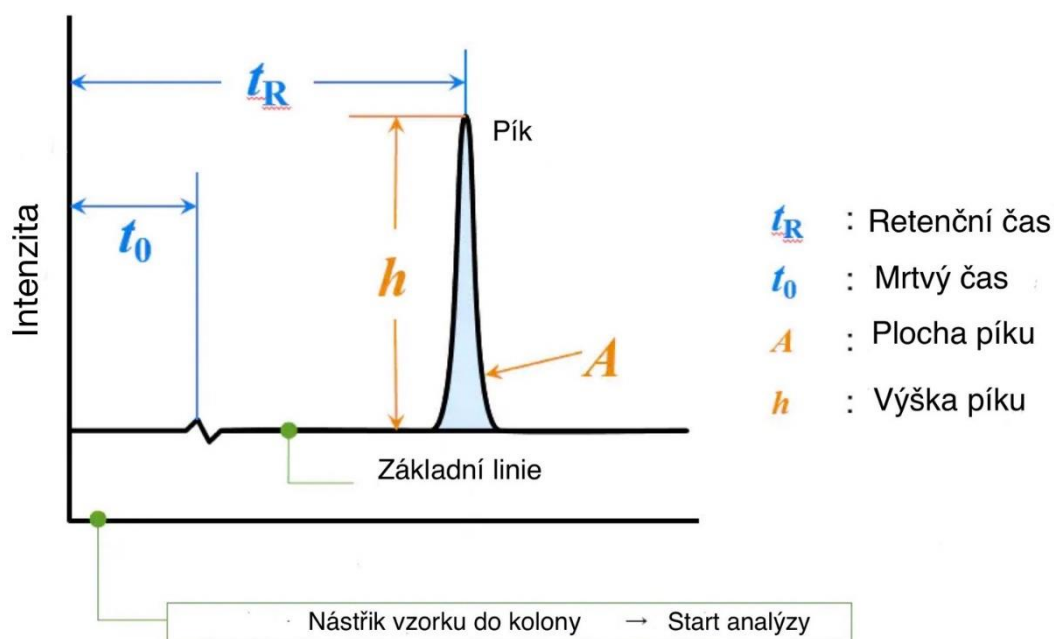
ESI má jednoznačnou výhodu v právě již zmiňované kompatibilitě s LC a je vhodná pro středně polární až iontové látky s vysokou molární hmotností kvůli možnosti tvorby vícenásobně nabitých iontů. [19]



Obrázek 5: Princip ionizace elektrosprejem [20]

2.3. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační technika, jenž se využívá k rozdělení směsi látek na základě rozdílné přitažlivosti mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Tato technika je vhodná pro netěkavé nepolární až iontové organické látky. Přístroj se nazývá chromatograf a jeho záznam chromatogram. Na záznamu jsou jednotlivé látky znázorněny pomocí píků a charakteristickým znakem je poté retenční čas (t_R), který udává, jak dlouho je látka zadržovaná na koloně. Výška, případně plocha píku znázorňuje množství látky ve vzorku. Běžně se využívá vysokoúčinná chromatografie (HPLC), ale v současné době se rozšířila také ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která je schopná vysokorychlostní analýzy. [21]



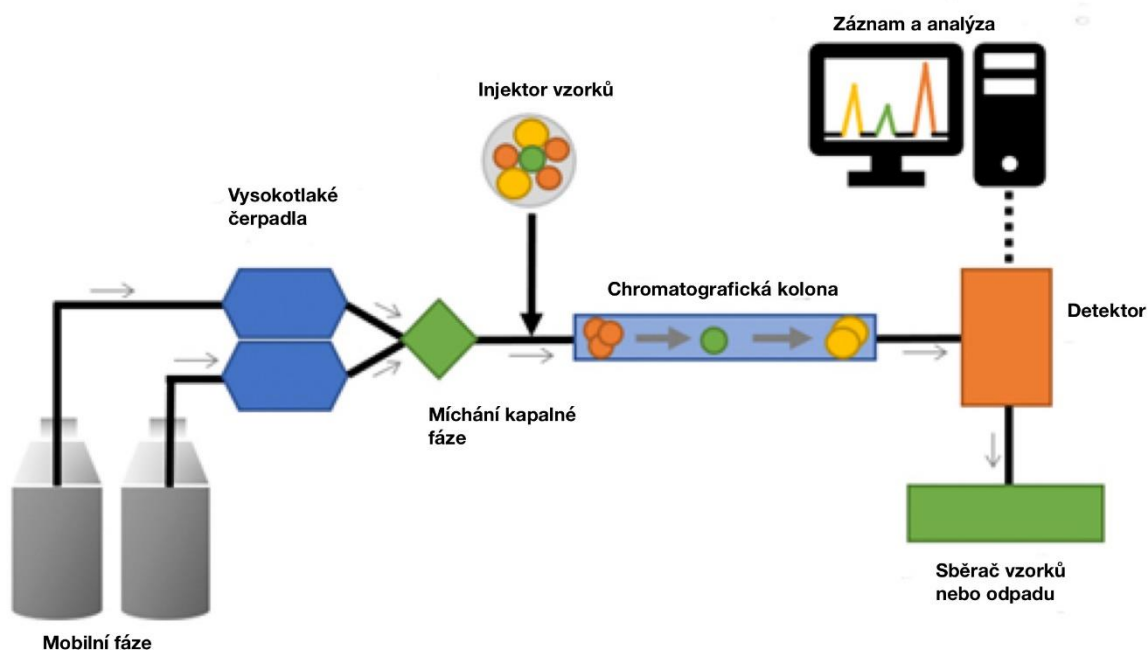
Obrázek 6: Chromatogram a jeho popis [21]

Jak již bylo zmíněno, k separaci dochází na základě interakce vzorku s mobilní a stacionární fází. Existuje několik typů chromatografie, které se klasifikují na základě fyzikálních stavů fází. Právě kapalinová chromatografie se vyznačuje kapalnou mobilní fází, která proniká pevnou stacionární fází. [22] Stabilní průtok mobilní fáze je řízen vysokotlakým čerpadlem. Složení mobilní fáze může být konstantní (izokratická eluce) nebo se poměr jednotlivých složek může v čase měnit (gradientová eluce).

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze a je unášen na stacionární fází (známou jako separační kolona), na které je analyt zachytáván a jednotlivé látky se následně oddělí. Po opuštění kolony je analyt unášen na detektor, kde je zaznamenán signál. Na základě retenčního času jsou látky identifikovány a plochy píku kvantifikovány. [21]

Kapalinová chromatografie je technika, která se v lipidomice využívá nejčastěji. Existují různé separační módy jako je kapalinová chromatografie s obrácenými (RP) nebo normálními fázemi (NP), hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) a další. Právě kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi, která využívá nepolární stacionární fází a polární mobilní fází, je nejběžnější a separuje lipidy na základě jejich nepolárních mastných acylových částí. Výhodou této techniky je separace jednotlivých izomerů včetně polohy mastných acylů, polohy a geometrie dvojných vazeb, což metody NP-LC nebo HILIC neumožňují. Na rozdíl od RP-LC, chromatografie s normálními fázemi a HILIC separují lipidy podle polárních skupin tzv. separace dle lipidových tříd.

Základní mechanismus separace je popsán teorií ekvivalentního počtu uhlíků (ECN). Podle toho se lipidy stejné třídy dělí podle rozdílu počtu uhlíků (CN) a dvojnásobku počtu dvojných vazeb (DB) v acylových řetězcích $ECN = CN - 2 * DB$. Retenční čas se tedy zvyšuje s počtem uhlíků a snižuje s počtem dvojných vazeb. [2]



Obrázek 7: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu [23]

2.3.1. Spojení MS-LC

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií představuje komplikovaný proces, který však přináší celou řadu výhod. Hlavním problémem je přívod velkého množství mobilní fáze a následná ionizace. Díky rozvoji ionizačních technik za atmosférického tlaku však bylo dosaženo běžného LC/MS spojení.

Biologické vzorky jsou komplexní matrice, které snižují ionizační účinnost, avšak separace analytů poté vede k vyšší citlivosti měření. Separace také umožňuje stanovení jednotlivých izomerů a izobaru. Jejich analýza bez separace totiž není možná. Spojením separace komplexních vzorků pomocí LC a citlivou detekcí pomocí MS vzniká možnost identifikace lipidů s vysokou jistotou. Využití retenčních časů, přesného určení m/z a fragmentačního chování z MS/MS analýzy je identifikace lipidů bezchybná. [24]

2.3.2. Příprava vzorku

Před samotnou analýzou je nutné izolovat lipidy z daného vzorku, a to lipidovou extrakcí. Nejčastěji se využívá extrakce kapalina-kapalina, tedy směs dvou nemísitelných kapalin. Nejstaršími metodami je extrakce dle Folcha a Bligh-Dyera, [25] které využívají směs chloroformu a methanolu. Od těchto postupů se v současné době ale ustupuje vzhledem k toxicitě chloroformu. Jako náhradní metoda se využívá extrakce dle Matyashe [26], kde je chloroform nahrazen metyl-terc-butyl éterem. Existuje však další řada extrakčních postupů a jsou vyvíjeny neustále další nové postupy. Nejjednodušším procesem je proteinová precipitace, tedy vysrážení proteinů, čehož se docílí pomocí organického rozpouštědla (methanol, ethanol, acetonitril a další). Nejedná se však o extrakci, neboť zde nejsou přítomny dvě fáze. Vzorek je poté přefiltrován, čímž jsou odstraněny proteiny. Anorganické soli jsou v extraktu stále přítomny, čímž dochází k znečištění přístroje, ale nedochází ke ztrátě analytu během extrakce jako tomu může být u dvoufázových extrakcí.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo objasnění retenčního a fragmentačního chování izomerních forem PC stanovených UHPLC/MS a aplikace pro detailní identifikaci PC v lidské plazmě. Nejprve bylo sledováno chování fosfatidylcholinů na komerčně dostupných standardech a poté byly poznatky využity pro co nejpřesnější identifikaci izomerů v lidské plazmě. Měření probíhalo v pozitivním i negativním iontovém módu, neboť každý mód přináší rozdílnou informaci.

Původní metoda [27], ze které jsem vycházela, byla zaměřena na identifikaci co nejvíce lipidů s vysokou přesností. Bylo však identifikováno několik lipidů se stejným složením v různých retenčních časech, což poukazuje na přítomnost izomerních forem. Moje práce se zaměřila právě na vysvětlení těchto izomerních forem s jejich co nejpřesnějším popisem, které v předchozí práci chybělo.

3.1. Chemikálie a standardy

Ke své experimentální práci jsem použila acetonitril, 2-propanol, methanol, butanol. Všechny v kvalitě HPLC/MS. Kyselinu mravenčí a mravenčan amonný od společnosti Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Chloroform stabilizovaný 0,5-1 % ethanolem v HPLC kvalitě od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Deionizovaná voda byla připravená pomocí systému Milli-Q-Reference Water Purification System (Molsheim, Francie). Standardy jednotlivých lipidů byly zakoupeny od společnosti Avanti Polar Lipids (Alabast, AL, USA) a Merck (Darmstadt, Německo).

3.1.1. Lipidové standardy

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 – 10 mg/ml rozpuštěním ve směsi MeOH:CHCl₃ (1:1, v/v). Jednotlivé standardy byly smíchány do směsi tak, aby izobarické PC nebyly přítomny ve stejné směsi (viz. Příloha 1). Směsi byly připraveny smícháním vypočtených podílů zásobních roztoků, aby koncentrace jednotlivých PC byla 20 nmol/ml, a doplněny odpovídajícím množstvím směsi MeOH:CHCl₃ (1:1, v/v). Směsi standardů i zásobní roztoky byly skladovány při -80 °C a těsně před měřením RP-UHPLC/MS byly 100krát naředěny.

3.2. Příprava vzorků

Vzhledem k tomu, že s plazmou není možno pracovat bez náležitých oprávnění, byly vzorky pro účely mé práce připraveny mým konzultantem. Nejprve byl vzorek směsné lidské plazmy (25 µl) deproteinizován 250 µl směsí butanolu a metanolu v poměru 1:1. Vzorek byl umístěn v ultrazvukové lázni při 25 °C po dobu 15 minut. Dále byl odstředován při 3000 otáčkách za minutu (886×g) po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následné přečištění proběhlo pomocí 0,25 µm celulózového filtru (OlimPeak, Teknohroma), který byl poté promyt ještě 500 µl směsí butanol:metanol (1:1, v/v). Extrakt byl odpařen do sucha a před analýzou rozpuštěn v 250 µl směsi MeOH:CHCl₃ (1:1, v/v).

3.3. RP-UHPLC/ESI-MS podmínky

Separace lipidů byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity series od společnosti Agilent technologies (Waldbroon, Německo) (Obr. 8). Metoda RP-UHPLC/MS je charakterizována těmito podmínkami:

- Kolona Acquity UPLC BEH C18 s rozměry $150 \times 2,1$ mm, $1,7 \mu\text{m}$, průtok mobilní fáze $0,35$ ml/min, dávkovaný objem $1 \mu\text{l}$ a teplota kolony $55 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Gradientová eluce s následujícím složením 0 min- 35% B, 8 min- 50% B, 21 - 23 min- 95% B a 24 - 25 min- 35% B. Mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a vody v poměru $60/40$ a mobilní fáze B obsahovala acetonitril-2-propanol v poměru $10/90$. Obě mobilní fáze obsahovaly $0,1\%$ kyseliny mravenčí a 5mM mravenčan amonný.

Experimenty byly provedeny na hmotnostním spektrometru Xevo G2 – XS QTOF firmy Waters (Milford, MA, USA) (Obr. 9). Data byly získány za použití pozitivního či negativního iontového režimu při kapilárním napětím 3kV pro pozitivní iontový režim a $1,5 \text{ kV}$ pro negativně-iontový režim v režimu citlivosti. Napětí na vstupních elektrodách bylo 20 V a 90 V . Teplota iontového zdroje byla $150 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota sušících plynů $500 \text{ }^\circ\text{C}$. Průtok plynů ve zdroji činil 50 l/h a průtok sušícího plynu 1000 l/h . Rozsah akvizice pro m/z činil 100 - 1200 s dobou skenování $0,5$ sekund v kontinuálním módu. Pro experimenty měřené metodou MS/MS v obou režimech polaritity byl použit argon jako kolizní plyn při kolizní energii 30 eV a rozsah akvizice pro m/z činil 100 - 1000 s dobou skenování $0,1$ sekund pro MS/MS měření. Jako referenční látka pro MS experimenty byl použit peptid leucin enkafalin.

Obrázek 8: Kapalinový chromatograf Agilent 1290 series (Agilent technologies Waldbroon, Německo)





Obrázek 9: Hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS QTOF (Waters Milford MA, USA)

3.4. Zpracování dat

Data naměřená metodou RP-UHPLC/MS byla získána pomocí softwaru MassLynx. Soubor dat byl podroben redukci šumu pomocí nástroje Waters Compression Tool. Pro lepší přesnost hmotnosti byla použita korekce pomocí referenční látky a soubor byl převeden z profilového do čárového spektra pomocí nástroje Accurate Mass Measure v programu MassLynx.

4. DISKUSE A VÝSLEDKY

4.1. Standardy

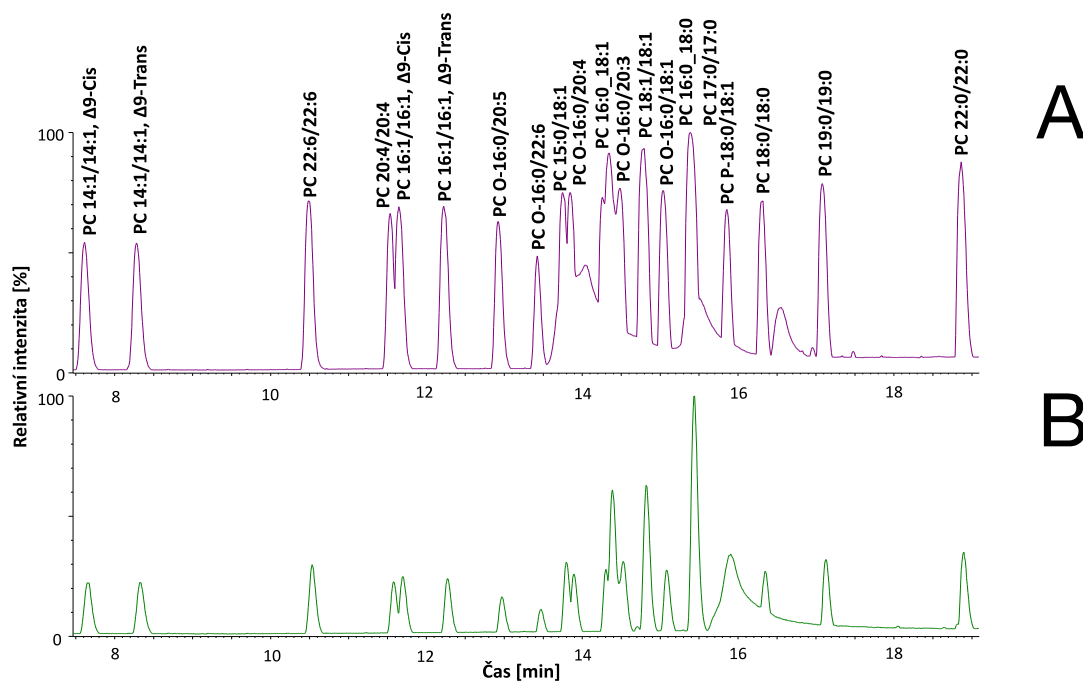
Nejprve bylo připraveno celkem 5 vzorků s různými standardy fosfatidylcholinů (Příloha 1), a to tak, aby ve směsi nebyly standardy se stejným m/z . Jednotlivé směsi byly změřeny metodami RP-UHPLC/MS a RP-UHPLC/MS/MS a na základě m/z s přesností na méně než 5 ppm byly zjištěny retenční časy (Rt) jednotlivých standardů (Tabulka č. 1). Každá směs standardů byla změřena 3x a odchylka měření byla ve všech případech menší než 0,01 min.

Tabulka 1: Standardy fosfatidylcholinů s teoretickými m/z pro pozitivní a negativní iontový mód a určené retenční časy

Standard	[M+H] ⁺	[M+COO] ⁻	Rt
PC 16:0/18:1	760,5851	804,5760	14,45
PC 18:1/16:0			14,42
PC 15:0/18:1	746,5694	790,5604	13,83
PC 18:1/18:1, Δ6-Cis	786,6007	830,5917	14,86
PC 18:1/18:1, Δ8-Cis			14,56
PC 18:1/18:1, Δ9-Cis			14,47
PC 18:1/18:1, Δ11-Cis			14,33
PC 18:1/18:1, Δ9-Trans			14,86
PC 16:1/16:1, Δ9-Cis	732,5538	774,5291	11,74
PC 16:1/16:1, Δ9-Trans			12,30
PC 14:1/14:1, Δ9-Cis	674,4755	718,4653	7,67
PC 14:1/14:1, Δ9-Trans			8,35
PC O-16:0/18:1	746,6058	790,5968	15,13
PC O-16:0/20:3	770,6058	814,5956	14,46
PC O-16:0/20:4	768,5902	812,5799	13,93
PC O-16:0/20:5	766,5745	810,5643	13,01
PC O-16:0/22:6	792,5901	836,5799	13,51
PC P-18:0/22:6	818,6058	862,5968	14,49
PC P-18:0/20:4	794,6058	838,5968	14,87
PC P-18:0/18:1	772,6215	816,6124	15,95
PC 16:0/16:0	734,5694	778,5604	14,41
PC 18:0/18:0	790,6320	834,6230	16,40
PC 17:0/17:0	762,6007	806,5917	15,48
PC 16:0/18:0			15,48
PC 18:0/16:0			15,48
PC 19:0/19:0	818,6633	862,6543	17,17
PC 22:0/22:0	902,7572	946,7482	18,96
PC 20:4/20:4	830,5694	874,5592	11,62

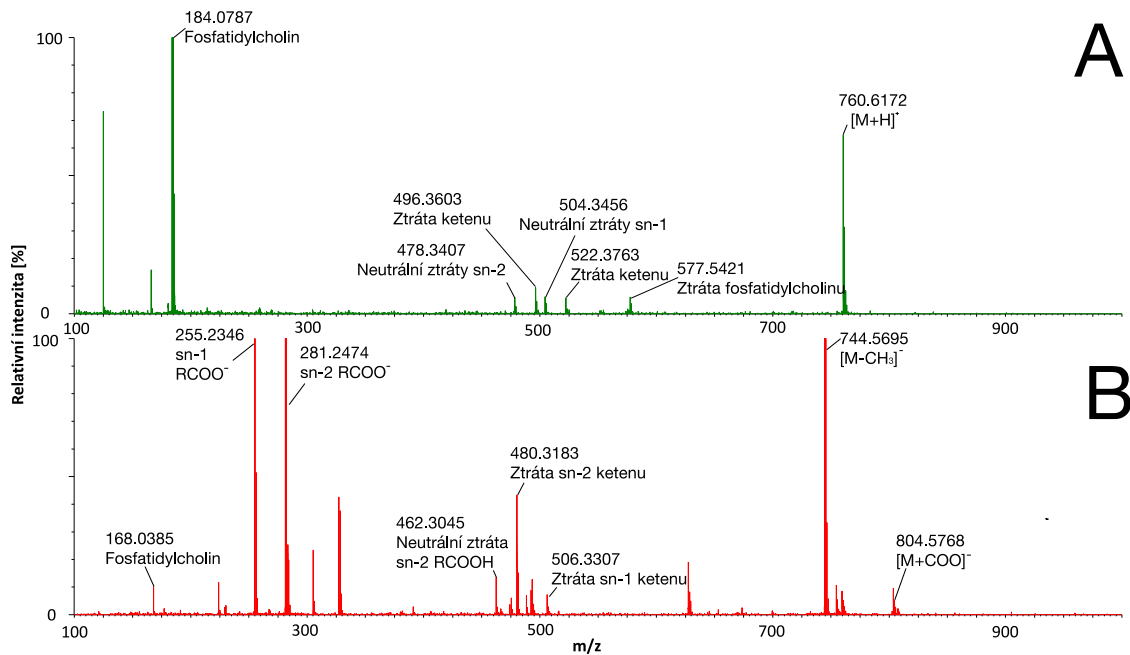
PC 22:6/22:6	878,5694	922,5592	10,57
--------------	----------	----------	-------

Retenční časy byly potvrzeny měřením pomocí pozitivního ($[M+H]^+$) a negativního ($[M+COO]^-$) iontového módu. Měřením byly získány chromatogramy (Obr. 10), kdy jednotlivé píky představují standardy z předchozí tabulky. V chromatogramu je znázorněn retenční čas (min) jednotlivých standardů a jejich relativní intenzity (%).



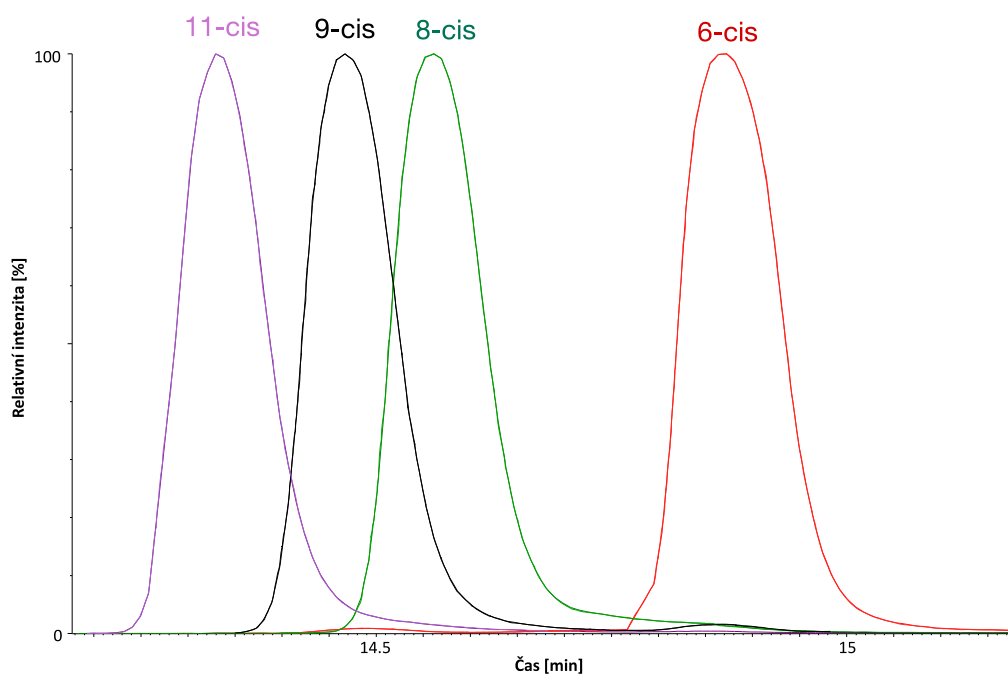
Obrázek 10: Chromatogram směsi všech standardů měřených metodou RP-UHPLC/MS v pozitivním (A) a negativním (B) iontovém módu

Dále byla pomocí tandemové metody MS/MS provedena fragmentace všech standardů v pozitivu i v negativu. Díky tandemové spektrometrii lze pozorovat rozdílné fragmenty látky, které napomáhají zjistit více detailů o struktuře látky, přičemž se některé fragmenty látky projevují výrazněji v pozitivu a jiné zase negativu (Obr. 11). V pozitivu největší intenzitu projevuje fosfatidylcholin (m/z 184), který je charakteristickým fragmentem pro PC stejně jako pro LPC a SM. Dalšími důležitými fragmenty v pozitivním módu jsou neutrální ztráty mastných kyselin, případně ztráty mastných kyselin ve formě ketenů. V negativním módu jsou naopak dominantními fragmenty mastných kyselin, případně ztráta CH_3 z cholinu.

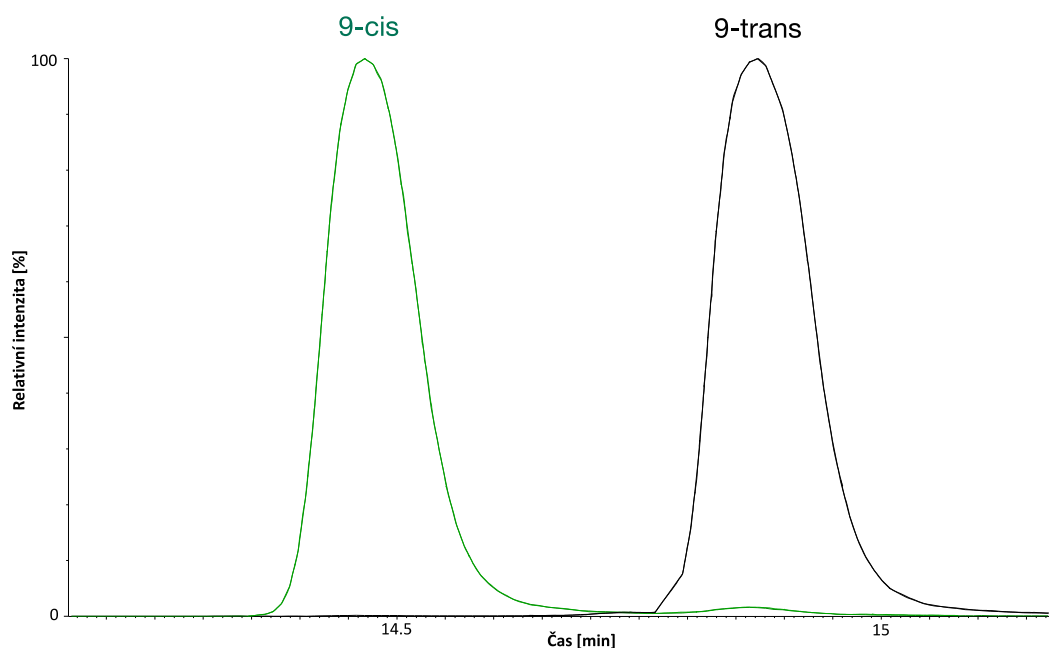


Obrázek 11: Frangmentační spektrum PC 16:0/18:1 v pozitivním (A) a negativním (B) iontovém módu

V Tabulce 1 můžeme pozorovat stejné m/z pro některé standardy. Jedná se tedy o izomerické nebo izobarické látky. Například pro konkrétní lipidy PC 18:1/18:1 $\Delta 6$ -*cis*, PC 18:1/18:1 $\Delta 8$ -*cis*, PC 18:1/18:1 $\Delta 9$ -*cis*, PC 18:1/18:1 $\Delta 11$ -*cis*, které mají totožné frangmentační hmotnostní spektrum, ale retenční časy se navzájem liší a lze tedy látky s rozdílnou polohou dvojné vazby rozlišit pomocí chromatografie (Obr. 12). Na druhou stranu, pro PC 18:1/18:1 $\Delta 6$ -*cis* a PC 18:1/18:1 $\Delta 9$ -*trans* je retenční čas stejný a rozlišení *cis* a *trans* polohy je možné pomocí retenčních závislostí, které jsou znázorněny níže.

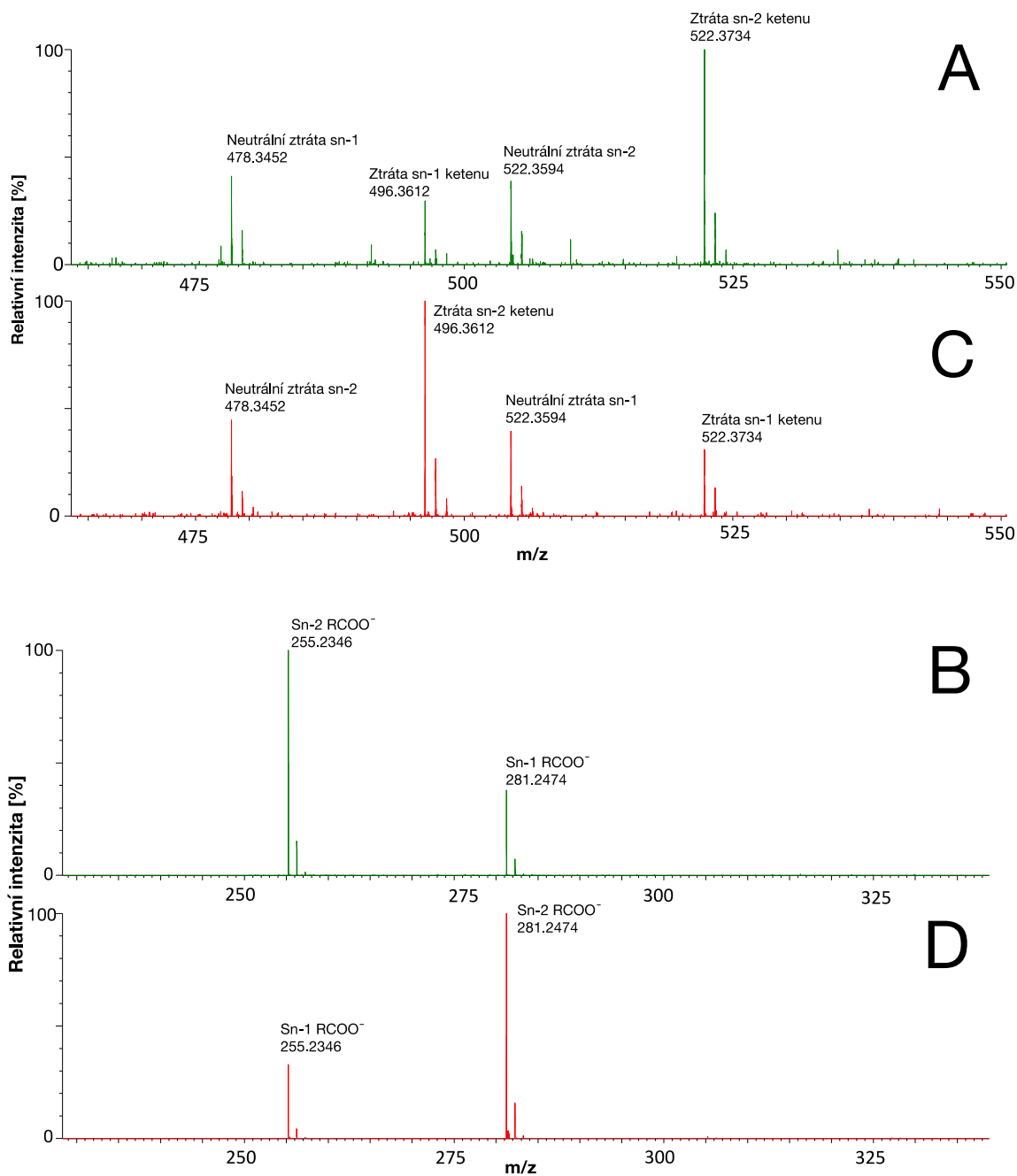


Obrázek 12: Extrahované iontové chromatogramy pro PC 18:1/18:1 s rozdílnými polohami dvojné vazby v konformaci *cis*



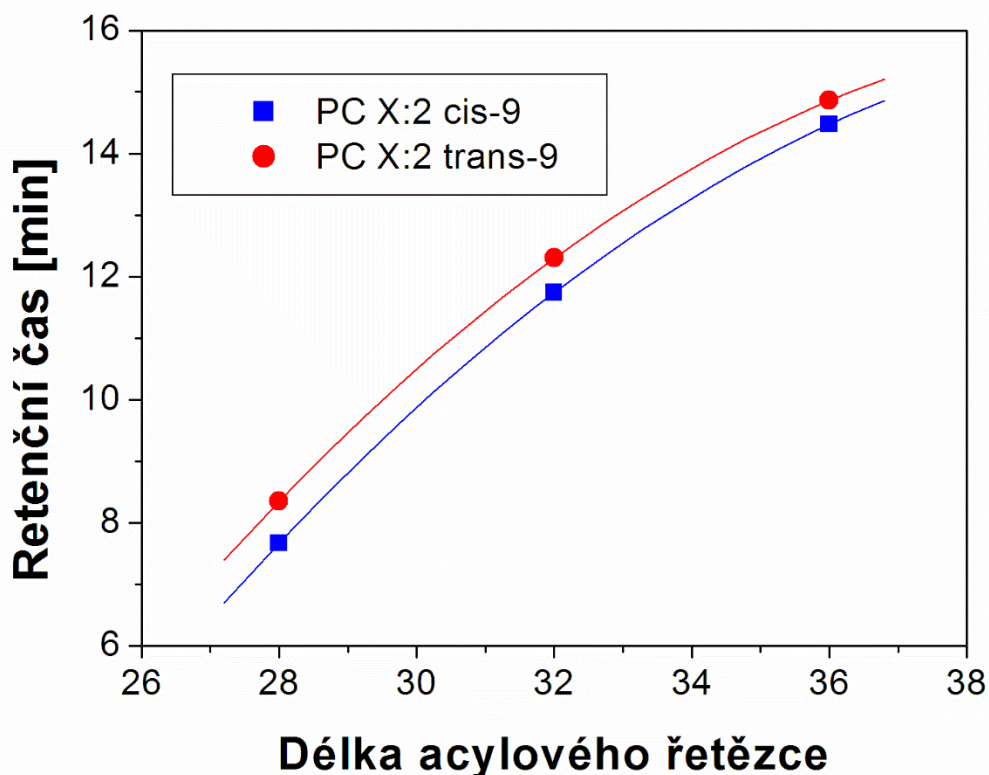
Obrázek 13: Extrahované iontové chromatogramy pro PC 18:1/18:1 s dvojnou vazbou v poloze 9 s konformací cis a trans

Rozdílná situace nastává v případě PC 17:0/17:0, PC 16:0/18:0 a PC 18:0/16:0, kdy jsou retenční časy totožné, ale rozdílnosti můžeme pozorovat v tandemovém hmotnostním spektru v pozitivním i negativním iontovém módu. Pro první zmíněný standard pozorujeme fragmenty pro mastnou kyselinu 17:0, zatím co v ostatních dvou případech pro 16:0 a 18:0. Druhý a třetí standard od sebe lze oddělit obtížně jak chromatografií, tak hmotnostní spektrometrií. Retenční časy jsou totožné, stejně jako záznamy v MS a MSMS. Jediným rozdílem jsou poměry intenzit pro RCOO^- v negativním módu a poměr ztrát mastných kyselin jako ketenů v pozitivním módu. Intenzivnější fragment znázorňuje mastnou kyselinu v poloze *sn*-2, kde dochází k jejímu ochotnějším odštěpení, což můžeme vidět na srovnání MSMS spekter (Obr. 14). Stejný trend byl pozorován i u standardů PC 16:0/18:1 a PC 18:1/16:0. Z toho poměru lze tedy odhalit, které složení je ve směsi převládající, ale nelze vyloučit přítomnost i druhého regioizomeru.



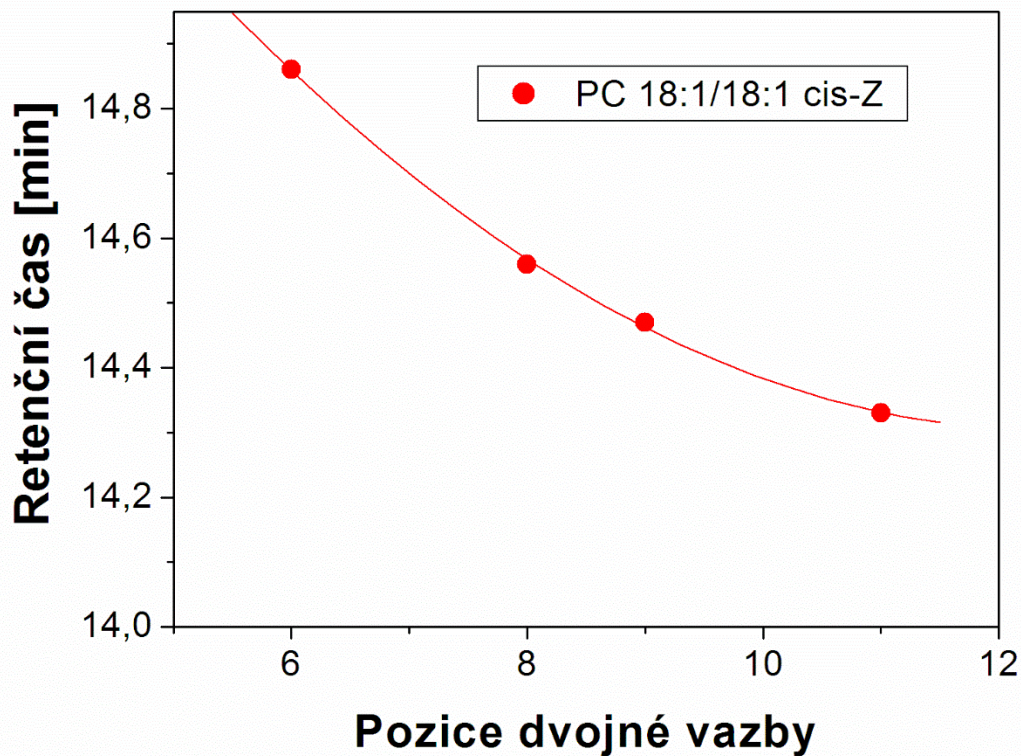
Obrázek 14: Fragmentační spektrum PC 18:1/16:0 v pozitivním (A) a negativním (B) a PC 16:0/18:1 v pozitivním (C) a negativním (D) iontovém módu

Retenční chování *cis* a *trans* izomerů bylo znázorněno v grafu (Obr.15), díky kterému můžeme sledovat i chování délky acylového řetězce fosfatidylcholinu v závislosti na retenčním čase. Je zde vidět, že úměrně s délkou řetězce roste i retenční čas. Lze však také pozorovat rozdílné chování *trans* a *cis* izomerů, které tvoří retenční závislosti. Obecně můžeme říct, že dvojná vazba v pozici *trans* bude nabývat vyšších hodnot retenčního času při různých délkách acylového řetězce než dvojná vazba v pozici *cis*.



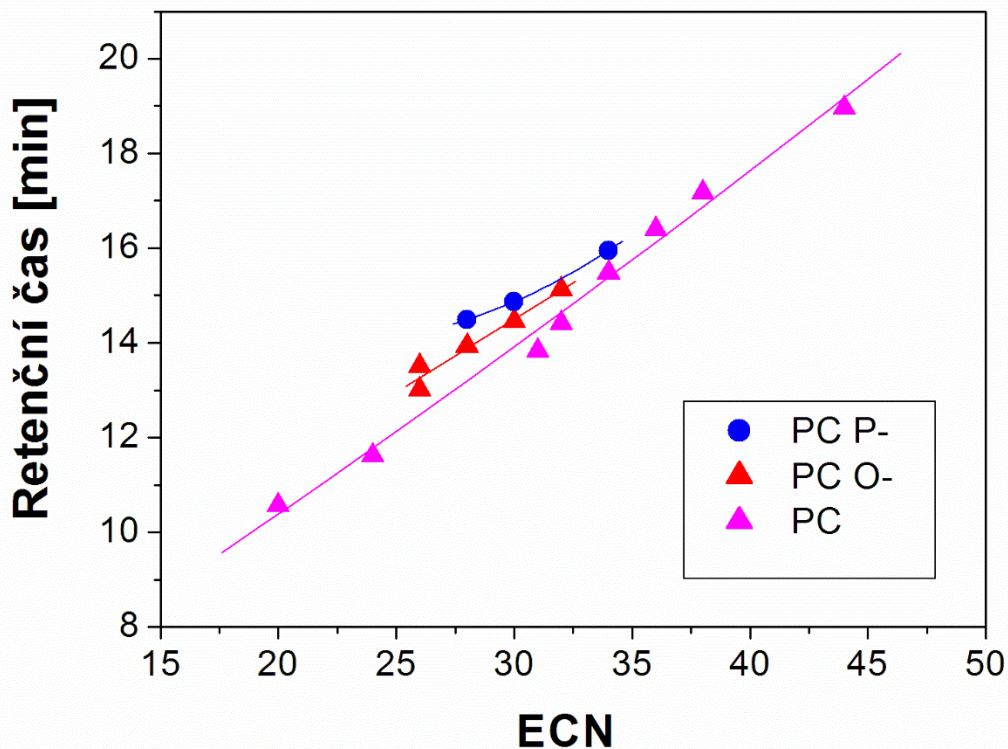
Obrázek 15: Graf znázorňující retenční chování v různých délkách acylového řetězce a chování dvojně vazby v pozicích cis-9 a trans-9

Další graf znázorňuje retenční závislost pro PC 18:1/18:1 s různými pozicemi dvojných vazeb v konformaci *cis* (Obr. 16). Z grafu je patrné, že čím blíže mají jednotlivé látky dvojnou vazbu, tím látky dosahují vyššího retenčního času. Například látka s pozicí dvojně vazby v poloze cis-6 dosahuje vyššího retenčního času než dvojná vazba v pozici cis-11. Bohužel komerčně nejsou dostupné stejná složení v pozici *trans*, ale pouze standard *trans*-9. Ten však potvrzuje předchozí tvrzení, jelikož *trans*-9 (Rt 14,86) má vyšší retenční čas než *cis*-9 (Rt 14,47), viz Obr. 18. Lze ale předpokládat, že i konformace *trans* by tvořila retenční závislost.



Obrázek 16: Graf znázorňující retenční chování pro PC 18:1/18:1 s rozdílnou pozicí dvojně vazby (Z) v konformaci cis

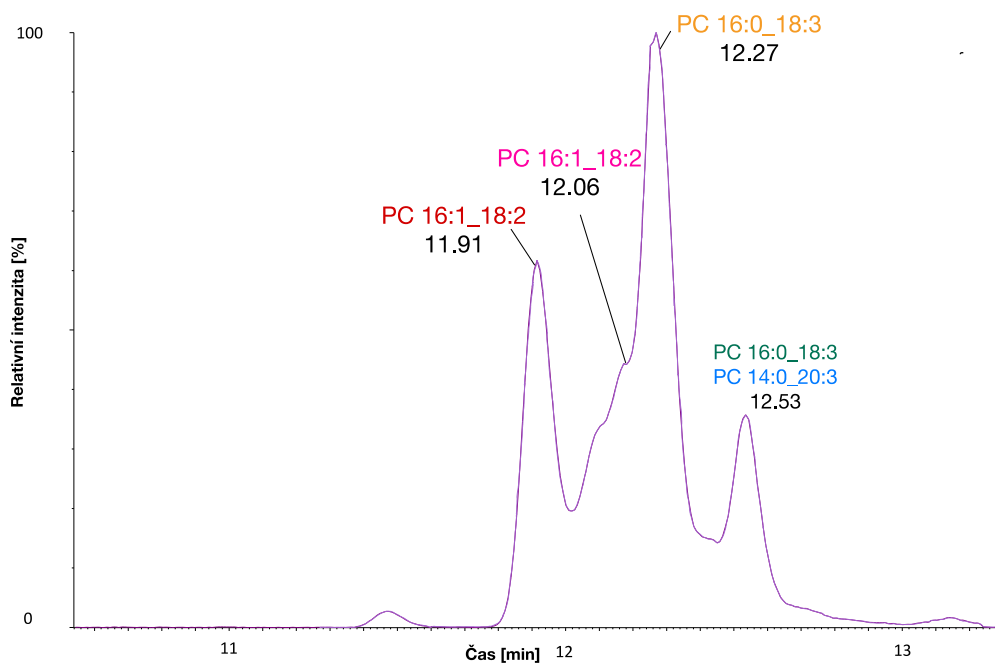
Poslední graf (Obr. 17), který byl vytvořen na základě změřených standardů se zabývá rozdílností retenčního chování fosfatidylcholinů s acylovou, etherovou a plasmalovou vazbou. V grafu jsou znázorněny závislosti retenčního času na ECN, které udává rozdíl počtu uhlíků v mastných řetězcích a dvojnásobku počtu dvojných vazeb. Díky tomuto číslu je možno porovnat retenční chování i látek s rozdílnými vazbami z jednoho grafu. V grafu můžeme pozorovat trend růstu retenčního času u jednotlivých podskupin, kdy u plasmalogenů je retenční čas vyšší než u etherů a nejnižší retenční časy pozorujeme u fosfatidylcholinů s acylovou vazbou. Jelikož všechny tři typy vazeb (PC, PC O-, PC P-) mohou být interpretovány jako lipid z jiné podtřídy, protože fragmentační spektra jsou podobná, retenční závislosti napomáhají k jejich správnému rozlišení. Bohužel z dostupných komerčních standardů nebylo možné sestavit trojici standardů se shodným m/z .



Obrázek 17: Graf sledující závislosti retenčního času na ECN jednotlivých standardů PC, PC O- a PC P-

4.2. Reálný vzorek lidské plazmy

Další měření proběhla na vzorcích lidské plazmy opět metodou MS a MS/MS, díky které byly zjištěny retenční časy a také složení mastných kyselin (viz. Příloha 2) u jednotlivých látek. Celkem bylo identifikováno 95 fosfatidylcholinů v lidské plazmě. Pro několik látek však bylo identifikováno více retenčních časů, což poukazuje na přítomnost velkého počtu izomerů. Například pro PC 34:3 bylo nalezeno pět látek s rozdílnými retenčními časy (Obr. 18). Konkrétně byly identifikovány 2 dvojice lipidů se stejným složením mastných kyselin a jeden fosfatidylcholin s rozdílným složením FA, avšak retenční časy látek se lišily (Tabulka 2). Ze znalosti získaných pomocí standardů lze usuzovat, že se jedná izomery, které se liší polohou případně geometrií dvojně vazby, avšak je možná i kombinace těchto možností. U látky s více dvojnými vazbami nelze bez standardu tvořící různé retenční závislosti s naprostou jistotou určit daný rozdíl.

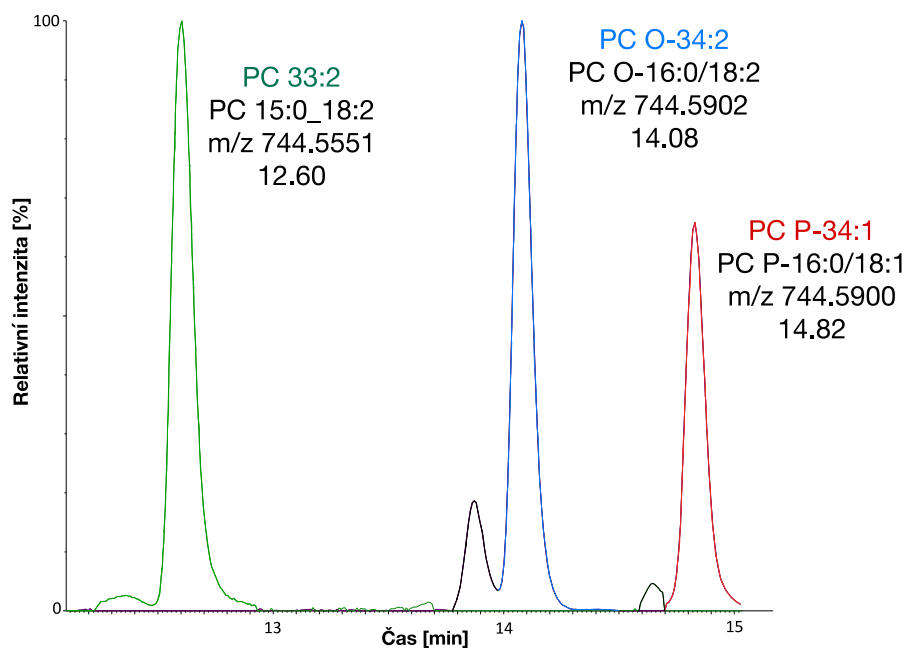


Obrázek 18: Extrahovaný iontový chromatogram pro PC 34:3

Tabulka 2: Tabulka znázorňující identifikované látky a jejich retenční časy

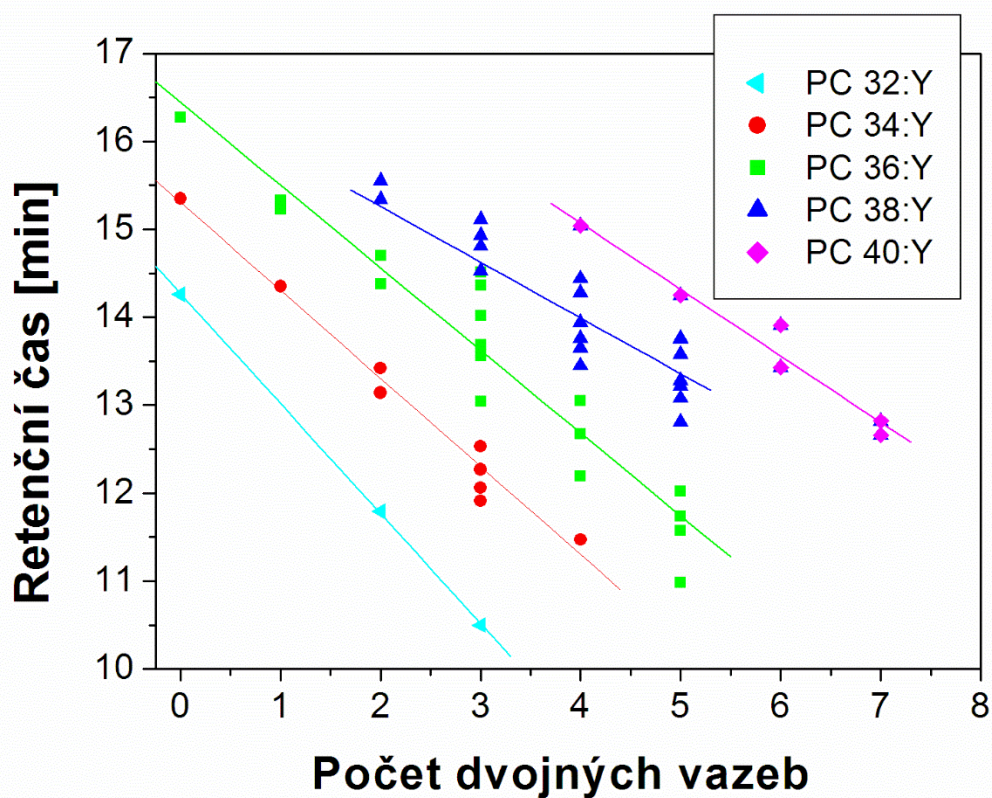
PC 34:3	PC 16:0_18:3	12,27
	PC 16:0_18:3	12,53
	PC 16:1_18:2	11,91
	PC 16:1_18:2	12,06
	PC 14:0_20:3	12,53

Látky s m/z 774 určenou pomocí MS (Obr. 19) lze interpretovat jako celou řadu izomerů a izobarů. Pomocí MS/MS ale bylo určeno, že první látka obsahuje mastné kyseliny 15:0 a 18:2, zatím co druhá látka pouze FA 18:2 a třetí látka FA 18:1. Na základě znalostí o retenčním chování PC-O a PC-P pomocí standardů, kdy plasmalogen eluuje později než ether, bylo určeno i složení následujících látek. U první látky se jedná o PC 15:0_18:2, druhé o PC O-16:0/18:2 a třetí o PC P-16:0/18:1.



Obrázek 19: Chromatogram znázorňující retenční chování látek se stejným hmotnostním poměrem

Následující graf zobrazuje závislost retenčního času identifikovaných PC na počtu dvojných vazeb při stejném počtu uhlíku (obr. 20). Retenční čas lineárně klesá s počtem dvojných vazeb a tento trend je pozorován u všech vzorků s počtem uhlíků 32–40. Například pro látku PC 32:0 je to hodnota Rt 14,26 min, zatímco látce PC 32:2 odpovídá retenční čas 11,79 min. Jelikož retenční závislosti mají definovaný průběh (rovnice regrese), lze chybějícím bodům (např. PC 32:1) predikovat retenční časy a při identifikaci se na tuto oblast více zaměřit. To stejné platí i pro ostatní vzorky v rámci jedné funkce. Opět lze pozorovat více látek u lipidů s 2 a více dvojnými vazbami, které se liší svými retenčními časy. Látky se opět liší svým složením mastných kyselin, případě konformací a lokalizací dvojných vazeb, ale vzhledem k počtu různých kombinací nelze strukturu více rozklíčovat. Další z trendů pozorovatelných z grafu je rostoucí počet dvojných vazeb s délkou acylového řetězce, což vychází z principu biosyntézy mastných kyselin. Se vzrůstající délkou acylového řetězce vzniká větší počet dvojných vazeb, například pro PC 40 je to až 7 dvojných vazeb.



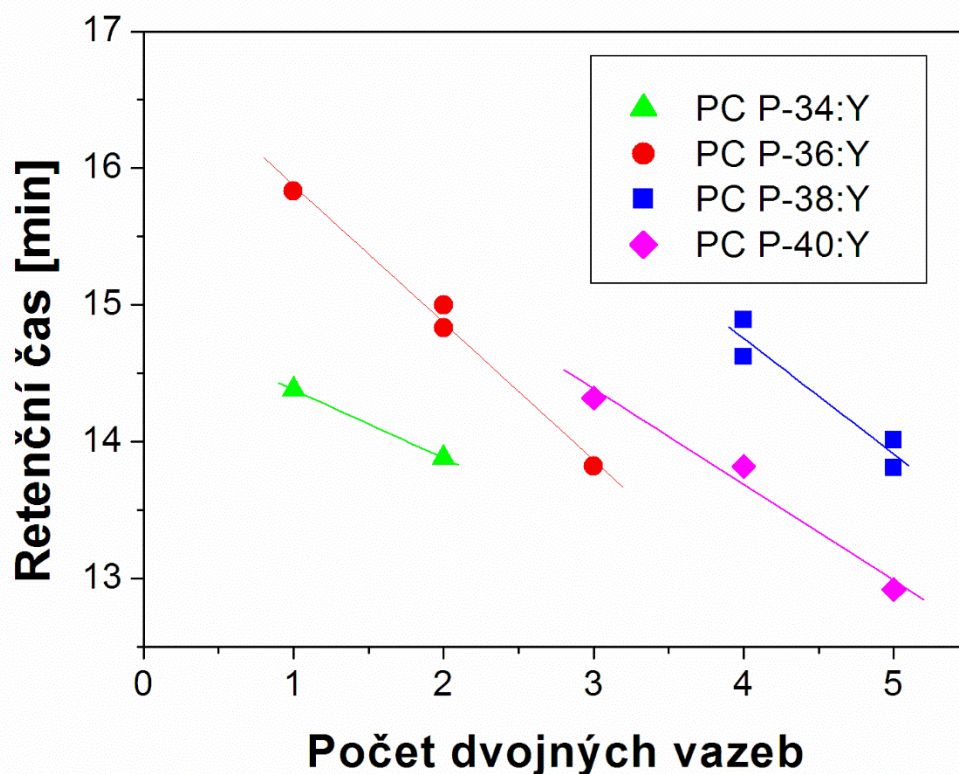
Obrázek 20: Graf znázorňující závislost retenčního času na počtu dvojných vazeb

V Tabulce 3 jsou uvedeny parametry přímků odpovídající rovnici: $y = ax + b$, včetně korelačních koeficientů R , vypočtené lineární regresí metodou nejmenších čtverců. Bylo ověřeno, že hodnota směrnice a této lineární závislosti roste s počtem dvojných vazeb. Naproti tomu hodnota úseku b s počtem vazeb klesá. V tomto druhém případě je však odhadnutá chyba číselně srovnatelná.

Tabulka 3: Tabulka lineárních regresí získaných ze závislosti v Obrázku 20

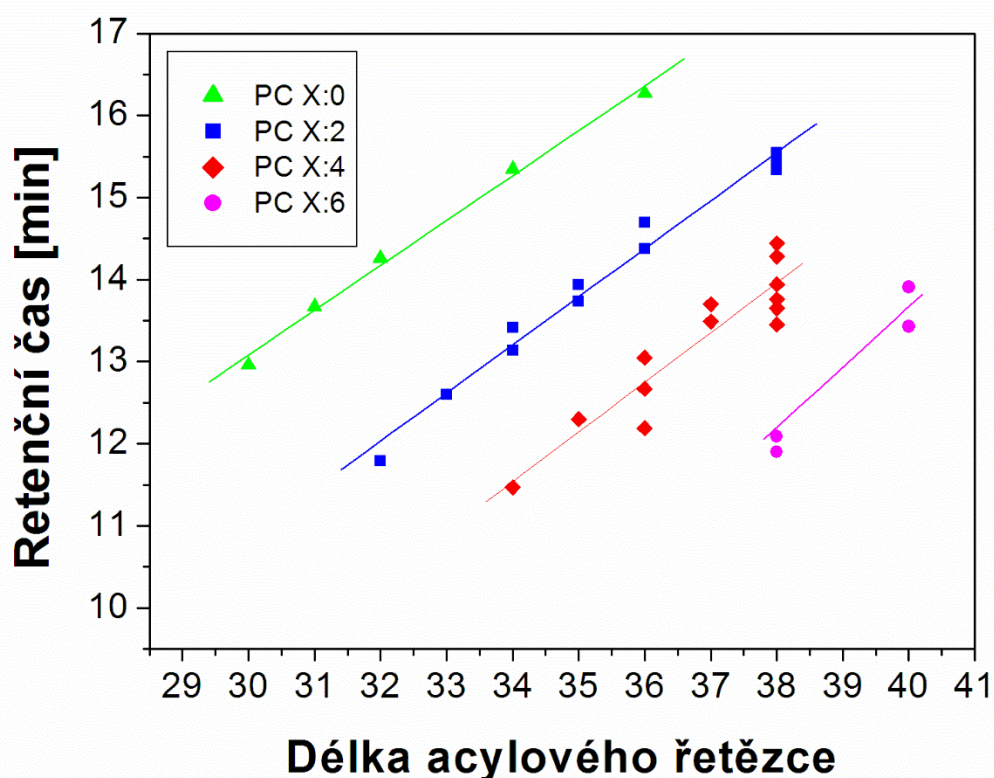
Vzorky	a	b	R
PC 32:Y	14,27	-1,25	0,9999
PC 34:Y	15,31	-1,01	0,9847
PC 36:Y	16,44	-0,94	0,9567
PC 38:Y	16,90	-0,72	0,9185
PC 40:Y	18,09	-0,76	0,9794

Stejný trend závislosti retenčního času na počtu dvojných vazeb byl pozorován taktéž pro PC P-, což je znázorněno na Obr. 21.



Obrázek 21: Graf znázorňující retenční chování fosfatidylcholinu plasmalogenu na počtu dvojných vazeb

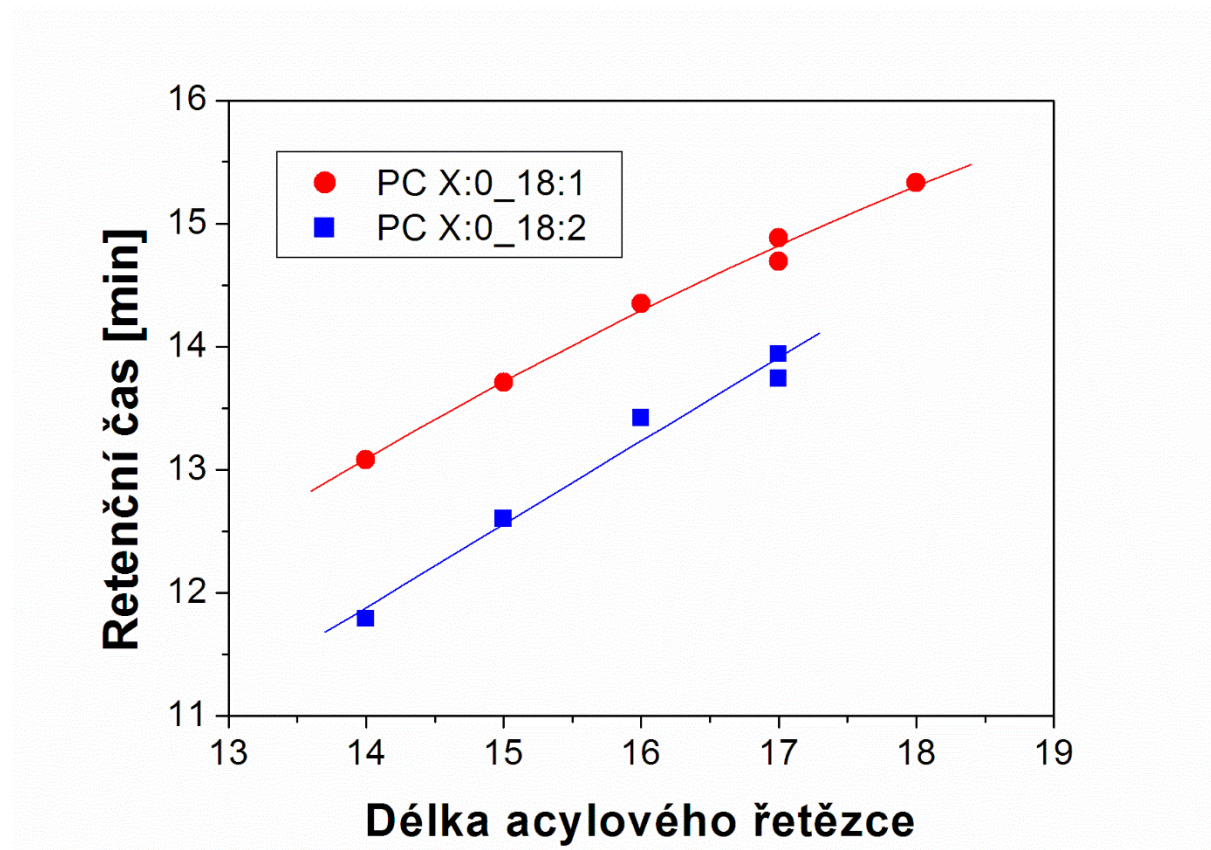
Další graf znázorňuje délku acylového řetězce v závislosti na retenčním čase (Obr. 22). Opět lze pozorovat lineární trend, kdy se zvyšující se délkou acylového řetězce roste i retenční čas. Čím je acylový řetězec delší, tím se i zvyšuje možnost většího počtu dvojných vazeb. Při vyšším počtu dvojných vazeb opět dochází k výskytu většího počtu izomerů, kde lze sledovat určité další retenční závislosti. Tyto závislosti opět mohou být využity k detailnějšímu popisu struktury. Praktické využití je uvedeno v závěru práce.



Obrázek 22: Graf znázorňující délku acylového řetězce jednotlivých vzorků v závislosti na retenčním čase

Příklad využití retenčních závislostí pro detailnější získání informací o struktuře je demonstrován na následujícím příkladu vybraného z Obr. 23. Konkrétně se jedná o fosfatidylcholin, které mají v některé *sn* pozici různou délku acylových řetězců bez dvojných vazeb. Z grafu je patrné, že s rostoucí délkou acylového řetězce roste i retenční čas (ECN pravidlo). Z toho vyplývá, že například PC 18:0/18:1 bude mít vyšší retenční čas než PC 16:0/18:1. Také je z grafu patrné, že existují dvě látky PC 17:0/18:1 a PC 17:0/18:2, které mají stejnou délku acylového řetězce, avšak jejich retenční časy se liší. Na první pohled také vybočují z retenční závislosti a jejich R_t jsou nižší (nejedná se tedy o regioizomery, ty by měly shodná R_t). V lidském organismu se většina dvojných vazeb vyskytuje v konformaci *cis*, pokud by se jednalo o konformaci *trans*, tak by dle předchozích závislostí zjištěných na standardech musel být R_t vyšší. Z tohoto důvodu tuto možnost vylučují a na základě znalostí o retenčním chování v závislosti na poloze dvojných vazeb usuzují, že se jedná o konformaci *cis* s vyšší pozicí dvojných vazeb. V lidském organismu se nejběžněji vyskytují FA 18:1 *cis*-9 a předpokládám, že se tedy jedná o konformaci *cis*-10 a vyšší. Při pohledu na rozdíly R_t (Obr. 13) mezi *cis*-9 a *cis*-10 (hodnota R_t dopočtena z rovnice regrese) je $\Delta 0,09$ min, zatímco mezi *cis*-9 a *cis*-11 je $\Delta 0,14$. Rozdíl mezi našimi neznámými lipidy je $\Delta 0,19$, což poukazuje na rozdíl 3 pozic, tedy na složení PC 17:0/18:1 *cis*-9 a PC 17:0/18:1 *cis*-12. Bez dodatečných experimentů (UVPD fragmentace nebo ozonololýza) nebo standardu o totožném složení nelze tuto informaci 100 % potvrdit. V druhém případě pro PC 17:0/18:2 je situace komplikovanější, jelikož zde může být mnoho kombinací spojených

s konformací či pozicí jedné nebo druhé dvojné vazby. Obecně se zvyšujícím se počtem dvojných vazeb se počet kombinací výrazně zvyšuje a znemožňuje přesné určení struktury. Obrázek 22 ovšem ukazuje velkou rozmanitost složení a naznačuje celou řadu retenčních závislostí. Pro jejich vysvětlení by však bylo třeba větší množství standardů.



Obrázek 23: Znávorňuje závislosti délky acylového řetězce na retenčním čase

5. ZÁVĚR

Cílem této práce byl popis retenčního a fragmentačního chování izomerních forem fosfatidylcholinů umožňující jejich spolehlivou identifikaci v lidské plazmě metodou RP-UHPLC/MS. Pomocí komerčně dostupných standardů byla prokázána a popsána chromatografická separace izomerních PC s rozdílnou vazbou mastného řetězce, pozicí a polohou dvojnásobné vazby. Zároveň bylo zjištěno, že regioizomery není možné chromatografií rozlišit, ale tandemová hmotnostní spektrometrie poskytuje různě intenzivní fragmenty umožňující jejich rozlišení. Kombinace separačních metod s hmotnostní spektrometrií tedy představují ideální nástroj pro rozlišení izomerních forem.

Následně byla provedena identifikace fosfatidylcholinů v lidské plazmě pomocí přesně určeného m/z s přesností na méně než 5 ppm a následného potvrzení pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie a retenčních závislostí vyplývajících z chromatografické separace. Celkem bylo identifikováno 95 fosfatidylcholinů s vysokou přesností. Na závěr byly uplatněny předešlé znalosti pro podrobný popis struktury neznámého PC, kdy bylo určeno přesné složení mastných kyselin a následně odhadnuta i konformace a pozice dvojnásobné vazby, což by bez kombinace získaných znalostí nebylo možné. Zároveň byla identifikována celá řada izomerů s více dvojnásobnými vazbami, kde bylo určeno složení mastných kyselin, ale prozatím není možné přesné určení pozice a konformace dvojnásobné vazby, jelikož se zde může jednat o různé kombinace. Pro jejich přesný popis bude nutné další zkoumání pomocí standardů, které však prozatím nejsou dostupné. Tato práce ukázala využití spojení chromatografické separace a hmotnostní spektrometrie pro rozlišení izomerních forem lipidů, což je nyní předním zájmem onkolipidimiky, která zkoumá změnu lipidového složení v závislosti na rakovinovém onemocnění.

6. POUŽITÁ LITERATURA

[1] WANG, Jianing, WANG Chunyan a HAN Xianlin. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, 1061) [cit. 2023-02-21].

Dostupné: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000326701930128X>

[2] ZÜLLIG, Thomas, TRÖTZMÜLLER Martin a KÖFELER C Harald. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, 412(10), 2191-2209 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-019-02241-y

[3] LIPID MAPS Classification updates. *Lipid Maps* [online]. 12. December 2022 [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/classification_updates

[4] HOLČAPEK, Michal, LIEBISCH Gerhard a EKROOS Kim. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, 90(7), 4249-4257 [cit. 2023-02-21]. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.7b05395

[5] TRIEBL, Alexandr, HARTLER Jürgen, MARTIN Trötz Müller a KÖFELER C. Harald. Lipidomics: Prospects from a technological perspective. *Europe PMC Funders Group: Author Manuscript* [online]. August 2017, 2018 August 01., 18 [cit. 2023-02-20].

Dostupné: <https://unipub.uni-graz.at/obvugrfodok/content/titleinfo/5834402/full.pdf>

[6] BROWN, Lowis a BEYNON John Herbet. Mass 36pektrometry. *Encyklopedia Britannica* [online]. 10 february 2023 [cit. 2023-02-21].

Dostupné: <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>

[7] HAN, Xianlin. Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. 2016, 12(11), 668-679 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1759-5029. DOI:10.1038/nrendo.2016.98

[8] Mass Spectrometry Ionization Methods. Emory College of Arts and Science: Mass Spectrometry Center [online]. Emory University, 201 Dowman Drive, Atlanta, Georgia 30322 USA [cit. 2023-02-21].

Dostupné: <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>

[9] CANSEY, Mehmet, WURTMAN Judith, SAKAMOTO Toshimasa a ULUS H. Ismail. Oral administration of circulating precursors for membrane phosphatides can promote the synthesis of new bran synapses. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* [online]. Leden 2008 [cit. 2023-02-20].

Dostupné: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-phosphatidylcholine_fig1_51406622

[10] TANG, Qi-Qun. Lipid metabolism and diseases. *Science Bulletin* [online]. 2016, 61(19), 1471-1472 [cit. 2023-02-21]. ISSN 20959273. DOI:10.1007/s11434-016-1174-z

[11] Lysosomal Storage Disease and Disorder: What are Lysosomal Storage Diseases and Disorders [online]. [cit. 2023-02-21].

Dostupné: <https://www.gaucherdisease.org/about-gaucher-disease/what-is/lysosomal-storage-disorders/>

[12] Niemann-Pick Disease. National Institute of Neurological Disorders and Stroke [online]. 9000 Rockville Pike, Bethesda, MDm 20892 [cit. 2023-02-21].

Dostupné: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/niemann-pick-disease>

- [13] Pompe Disease. National Institute of Neurological Disorders and Stroke [online]. 9000 Rockville Pike, Bethesda, MDm 20892 [cit. 2023-02-21].
Dostupné : <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/pompe-disease>
- [14] WOLRAB, Denise, JIRÁSKO Robert, CÍFKOVÁ Eva, et al. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. Nature Communications [online]. 2022, 13(1) [cit. 2023-02-20]. ISSN 2041-1723. DOI:10.1038/s41467-021-27765-9
- [15] BROWN, Lowis a BEYNON. John Herbet Mass 37pektrometry. Encyklopedia Britannica [online]. 10 february 2023 [cit. 2023-02-21].
Dostupné: <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>
- [16] Mass Spectrometry. PREMIER Biosoft: Accelerating Research in Life Sciences [online]. [cit. 2023-02-20].
Dostupné:http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html
- [17] FENN John B. Facts. The Nobel Prize [online]. [cit. 2023-02-21].
Dostupné: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/fenn/facts/>
- [18] MASON, Philip E., UHLIG Frank, VANĚK Václav, BUTTERSACK Tillmann, BAUERRECKER Sigurd a JUNGWIRTH Pavel. Coulomb explosion during the early stages of the reaction of alkali metals with water. Nature Chemistry [online]. 2015, 7(3), 250-254 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1755-4330. DOI:10.1038/nchem.2161
- [19] Mass Spectrometry Ionization Methods. Emory College of Arts and Science: Mass Spectrometry Center [online]. Emory University, 201 Dowman Drive, Atlanta, Georgia 30322 USA [cit. 2023-02-21].
Dostupné: <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>
- [20] HANRIEDER, Jörn. Cerebrum Illumininas: Mass Spectrometric Analysis of Protein and Peptide Dynamics in Neurological Diseases. UPPSALA UNIVERSITET, 2010. Dissertation. UPPSALA UNIVERSITET.
Dostupné: <http://uu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A359600&dswid=7544>
- [21] What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? . SHIMADZU: Excellence in Science [online]. [cit. 2023-02-20].
Dostupné:https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
- [22] BETANCOURT, Jennifer a GOTTLIEB Sean. Liquid Chromatography. Libretexts: Chemistry [online]. 16 August 2020 [cit. 2023-02-21].
Dostupné:[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)
- [23] Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism [online]. 2020-03-06 [cit. 2023-02-20]. DOI:10.3384/diss.diva-163614
- [24] ZÜLLIG, Thomas a KÖFELER C. Harald. HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY IN LIPIDOMICS. Mass Spectrometry Reviews [online]. 2021, 40(3), 162-176 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0277-7037. DOI:10.1002/mas.21627
- [25] IVERSON, Sara J., LANG Shelley L. C. a COOPER H Margaret .. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue.

Lipids [online]. 2001, 36(11), 1283-1287 [cit. 2023-02-21]. ISSN 0024-4201. DOI:10.1007/s11745-001-0843-0

[26] ULMER, Candice Z., JONES, Christina M. YOST Richard A., GARRETT Timothy J. a BOWDEN John A.. Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, 1037, 351-357 [cit. 2023-02-21]. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2018.08.004

[27] VAŇKOVÁ, Zuzana, PETERKA, Ondřej, CHOCHOLOUŠKOVÁ, Michaela, WOLRAB, Denise, JIRÁSKO, Robert a HOLČAPEK, Michal. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2022, 414(1), 319-331 [cit. 2023-03-05]. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-021-03492-4

7. PŘÍLOHY

Tabulka S1: Tabulka standartových mixů použitých při měření

STD MIX 1						
Druh lipidu	Celková koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	V (μl)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ IS-Mix	$\mu\text{g}/\text{ml}$ plazma	nmol/ml plazma	MW
PC 16:0/18:1	2	9,49	18,98	15,184	20,0	759,57
PC 18:1/18:1, $\Delta 6$ -Cis	2	9,81	19,62	15,696	20,0	785,59
PC O-16:0/18:1	2	9,31	18,62	14,896	20,0	745,59
PC O-16:0/20:3	5	3,84	19,2	15,36	20,0	769,59
PC O-16:0/20:4	5	3,84	19,2	15,36	20,0	767,58
PC O-16:0/20:5	5	3,83	19,15	15,32	20,0	765,56
PC O-16:0/22:6	5	3,95	19,75	15,8	20,0	791,58
PC P-18:0/22:6	1	20,43	20,43	16,344	20,0	817,59
PC P-18:0/20:4	1	19,83	19,83	15,864	20,0	793,59
PC P-18:0/18:1	1	19,29	19,29	15,432	20,0	771,61
PC 16:0/16:0	2	9,16	18,32	14,656	20,0	733,56
PC 18:0/18:0	2	9,87	19,74	15,792	20,0	789,62
PC 17:0/17:0	2	9,51	19,02	15,216	20,0	761,59
PC 22:0/22:0	2	11,27	22,54	18,032	20,0	901,75
PC 20:4/20:4	10	2,07	20,7	16,56	20,0	829,56
PC 22:6/22:6	10	2,19	21,9	17,52	20,0	877,56
	Celkem	1000				
	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	852				
STD MIX 2						
Druh lipidu	Celková koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	V (μl)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ IS-Mix	$\mu\text{g}/\text{ml}$ plazma	nmol/ml plazma	MW
PC 18:1/16:0	2	9,49	18,98	15,184	20,0	759,57
PC 15:0/18:1	1	18,63	18,63	14,904	20,0	745,56
PC 18:1/18:1, $\Delta 9$ -Cis	2	9,81	19,62	15,696	20,0	785,59
PC 16:1/16:1, $\Delta 9$ -Cis	2	9,11	18,22	14,576	20,0	729,53
PC 14:1/14:1, $\Delta 9$ -Cis	2	8,41	16,82	13,456	20,0	673,46
PC 16:0/18:0	2	9,51	19,02	15,216	20,0	761,59
PC 19:0/19:0	2	10,22	20,44	16,352	20,0	817,65
	Celkem	1000				
	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	925				

STD MIX 3						
Druh lipidu	Celková koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	V (μl)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ IS-Mix	$\mu\text{g}/\text{ml}$ plazma	nmol/ml plazma	MW
PC 18:1/18:1, Δ 9-Trans	2	9,81	19,62	15,696	20,0	785,59
PC 16:1/16:1, Δ 9-Trans	2	9,11	18,22	14,576	20,0	729,53
PC 14:1/14:1, Δ 9-Trans	2	8,41	16,82	13,456	20,0	673,46
PC 18:0/16:0	2	9,51	19,02	15,216	20,0	761,59
	Celkem	1000				
	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	963				
STD MIX 4						
Druh lipidu	Celková koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	V (μl)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ IS-Mix	$\mu\text{g}/\text{ml}$ plazma	nmol/ml plazma	MW
PC 18:1/18:1, Δ 8-Cis	10	1,96	19,6	15,68	20,0	785,59
	Celkem	1000				
	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	998				
STD MIX 5						
Druh lipidu	Celková koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	V (μl)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ IS-Mix	$\mu\text{g}/\text{ml}$ plazma	nmol/ml plazma	MW
PC 18:1/18:1, Δ 11-Cis	10	1,96	19,6	15,68	20,0	785,59
	Celkem	1000				
	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	998				

Tabulka S2: Tabulka identifikovaných lipidů ve vzorku plasmy s retenčními časy

Druh lipidu	Mastné kyseliny	RT
PC 30:0	PC 14:0_16:0	12,96
PC 31:0		13,67
PC 32:0	PC 16:0_16:0	14,26
PC 32:1	PC 16:1_16:0	13,08
	PC 14:0_18:1	13,08
PC 32:2	PC 14:0_18:2	11,79
PC 32:3		10,50
PC 33:1	PC 15:0_18:1	13,71
PC 33:2	PC 15:0_18:2	12,60
PC 34:0	PC 16:0_18:0	15,35
PC 34:1	PC 16:0_18:1	14,35
PC 34:2	PC 16:1_18:1	13,14
	PC 16:0_18:2	13,42
PC 34:3	PC 16:0_18:3	12,27
	PC 16:0_18:3	12,53
	PC 16:1_18:2	11,91
	PC 16:1_18:2	12,06
	PC 14:0_20:3	12,53
PC 34:4	PC 14:0_20:4	11,47
PC 35:1	PC 17:0_18:1	14,69
	PC 17:0_18:1	14,88
PC 35:2	PC 17:0_18:2	13,74
	PC 17:0_18:2	13,94
PC 35:3		12,68
	PC 15:0_20:3	12,94
PC 35:4	PC 15:0_20:4	12,30
PC 36:0	PC 18:0_18:0	16,27
PC 36:1	PC 18:0_18:1	15,33
	PC 16:0_20:1	15,23
PC 36:2	PC 16:0_20:2	14,38
	PC 18:1_18:1	14,38
	PC 18:0_18:2	14,70
PC 36:3	PC 18:1_18:2	13,43
	PC 18:1_18:2	13,57
	PC 16:0_20:3	13,04
	PC 16:0_20:3	13,56
	PC 16:0_20:3	13,69

	PC 16:0_20:3	14,02
PC 36:4	PC 18:2_18:2	12,19
	PC 16:0_20:4	12,67
	PC 16:0_20:4	13,05
PC 36:5	PC 18:3_18:2	10,98
	PC 16:1_20:4	11,57
	PC 16:1_20:4	11,74
	PC 16:0_20:5	12,02
PC 37:3	PC 17:0_20:3	14,21
PC 37:4	PC 17:0_20:4	13,49
	PC 17:0_20:4	13,70
PC 38:2	PC 18:1_20:1	15,34
	PC 18:0_20:2	15,44
	PC 18:2_20:0	15,55
PC 38:3	PC 18:2_20:1	14,53
	PC 18:0_20:3	14,81
	PC 18:0_20:3	14,93
	PC 18:0_20:3	15,11
PC 38:4	PC 18:2_20:2	13,45
	PC 18:1_20:3	13,76
	PC 18:1_20:3	13,65
	PC 16:0_22:4	13,94
	PC 18:0_20:4	14,28
	PC 18:0_20:4	14,44
PC 38:5	PC 18:2_20:3	12,81
	PC 16:0_22:5	13,28
	PC 18:1_20:4	13,08
	PC 18:1_20:4	13,22
	PC 18:1_20:4	13,75
	PC 18:0_20:5	13,58
	PC 16:0_22:5	13,76
PC 38:6	PC 18:2_20:4	11,90
	PC 18:1_20:5	12,09
	PC 16:0_22:6	12,60
PC 39:4	PC 20:4_19:0	14,86
PC 40:4	PC 18:0_22:4	15,04
PC 40:5	PC 18:0_22:5	14,25
PC 40:6	PC 16:0_24:6	13,43
	PC 18:0_22:6	13,91
PC 40:7	PC 18:1_22:6	12,66
	PC 18:1_22:6	12,82
PC 40:8	PC 18:2_22:6	11,49

PC O-32:0	PC O-16:0/16:0	14,98
PC O-34:2	PC O-16:0/18:2	14,08
PC P-32:0	PC P-16:0/16:0	14,81
PC P-34:1	PC P-16:0/18:1	14,82
PC P-34:2	PC P-16:0/18:2	13,88
PC P-36:1	PC P-18:0/18:1	15,83
PC P-36:2	PC P-18:1/18:1	14,83
	PC P-18:0/18:2	15,00
PC P-36:3	PC P-18:1/18:2	13,82
PC P-36:4	PC P-18:0/20:4	13,58
PC P-38:3	PC P-18:0/20:3	14,32
PC P-38:4	PC P-18:0/20:4	13,82
PC P-38:5	PC P-18:0/20:5	12,92
PC P-40:4	PC P-18:0/22:4	14,62
	PC P-20:0/20:4	14,89
PC P-40:5	PC P-18:0/22:5	13,81
	PC P-20:0/20:5	14,01