

4. Česká lipidomická konference

25.-26. června 2014, ÚOCHB AV ČR, Praha

Sborník příspěvků



Lipidomická sekce
České společnosti pro biochemii a molekulární biologii

Sponzoři

AMEDIS

AB SCIEX

LECO®

pragolab

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ČESKÁ SPOLEČNOST PRO BIOCHEMIÍ
A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII 

 **ÚOCHB AV ČR, v.v.i.**

Program

Středa, 25. 6. 2014	
12:30 - 13:00	<i>příjezd účastníků, registrace</i>
13:00 - 13:05	zahájení (Josef Cvačka)
SEKCE I. <i>předsedající – Irena Valterová</i>	
13:05 - 13:50 ZVANÁ PŘEDNÁŠKA	Ω-3 mastné kyseliny z mořských ryb v prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Jan Kopecký)
13:50 - 14:15	Effect of different dietary docosahexaenoic acid/eicosapentaenoic acid ratio on plasma lipids level in rats (Tomáš Komprda)
14:15 - 14:40	Nitrované mastné kyseliny: endogenní regulátory kardiovaskulárních a imunitních funkcí (Michaela Pekarová)
14:40 - 15:10	Waters 2014 (Miroslav Procházka, <i>Waters</i>)
15:10 - 15:40	<i>přestávka na kávu + posterová sekce</i>
SEKCE II. <i>předsedající – Michal Holčapek</i>	
15:40 - 16:05	Strukturní variabilita lipidů produkovaných lidskou kůží (Josef Cvačka)
16:05 - 16:35	Lipidy viděny vysokorozlišovací optikou (Jaroslav Pól, <i>Thermo</i>)
16:35 - 17:00	Lipidomická analýza pomocí superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Miroslav Lísa)
17:00 - 17:30	Nabídky přístrojů pro analýzu a předúpravu vzorků (Magdaléna Voldřichová, <i>Pragolab</i>)
od 18:00	<i>večerní rout – Pizzeria la fontanella</i>
Čtvrtek, 26. 6. 2014	
SEKCE III. <i>předsedající – Josef Cvačka</i>	
8:30 - 9:15 ZVANÁ PŘEDNÁŠKA	Mechanismy biosyntézy a produkce triacylglycerolů olejotvornými mikroorganismy (Tomáš Řezanka)
9:15 - 10:00	Komplexní lipidomická analýza s využitím hmotnostní spektrometrie ve spojení se separačními technikami (Michal Holčapek)
10:00 - 10:30	Separace tříd lipidů pomocí diferenční mobility iontů v shot-gun lipidomice (Tomáš Korba + František Laštovička, <i>Amedis + AB Sciex</i>)
10:30 - 11:15	<i>přestávka na kávu + posterová sekce</i>
SEKCE IV. <i>předsedající – Miroslav Lísa</i>	
11:15 - 11:40	Charakterizace desaturas mastných kyselin z kvasinky <i>Candida parapsilosis</i> , produkujících vícenenasycené a hydroxylované mastné kyseliny (Aleš Buček)
11:40 - 12:05	Inovativní postupy pro podrobnou analýzu směsí uhlovodíků s dlouhými alifatickými řetězci (Vladimír Vrkoslav)
12:05 - 12:35	GC×GC TOFMS: užitečný nástroj pro identifikaci a charakterizaci složitých směsí. (Anna Jirošová + Pavel Jiroš, <i>LECO</i>)
12:35 - 12:50	<i>volby výboru LS ČSBMB, zakončení</i>
od 13:15	<i>oběd – Pizzeria la fontanella</i>

Omega-3 mastné kyseliny z mořských ryb v prevenci kardiovaskulárních onemocnění

MUDr. Jan Kopecký DrSc.

Oddělení biologie tukové tkáně, Fyziologický ústav AVČR, Praha

Ω -3 mastné kyseliny z mořských ryb (ω -3) jsou přírodní látky se silnými biologickými účinky. Většina populačních studií (1, 2) a také intervenční pokusy na laboratorních zvířatech prokazují tlumivé působení ω -3 na zánět a hyperlipidémii, ochranný vliv na glukózovou homeostázu a citlivost k inzulínu u lidí i u zvířat a preventivní působení při vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Vlivem ω -3 se podařilo opakovaně prokázat reversi resistance k inzulínu u laboratorních zvířat. Zlepšení glukózové homeostázy vlivem ω -3 suplementace bylo popsáno u prediabetiků (3, 4). Naproti tomu naprostá většina randomizovaných klinických studií (RCT) na pacientech s diabetem mellitus 2 typu vliv ω -3 na citlivost k inzulínu neprokázala (5), i přes to, že hypolipidemický vliv ω -3 se jasně projevil. Ani velké RCT z poslední doby, zaměřené na vliv ω -3 na riziko opakování kardiovaskulárních onemocnění [např. *ORIGIN trial* (6); a *JELIS trial* (7); viz níže] nevyovídají o tom, zda intervence s ω -3 může snížit riziko vzniku diabetu u prediabetiků. Na rozdíl od řady RCT v minulosti [např. *GISSI trial* (8)], se ve většině recentních RCT vliv ω -3 na sekundární prevenci kardiovaskulárního onemocnění nepodařilo prokázat (*ORIGIN vs. JELIS trial*). Rozdílné výsledky starších a novějších studií mohou odrážet vliv mnoha faktorů, např. zlepšenou farmakoterapii zaměřenou na minimalizaci kardiovaskulárních rizik (9) či delší prodlevu po prvním kardiovaskulárním onemocnění (infarktu myokardu) před zahájení intervence s ω -3. Je pravděpodobné, že ω -3 mohou za určitých podmínek snížit riziko opakování kardiovaskulárního onemocnění, zejména pokud je suplementace zahájena do dvou týdnů po předchozím infarktu myokardu (10).

Účinek ω -3 závisí na jejich bioavailabilitě, tj. podílu ω -3, které se dostávají z potravy do organismu. V bioavailabilitě jsou interindividuální rozdíly a tento proces je ovlivněn řadou faktorů (11). Např. tuky v potravě bioavailabilitu značně zvyšují indukcí pankreatických lipáz. Důležitá je i forma, v jaké jsou ω -3 podávány (vyšší bioavailabilita ω -3 při jejich podání ve formě fofolipidů než ve formě triglyceridů či ethyl esterů). Optimálním markerem bioavaliability je ω -3 index, t.j. poměr mezi obsahem ω -3 a celkovým obsahem mastných kyselin při jejich stanovení buď v membránách krevních erytrocytů, nebo v celkových fosfolipidech v plazmě. Stanovení ω -3 indexu je významné pro interpretaci výsledků studií na zdravých i nemocných lidech (11-13). Zejména prospektivní studie, ve kterých byl ω -3 index použit jako biomarker, přinesly jasné důkazy o významu zvýšení příjmu ω -3 pro prevenci kardiovaskulárních chorob.

Podpořeno grantem IGA MZ (NT13763-4)

Reference:

1. Dyerberg J 1986 *Nutr Rev* 44:125-134;
2. Bjerregaard P et al 2000 *Eur J Clin Nutrition* 54:732-737;
3. Ramel A et al 2008 *Diabetologia* 51:1261-1268;
4. Dangardt F et al 2012 *J Nutr Metab* 2012:395757;
5. Mostad IL et al 2006 *Am J Clin Nutr* 84:540-550;
6. Bosch J et al 2012 *N Engl J Med* 367:309-318;
7. Oikawa S et al 2009 *Atherosclerosis* 206:535-539;
8. Marchioli R 1999 *Lancet* 354:447-455;
9. de Lorgeril ME et al 2013 *BMC Med* 11:5;
10. Poole CD et al 2013 *Clin Ther* 35:40-51;
11. Schuchardt JP and Hahn A 2013 *PLEFA* 89:1-8;
12. Harris WS 2008 *Am J Clin Nutr* 87:1997S-2002S;
13. Mozaffarian DE et al 2013 *Ann Intern Med* 158:515-525

Effect of different dietary docosahexaenoic acid/eicosapentaenoic acid ratio on plasma lipids level in rats

Tomáš Komprda, Ondrej Škultéty, Soňa Křížková, Gabriela Zorníková, Veronika Rozíková, Richard Krobot
Mendelova univerzita v Brně
komprda@mendelu.cz

The hypothesis that oils with different ratio of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) affect plasma lipids level in rats in a different degree was tested using the diets with 6 % of fish oil (FO) and *Schizochytrium* microalga oil (SchO); the diet with 6 % of safflower oil (SaO; high content of *n*-6 PUFA linoleic acid) was used as a control. EPA+DHA content in the SaO, FO and SchO diet was 1.6, 21.8 and 32.1 % of the sum of total fatty acids; the DHA/EPA ratio was 1.3, 1.3 and 11.3, respectively. The difference between FO and SchO was established only in the case of plasma triacylglycerol (TAG) level: plasma TAG of the FO rats did not differ from the control rats ($P > 0.05$), while SchO decreased ($P < 0.05$) plasma TAG to 46 % of the control. On the other hand, FO and SchO decreased ($P < 0.05$) total plasma cholesterol (TC) in rats in the same extent, to 73 % of the control. Regarding the underlying mechanisms for the TC decrease, both SchO and FO up-regulated hepatic Insig-1 gene (181 and 133 % of the control; $P < 0.05$), which tended ($P = 0.15$ and $P = 0.19$, respectively) to decrease the amount of hepatic nSREBP-2 protein (61 and 66 % of the control). However, neither SchO nor FO influenced hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase gene expression ($P > 0.05$); SchO (but not FO) increased ($P < 0.05$) hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA. It was concluded that the decrease of total plasma cholesterol might be caused by an increased cholesterol uptake from plasma into the cells (in the case of SchO), but also by other (in the present study not tested) mechanisms.

Nitrované mastné kyseliny: endogenní regulátory kardiovaskulárních a imunitních funkcí

Pekarová M.¹, Ambrožová G.², Martišková H.^{1,2}, Klinke A.³, Ravekes T.³, Lojek A.¹, Kubala L.¹, Rudolph T.³

¹ *Biofyzikální ústav, Akademe věd České republiky v.v.i., Brno, ČR*

² *Oddělení exp. biologie a imunologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR*

³ *Oddělení Kardiologie, Uniklinik-Köln, Kolín nad Rýnem, Německo*

pekarovam@ibp.cz

Srdeční selhání, jako časté a závažné onemocnění, je stále jednou z největších ekonomických zátěží ve zdravotnictví. Příčinou tohoto patofyziologického stavu je narušení komplexních fyziologických procesů v organismu a také funkcí různých typů buněk (jako jsou kardiomyocyty, buňky hladké svaloviny, vaskulární endoteliální buňky). Jelikož klíčovým terapeutickým cílem moderní kardiologie je minimalizace poškození srdeční tkáně, je nezbytné pochopit a objasnit molekulární mechanismy a biologické principy uplatňující se v nově zaváděných terapiích. Cílem této práce je objasnit roli nitrovaných mastných kyselin (nitro-MK), jenž jsou endogenně produkovány v různých tkáních a buněčných membránách, jako látek, které by se mohli podílet na léčbě a prevenci srdečního selhání. V posledních několika letech vícero studií potvrdilo protizánětlivé účinky nitro-MK v různých *in vivo* a *in vitro* modelech, včetně modulace aktivace makrofágů, prevence aktivace leukocytů, krevních destiček a rozvoje aterosklerózy. Naše výsledky ukázaly, že nitro-MK mají kardioprotektivní a protizánětlivé účinky v rámci zánětlivých procesů spojených s rozvojem kardiovaskulárních onemocněních. Tyto účinky jsou zprostředkované především redukcí produkce reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku, chemotaktických látek a také ovlivněním aktivace intracelulárních signálních drah, které jsou spojeny s rozvojem kardiovaskulární a také imunitní dysfunkce.

Strukturní variabilita lipidů produkovaných lidskou kůží

Josef Cvačka¹, Vladimír Vrkoslav¹, Eva Háková^{1,2}, Lenka Šubčíková², Michal Hoskovec¹,
Radka Míková^{1,2}

¹ Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha

² Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha
cvacka@uochb.cas.cz

Kůže je největším orgánem lidského těla. Je složena z vrstev několika druhů buněk a tvoří bariéru mezi vnitřními orgány těla a vnějším prostředím. Má řadu funkcí, přičemž jednou z nejdůležitějších je funkce ochranná. Při oslabení kožní bariéry dochází ke vzniku závažných onemocnění, například atopického ekzému nebo lupénky. Ve fyziologii a patologii kůže hrají zásadní roli lipidy. Ty vznikají ve vrstvě pokožky zvané *stratum granulosum* a v mazových žlázách. Kůže vytváří bohatou směs lipidů již během prenatálního vývoje. Lidský plod je od počátku posledního trimestru těhotenství pokrytý vrstvou novorozeneckého mázku (*vernix caseosa*), který jej chrání před macerací v plodové vodě. Novorozenecký mázek je tvořený vodou (80 %), proteiny (10 %) a lipidy (10 %). Vyskytuje se pouze u člověka a je zajímavý svými unikátními hojivými a antibakteriálními účinky s možným využitím v medicíně. Náš výzkum se zaměřuje na detailní charakterizování komplexní směsi lipidů novorozeneckého mázku.

Lipidy novorozeneckého mázku byly získány extrakcí organickými rozpouštědly a rozděleny pomocí sloupcové chromatografie na několik desítek frakcí. Jednotlivé frakce byly dále separovány pomocí HPLC a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Podrobně jsme se věnovali třídě diesterů 1,2-diolů (1,2-DDE), která se vyskytuje v mázku, ale není produkována kůží dospělých. 1,2-DDE byly separovány na koloně Nova-Pak C18 s gradientovou elucí v systému acetonitril/ethylacetát. Molekulové druhy 1,2-DDE opouštěly kolonu v závislosti na celkovém počtu uhlíkových atomů a dvojných vazeb v řetězcích, tj. podle pořadí jejich hodnoty ECN. Amonné adukty byly podrobeny vícenásobné kolizně indukované fragmentaci (MS^2 , MS^3) s využitím datově-závislých skenů. Tímto způsobem jsme identifikovali více než dva tisíce 1,2-DDE. Nejhojněji zastoupenými byly mononenasyčené estery kombinující diol C22:0 a mastnou kyselinu C18: 1 spolu s mastnými kyselinami C16:0, C14:0 nebo C15:0.

Tato práce vznikla za podpory GAČR P206/12/0750 a projektu RVO 61388963.

Lipidomická analýza pomocí superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Miroslav Lísa a Michal Holčapek

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie, Pardubice
miroslav.lisa@upce.cz

Přírodní vzorky lipidů představují velice komplexní směsi s velkou strukturální odlišností jednotlivých látek, což klade vysoké nároky na analytické techniky používané pro jejich charakterizaci. V současné době jsou pro lipidomickou analýzu používány především dva základní přístupy. Shotgun analýza využívá analýzy vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie a speciálních skenů bez předchozí separace lipidů. Výhodou je relativně rychlá analýza vzorku, avšak může docházet k potlačování ionizace látek navzájem díky přítomnosti všech látek najednou v iontovém zdroji a neumožňuje identifikaci většiny izomerů. Další přístup využívá separace a identifikace lipidů pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (MS). Tento přístup poskytuje detailnější informace o složení lipidů včetně identifikace izomerů, ale často je potřeba kombinovat několik chromatografických metod kvůli složitosti vzorku, což je časově náročné.

Cílem této práce bylo vyvinout rychlou analytickou metodu pro komplexní lipidomickou analýzu pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC) s MS identifikací. Byly optimalizovány parametry SFC separace s cílem rozlišit maximální množství tříd lipidů. Finální SFC/MS analýza umožňuje separaci 16 tříd polárních a nepolárních lipidů v rámci 6 min. Zároveň bylo dosaženo částečné separace jednotlivých lipidů v rámci tříd na základě různého počtu dvojných vazeb a délky acylů. Třídy lipidů a složení esterifikovaných acylů byly identifikovány na základě naměřených tandemových hmotnostních spekter pomocí ESI ionizace v pozitivním i negativním záznamu iontů. Pro separaci lipidů koeluuujících v SFC byla využita iontová mobilita jako další separační dimenze, která umožňuje separaci lipidů podle délky acylu a počtu dvojných vazeb. Finální SFC/MS metoda byla použita pro charakterizaci složení lipidů v biologických tkáních.

Tato práce byla podporovaná projektem ERC CZ č. LL1302 MŠMT.

Mechanismy biosyntézy a produkce triacylglycerolů olejotvornými mikroorganismy

Tomáš Řezanka

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha
rezanka@biomed.cas.cz

Řasy, sinice i bakterie produkují "single cell oils" (SCO), které obsahují jako hlavní složku triacylglyceroly (TAG), jež jsou důležitým zdrojem polyenových mastných kyselin a dalších neobvyklých mastných kyselin důležitých pro výživu lidí i zvířat, ale uplatňují se i jako zdroje biopaliv 3. generace. Cílem předkládané teze bylo vůbec poprvé analyzovat SCO, pokud jde o obsah a spektrum intaktních TAG. Ty se liší délkou acylů, počtem a polohou dvojných vazeb, stereochemickou pozicí a *cis/trans* izomerií. Výsledkem je obrovský počet izomerů s podstatně odlišnými vlastnostmi a výživovou hodnotou, ale i hodnotami důležitými pro biopaliva, jako jsou bod zákalu a tuhnutí. Separace TAG pomocí HPLC byla optimalizována použitím několika kolon v sérii k dosažení co nejvyšší selektivity separace. Analýza zahrnuje LC-MS-APCI (hmotnostní spektrometrie-chemická ionizace při atmosférickém tlaku) a LC-MS/ESI (ionizace elektrospřejem) s kladnou nebo zápornou ionizací. Mikrobiální oleje SCO z širokého spektra přírodních vzorků, zahrnují především (a) SCO důležité pro výživu, a (b) SCO obsahující neobvyklé mastné kyseliny, připravené pomocí prekurzorem řízené biosyntézy, s lichým počtem uhlíků, mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, neobvyklými polohami dvojných vazeb a/nebo větvenými alkylovými řetězci, použitelné jako biopaliva.

Charakterizace desaturas mastných kyselin z kvasinky *Candida parapsilosis* produkujících vícenenasycené a hydroxylované mastné kyseliny

A. Buček¹, P. Matoušková¹, H. Sychrová², I. Pichová¹, O. Hrušková-Heidingsfeldová¹

¹ Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha

² Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

bucek@uochb.cas.cz

Nenasycené mastné kyseliny hrají klíčovou roli v řadě buněčných dějů, jako je např. udržování optimálních fyzikálních a biologických vlastností buněčných membrán. Nenasycené mastné kyseliny jsou biosyntetizovány z nasycených mastných kyselin prostřednictvím dvou evolučně nepříbuzných skupin desaturas: 1) rozpustné desaturasy v plastidech rostlin a 2) membránové desaturasy (dále jen desaturasy), které se vyskytují u všech eukaryotních jedno- i mnohobuněčných organismů a také u některých bakterií. Výzkum desaturas u kvasinek a hub je motivován především snahou nalézt desaturasy s enzymovými specifitami, které by bylo možno využít pro produkci vícenenasycených mastných kyselin (PUFA, z angl. PolyUnsaturated Fatty Acid) a dalších průmyslově hodnotných mastných kyselin. Navíc hrají desaturasy mastných kyselin důležitou roli v růstu a morfogenezi kvasinek, které jsou rostlinnými či lidskými patogeny, a jsou tak možným cílem antifungálních přípravků.

V této práci jsme izolovali geny CpFAD2 a CpFAD3 pro desaturasy mastných kyselin z oportunisticky patogenní kvasinky *Candida parapsilosis* a pomocí GC/MS stanovili produkované PUFA. Desaturasy CpFad2 a CpFad3 byly exprimovány v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, která přirozeně disponuje pouze $\Delta 9$ -desaturasou a je tak vhodným hostitelským organismem pro charakterizaci desaturas, které produkují PUFA. CpFad2 produkovala směs $\Delta 12$ - a $\Delta 15$ -PUFA. Hlavními produkty byly kyselina linolová ($\Delta 9, \Delta 12$ -18:2) a hexadekadienová ($\Delta 9, \Delta 12$ -16:2) doprovázená kys. α -linolenovou ($\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$ -18:3) a kys. hexadekatrienovou s dvojnou vazbou v neobvyklé koncové poloze ($\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$ -16:3). Analýzou trimethylsilylových derivátů mastných kyselin byla identifikována kys. ricinolejová (kys. 12-hydroxy-9-oktadekanová) jako další produkt CpFad2. Tyto výsledky naznačují, že detailní analýza produktů " $\Delta 12$ -desaturas" také u dalších druhů hub a kvasinek by mohla odhalit široké spektrum produkovaných minoritních PUFA a hydroxylovaných mastných kyselin [1].

[1] Buček et al.: *PLoS ONE* **9** (3): doi:10.1371/journal.pone.0093322 (2014).

Inovativní postupy pro podrobnou analýzu směsí uhlovodíků s dlouhými alifatickými řetězci

Vladimír Vrkoslav¹, Petra Horká^{1,2}, Martin Vít^{1,2}, Jindřich Jindřich², Ivan Jelínek², Josef Cvačka¹

¹ Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Praha

² Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha

vrkoslav@uochb.cas.cz

V současnosti není dostatek metod, pomocí kterých by bylo možné podrobně studovat uhlovodíky s velmi dlouhými alifatickými řetězci. Tyto látky však v přírodě zastávají, zejména u hmyzu a rostlin, důležité biologické funkce. Nejčastěji používanou metodou analýzy uhlovodíků je plynová chromatografie a spojení plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS). K ionizaci uhlovodíků se nejčastěji používá elektronová ionizace (EI), případně chemická ionizace (CI). Metoda je ideální pro kvantitativní a kvalitativní analýzu kratších uhlovodíků s menším počtem dvojných vazeb. Další možností strukturní analýzy je využití vhodné derivatizační reakce a analýza produktů GC/EI-MS. Zmíněné metody lze jednoduše aplikovat na směs alifatických uhlovodíků s délkou řetězce do 35 uhlovodíků. Pro vyšší uhlovodíky se použití GC/MS s délkou řetězce a počtem dvojných vazeb komplikuje. Hlavními důvody jsou vyšší bod varu a nestabilita dvojných vazeb při vyšších teplotách. Pro strukturní analýzu zvláště nenasycených uhlovodíků s dlouhým uhlíkovým řetězcem je vhodné využít principiálně odlišné metody.

Pro zjišťování struktury uhlovodíků s dlouhým alifatickým řetězcem je výhodné směs rozdělit a následně analyzovat on-line nebo off-line pomocí hmotnostního detektoru. Bylo studováno retenční chování a byla optimalizována separace uhlovodíků metodou argentační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Ag^+ -HPLC) a chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC). Pomocí RP-HPLC byly uhlovodíky rozděleny podle hydrofobicity. Na rozpustnost uhlovodíků má největší vliv délka jejich alifatického řetězce a počet dvojných vazeb. Ag^+ -HPLC využívá interakce dvojných vazeb uhlovodíků s ionty stříbra přítomnými ve stacionární fázi. Analyty byly v tomto případě separovány primárně podle počtu dvojných vazeb.

Ionizace uhlovodíků měkkými ionizačními technikami kompatibilními s HPLC není triviální. Bylo demonstrováno využití ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) pro ionizaci uhlovodíků a jejich strukturní charakterizaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). MALDI bylo využito pro off-line charakterizaci frakcí získaných RP-HPLC směsí kutikulárních uhlovodíků masačky *Neobellieria bullata*. Pro detekci uhlovodíků v Ag^+ -HPLC bylo možné využít APCI-MS detekci on-line.

Tato práce byla financována z prostředků GAČR P206/12/1093

GC×GC TOFMS: užitečný nástroj pro identifikaci a charakterizaci složitých směsí

Pavel Jiroš

Leco Instrumente Plzeň

Aplikace: **Voskové estery s C12 alkoholy: nově identifikovány ve frontální žláze vojáků inkvilinních druhů termitů z čeledi Termitinae. Fungují jako domovská vůně?**

Anna Jirošová, Pavlína Kyjaková, Klára Dolejšová, Andrej Jančařík, Robert Hanus

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha

luxova@uochb.cas.cz

Některé tropické druhy termitů žijí tzv. inkvilinním způsobem, tedy nestaví si vlastní hnízda, nýbrž žijí v hnízdech postavených a obývaných jinými druhy termitů. Takový způsob soužití nabízí otázku, jakými mechanismy dokážou nezvaní obyvatelé zajistit soužití s hostitelem a vyhnout se jeho zcela pochopitelné agresivní reakci. Právě tyto mechanismy zkoumáme u dvou druhů inkvilinů z deštného pralesa Francouzské Guyany, *Inquilinetremes* a *Spinitermes* (Termitidae: Termitinae).

Sekrece z obranné frontální žlázy kasty vojáků samostatně žijících termitů obvykle obsahuje toxické chemikálie s obrannou funkcí. Avšak my jsme při analýze frontální sekrece vojáků u inkvilinních druhů identifikovali velké množství netoxických voskových esterů složených z C12 alkoholů: (Z)-dodec-3-en-1-olu **DE**, (3Z,6Z)-dodeka-3,6-dien-1-olu **DDE** a (3Z,6Z,8E)-dodeka-3,6,8-trien-1-olu **DTE** a strukturně rozmanitých mastných kyselin. C12 alkoholy **DE**, **DDE** a **DTE** jsou známy u celé řady termitů jako stopovací feromony vylučované dělníky v nanogramových množstvích, popřípadě jako pohlavní feromony u pohlavních jedinců. Nález vosků těchto C12 alkoholů ve frontální žláze inkvilinních vojáků v množství řádově vyšším otevřel spekulace o jejich nové funkci. V současné době testujeme hypotézu o domovské vůni inkvilinních termitů, tedy cíleného uvolňování C12 alkoholů z vosků a jejich použití ke značení části hnízda obývané inkviliny.

K identifikaci zmíněných voskových esterů byla použita komprehensivní dvoudimensionální GC s TOF-MS detektorem, v sestavě nepolární kolona v první dimenzi a polární kolona v druhé. K určení struktur v komplexní směsi v malém množství byla potřeba řada derivatizačních technik od reesterifikace vosků dle Stránského po určení polohy dvojnásobné vazby po reakci s DMDS. Struktura byla rovněž potvrzena GC-CI-MS s vysokým rozlišením a GC-FTIR. Předseparace směsi byla provedena pomocí preparativního GC.

Po vyhodnocení analytických dat byly vybrané navržené molekuly vosků **DE** a **DDE** synteticky připraveny a jejich struktura byla ve frontálních žlázách vojáků *Inquilinetremes* a *Spinitermes* potvrzena po porovnání se syntetickými standardy.

Charakterizace triacylglycerolů pomocí acetonitrilového aduktu vznikajícího ve zdroji pro APCI

Eva Háková^{1,2}, Vladimír Vrkoslav², Josef Cvačka²

¹ Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha

² Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Praha

hakova@uochb.cas.cz

Triacylglyceroly (TGs) se řadí k nejhojněji zastoupené lipidové třídě jak u rostlin, tak u živočichů, u nichž se vyskytují hlavně v tukové tkáni. V rostlinách tvoří největší zásobárnu uhlíků a podílejí se tak na vývoji rostlin [1,2]. TGs patří mezi sloučeniny se značnou strukturální variabilitou a jejich délka délky acylových řetězců, stupně nenasycenosti a polohy dvojných vazeb (DB) korelují s chemicko-fyzikálními vlastnostmi TGs a biologickou aktivitou [3].

Metoda pro lokalizaci dvojných vazeb u TGs využívá tandemovou hmotnostní spektrometrii s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Polohu DB je možné určit pomocí radikalkationtu $C_3H_5N^{+•}$ (m/z 55), který vzniká reakcemi acetonitrilu v APCI zdrojích. Fragmentací molekulárního aduktu $[M+55]^{+•}$ lze pozorovat ionty, které odpovídají štěpení C-C vazeb v okolí původní DB [4]. Dle intenzit signálů fragmentů náležících neutrálním ztrátám mastných kyselin (FAs) umožňuje tato technika také rozlišit regioizomery. Pro podrobnou studii fragmentačních spekter byly využity jak standardy TGs, tak standardy připravené randomizační syntézou prováděnou v mikroměřítku, jež mají na glycerolovém řetězci navázané acyly s odlišným počtem DB i délkou uhlovodíkového řetězce. Touto nově vyvinutou metodou a spojením s HPLC technikou, byly následně studovány vzorky přírodních olejů a novorozeneckého mázku.

[1] Laakso P.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 43 (2002).

[2] Eastmond P.J.: Triacylglycerol mobilisation in plants (přístupné online na adrese:

http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_mobilisation/index.htm).

[3] Mitchell T. W., Pham H., Thomas M. C., Blanksby S. J.: *J. Chromatogr.* **B 877**, 2722 (2009).

[4] Vrkoslav V., Háková M., Pecková K., Urbanová K., Cvačka J.: *Anal. Chem.* **83**, 2978 (2011).

Tato práce vznikla za podpory SVV260084 a grantu GAČR P206/12/0750.

Optimalizace metody pro extrakci eikosanoidů z biologických vzorků

Marie Moravcová, Ondřej Kuda, Jan Kopecký

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Oddělení biologie tukové tkáně, Praha 4

mamoravcova.1@seznam.cz

Eikosanoidy jsou sloučeniny odvozené od polynenasycených mastných kyselin (PUFAs) s řetězcem dlouhým 20 uhlíků. Jsou to lipidické signální molekuly syntetizované z kyseliny arachidonové (AA), eikosapentaenové (EPA) nebo dokosahexaenové (DHA). Po stimulaci buňky enzym cytosolická fosfolipáza A2 (cPLA2) uvolní AA z buněčných fosfolipidů a volná AA může být přeměněna třemi různými oxidačními dráhami na stovky bioaktivních produktů. Eikosanoidy se účastní fyziologických funkcí organismu, jako je regulace stahů hladkého svalstva, propustnost cév a srážení krevních destiček, jsou také spojeny se zánětlivými, autoimunitními a alergickými procesy. První krok při analýze eikosanoidů je jejich extrakce z biologických vzorků. Používané metody zahrnují extrakci rozpouštědlem a extrakci na pevné fázi (SPE). SPE je nyní nepostradatelnou součástí analýzy eikosanoidů pomocí moderních analytických metod jako je HPLC/MS. Byla optimalizována metoda pro preseparaci eikosanoidů ze vzorku gonadálního tuku myši za použití extrakce na pevné fázi pomocí čtyř kolonek s reverzní fází: Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA), Chromabond HR-X 60 mg/3 ml, 45 μm (Macherey-Nagel, Germany), Strata C18 200 mg/3 ml, 55 μm (Phenomex, USA) a Oasis HLB 60 mg/3 ml, 30 μm (Waters, USA). Porovnáním účinnosti separace bylo zjištěno, že na všech kolonkách lze separovat frakci eikosanoidů. Jednoznačně nejvyšší efektivitu separace vykazuje kolona Strata X 60 mg/3 ml, 33 μm (Phenomenex, USA) se styren-divinylbenzen kopolymerním sorbentem. SPE na koloně Strata X představuje robustní a stabilní metodu pro separaci eikosanoidů z biologických vzorků, vzhledem ke schopnosti účinně zadržet eikosanoidy a pro rychlý a snadný postup při extrakci.

Analýza antioxidantů v lupinovém oleji

Portychová L., Hrbáč J., Jirovský D., Halouzka V., Rimán D., Bartošová Z., Horna A.

Institut Nutrice a Diagnostiky, RADANAL s.r.o., Pardubice

Katedra fyzikální chemie a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, UP, Olomouc

Lenka.Portychova@vuos.com

Lupina je rostlina pěstovaná zejména v Severní a Jižní Americe, ale v menší míře též v Evropě. Jedná se o typ luštěniny, kterou zařazovali do svého jídelníčku již staří Egypťané. Důležitou složkou (tvořící cca 8 % objemu) semen této rostliny je lupinový olej, který obsahuje nenasycené mastné kyseliny a je bohatý na antioxidanty rozpustné v tuku. Olej je ze semen většinou získáván extrakcí oxidem uhličitým. V posledních letech výrazně roste zájem o přírodní antioxidanty díky jejich blahodárnému účinku při prevenci různých onemocnění. V této práci jsme se zaměřili na měření antioxidační kapacity lipofilních vzorků (lupinového oleje) a na stanovení přítomných antioxidantů. Kvantitativní analýza antioxidantů v částech rostlin obecně představuje velký analytický problém. Pro měření byla využita metoda kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí (s aktivovanou mikroelektrodou z uhlíkového vlákna) a modifikovaná chemiluminiscence. Bylo zjištěno, že antioxidační kapacita lupinového oleje je asi třetinová ve srovnání s antioxidační kapacitou oleje olivového. Tyto dva druhy olejů se však liší typem přítomných antioxidantů. V lupinovém oleji se vyskytují zejména karotenoidy (zeaxantin, lutein) a tokoferolové izomery.

Tato práce byla podpořena Technologickou agenturou České republiky (grant č. TA01010737), Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/0796) a studentskými projekty Univerzity Palackého (PrF_2013_031).

TLC lipidů s ambientní hmotnostně spektrometrickou detekcí

Jan Rejšek, Vladimír Vrkošlav, Josef Cvačka

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Praha

janrejsek@centrum.cz

Ambientní ionizací v hmotnostní spektrometrii se rozumí ionizace, která probíhá v otevřeném prostoru vně hmotnostního spektrometru. V dnešní době je známo asi 30 typů ambientních ionizačních technik. Jejich hlavními výhodami jsou rychlost analýzy a fakt, že nevyžadují žádnou, nebo minimální předúpravu vzorku. V této práci byly studovány techniky desorpční elektrosprejové ionizace (DESI, desorption electrospray ionization) [1] a desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku (DAPPI, desorption atmospheric pressure photoionization) [2]. Tyto metody využívají sprejování rozpouštědel k desorpci a ionizaci analytu z pevného substrátu. Techniky byly využity při spojení TLC/MS, kdy byly nalezeny vhodné podmínky pro DESI analýzu šesti zástupců šesti různých lipidových tříd po separaci na HPTLC desce a rovněž pro DAPPI analýzu několika lipidů po separaci na HPTLC desce. DAPPI bylo dále aplikováno pro detekci některých složek lipidové povahy celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku po separaci na HPTLC desce.

[1] Takats Z., Wiseman J.M., Gologan B., Cooks R.G.: *Science* **306**, 471-473 (2004).

[2] Haapala M., Pol J., Saarela V., Arvola V., Kotiaho T., Ketola R.A., Franssila S., Kauppila T.J., Kostianen R.: *Anal. Chem.* **79**, 7867-7872 (2007).

Tato práce byla financována z projektu GAČR P206/12/0750 a programu interní podpory projektů mezinárodní spolupráce AV ČR M200551204.

Vývoj metody MALDI imaging pro zobrazování distribuce uhlovodíků na povrchu rostlin a hmyzu

Miloslav Šulc², Vladimír Vrkoslav¹, Josef Cvačka¹

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Praha

²Česká zemědělská univerzita, Katedra chemie, Praha 6

sulcm@af.czu.cz

Povrch těla vyšších rostlin a hmyzu je pokryt vrstvou kutikulárního vosku. Složení kutikulárních vosků je u jednotlivých organismů odlišný. Vždy se jedná o látky s velmi nízkou polaritou. V kutikulárních voscích se často vyskytují uhlovodíky, voskové estery, estery cholesterolu, ketony, aldehydy a karboxylové kyseliny s dlouhými alifatickými řetězci. Mají hlavně funkci ochrannou - ochraňují organismus před vysycháním, ultrafialovými paprsky a průnikem patogenů [1]. Některé jeho složky mohou také hrát důležitou roli ve vnitrodruhové komunikaci hmyzu nebo ovlivňovat vztahy mezi rostlinami a hmyzími škůdci. Lokalizace lipidů na povrchu organismů může výrazně přispět k pochopení těchto vztahů. Již v našem dřívějším studiu těchto látek metodou MALDI imaging [2] byla využita tvorba molekulárních aduktů lipidů s alkalickými kovy. Tato metoda ovšem nedosahovala dostatečných detekčních limitů hlavně pro nejméně polární složku kutikulárních lipidů – uhlovodíky. Instrument byl vybaven dusíkovým laserem (337 nm), který dosahoval maximální frekvence jen 20 Hz. Tato frekvence nedovolovala monitorovat velké plochy s rozlišením vyšším než 0,2 mm.

Předkládaná práce popisuje proces optimalizace přípravy vzorku a podmínky měření MALDI MSI uhlovodíků na přístroji UltrafleXtreme (Bruker, Německo) vybaveného NdYAG laserem (355 nm, 1000 Hz). Jako modelový objekt byla vybrána křídla masačky *Neobeliera bullata*. Byly použity kombinace matic kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (DHB) a vanilinu (VA) s Li⁺ a Ag⁺ ionty. Zmíněné kationty jsou schopny zprostředkovat ionizaci uhlovodíků za tvorby molekulárních aduktů [M+Li]⁺, respektive [M+Ag]⁺. Matrice byly nanášeny na povrch technikou sprejování. Vyvinutá metoda dosahuje lepší citlivost než metoda prezentovaná v roce 2010 [2].

1. R.J. Hamilton (Ed.): *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press Ltd., Dundee 1995.
2. V. Vrkoslav, A. Muck, J. Cvačka, A. Svatoš, MALDI Imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 220–231 (2010).

Tato práce byla financována z prostředků GAČR P206/12/1093

Sborník příspěvků 4. České lipidomické konference

Praha 25.-26. června 2014

Vydal: Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Počet výtisků: 50

Počet stran formátu A4: 15

Editor: Michal Hoskovec © 2014

neprodejné

ISBN 978-80-86241-53-1