

# Metodické aspekty stanovení mastných kyselin v klinicky relevantních matricích

M. Vecka, A. Žák, M. Zeman, B. Staňková, E. Tvrzická

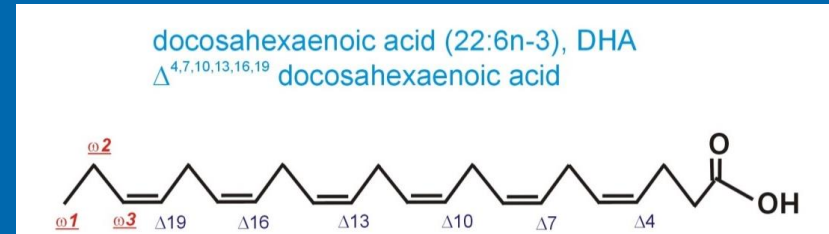
*IV. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha*



# Mastné kyseliny

## Struktura mastných kyselin

- často triviální názvy
- polohová/geometrická izomerie



22:6n-3 nebo 22:6 $\omega$ 3

## Význam mastných kyselin

- strukturální (vlastnosti membrán)
- energetický (1 g TAG ~ 38 kJ)
- izolační (TAG-termoregulace/SPL-el./CER-HOH)
- prekurzory pro další látky (*signální molekuly, ligandy, acylace...*)

↓  
význam analýz mastných kyselin



# Analýzy mastných kyselin

## *klinický význam*

### Metabolické pochody

patofyziologie metabolismu FA

- mt poruchy FA transportu/oxidace (*Houten 2016*)
- deficiencie příjmu EFA - GIT (*Holman 1998*)
- peroxisomální poruchy (*Lagerstedt 2001*)

jiné metabolické poruchy (*viz dále*)

### FA jako markery

nutriční parametry (EPA+DHA/tFA/PA) (*Arab 2003*)

### Klasifikační metody

- bakteriální kmeny (*SHERLOCK®....*)
- analýzy potravin



# MATRICE

*(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)*

## I. Typ matrice

### Klasické matrice I

- nejčastěji: sérum/plazma (*Akinyemi 2016*)
- erytrocyty (ERY) (*Demmelmair 2012*)
- suchá krevní kapka (*Gunash 2019, Harris 2016*)



# MATRICE

*(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)*

## I. Typ matrice

### Klasické matrice II

- tkáně: tuková tkáň

- profil FA: lokalizace - subc~visc (*Garaulet 2001*)

~ x epikard (*Hjelmggaard 2018, Pezeshkian 2013*)

neexistuje jednoduchý vztah mezi profilem NEFA a FA tukové tkáně

*(Hodson 2008, Walker 2015)*

- další tkáně: jaterní ...



# MATRICE

*(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)*

## I. Typ matrice

### Klasické matrice III

- mateřské mléko (*Garaulet 2001*)

laktanční stadium: kolostrum x přechodné x zralé mléko

*(da Costa 2016, Dai 2020)*

stáří novorozence: předčasný porod x v termínu (*Bitman 1983*)

dieta matky (*Codinin 2020*)

- vzorky diet/potravin, PEN, dietní doplňky ...

### Méně časté matrice

- sliny (*Neyraud 2017*), ušní maz (*Stránský 2011*), moč (*Ukolov 2015*), žluč (*van Berge Henegouven 1987*), stolice – SCFA (*Primec 2017*)



# MATRICE

*(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)*

## II. Limitace matrice – odraz metabolických pochodů

plazma/sérum - lipidové celkové extrakty = suma efektů

více odráží vliv diety než jednotlivé lipidové třídy *(Furtado 2019)*

plazma/sérum - jednotlivé lipidové třídy

PL – eliminace vlivu postprandiálních TAG

lépe odrážejí stav buněčných membrán

hlavně PC, nutnost dělení: TLC, SPE *(Burdge 2004)*

CE – více vliv diety, LCAT, CETP *(Brenna 2018)*

NEFA - ?? korelace k tukové tkáni *(Walker 2015)*

minoritní – separace x selektivní reakce pro detekci  
x přímé lipidomické analýzy (HPLC)

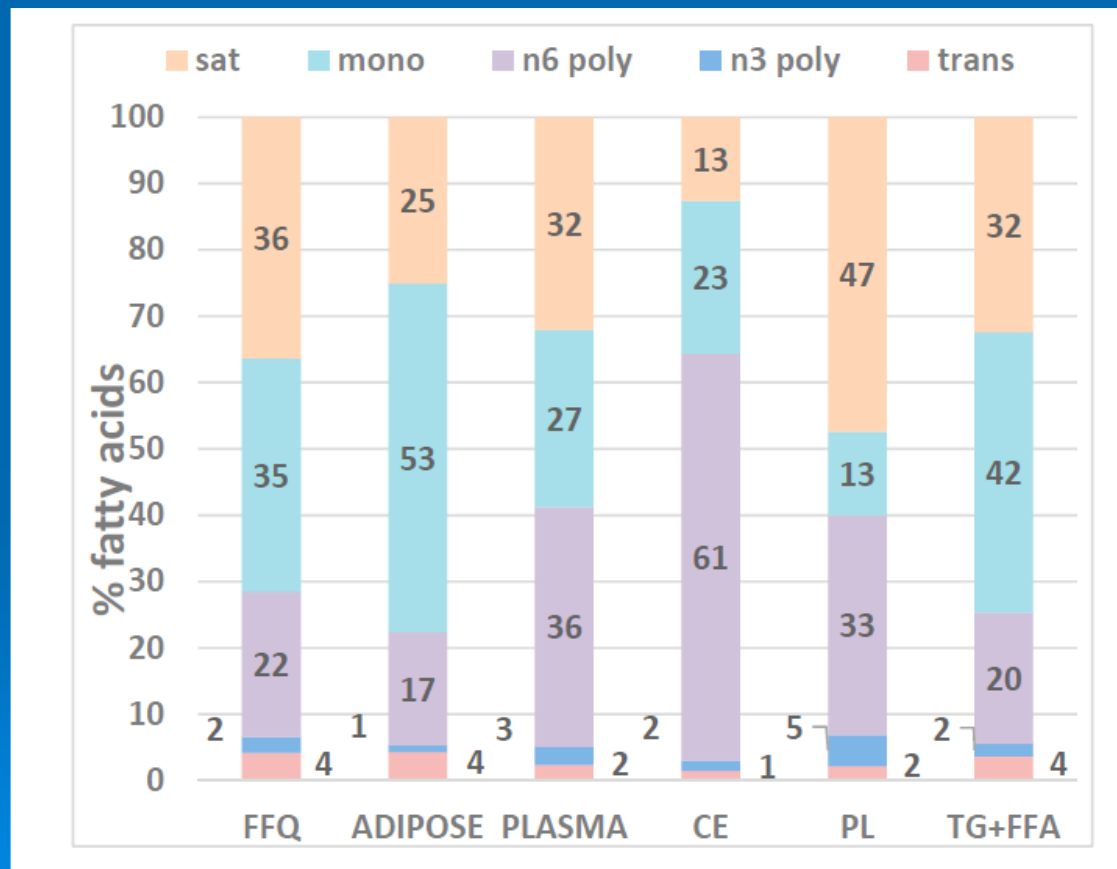


# MATRICE

*(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)*

## II. Limitace matrice – odraz metabolických pochodů

Profil FA v různých matricích





# MATRICE

(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)

## II. Limitace matrice – odraz metabolických pochodů

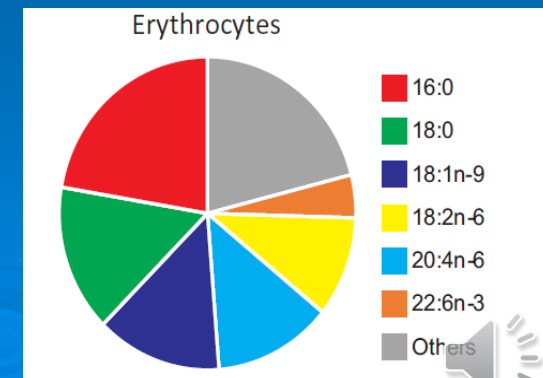
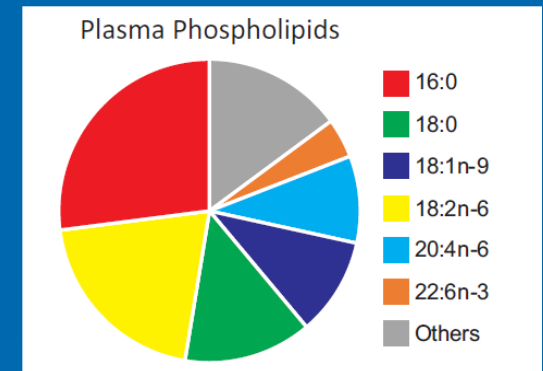
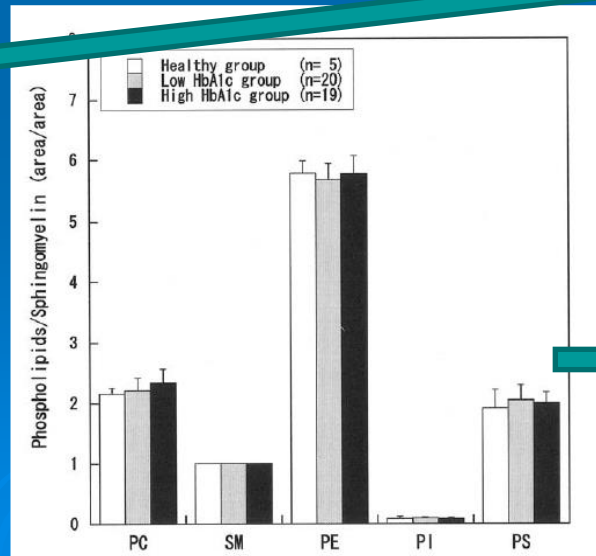
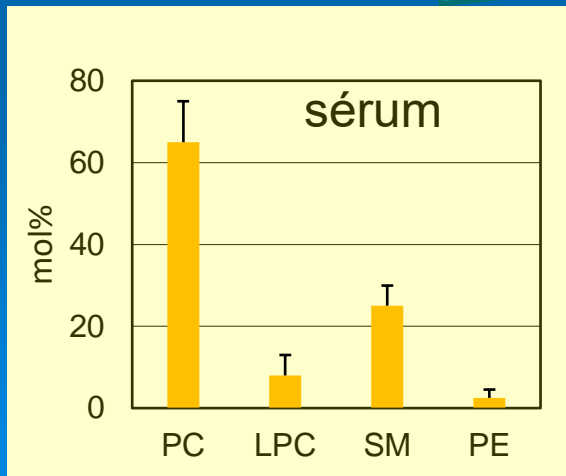
### ERY PL

více druhů PL = přesnější pohled na složení membrán (*Mawatari 2004*)

delší obrat řetězců FA (*Brenna 2018*)

x jednotlivé FA se liší: (PA x EPA)

oxidace matrice v preanalytické fázi Hb



*Mawatari 2004*

*Brenna 2018*

# MATRICE

(v čem budeme mastné kyseliny analyzovat?)

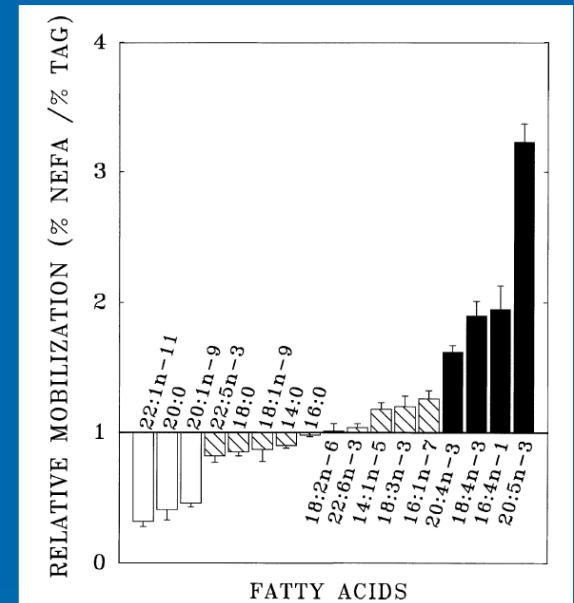
## II. Limitace matrice – odraz metabolických pochodů

### tuková tkáň

dlouhodobé ukládání TAG měsíce/roky

(Spalding 2017, Arner 2011)

rozdílná mobilizace FA (Raclot 1997)

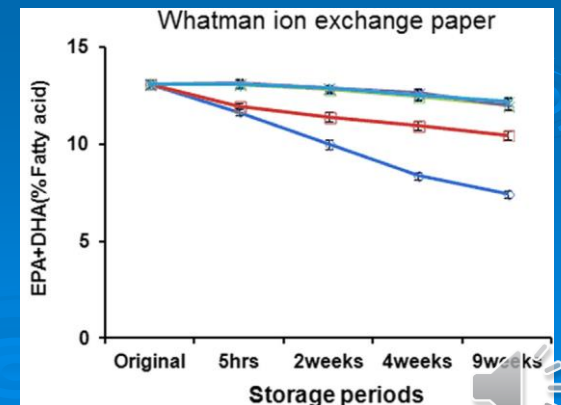


### suchá krevní kapka

nejjednodušší sběr x sumace nejvíce vlivů

(Marangoni 2007, Gunash 2019)

pro analýzu PUFA nutno stabilizovat (Liu 2014)



# MATRICE

*(jaké mastné kyseliny budeme analyzovat?)*

## III. Limitace matrice – množství

### dostupnost matrice

plazma: CE, TAG, PL (stovky  $\mu\text{L}$ ) > NEFA > celkové FA (desítky  $\mu\text{L}$ )

tkáně: podle obsahu/lipidové třídy

sliny (jednotky mL) > tuková tkáň (PL) ... ERY PL >> tuková tkáň (TAG)

### typ preanalytické fáze

LLE x TLC x SPE

### analytická platforma

HPLC-UV > HPLC-DAD > GC-FID > GC-MS > LC-MS

## IV. Limitace matrice – odběr

cirkadiánní rytmy/postprandiální fáze/stres (NEFA, TAG)

oxidace matrice, obsah HOH (krevní skvrny)



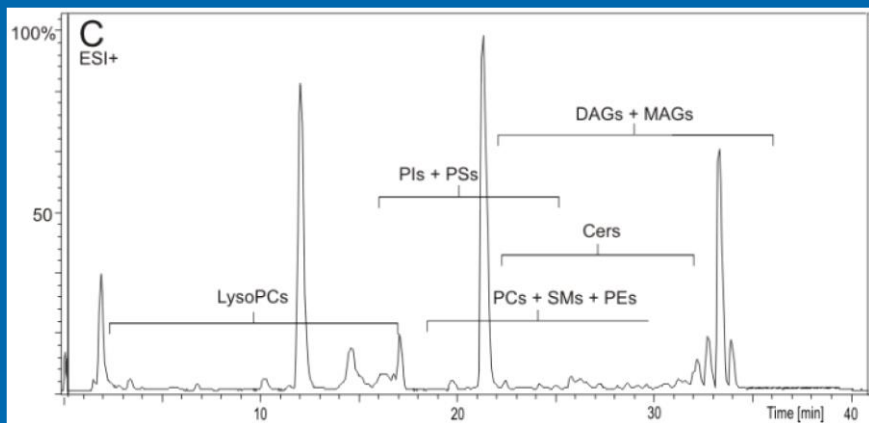
# MATRICE

*(jaké mastné kyseliny budeme analyzovat?)*

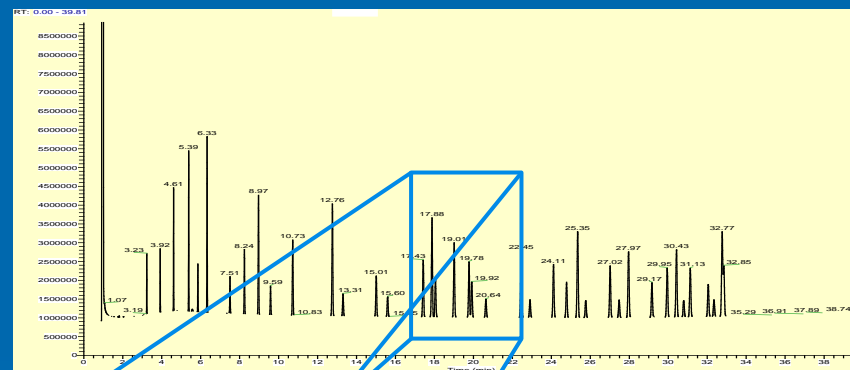
## V. Limitace matrice – komplexnost FA

celé molekuly x profil FA řetězců

lipidomika (UHPLC-MS)

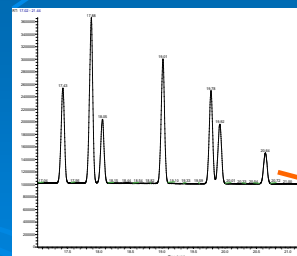


profilové analýzy (GC)



PC(36:2)	786.6001
PC(36:4)	782.5657
PC(36:5)	780.5495
PC(38:4)	810.5982
DAG(18:1/18:0)	640.5840
TAG(16:0/18:1/18:2)	874.7848
TAG(18:1/18:2/18:1)	900.8008
TAG(16:0/18:1/18:1)	876.8012
TAG(18:3/18:1/20:0)	928.8256

pouze počet  
dvojných  
vazeb



poloha+konfigurace  
dvojných vazeb

izomery 18:1, 18:2



# MATRICE

*(jaké mastné kyseliny budeme analyzovat?)*

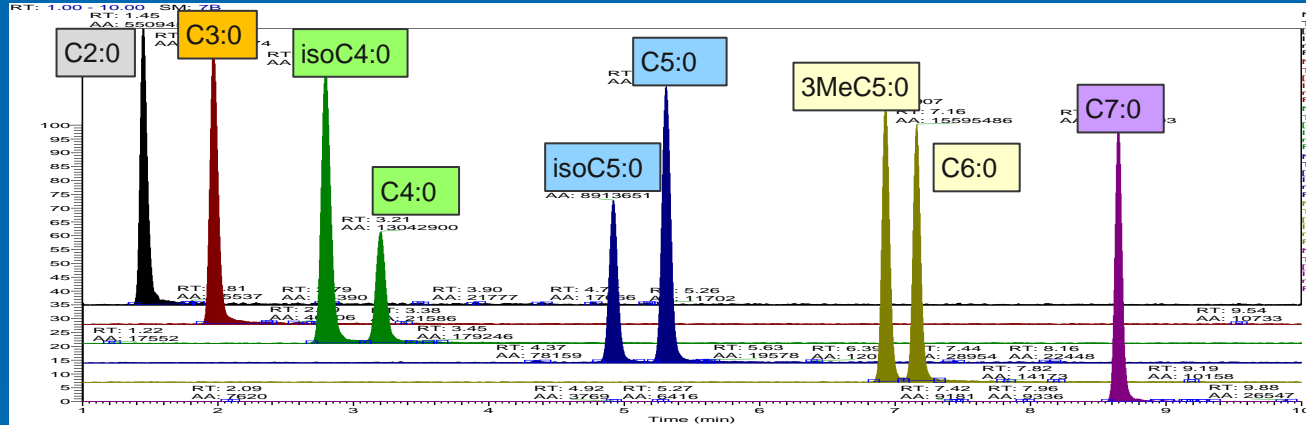
## V. Limitace matrice – komplexnost FA

### délka řetězce FA

velmi krátké FA – volatilita (krátká > komplikovaná preanalytická fáze)

LC-MS  
derivatizace  
po extrakci

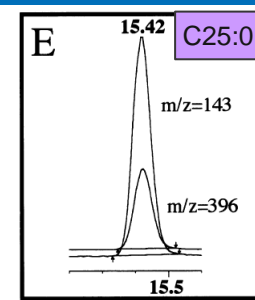
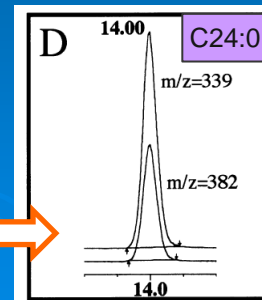
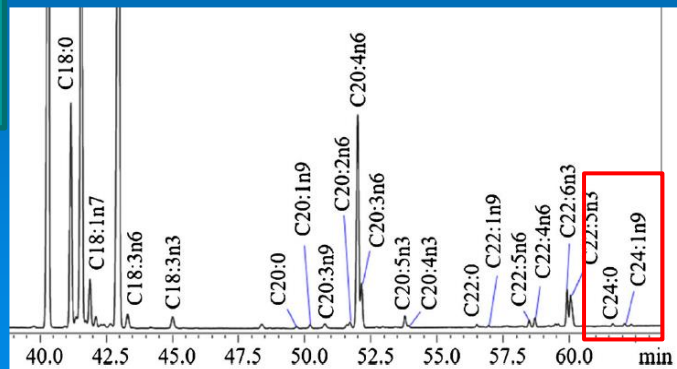
*časté  
kontaminace*



velmi dlouhé FA – nízké koncentrace (FID < MS/MS)

GC-FID  
derivatizace  
po extrakci

*časté  
kontaminace*



GC-MS  
derivatizace  
po extrakci



Takemoto 2003

Micalizzi 2020

# PREANALYTICKÁ FÁZE

*(kroky před vlastní analýzou)*

## I. Odběr matrice

### plazma/ERY

plazma (chelatace  $\text{Me}^{2+}$ ) > sérum;

RBC: promytí PBS (přítomen Hb)/ lýza HOH (Hb oddělen - „ghosts“)

uchovávat v chladu (hydrolyza lipidů) do dalšího zpracování

### stabilita matrice

degradace vlivem  $\text{O}_2$ :

oddělení Hb pro analýzy ERY PL

PL: skladování pod  $\text{N}_2$ /-80°C (> roky), -20°C (měsíce)

*(Hodson 2002, Di Marino 2000); ERY PL (Magnusardottir 2001)*

přidávání antioxidantů (BHT; x interference s analýzami)

enzymatická degradace

NEFA: nelze skladování pod  $\text{N}_2$  při -20°C (PLasy)



# PREANALYTICKÁ FÁZE

*(kroky před vlastní analýzou)*

## II. Dělení lipidových tříd

### plazma

od nepolárních částí (LLE extrakce, srážení ACN/MeOH/IPA)  
*(Criado-Navarro 2020)*

další podrobné dělení (TLC > HPLC > SPE > LLE; UC)

### ERY

případné oddělení Hb v suspenzi ERY

většinou pouze LLE extrakce + přímá transmethylace PL  
*(Brenna 2018)*

### Tuková tkáň

TAG > 95%; dělení není nutné

minoritní třídy (lipidomické přístupy + TLC/SPE) *(Tomášová 2020)*



# ANALYTICKÁ FÁZE

(čím budeme analyzovat?)

## Analytické platformy

	GC- platformy	LC- platformy
cena/dostupnost	levné (GC-FID < GC-MS)	drahé (LC-ELSD < LC-DAD < LC-MS/MS)
preanalytická fáze	dlouhá (komplikovaná)	jednoduchá
separace lipidových tříd	nutná	není nutná
derivatizace	nutná	není nutná
separační účinnost	vysoká (geometrické i polohové izomery FA)	nízká až střední (HPLC < UHPLC)
kalibrace	snadná	komplikovaná
analýzy celých molekul	nelze – pouze profilové analýzy	možné
citlivost	dobrá až velmi dobrá	nízká až velmi dobrá





# VÝSTUP DAT

(kroky po vlastní analýze)

## Interpretace dat

### Profilová x absolutní data

relativní obsah (mol%, mg/100 mg..) u GC/LC- analýz

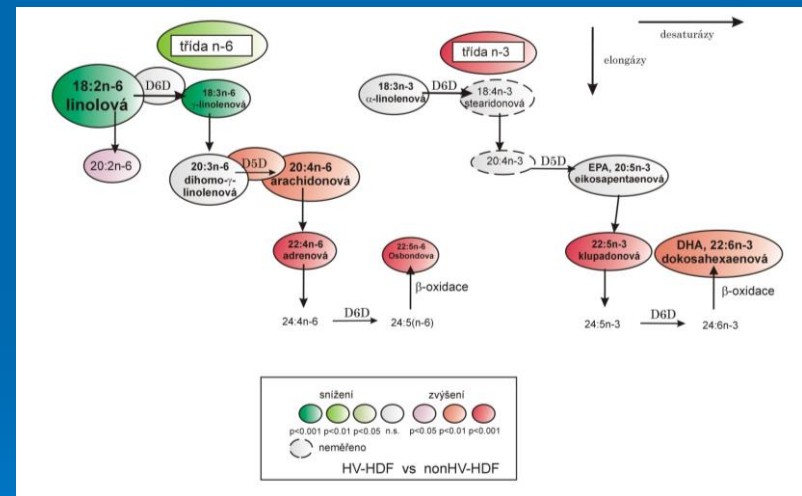
pro absolutní data nutná kompletní validace metody u GC>LC- analýz

**Table 2** Fatty acids content in analyzed samples

	Peanut	Pump-kin/ melon	Cashew	Coconut
ΣSFA	20.7±5.7	20.3±2.5	19.5±3.4	91.2±0.4
ΣMUFA	60.6±13.2	36.8±8.9	63.3±6.7	7.9±0.4
ΣPUFAn-6	17.9±8.6	42.3±9.4	16.4±4.2	0.4±0.1
ΣPUFAn-3	< 0.2	< 0.2	< 0.2	
TFA	0.7±0.3	0.5±0.1	0.7±0.2	0.4±0.2

weight% ± SD format.

*Vecka 2019*



## Chybné výstupy analýz FA

nesprávná/neúplná identifikace (interference/18:1 vs 18:1n-7, 18:1n-9)

nezohlednění limitace metody (LOQ)



# Závěr

- Při plánování stanovení mastných kyselin je nutné vzít v úvahu konkrétní typ a dostupnost matrice, druh lipidové třídy i typy stanovovaných mastných kyselin, případně analytické možnosti laboratoře
- Na výsledku analýzy se podílejí další preanalytické faktory, jako odběr, množství a skladování vzorku
- Zvýšené nároky na detekci řetězců mastných kyselin spolu s postupujícími možnostmi a dostupností pokročilých analytických platforem mění původně samostatnou oblast stanovení profilu mastných kyselin v součást lipidomických analýz



***Děkuji za pozornost***

***Studie byla podpořena projekty***

***RVO-VFN64165/2012 a PROGRES Q25/LF***



