

MASTNÉ KYSELINY A TUKY VE ZDRAVÍ A NEMOCI

Miroslav Zeman
Jaroslav Macášek
Marek Vecka
a kolektiv

MASTNÉ KYSELINY A TUKY VE ZDRAVÍ A NEMOCI

Miroslav Zeman
Jaroslav Macášek
Marek Vecka
a kolektiv

GRADA Publishing

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude trestně stíháno. Automatizovaná analýza textů nebo dat ve smyslu čl. 4 směrnice 2019/790/EU a použití této knihy k trénování AI jsou bez souhlasu nositele práv zakázány.

Miroslav Zeman, Jaroslav Macášek, Marek Vecka a kolektiv

Mastné kyseliny a tuky ve zdraví a nemoci

Hlavní autor:

Doc. MUDr. Miroslav Zeman, CSc.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

Autoři:

MUDr. Jaroslav Macášek, Ph.D.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

RNDr. Marek Vecka, Ph.D.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

Prof. MUDr. Radan Brůha, CSc.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

Prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

Doc. Ing. Jiří Brát, CSc.,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav mléka, tuků a kosmetiky

RNDr. Eva Tvrzická, CSc.,

IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN Praha

Doc. Dr. Ing. Marek Doležal,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,

Ústav analýzy potravin a výživy (spolupráce na kapitole 17)

Recenzentka: Ing. Ludmila Kazdová, CSc.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

© Grada Publishing, a.s., 2024

Cover Design © Grada Publishing, a.s., 2024

Autorem obrázků v knize je RNDr. Marek Vecka, Ph.D., není-li uvedeno jinak.

Obrázky 16.1–16.5 překreslil podle podkladů od autorů Jaroslav Kolman.

Vydala Grada Publishing, a.s.
U Průhonu 22, Praha 7
jako svou 9285. publikaci
Odpovědná redaktorka Mgr. Viola Těšínská
Sazba a zlom Jaroslav Kolman
Počet stran 304
1. vydání, Praha 2024
Vytiskla tiskárna TNM PRINT s.r.o., Nové Město

Tato publikace vznikla za podpory MZ ČR-RVO-VFN64165, NU23-01-00288, Cooperatio/Gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK. Kapitola 17 vznikla za finanční podpory z prostředků Ministerstva zemědělství v rámci projektu Naučte se používat jedlé tuky a oleje. Za podporu děkujeme také firmám ADM Olomouc s.r.o., AstraZeneca Czech Republic s.r.o., FABIO PRODUKT spol. s r.o. a Zentiva, k.s.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění však pro autory ani pro nakladatelství nevyplývají žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-271-7334-1 (pdf)
ISBN 978-80-271-5161-5 (print)

Primární hypercholesterolemie/
homozygotní familiární
hypercholesterolemie (HoFH)¹

Fixní kombinace pro
pacienty, kteří jsou adekvátně
kontrolováni volnou kombinací
rosuvastatinu a ezetimibu¹

Fixní kombinace rosuvastatinu a ezetimibu¹

Zkrácená informace o přípravku ROZETIN

LÉČIVÁ LÁTKA: 1 potahovaná tableta obsahuje rosuvastatinum calcium (odpovídající rosuvastatinum 10mg/20mg/40mg) a ezetimibum 10 mg. **INDIKACE:** primární hypercholesterolemie (heterozygotní familiární a nefamiliární) / homozygotní familiární hypercholesterolemie (HoFH). **DÁVKOVÁNÍ:** pacient má být na vhodné hypolipidemické dietě a v průběhu léčby přípravkem Rozetin musí v dietě pokračovat. Přípravek Rozetin není vhodný pro počáteční léčbu. Pacienti mají užívat sílu odpovídající jejich předchozí léčbě jednosložkovými přípravky. Doporučená dávka: 1 tableta denně, ve stejnou dobu, s/bez jídla, tablety polykat celé a zapíjet se vodou. Bezpečnost a účinnost kombinace ezetimib + rosuvastatin u dětí do 18 let nebyla dosud stanovena. U pacientů s mírnou poruchou funkce jater nebo ledvin není nutná úprava dávkování. U pacientů se středně těžkou poruchou funkce ledvin, u pacientů s asijským původem a u starších pacientů je doporučena úvodní dávka 5 mg rosuvastatinu. **KONTRAINDIKACE:** hypersenzitivita na léčivé látky nebo na kteroukoli pomocnou látku. Po dobu těhotenství a kojení a u žen ve fertilním věku bez přiměřených kontracepčních opatření. Aktivní onemocnění jater nebo přetrvávající nevysvětlené zvýšení koncentrace sérových transamináz a při zvýšení transamináz nad 3násobek horní hranice normálu (ULN). Při těžké poruše funkce ledvin (clearance kreatininu < 30 ml/min). Při myopatii. Při současném užívání kombinace sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir nebo cyklosporinu. Dávka 40 mg/10 mg je kontraindikována u pacientů s predispozičními faktory k myopatii/rhabdomyolýze: středně těžká porucha funkce ledvin (clearance kreatininu < 60 ml/min), hypotyreóza, osobní/rodinná anamnéza dědičných muskulárních poruch, předchozí anamnéza muskulární toxicity po podání jiných inhibitorů HMG-CoA reduktázy nebo fibrátů, nadměrné požívání alkoholu, stavy, při kterých může dojít ke zvýšení plazmatických hladin rosuvastatinu, asijský původ, současné užívání fibrátů. **ZVLÁŠTNÍ UPOZORNĚNÍ:** u pacientů léčených rosuvastatinem ve všech dávkách, zvláště pak v dávkách >20 mg, byly hlášeny účinky na kosterní svalstvo, např. myalgie, myopatie a vzácně rhabdomyolýza. Pokud jsou hladiny kreatinkinázy (CK) před zahájením léčby významně zvýšené (> 5x ULN), je třeba kontrolu opakovat v průběhu 5–7 dní, jestliže opakovaná kontrola CK > 5x ULN, léčba se nemá zahajovat. S opatrností u pacientů s predispozičními faktory k myopatii/rhabdomyolýze. Pacienti je třeba požádat, aby okamžitě hlásili nevysvětlitelné bolesti svalů, svalovou slabost nebo křeče, zvláště pokud jsou spojeny s malátností nebo horečkou; jestliže dojde k výraznému vzestupu hladiny CK (> 5x ULN) nebo jsou svalové příznaky závažné a působí problémy během dne (i když jsou hodnoty CK ≤ 5x ULN), je třeba léčbu přerušit. Před začátkem a 3 měsíce po zahájení léčby se doporučuje provést jaterní testy. Léčba rosuvastatinem se má přerušit nebo dávkování snížit, pokud je hladina sérových transamináz vyšší než 3násobek ULN. Při léčbě dávkou 40 mg zvážit sledování funkce ledvin během rutinních kontrol. Pokud u pacienta existuje podezření na rozvoj intersticiálního plicního onemocnění, je třeba léčbu statiny ukončit. Byly hlášeny závažné kožní nežádoucí účinky včetně Stevensova-Johnsonova syndromu (SJS) a lékové reakce s eozinofilií a systémovými příznaky (DRESS), které mohou být život ohrožující nebo fatální. Přípravek Rozetin obsahuje monohydrát laktosy. Pacienti se vzácnými dědičnými problémy s intolerancí galaktosy, úplným nedostatkem laktázy nebo s malabsorpcí glukosy a galaktosy nemají tento přípravek užívat. **INTERAKCE:** kontraindikované kombinace: cyklosporin, gemfibrozil. Nedoporučované kombinace: fibráty a další přípravky snižující hladinu lipidů, inhibitory proteáz, inhibitory transportních proteinů, kyselina fusidová a 7 dnů po poslední dávce kyseliny fusidové. **Ostatní interakce:** rosuvastatin není ani inhibitorem, ani induktorem isoenzymů cytochromu P450, ezetimib neindukuje enzymy cytochromu P450, současné podávání antacid snižilo rychlost absorpce ezetimibu, ale na biologickou dostupnost ezetimibu nemělo žádný vliv, bylo pozorováno snížení AUC ezetimibu při použití s kolestyraminem; při použití s erytromycinem bylo pozorováno zmenšení AUC rosuvastatinu. Pokud je Rozetin přidán k warfarinu, jiným kumarinovým antikoagulanciím nebo flutidionu, musí být patřičně sledován INR. Přerušení léčby přípravkem nebo snížení dávky může vést ke snížení INR. Současné podávání rosuvastatinu a perorálních kontraceptiv vedlo ke zvětšení AUC etinylestradiolu o 26 % a norgestrelu o 34 %. Toto zvýšení hladin v plazmě brát v úvahu při určení dávek perorálního kontraceptiva. Interakce vyžadující úpravu dávkování rosuvastatinu najdete podrobně v úplném znění SPC. **FERTILITA, TĚHOTENSTVÍ A KOJENÍ:** kontraindikován v průběhu těhotenství a kojení. Ženy ve fertilním věku mají během léčby používat vhodné antikoncepční metody. **ÚČINKY NA SCHOPNOST ŘÍDIT A OBSLUHOVAT STROJE:** studie nebyly provedeny. Je však třeba brát v úvahu, že byla hlášena závrať. **NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY:** byly obvykle mírné a přechodné. Nejčastější nežádoucí účinky, souvisejícími s léčbou kombinací ezetimib + rosuvastatin: zvýšené jaterní transaminázy, gastrointestinální obtíže a bolest svalů. Dále časté: diabetes mellitus, bolest hlavy, závrať, zácpa, nauzea, bolest břicha, průjem, flatulence, astenie, únava. **UCHOVÁVÁNÍ:** v původním obalu (ochrana před světlem a vlhkostí). **VELIKOST BALENÍ:** 30 nebo 100 potahovaných tablet. **DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI:** Zentiva k. s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Česká republika. **DATUM REVIZE TEXTU:** 9. 4. 2022. **VÝDEJ:** je vázán na lékařský předpis. Přípravek je plně hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Před předepsáním nebo výdejem přípravku se seznámte s úplnou informací o přípravku, které obdržíte na adrese: Zentiva, k. s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Česká republika.

Reference: 1. SPC přípravku Rozetin[®], datum revize textu 9. 4. 2022.

Určeno pro odbornou veřejnost

Zentiva, k.s., marketingové oddělení, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Česká republika, www.zentiva.cz

ZENTIVA

Obsah

1	Klasifikace a vlastnosti mastných kyselin	1
	M. Vecka	
1.1	Nomenklatura mastných kyselin	1
1.2	Vlastnosti mastných kyselin	4
2	Analýza mastných kyselin	9
	E. Tvrzická	
2.1	Historie	10
2.2	Vývoj aparatury	10
2.2.1	Injekční techniky	10
2.2.2	Kolony	10
2.2.3	Detekce	11
2.3	Kvalitativní analýza	11
2.4	Kvantitativní analýza	12
2.5	Příprava vzorku	12
2.5.1	Izolace celkového lipidu	12
2.5.2	Separace lipidových tříd	14
3	Základní metabolismus mastných kyselin	21
	M. Vecka	
3.1	Přehled biosyntézy mastných kyselin	21
3.1.1	De novo biosyntéza (velmi) dlouhých mastných kyselin	21
3.1.2	Přeměny esenciálních mastných kyselin	21
3.2	Základní přeměny řetězců mastných kyselin	23
3.2.1	Desaturace mastných kyselin	23
3.2.2	Elongace mastných kyselin	24
3.2.3	Oxidace mastných kyselin	25
3.3	Přeměny zvláštních typů mastných kyselin	27
3.3.1	Biosyntéza netradičních typů mastných kyselin	27
3.3.2	Biosyntéza 2-hydroxymastných kyselin	27
4	Třídy mastných kyselin	31
	M. Vecka	
4.1	Nasycené mastné kyseliny	31
4.1.1	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem	31
4.1.2	Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem	31
4.1.3	Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem	32
4.2	Mononenasycené mastné kyseliny	33
4.2.1	Mononenasycené mastné kyseliny třídy n-7	33
4.2.2	Mononenasycené mastné kyseliny třídy n-9	34
4.2.3	Mononenasycené mastné kyseliny ostatních tříd	34
4.3	Polynenasycené mastné kyseliny	35
4.3.1	Polynenasycené mastné kyseliny třídy n-3	35
4.3.2	Polynenasycené mastné kyseliny třídy n-6	35
4.3.3	Polynenasycené mastné kyseliny ostatních tříd	36

4.4	Transmastné kyseliny	36
4.5	Konjugované mastné kyseliny	37
4.6	Neobvyklé mastné kyseliny	38
4.6.1	Mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem	38
4.6.2	Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků	39
4.6.3	Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem	39
5	Biologicky aktivní deriváty mastných kyselin	45
	M. Vecka	
5.1	Oxylipiny	45
5.1.1	Eikosanoidy	45
5.1.2	Dokosanoidy	48
5.1.3	Oktadekanoidy	48
5.1.4	Jiné oxylipiny	50
5.1.5	Tvorba oxylipinů přímo ve fosfolipidech	50
5.1.6	Neenzymová tvorba oxylipinů	51
5.2	Konjugáty mastných kyselin	52
5.2.1	Amidy mastných kyselin	52
5.2.2	Estery mastných kyselin	53
5.3	Jiné deriváty mastných kyselin	55
6	Mastné kyseliny a arteriální trombóza	59
	A. Žák	
6.1	Arteriální trombóza	59
6.1.1	Význam arteriální trombózy	60
6.1.2	Arteriální trombóza a akutní koronární syndromy	60
6.1.3	Patogenetické faktory arteriální trombózy	61
6.1.4	Rizikové faktory arteriální trombózy	62
6.2	Polynenasycené mastné kyseliny a funkce krevních destiček	62
6.2.1	Eikosanoidy a trombogeneze	64
6.2.2	Polynenasycené mastné kyseliny třídy n-6 a funkce destiček	65
6.2.3	Polynenasycené mastné kyseliny třídy n-3 a funkce destiček	65
7	Mastné kyseliny a zánět	67
	A. Žák	
7.1	Úvod	67
7.2	Definice	67
7.3	Příčiny zánětu a protagonisté zánětlivé reakce	68
7.3.1	Příčiny zánětu	68
7.3.2	Protagonisté zánětlivé reakce	68
7.4	Stadia zánětlivé reakce	69
7.4.1	Aktivace endotelu	69
7.4.2	Interakce molekulárních struktur patogenů (PAMP) a struktur poškozených tkání (DAMP) se složkami vrozené imunity	70
7.4.3	Receptory rozeznávající typické vzory (PRR)	70
7.4.4	Agonisté PRR skupiny PAMP	71
7.4.5	Agonisté PRR skupiny DAMP	71
7.4.6	Aktivace signálních dějů	71
7.4.7	Význam cytokinů v zánětlivých dějích	71
7.4.8	Ukončení a rezoluce zánětu	73

7.5	Postavení lipidových sloučenin v zánětlivých procesech	75
7.5.1	Prozánětlivé lipidové mediátory	75
7.5.2	Protizánětlivé lipidové mediátory	76
7.5.3	Specializované prorezoluční lipidové mediátory	77
8	Mastné kyseliny a obezita	83
	J. Macášek	
8.1	Úvod	83
8.2	Patofyziologie obezity	83
8.3	Příjem mastných kyselin a obezita	84
8.4	Volné mastné kyseliny	84
8.5	Nasycené mastné kyseliny	85
8.6	Mononenasyčené mastné kyseliny	85
8.7	Polynenasycené mastné kyseliny	87
8.8	Kanabinoidy a obezita	89
9	Mastné kyseliny a diabetes mellitus	95
	M. Zeman	
9.1	Úvod	95
9.2	Mastné kyseliny a inzulinová rezistence	95
9.3	Mastné kyseliny a β -buňky Langerhansových ostrůvků	97
9.4	Význam jednotlivých mastných kyselin, epidemiologické údaje, sledování biomarkerů	98
9.4.1	Nasycené mastné kyseliny a mastné kyseliny de novo lipogeneze	100
9.4.2	Kyselina linolová	101
9.4.3	Kyselina dihomog- γ -linolenová	101
9.4.4	Kyselina palmitolejová	102
9.4.5	PUFAn-3	102
9.4.6	Další mastné kyseliny	103
10	Mastné kyseliny a kardiovaskulární onemocnění	109
	M. Zeman	
10.1	Úvod	109
10.2	Nasycené mastné kyseliny	109
10.3	Transmastné kyseliny	110
10.4	Mononenasyčené mastné kyseliny	111
10.5	Takzvaná středomořská dieta	111
10.6	Polynenasycené mastné kyseliny, PUFAn-6, PUFAn-3	111
10.6.1	PUFAn-6	111
10.6.2	PUFAn-3	113
11	Mastné kyseliny a játra	127
	R. Brůha	
11.1	Úvod	127
11.2	Nealkoholová tuková choroba jater	127
11.2.1	Přísun mastných kyselin do jater a jejich distribuce v hepatocytech	129
11.2.2	De novo lipogeneze v játrech	130
11.2.3	Odsun mastných kyselin z hepatocytů	130
11.2.4	Genetická dispozice ke zvýšené akumulaci tuků v játrech	131
11.2.5	Složení mastných kyselin v játrech u MASLD	131
11.2.6	MASLD a střevní mikrobiota	132
11.2.7	Léčba	133

12	Mastné kyseliny a GIT	137
	M. Vecka	
12.1	Absorpce mastných kyselin	137
12.2	Metabolismus mastných kyselin ve střevě	138
12.3	Vliv různých onemocnění na střevní absorpci a metabolismus mastných kyselin	139
12.3.1	Chronická pankreatitida	140
12.3.2	Crohnova choroba	141
12.3.3	Cystická fibróza	141
12.3.4	Potravinové intolerance	142
13	Mastné kyseliny, mozek a neuropsychiatrická onemocnění	145
	M. Zeman	
13.1	Úvod	145
13.2	Polynenasycené mastné kyseliny v mozku plodu a novorozence	146
13.3	Funkce DHA a AA v CNS	149
13.4	Mastné kyseliny u patologických stavů v neuropsychiatrii	152
13.4.1	Alzheimerova demence	152
13.4.2	Depresivní poruchy	155
13.4.3	Bipolární afektivní porucha	156
13.4.4	Schizofrenie	158
13.4.5	Neurodegenerativní onemocnění	159
14	Mastné kyseliny a nádory	169
	J. Macášek	
14.1	Obecný přehled	169
14.2	Odchyly metabolismu mastných kyselin u nádorů a vztah ke kancerogenezi	170
14.3	Mastné kyseliny u nádorové kachexie, úloha PUFA	172
14.4	Mastné kyseliny u vybraných maligních chorob	172
14.4.1	Karcinom pankreatu	172
14.4.2	Kolorektální karcinom	173
14.4.3	Karcinom prostaty	173
14.4.4	Karcinom prsu	175
14.5	Mastné kyseliny a terapie nádorů	179
15	Efekty léčby na metabolismus mastných kyselin	185
	M. Zeman, M. Vecka	
15.1	Hypolipidemika	185
15.1.1	Inhibitory biosyntézy cholesterolu	185
15.1.2	Fibráty	187
15.1.3	Látky interferující se střevní absorpcí cholesterolu	188
15.1.4	Kyselina nikotinová	189
15.2	Antidiabetika	189
15.2.1	Inzulinové senzitizery	189
15.2.2	Inkretiny	194
15.2.3	Glifloziny (inhibitory SGLT2)	195
15.2.4	Inhibitory α -glukosidasy	195
15.2.5	Inzulinová sekretagoga (deriváty sulfonylurey, glinidy)	195
15.3	Vybrané psychotropní látky a mastné kyseliny	196
15.3.1	Antipsychotika	196
15.3.2	Antidepresiva	199

16	Tuky a mastné kyseliny z pohledu výživy	205
	J. Brát	
16.1	Výživová doporučení	205
16.1.1	Výživová doporučení pro tuky	206
16.1.2	Výživová doporučení pro mastné kyseliny	207
16.1.3	Reálný versus doporučený příjem jednotlivých skupin mastných kyselin	210
16.1.4	Zjednodušení výživových doporučení pro spotřebitele	219
16.2	Získávání a zpracování olejů a tuků	230
16.2.1	Lisování, extrakce	230
16.2.2	Rafinace	230
16.2.3	Ztužování	231
16.2.4	Frakcionace	232
16.2.5	Přeesterifikace	233
16.3	Funkční vlastnosti tuků a možnosti jejich ovlivnění	235
16.3.1	Tuky v teplé kuchyni	235
16.3.2	Strukturní tuky	235
16.4	Tuky a legislativa	236
16.4.1	Výživové údaje na obalech potravin	236
16.4.2	Výživová a zdravotní tvrzení pro tuky	237
16.4.3	Regulace transmastných kyselin v potravinách	237
16.5	Co si odnést z této kapitoly	238
17	Charakteristiky nejvýznamnějších tuků a olejů	243
	J. Brát, M. Doležal	
17.1	Běžně používané oleje a tuky	244
17.1.1	Řepkový olej	244
17.1.2	Slunečnicový olej	244
17.1.3	Slunečnicový olej s vysokým obsahem kyseliny olejové (FA 18:1n-9)	245
17.1.4	Olivový olej	245
17.1.5	Mléčný tuk, máslo, ghee	246
17.1.6	Vepřové sádlo	246
17.1.7	Margarín – roztíratelný tuk s obsahem mléčného tuku do 3 %	248
17.1.8	Pokrmový tuk	249
17.2	Oleje a tuky používané v domácnostech okrajově	249
17.2.1	Kokosový tuk	249
17.2.2	Palmový olej a palmojádrový tuk	250
17.2.3	Lněný olej	251
17.2.4	Sójový olej	251
17.2.5	Dýňový olej	252
17.2.6	Konopný olej	252
17.2.7	Sezamový olej	253
17.2.8	Rýžový olej	253
17.2.9	Podzemnicový (arašídový) olej	253
17.2.10	Kukuřičný (klíčkový) olej	254
17.2.11	Olej z vlašských ořechů	254
17.2.12	Olej z lískových ořechů	254
17.2.13	Avokádový olej	255
17.2.14	Mandlový olej	255
17.2.15	Makový olej	255
17.2.16	Pšeničný (klíčkový) olej	256
17.2.17	Kakaové máslo	256

17.2.18	Světlicový olej	257
17.2.19	Olej z ostropestřce	257
17.2.20	Brutnákový olej	257
17.2.21	Pupalkový olej	258
17.2.22	Olej z hroznových jader	258
17.2.23	Makadamiový olej	258
17.2.24	Chia olej	259
17.2.25	Rakytňákový olej	259
17.2.26	Bambucké máslo (máslo shea)	260
17.2.27	Pistáciový olej	260
17.2.28	Olej z ořechů para	260
17.2.29	Olej z ořechů kešu	261
17.2.30	Olej z pekanových ořechů	261
17.2.31	Arganový olej	262
17.2.32	Hadinecový olej	262
17.2.33	Olejníčkový olej	263
17.2.34	Lničkový olej	263
17.2.35	Husí sádlo	263
17.2.36	Kachní sádlo	264
17.2.37	Hovězí lůj	264
17.2.38	Olej z tresčích jater	264
17.2.39	Rybí tuk	265
17.3	Co si odnést z této kapitoly	265
Přílohy		267
M. Vecka		
Příloha 1:	Triviální názvy mastných kyselin	267
Příloha 2:	Ukazatelé metabolismu mastných kyselin	273
P2.1	Analýza exprese genů a obsah mastných kyselin	273
P2.2	Analýza profilu mastných kyselin	273
P2.3	Odvozené parametry metabolismu mastných kyselin	273
P2.4	Klasifikační schémata	276
Nejdůležitější použité zkratky		277
Rejstřík		283
Souhrn		289
Summary		290

ÚVOD

Mastné kyseliny jsou základním stavebním kamenem lipidových sloučenin. I když byly izolovány již na začátku 19. století, stále ještě nejsou známy všechny funkce, které vykonávají v živých organismech. Kromě toho, že mastné kyseliny jsou významnou zásobní formou energie, hrají také důležité strukturální a funkční role. Ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti a tím i funkce buněčných membrán. Vazbou na některé proteiny modulují jejich působení, jsou součástí molekul podílejících se na buněčné signalizaci a jsou také prekuzory širokého spektra biologicky aktivních molekul, které ovlivňují životní funkce v průběhu celého života.

Tato kniha jako první v České republice pojednává problematiku mastných kyselin v celé šíři – od teoretických základů struktury a metabolismu až po uplatnění mastných kyselin v patogenezi závažných onemocnění. Čtenář je informován o uplatnění jednotlivých mastných kyselin v mechanismech zánětu, trombózy, oxidačního stresu, inzulinové rezistence i kancerogeneze a o současném stavu zkoumání možností užití někte-

rých mastných kyselin v prevenci a léčbě kardiometabolických, gastroenterologických, neuropsychiatrických i nádorových onemocnění. Významnou součástí knihy je kapitola informující o postavení mastných kyselin ve výživě. V této kapitole jsou obsaženy informace o nutričních vlastnostech hlavních mastných kyselin a o jejich zastoupení v olejích užívaných v potravinářství a průmyslu. Komentovány jsou zde současné názory na význam složení tuků ve stravě z hlediska prevence závažných onemocnění. Velkým přínosem k porozumění často složité problematice, která je v knize probírána, jsou barevné obrázky a tabulky, jež výrazně zlepšují orientaci čtenáře v textu.

Kniha je určena širokému okruhu čtenářů. Cílem autorů je zaujmout nejen biochemiky, ale i kardiology, diabetology, gastroenterology, neurology a psychiatry, praktické lékaře a další zdravotníky všech oborů. Informace o významu kvality a kvantity tuků ve výživě však jistě najdou svůj okruh čtenářů v řadách široké veřejnosti i mimo zdravotnictví.

1 Klasifikace a vlastnosti mastných kyselin

M. Vecka

Mastné kyseliny patří mezi důležité strukturní součásti lipidů, které spolu s bílkovinami a sacharidy představují základní stavební kameny živých organismů. Moderní klasifikační systém lipidů definuje lipidy jako hydrofobní nebo amfipatické (či amfifilní) molekuly, vzniklé buď karbaniontovou kondenzací thioesterů (např. mastné kyseliny), nebo karbokationtovou kondenzací isoprenových jednotek (např. steroly) (Fahy et al. 2009, Liebisch et al. 2020). Mastné kyseliny patří podle tohoto systému k prvnímu typu lipidů a v něm do třídy odvozené přímo od acylů mastných kyselin (třída FA, fatty acids). Pro strukturu mastné kyseliny je typická přítomnost polární části, karboxylu, a nepolárního řetězce, kde mohou být přítomny hlavně dvojné vazby. Délka řetězce, počet a konfigurace dvojných vazeb jsou parametry, které významně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly mastné kyseliny, a tato variabilita předurčuje mastné kyseliny k různorodému použití v metabolických dějích a k nezastupitelné roli v živočišném organismu. Mastné kyseliny jsou hlavní zásobní formou energie, nezbytnou strukturní součástí membrán a pomocí kovalentní vazby modifikují a regulují vlastnosti mnohých proteinů. Jako součásti některých lipidových signálních molekul hrají důležitou roli v metabolických regulačních kaskádách (Rangan a Smith 2002).

1.1 Nomenklatura mastných kyselin

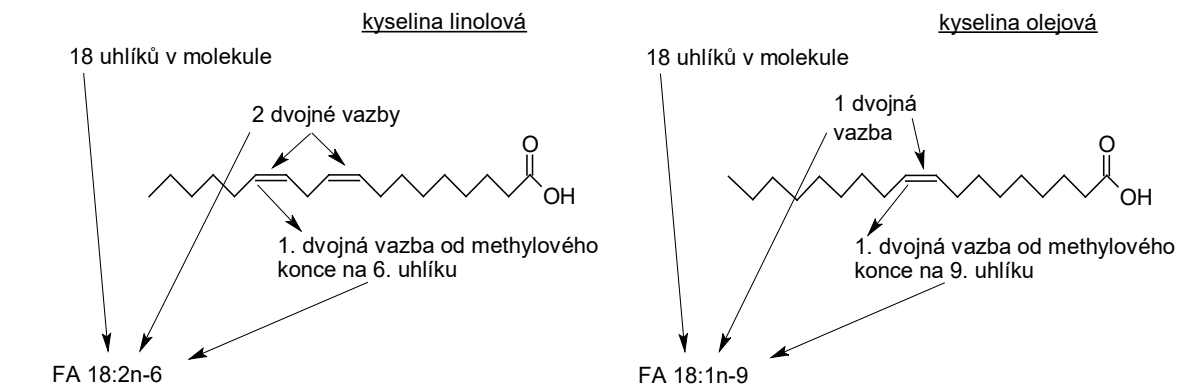
Pojmenování řetězců mastných kyselin pomocí systematického názvosloví je značně nepřehledné, a tak se v literatuře často dává přednost triviálním názvům (tab. 1.1

a tab. P1–4 v příloze 1) (Dijkstra 2021), které mají dlouhou historickou tradici. V praxi se také osvědčilo několik zjednodušujících systémů popisujících strukturu mastné kyseliny:

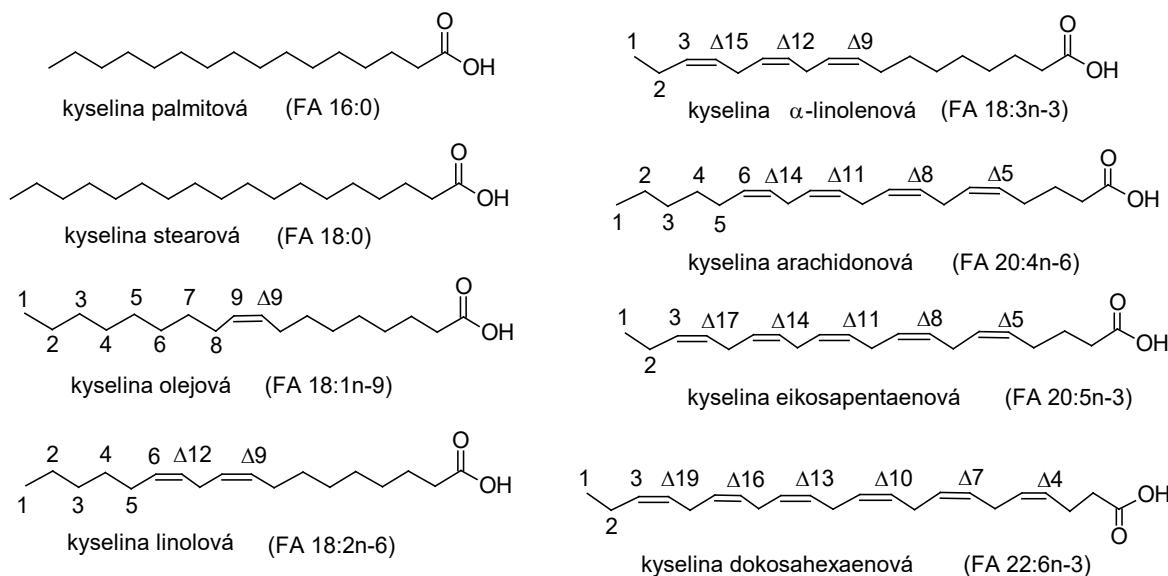
1. Zkrácená notace struktury mastných kyselin ve tvaru C:Nn-x. V tomto systému C představuje počet uhlíků v řetězci, N počet dvojných vazeb, x pozici první dvojně vazby **počítáno od methylového konce**. Tato notace předpokládá, že všechny dvojně vazby mají konfiguraci *cis*- (Z), jsou od sebe odděleny methylenovou skupinou (= mají tzv. pentadienové uspořádání) a na řetězci molekuly nejsou přítomny substituenty (viz obr. 1.1).
2. Zkrácená notace struktury mastných kyselin ve tvaru C:N ω x. Postup a předpoklady jsou stejné jako u systému 1, pouze se místo n- použije ω ; tento postup je historicky starší.

Oba výše zmíněné postupy mají tu výhodu, že usnadňují orientaci v metabolických vztazích mezi mastnými kyselinami (podrobněji viz kapitola 3 Základní metabolismus mastných kyselin), protože poloha první dvojně vazby na methylovém konci se u člověka v rámci klasických metabolických drah nemění. Podle toho můžeme u člověka nenasyčené řetězce mastných kyselin klasifikovat jako zástupce třídy (rodiny) n-11, n-9, n-7 či n-6. Další příklady mastných kyselin viz obr. 1.2.

Pokud nejsou dvojně vazby v orientaci *cis*- (Z), ale *trans*- (E), přidává se na konec notace ještě t. V případě vyššího počtu dvojných vazeb se takto doplní orientace všech dvojných vazeb od karboxylového konce včetně dvojných vazeb v konfiguraci *cis*- (Z), kterým náleží



Obr. 1.1 Použití zkrácené notace



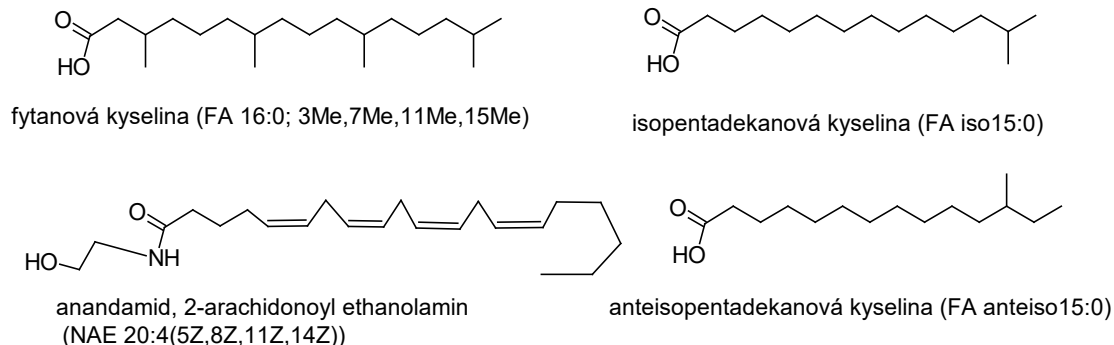
Obr. 1.2 Strukturní vzorce některých mastných kyselin. Na obrázku je naznačen postup číslování podle zkrácené notace oproti číslování řetězců vycházejícího z IUPAC nomenklatury (čísla po symbolu Δ)

zkratka c (např. 18:1n-9t, 18:2n-6cc, 18:2n-6ct, 18:2n-6tc, 18:2n-6tt). Někdy můžeme v literatuře narazit i na zkrácenou notaci začínající na velké C nebo FA, takže kyselina stearová se popíše jako C18:0 nebo FA 18:0 (vedle 18:0). V dalším textu se budeme držet notace začínající identifikátorem FA.

3. Jestliže na popis struktury mastné kyseliny nestačí výše zmíněné přístupy, můžeme narazit i na další systémy (které však nejsou v literatuře příliš konzistentní). V klinické praxi se s takovými strukturami mastných kyselin setkáváme vzácně; pro představu uvádíme jen nejběžnější systémy, jež využívají výhod zkrácené notace (ad body 1. a 2.) a používají se pro popis struktur pomocí hmotnostní spektrometrie

(Liebisch et al. 2020) nebo i jiných analytických metod (Dijkstra 2021).

- V případě, že je porušen předpoklad oddělení dvojných vazeb methylenovou skupinou, musí se pozice všech dvojných vazeb naznačit číselnými lokanty. Ty respektují názvoslovný systém IUPAC, tedy počítají uhlíky **od karboxylového konce**, např. FA 18:3 9c11t13c nebo FA 18:3 D9c11t13c, případně FA 18:3D^{9c11t13c} nebo FA 18:3 (9Z,11E,13Z).
- Pokud jsou přítomny další substituenty na řetězci mastné kyseliny, naznačuje se struktura připojované struktury zkratkami. Existují ustálené zkratky pro jednoduché řetězce, často se vychází z názvosloví organické chemie. Použí-

**Obr. 1.3** Netradiční mastné kyseliny**Tab. 1.1** Nejběžnější mastné kyseliny s dlouhým řetězcem

Označení	Systematický název podle IUPAC	Triviální název**	Zkratka
FA 14:0	tetradekanová kyselina	kyselina myristová	
FA 16:0	hexadekanová kyselina	kyselina palmitová	
FA 16:1n-7	(9Z)-hexadec-9-enová kyselina	kyselina palmitolejová	POA
FA 18:0	oktadekanová kyselina	kyselina stearová	SA
FA 18:1n-9t	(9E)-oktadec-9-enová kyselina	kyselina elaidová	
FA 18:1n-7t	(11E)-oktadec-11-enová kyselina	kyselina vakcenová	(VA)
FA 18:1n-9	(9Z)-oktadec-9-enová kyselina	kyselina olejová	OA
FA 18:1n-7	(11Z)-oktadec-11-enová kyselina	kyselina <i>cis</i> -vakcenová	cVA
FA 18:2n-6	(9Z,12Z)-oktadeca-9,12-dienová kyselina	kyselina linolová	LA
FA 18:3n-6	(6Z,9Z,12Z)-oktadeca-6,9,12-trienová kyselina	kyselina γ -linolenová	GLA
FA 18:3n-3	(9Z,12Z,15Z)-oktadeca-9,12,15-trienová kyselina	kyselina α -linolenová	ALA
FA 18:4n-3	(6Z,9Z,12Z,15Z)-oktadeca-6,9,12,15-tetraenová kyselina	kyselina stearidonová	(STA)
FA 20:0	ikosanová kyselina*	kyselina arachidová	(ARA)
FA 20:3n-9	(5Z,8Z,11Z)-ikosa-5,8,11-trienová kyselina	kyselina Meadova	(MEA)
FA 20:3n-6	(8Z,11Z,14Z)-ikosa-8,11,14-trienová kyselina	kyselina dihomo- γ -linolenová	DHGLA
FA 20:4n-6	(5Z,8Z,11Z,14Z)-ikosa-5,8,11,14-tetraenová kyselina	kyselina arachidonová	AA
FA 20:5n-3	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-ikosa-5,8,11,14,17-pentaenová kyselina	kyselina eikosapentaenová/timnodonová	EPA
FA 22:0	dokosanová kyselina	kyselina behenová	
FA 22:1n-9	(13Z)-dokosa-13-enová kyselina	kyselina eruková	(EA)
FA 22:4n-6	(7Z,10Z,13Z,16Z)-dokosa-7,10,13,16-tetraenová kyselina	kyselina adrenová	(ADA)
FA 22:5n-3	(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokosa-7,10,13,16,19-pentaenová kyselina	kyselina klupanodonová***	DPA-3
FA 22:5n-6	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-dokosa-4,7,10,13,16-pentaenová kyselina	kyselina Osbondova	DPA-6
FA 22:6n-3	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokosa-4,7,10,13,16,19-hexaenová kyselina	kyselina cervonová	DHA
FA 24:1n-9	(15Z)-tetrakosa-15-enová kyselina	kyselina nervonová	(NA)

* Správná předpona pro dvacetihlíkový skelet je ikosa-. Tvar eikosa- přetrvává z historických důvodů v termínech např. pro eikosanoidy nebo eikosapentaenovou kyselinu (viz dále a kapitola 3 Základní metabolismus mastných kyselin). V dalším textu se budeme držet těchto zavedených termínů.

** Úplnější přehled triviálních názvů mastných kyselin viz příloha 1.

*** Někdy se užívá název klupadonová.

vají se i předpony *iso*-, *anteiso*-, případně i jejich zkratky (a, i) pro připojení methylové skupiny na druhý uhlík (v případě předpony *iso*-) nebo na třetí uhlík (v případě předpony *anteiso*-) od methylového konce (v obou předchozích případech se uhlík methylové skupiny počítá do názvoslovného kmene). Další významné substituenty zahrnují různé hydroxy-, oxo-, amino- a další skupiny (viz obr. 1.3).

Podle délky řetězce se mastné kyseliny rozdělují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, short-chain fatty acids) obsahující v molekule 2–5 uhlíků, mastné kyseliny se středním řetězcem (MCFA, medium-chain fatty acids) s 6–11 uhlíky, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA, long-chain fatty acids) s 12–21/22 uhlíky a mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA, very long-chain fatty acids) obsahující řetězce s více než 21/22 uhlíky. Podle stupně nenasycenosti řetězce rozlišujeme nasycené mastné kyseliny (SFA, saturated fatty acids), řetězce s jednou dvojnou vazbou neboli mononenasycené mastné kyseliny (MUFA, monounsaturated fatty acids) nebo řetězce s více dvojnými vazbami čili polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, polyunsaturated fatty acids).

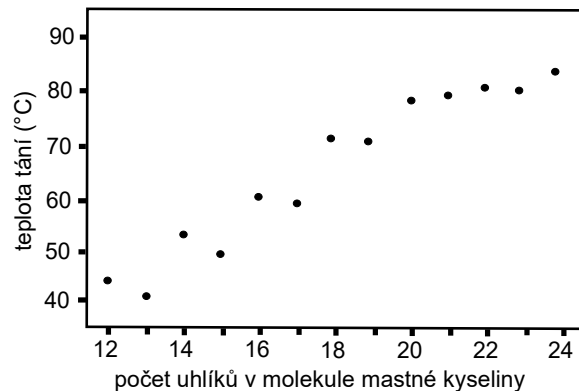
1.2 Vlastnosti mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou v živém organismu přítomny ve volné (neesterifikované) formě jen zřídka, proto fyzikální vlastnosti přesně definovaných molekul mastných kyselin jenom zčásti přibližují fyzikální vlastnosti přírodních matric. V jednodušším přiblížení můžeme na tyto matrice nahlížet jako na směsi glycerolipidů (v případě různých tuků/olejů), ve složitějších matricích jsou zastoupeny i jiné lipidové třídy (vzpomeňme na molekuly glycerofosfolipidů nebo sfingolipidů v biologických membránách). Klinicky důležité fyzikálně-chemické vlastnosti mastných kyselin zahrnují hlavně bod tání, rozpustnost a náchylnost k oxidačním změnám. Úroveň střešní absorpce mastných kyselin úzce souvisí s těmito charakteristikami (McKimmie et al. 2013).

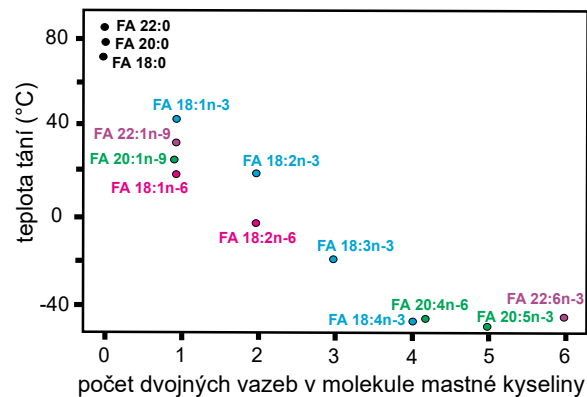
Bod tání

Řetězce mastných kyselin ve fosfolipidech hrají důležitou roli při zachování optimální fluidity membrán. Re-modelace savčích membrán (včetně změn zastoupení

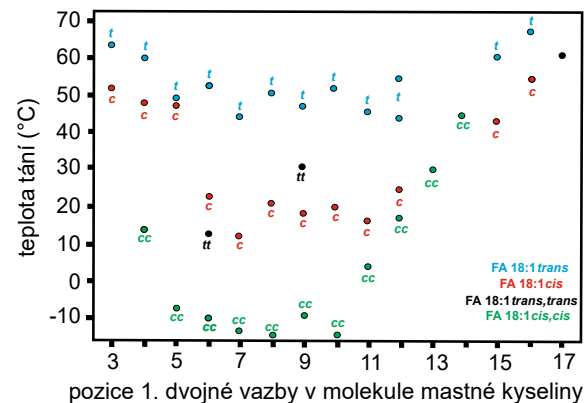
dvojných vazeb a délek acylů mastných kyselin) je důsledkem vlivu nutriční nebo požadavků na funkci membrány (Ernst et al. 2018). Obecně se bod tání mastné kyseliny zvyšuje s délkou řetězce (u řetězců s lichým počtem uhlíků jsou většinou teploty tání nižší) a sni-



Obr. 1.4a Body tání nasycených mastných kyselin



Obr. 1.4b Body tání nenasycených mastných kyselin



Obr. 1.4c Body tání mastných kyselin s 18 uhlíky

žuje s přibývajícím počtem dvojných vazeb (obr. 1.4a, b). Největší vliv mají dvojné vazby uprostřed řetězce, *trans*-orientace dvojných vazeb teplotu tání zvyšuje, jak je patrné z obrázku 1.4c (Gunstone et al. 2007).

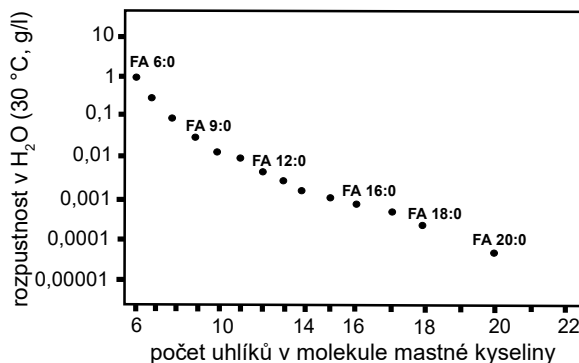
Body tání volných nasycených mastných kyselin a jejich triacylglycerolů se příliš neliší, pro mononenasycené FA se tento rozdíl pohybuje v řádu 10 °C (Knothe a Dunn 2009). Tato vlastnost se dá poměrně dobře extrapolovat i na složité směsi triacylglycerolů (oleje) podle zastoupení SFA/MUFA/PUFA (Fasina et al. 2008).

Rozpustnost ve vodě

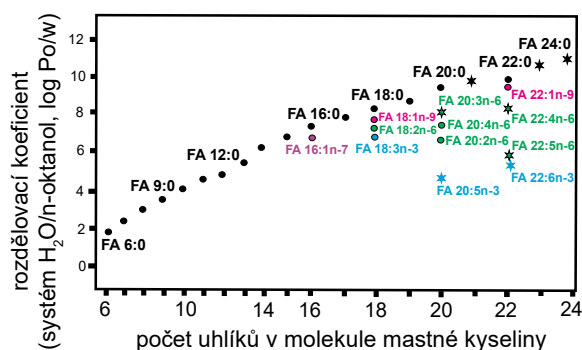
Rozpustnost mastných kyselin v polární fázi při neutrálním pH úzce souvisí se schopností organismu tyto molekuly absorbovat a transportovat. Krátké mastné kyseliny jsou ve vodě rozpustné, kdežto delší řetězce mastných kyselin rozpouštění ve vodě brání (obr. 1.5a). Farmakologicky důležitý parametr popisující rozpustnost v soustavě nepolárního/polárního rozpouštědla, rozdělovací koeficient pro systém *n*-oktanol/voda, je pro mnoho mastných kyselin také znám (obr. 1.5b) (Bavafa et al. 2011).

Odolnost vůči oxidaci

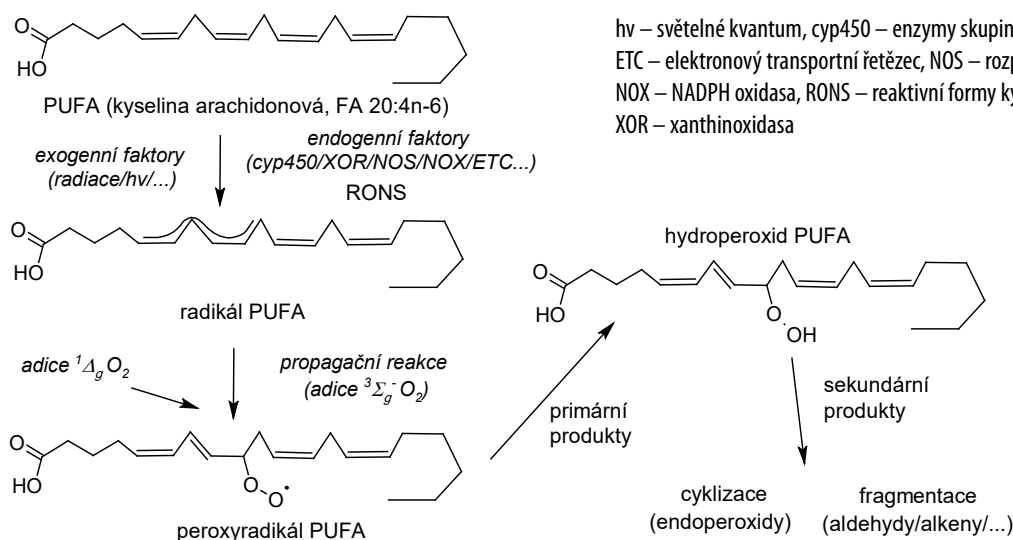
Odolnost vůči oxidaci je další důležitá vlastnost řetězců mastných kyselin. Obecně nasycené řetězce odolávají oxidačním změnám velmi dobře a za mírných podmínek jsou považovány za stálé, např. poměry různých oxidačních produktů k nasyceným mastným kyselinám se používají jako indikátory stárnutí olejů (Modugno



Obr. 1.5a Rozpustnost nasycených mastných kyselin



Obr. 1.5b Rozdělovací koeficient FA podle Ralston (1942); údaje pro kyseliny s řetězcem delším než 14 uhlíků jsou horním odhadem hodnot vyjádřených hvězdičkami a jsou vypočteny na základě kvantověchemických aproximací (Bavafa 2011)



Obr. 1.6 Počáteční fáze oxidace nenasycených mastných kyselin. Na obrázku je naznačena pouze jedna možnost tvorby hydroperoxidu z kyseliny arachidonové

et al. 2019, Manzano et al. 2011). Přítomnost dvojných vazeb zvyšuje náchylnost řetězce masné kyseliny k oxidačním změnám, což je zvláště patrné u dvojných vazeb v pentadienovém uspořádání, kde je vodík methylenové skupiny snadno abstrahován radikály a vzniká rezonančně stabilizovaný radikál (obr. 1.6). Další osud tohoto radikálu závisí na mnoha faktorech, zejména intramolekulární pozici a uspořádání dalších dvojných vazeb vůči uhlíku nesoucímu nepárový elektron, dále na koncentraci a vlastnostech dalších látek v matici.

Ve vodném prostředí, kde jsou masné kyseliny součástí micelárních struktur, není vztah mezi počtem dvojných vazeb a náchylností k oxidaci čistě lineární. Řetězce EPA a DHA (zástupci PUFAn-3) jsou v tomto prostředí stabilnější než LA i AA (patřící do PUFAn-6), protože zaujímají výhodnější konformace bránící dalšímu šíření oxidačních změn. Dietní suplementace PUFAn-6 náchylnost částic LDL k oxidaci zvyšuje, kdežto přidávání PUFAn-3 nemá na oxidaci LDL-částic jasný efekt (Ghnimi et al. 2018, Miyashita 2014). Pokusy *in vitro* naznačují, že EPA lépe než DHA inhibuje oxidaci LDL-částic (Sheratt et al. 2020), a má tak od určitých koncentrací příznivý vliv na vlastnosti membrán, což mimo jiné stojí za úspěchy suplementace EPA v prevenci kardiovaskulárních onemocnění (O'Connell et al. 2020 a též kapitola 10 Masné kyseliny a kardiovaskulární onemocnění).

K zapamatování:

- Masné kyseliny patří mezi důležité stavební složky biologických membrán, hrají významnou roli v mnoha metabolických dějích.
- Názvosloví mastných kyselin často vychází z triviálních pojmenování; v současné době se používá i zkrácená notace ve formátu C:Nn-x, kde C představuje počet uhlíků v řetězci, N počet dvojných vazeb, x pozici první dvojně vazby počítáno od methylového konce.
- Podle počtu uhlíků v molekule se masné kyseliny dělí na masné kyseliny s řetězcem krátkým (2–5 uhlíků), středně dlouhým (6–11 uhlíků), dlouhým (12–21/22 uhlíků) a velmi dlouhým (nad 21/22 uhlíků).
- Podle počtu dvojných vazeb se masné kyseliny rozdělují na nasycené (bez dvojně vazby), mononenasycené (jedna dvojná vazba) a polynenasycené (dvě a více dvojných vazeb).
- Struktura masné kyseliny má významný vliv na její fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou rozpustnost, bod tání (vyšší délka řetězce snižuje polaritu molekuly a zvyšuje bod tání) nebo odolnost vůči oxidaci (dvojně vazby zvyšují náchylnost vůči oxidaci).

Literatura ke kapitole 1

- Bavafa S, Mahboubi M, Behjatmanesh Ardakani R, et al.: Quantitative structure-property relationship (QSPR) study of octanol-water partition coefficients (logPo/w) of fatty acids using multiple linear regression (MLR). *Ovidius Univ Anna Chem* 2011; 22: 79–86.
- Dijkstra AJ: *Trivial names of fatty acids – Part 1*. <https://lipid-library.aocs.org/resource-material/trivial-names-of-fatty-acids-part-1>. Datum přístupu 8. 3. 2021.
- Ernst R, Ballweg S, Levental I: Cellular mechanisms of physicochemical membrane homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 2018; 53: 44–51.
- Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al.: Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2005; 50 (Suppl): S9–S14.
- Fasina OO, Craig-Schmidt M, Colley Z, et al.: Predicting melting characteristics of vegetable oils from fatty acid composition. *LWT* 2008; 41: 1501–1505.
- Ghnimi S, Budilarto E, Kamal-Eldin A: The New Paradigm for Lipid Oxidation and Insights to Microencapsulation of Omega-3 Fatty Acids. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 2018; 16: 1206–1218.
- Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (Eds.) *The Lipid Handbook*. 3rd Ed. Boca Raton, FL USA, CRC Press 2007 Index.
- Knothe G, Dunn RO: A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. *J Am Oil Chem Soc* 2009; 86: 843–856.
- Liebisch G, Fahy E, Aoki J, et al.: Update on LIPD MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res* 2020; 61: 1539–1555.
- Manzano E, Rodriguez-Simon LR, Navas N, et al.: Study of the GC-MS determination of the palmitic-stearic ratio for the characterization of drying oil painting: La Encarnación by Alonso Cano as a case study. *Talanta* 2011; 84: 1148–1154.
- McKimmie RL, Easter L, Weinberg RB: Acyl chain length, saturation, and hydrophobicity modulate the efficiency of dietary fatty acid absorption in adult humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305: G620–G627.
- Miyashita K: Paradox of omega-3 PUFA oxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 2014; 116: 1268–1279.
- Modugno F, Di Gianvincenzo F, Degano I, et al.: On the influence of relative humidity on the oxidation of fresh and aged oil paints. *Sci Rep* 2019; 9: 5533.
- O'Connell TD, Mason RP, Budoff MJ, et al.: Mechanistic insights into cardiovascular protection for omega-3 fatty acids and their bioactive lipid metabolites. *Eur Heart J* 2020; 22 (Suppl J): J3–J20.

- Properties of fatty acids and their methyl esters. In: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 97th Ed. (Haynes WM Eds.) Boca Raton, FL USA, CRC Press 2017, Section 7-7.
- Ralston AW, Hoerr CW: The solubilities of the normal saturated fatty acids. *J Org Chem* 1943; 7: 546–555.
- Rangan VS, Smith S: Fatty acid synthesis in eucaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th Ed. (Vance DE, Vance JE Eds.), Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V. 2002, p. 151–179.
- Sheratt SCR, Juliano RA, Mason RP: Eicosapentaenoic acid (EPA) has optimal length and degree of unsaturation to inhibit oxidation of small dense LDL and membrane cholesterol domains as compared to related fatty acids in vitro. *BBA – Biomembranes* 2020; 1862: 183254.

2 Analýza mastných kyselin

E. Tvrzická

V přírodě se vyskytuje velké množství mastných kyselin (FA), jen v lidské plazmě jich bylo identifikováno okolo 60. Mají většinou rovný řetězec se sudým počtem atomů C a dvojnými vazbami v pentadienovém uspořádání, převážně v konfiguraci *cis*-; obecně jsou značeny CN:Pn-x, kde CN je celkový počet atomů C, P počet dvojných vazeb, x poloha první dvojný vazby od methylového konce. Pro různé metabolické studie jsou obvykle stanovovány pouze ty FA, které v metabolismu hrají významnou roli (obvykle pouze sudé s 12–22 uhlíky). Důležitost těchto analýz dokládá skutečnost, že dosud bylo publikováno více než 250 000 analýz v oblasti medicíny, biologie, potravinářství a dalších.

Analýza profilu FA v biologickém materiálu (zde především v lipidech krevního séra, membránách krevních buněk, tukové tkáni) a dále v potravinách a doplňcích stravy je nejčastěji realizována metodami plynové chromatografie (GLC) s plamenioionizační detekcí (FID) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV detekcí. Pro GLC jsou FA převáděny nejčastěji na methylestery za alkalické či kyselé katalýzy (např. methoxid sodný, fluorid boritý, acetylchlorid, methyl chloroformát, kyselina sírová); pro HPLC jsou derivatizovány chromofory k detekci UV (např. fenacylbromid, 2-bromo-2'-acetonafon, 2-nitrofenylhydrazin, dibromoacetofenon, 1-naftylamin) nebo fluorescenční (např. panacylbromid, 9-anthryldiazomethan, 9-(2-hydroxyethyl)-karbazol, 9-bromomethylakridin, 3-bromoacetyl-7-methoxykumarin).

Nejdokonalějším systémem je spojení GLC nebo HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí, avšak vysoké pořizovací náklady aparatury jsou pro širší vy-

užití v rozsáhlých studiích limitujícím faktorem. Tyto metody byly v nedávné době přehledně zpracovány (Chiu a Kuo 2020).

Pro GLC stanovení jsou používány kolony střední, resp. vysoké polarit (25–30 m, resp. 50–100 m). U středně polárních kolon je pořadí eluce (retenční čas, RT) určeno délkou řetězce a stoupajícím počtem dvojných vazeb ($RT_{FA\ 18:4n-3} < RT_{FA\ 20:0}$). Jejich poměrně vysoký teplotní limit umožňuje i eluci sterolů při analýze sterolesterů, nelze však oddělit isomery v konfiguraci *trans*-. Ty mohou být analyzovány na velmi polárních kolonách, které mají nižší teplotní limit, *trans*- isomery jsou eluovány před příslušnými *cis*- isomery, pro stejný CN roste RT s počtem dvojných vazeb, ale pořadí eluce je ovlivněné ještě dalšími faktory ($RT_{FA\ 20:0} < RT_{FA\ 18:3n-3}$). Analýzy HPLC mohou být isokratické nebo gradientové, pro mobilní fázi (MF) jsou používány směsi methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, kyselina octová. Pořadí eluce je výrazně odlišné – *cis*- isomery jsou eluovány před odpovídajícími *trans*- isomery, při stejném CN jsou FA eluovány podle klesajícího počtu dvojných vazeb ($RT_{FA\ 20:5n-3} < RT_{FA\ 14:0}$).

Obě metody, GLC i HPLC, mají specifické výhody i nevýhody. Pro GLC je nastříkované množství v řádu ng-μg, pro HPLC μg-mg. Plyn představuje ekologickou a dokonale reprodukovatelnou mobilní fázi oproti organickým rozpouštědlům. Nástřik za studena přímo na kolonu (cold on-column) v GLC nezpůsobuje ztráty těkavějších složek ve srovnání s nástřikem do vyhřívaného injektoru. Díky moderním aparaturám je zajištěna dobrá reprodukovatelnost teplotního programu při GLC, stejně jako reprodukovatelnost gradientu mobilní

fáze u HPLC. Při chromatografickém procesu dochází u obou metod ke kontaminaci stacionární fáze jednak rozkladnými produkty vzorku, jednak samotnou mobilní fází, což vede ke změnám v dělení i kvantitativní odezvy jednotlivých složek. U GLC lze problém řešit použitím předkolony, která je v průběhu životnosti měněna, případně odříznutím části kolony s viditelnými depozity. U HPLC lze rovněž po určitou dobu vyměňovat předkolony, pak následuje částečná výměna náplně kolony. U obou metod platí, že linearitu kalibrační závislosti odezvy detektoru na nastříkovaném množství jednotlivých složek je třeba pro každý systém individuálně určit a v průběhu životnosti kolony kontrolovat. Obsah složek bývá většinou stanovován jako molární procento, méně často je určován absolutně metodou vnitřního standardu.

Tato kapitola je součástí rozsáhlé publikace o složení FA a jeho změnách za různých patofyziologických stavů – v důsledku onemocnění, léčby, výživy a dalších faktorů; proto se budeme zabývat především metodou, která byla v těchto studiích využita, tj. metodou GLC-FID.

2.1 Historie

V roce 2022 uplynulo již 70 let od doby, kdy James a Martin (1952) publikovali první práci o separaci nederivatizovaných mastných kyselin s krátkým až středním řetězcem (C2–C11) plynovou chromatografií. Po čtyřech letech publikovali titíž autoři (James a Martin, 1956) separaci mastných kyselin s dlouhým řetězcem (C12–C18) ve formě methylesterů. Tato metoda se ukázala jako nejvýhodnější a je používána dodnes.

Stejně jako u každé nové metody i u plynové chromatografie bylo nezbytné překonat řadu obtíží. Především to byly ztráty jednotlivých složek vzorku, ke kterým docházelo ve všech třech částech aparatury – v injektoru, koloně i detektoru. Dalším závažným problémem byly možnosti integrace – na základě manuálního měření se plocha vrcholu (peaku) vypočetla jako součin výšky a šířky v její polovině. Nulovou linií bylo rovněž nutné prokládat manuálně. Za těchto podmínek bylo třeba vztahovat naměřené hodnoty ploch peaků ke známému množství vnitřního standardu na základě kalibrace, jak bude zmíněno dále. Technický pokrok za posledních 70 let udělal tak obrovský skok, že dnes jsou tyto způsoby práce jen těžko uvěřitelné; přesto stále ještě žijí jejich pamětníci.

2.2 Vývoj aparatury

2.2.1 Injekční techniky

Úlohou vyhřívaného injektoru je převést nastříkovaný vzorek v organickém rozpouštědle do plynné formy. V případě mastných kyselin to znamená do formy aerosolu, protože u většiny z nich je bod varu totožný s teplotou rozkladu. První injektory byly kovové a do značné míry katalyzovaly pyrolytický rozklad vzorku. Na počátku 60. let se začaly vybavovat inertními vložkami z křemene nebo speciálně upraveného skla, a ztráty nenasyčených mastných kyselin tak byly způsobeny isothermálním chromatografickým procesem na náplňových kolonách (Gerson et al. 1966). Vliv injekční techniky na odezvu detektoru popsali detailně Grob a Grob (1969). Vývoj kapilárních kolon byl doprovázen zaváděním nových injekčních systémů, které měly zajistit kvantitativní odezvu jednotlivých složek lišících se těkavostí (Grob a Grob 1978). Nejlepší technikou je nástřik na kolonu za studena, tzv. cold on-column injektor, který vylučuje jakoukoli diskriminaci nenasyčených složek během nástřiku (Grob a Grob 1978, Badings a De Jong 1983). Nevýhodou této techniky je nutnost nízké počáteční teploty termostatu (cca 30 °C), což lze obejít zavedením tzv. pohyblivého „on-column“ injektoru. Injekční systém bez rozpouštědla, nazývaný též pevný injektor nebo injektor s pohyblivou jehlou (van den Berg a Cox 1972, Sisfontes et al. 1981) má výhodu snadné údržby, pro analýzu FAME (fatty acids methyl esters) však není výhodný (Al Makdessi et al. 1986).

Nejčastěji je pro analýzu FAME používán vyhřívaný injektor typu „split-splitless“, přičemž forma splitless je méně diskriminující pro složky lišící se značně hodnotou bodu varu; optimalizací všech parametrů klasického nástřiku „split“ lze diskriminaci prakticky vyloučit (Bannon et al. 1987). Kombinaci všech zmíněných injekčních technik umožňuje injektor s programovanou teplotou odpařování (Eder et al. 1991), který je však k analýze FAME využíván jen zřídka (Eder et al. 1992).

2.2.2 Kolony

První analýzy FAME byly realizovány na náplňových kolonách, což byly kovové nebo skleněné trubice o délce 1–3 m a vnitřním průměru 2–4 mm. Pro tyto kolony byly charakteristické ztráty odezvy detektoru, které rostly se stoupajícím CN a stupněm desaturace a mu-

sely být kompenzovány korekčními faktory (response correction factors, RCF) (Gerson et al. 1966, Ackman et al. 1963, Ackman et al. 1964). Počátkem 70. let byly náplňové kolony postupně nahrazovány kapilárními se širokým (wide-bore, 0,7–1 mm) a úzkým vnitřním průměrem (narrow-bore, 0,1–0,3 mm). Kolony byly zhotoveny ze skla nebo křemene, byly dlouhé 15–100 m a uvnitř byly pokryty chemicky vázanou stacionární fází o různé polaritě.

Pro analýzu FA v biologických vzorcích nejsou vhodné nepolární stacionární fáze (komerční značení CP-Sil 5, CP-Sil 8, DB-1, DB-5, OV-1, OV-101, SE 30, SP-2100, SPB-1, SPB-5). Pořadí eluce na těchto fázích reflektuje bod varu jednotlivých složek; nenasycené složky jsou eluovány před nasycenými a špatně jsou rozlišeny polohové isomery, především u MUFA (Bakkeren et al. 1984). Nejčastěji se používají kolony o střední polaritě (komerční značení CP-WAX 52, CP-WAX 58, Carbowax 20M, DB-225, DB-1701, DB-WAX, DB-FFAP, OV-225, SP-2300). Pořadí eluce je dáno především délkou uhlíkového řetězce a teprve na druhém místě stupněm desaturace. Pro hodnocení je toto pořadí velmi výhodné, protože FAME se čtyřmi až pěti dvojnými vazbami jsou eluovány před nasycenými FAME s řetězcem o dva uhlíky delším, tj. kyselina stearidonová (FA 18:4n-3) je eluována před arachovou (FA 20:0), eikosapentaenová kyselina (FA 20:5n-3) před behenovou (FA 22:0) a dokosapentaenová kyselina (FA 22:5n-3) před kyselinou lignocerovou (FA 24:0). Dokosahexaenová kyselina (FA 22:6n-3), jedna z nejdůležitějších kyselin z rodiny n-3, je eluována mezi FA 24:0 a kyselinou nervonovou (FA 24:1n-9) s rozdělením až k nulové linii. Polynenasycené FA (PUFA) skupiny n-6 jsou eluovány před PUFA n-3 se stejným CN a počtem dvojných vazeb (Beaumelle a Vial 1986). Kolony s vysoce polární stacionární fází (komerční označení CP-Sil 88, OV-275, SP-2330, SP-2340) jsou používány k separaci geometrických (*cis-trans*) isomerů. Tyto kolony bývají dlouhé 50–100 m, ale pro uspokojivé rozdělení *cis-trans* isomerů 18:1 bývá někdy nutné předchozí rozdělení preparativní tenkovrstevnou chromatografií (TLC, thin layer chromatography) na silikagelu impregnovaném roztokem dusičnanu stříbrného (argentnitratová chromatografie) (Ratnayke 1998).

2.2.3 Detekce

Spojení plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí je tím nejlepším k analýze vzorků, které obsahují neobvyklé mastné kyseliny (Coombe et al.

1985, Caruso et al. 1991, Bizzozero et al. 1991), ale vysoká pořizovací cena je důvodem pro častější využití podstatně levnějšího plamenioionizačního detektoru (FID, flame ionization detector). Počátkem 70. let byly k analýze FAME používány i detektory založené na tepelné vodivosti (TCD, thermal conductivity detector), které poskytovaly výsledky srovnatelné s FID (Herb a Martin 1970, Watanabe et al. 1973), posléze však bylo nalezeno jejich vhodnější využití k analýze plyných směsí.

Optimalizací operačních podmínek plamenioionizačního detektoru, především průtoku vodíku, lze rozšířit rozsah lineární odezvy a dosáhnout tak zlepšení kvantitativních výsledků (Albertyn et al. 1982). Adjustace systému tak, aby bylo dosaženo správné odezvy detektoru pomocí teoretických RF (Ackman a Sipos 1964), je správnější než aplikace RCF pro korekci systémových chyb (Albertyn et al. 1982).

Za podmínek isotermální analýzy bylo prakticky nemožné detekovat FA s velmi dlouhým řetězcem (Iversen 1970). Optimalizace teplotního programu, často několikastupňového proloženého isotermálními úseky, dovoluje uspokojivé rozdělení všech sledovaných složek v „rozumném“ čase (do 60 minut). Kritický pár, jehož zhoršené dělení signalizuje nutnost pozměnit teplotní program, vyměnit předkolonu nebo odstranit kontaminovanou počáteční část kolony, představují pro analýzu FAME v biologických vzorcích obvykle kyseliny palmitolejová (FA 16:1n-7) a Δ^7 hexadecenová (FA 16:1n-9).

2.3 Kvalitativní analýza

Využití retenčních dat pro kvalitativní analýzu bylo publikováno spolu se zavedením metody GC (James a Martin 1952). Systém retenčních indexů je založen na lineární závislosti mezi logaritmem retenčního objemu a CN homologů za daných chromatografických podmínek. V roce 1958 Kováts publikoval tento vztah, známý jako Kovátsovy retenční indexy. O rok později byl tento vztah modifikován pro homologní série FAME lišící se stoupajícím stupněm desaturace (James 1959). Retenční objemy byly nahrazeny adjustovanými retenčními časy (Ettre 1964) a pro programovaný teplotní program elučními teplotami (Van den Dool a Kratz 1963). Teplotní závislost retenčních indexů definovali Takács se spolupracovníky v roce 1972 (Takács et al. 1972). Pro běžnou praxi je výhodnější používat hodnoty ekvivalentní délky řetězce (ECL) než klasické Kovátsovy indexy (Miwa et

al. 1960). Ty jsou za podmínek teplotního programu vypočteny z rovnice:

$$ECL = (RT_x - RT_n) / (RT_{n+1} - RT_n) + n$$

kde index x přísluší sledované složce, indexy n a $n+1$ standardům (obvykle nasyceným homologům s rovným řetězcem) eluovaným před složkou x a po ní. Ekvivalentní délky řetězce pro FAME na různých stacionárních fázích studovali Ackman a Hooper (1973), Ackman et al. (1974), Sébédio a Ackman (1982). Pro velké rutinní série, kde jednotlivé složky již byly identifikovány, je výhodnější používat parametr relativní retenční čas (RRT), vypočtený jako prostý poměr nekorigovaných retenčních časů sledovaných složek a vnitřního standardu. Integrovační software (SW) poskytuje automatický výpočet RRT, je však třeba počítat s tím, že tento parametr se mění se stárnutím kolony a musí být podle potřeby aktualizován. Nejmodernější SW umožňují velmi snadnou identifikaci stanovovaných složek superpozicí chromatogramu měřeného a kontrolního vzorku, který je aktualizován v každé měřené sérii.

2.4 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza metodou GLC-FID je založena na vztahu mezi hmotou „efektivního uhlíku“ a odezvou detektoru. Efektivním uhlíkem pro FAME je míněna hmotnost uhlíkových atomů v methylenových skupinách, ne však uhlíku v karboxylové skupině. Kvantifikace jednotlivých FA je založena na srovnání ploch jejich peaků, A_p , a ploch peaku vnitřního standardu (IS), A_{is} . Jako IS je obvykle používána FA s lichým počtem atomů uhlíku, která není přítomna ve zkoumaném biologickém vzorku. Pro analýzu FAME v krvi a dalších biologických vzorcích jsou to nejčastěji kyseliny heptadekanová (FA 17:0) (Eder et al. 1991, Eder et al. 1992, Bannon et al. 1986, Muskiet et al. 1983, Ohta et al. 1990) a nonadekanová (FA 19:0) (Beaumelle a Vial 1986, Taylor et al. 1987, Sattler et al. 1996). Někteří autoři použili ke stanovení polynenasycených FA (PUFA) v krevním séru kyselinu dokosatrienovou (FA 22:3n-3) (Ohta et al. 1990, Liebich et al. 1991), Shantha a Ackman (1990) pro analýzu rybích olejů kyselinu trikosanovou (FA 23:0) a tetrakosenovou (FA 24:1n-9). S rostoucím rozdílem CN vzrůstá i hodnota relativní standardní odchylky (RSD), což bývá kompenzováno použitím několika IS

(van der Steege et al. 1987, Eder et al. 1991). Platnost hodnot teoretické relativní odezvy (RRF, Ackman a Sipos 1964) potvrdili Bannon se spolupracovníky (1986) analýzou PUFA před hydrogenací a po ní a dále Eder se spolupracovníky (1991) srovnáním různých injekčních technik. V **tabulce 2.1** jsou uvedeny teoretické hodnoty RRF pro FAME CN 8-24, vypočtené jako poměr váhového procenta aktivních atomů uhlíku jednotlivých složek vztažených ke 4 referenčním FAME (FA 17:0, FA 18:0, FA 19:0, FA 21:0).

Výsledky složení FA, získané měřením na kapilárních kolonách, byly po dlouhou dobu vyjadřované jako molární procento jednotlivých složek, které se prakticky rovnalo procentu ploch jejich peaků. Pouze někteří autoři vyjadřovali výsledky jako absolutní koncentrace vztažené k definovanému objemu či hmotnosti biologického vzorku (Ohta et al. 1990, Sattler et al. 1996) podle vzorce:

$$C_i = C_{is} \cdot A_i / A_{is} \cdot RRF_{teor}^{-1}$$

kde indexy i a is náležejí stanovované složce a vnitřnímu standardu.

2.5 Příprava vzorku

2.5.1 Izolace celkového lipidu

Prvním krokem ke stanovení profilu FA v biologickém materiálu je izolace lipidové složky, nejčastěji metodou podle Folche, tj. směsí chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (Folch et al. 1957). Modifikace této metody záměnou chloroformu za výrazně méně toxický dichlormethan (Carlson et al. 1985) poskytuje stejné kvantitativní výtěžky, je však šetrnější vůči laboratornímu personálu.

Nejdůležitější podmínkou úspěšné izolace lipidu je dodržet poměr objemu vzorku a extrakční směsi tak, aby se při extrakci netvořily 2 fáze – vodná a organická (obvykle 1:10–20). U krevního séra a kapalných biologických vzorků postačí cca 10minutové třepání, po kterém následuje filtrace precipitátu a rozdělení fází přidáním vody nebo solného roztoku. Lipidová složka zůstává ve spodní chloroformové vrstvě, která je po odebrání vysušena proudem dusíku za teploty do 50 °C, aby nedošlo k rozkladu nebo úniku těkavých složek. Pokud postačí stanovení profilu FA v celkovém lipidu, je vhodné před

Tab. 2.1 Teoretické relativní odezvy

CN	C=C	MW _{FA}	MW _{FAME}	% C ^a	RRF _{17:0} ^b	RRF _{18:0} ^b	RRF _{19:0} ^b	RRF _{21:0} ^b
8	0	144,212	158,239	60,72	1,182	1,193	1,202	1,220
10	0	172,266	186,293	64,47	1,113	1,123	1,133	1,149
12	0	200,320	214,346	67,24	1,067	1,077	1,086	1,101
14	0	228,373	242,400	69,37	1,035	1,044	1,053	1,068
14	1	226,357	240,384	69,95	1,026	1,035	1,044	1,059
16	0	256,427	270,454	71,06	1,010	1,019	1,028	1,042
16	1	254,411	268,438	71,59	1,003	1,012	1,020	1,034
17	0	270,454	284,480	71,78	1,000	1,009	1,017	1,032
18	0	284,480	298,507	72,43	0,991	1,000	1,008	1,023
18	1	282,465	296,491	72,92	0,984	0,993	1,001	1,016
18	2	280,449	294,476	73,42	0,978	0,986	0,995	1,009
18	3	278,433	292,460	73,92	0,971	0,980	0,988	1,002
18	4	276,417	290,444	74,44	0,964	0,973	0,981	0,995
19	0	298,507	312,534	73,02	0,983	0,992	1,000	1,014
20	0	312,534	326,561	73,56	0,976	0,985	0,993	1,007
20	1	310,518	324,545	74,02	0,970	0,979	0,987	1,001
20	2	308,502	322,529	74,48	0,964	0,972	0,980	0,994
20	3	306,487	320,513	74,95	0,958	0,966	0,974	0,988
20	4	304,471	318,498	75,42	0,952	0,960	0,968	0,982
20	5	302,455	316,482	75,90	0,946	0,954	0,962	0,976
21	0	326,561	340,588	74,06	0,969	0,978	0,986	1,000
22	0	340,588	354,614	74,52	0,963	0,972	0,980	0,994
22	1	338,572	352,599	74,94	0,958	0,966	0,974	0,988
22	2	336,556	350,583	75,37	0,952	0,961	0,969	0,983
22	3	334,540	348,567	75,81	0,947	0,955	0,963	0,977
22	4	332,524	346,551	76,25	0,941	0,950	0,958	0,971
22	5	330,509	344,535	76,70	0,936	0,944	0,952	0,966
22	6	328,493	342,520	77,15	0,930	0,939	0,946	0,960
24	0	368,641	382,668	75,33	0,953	0,961	0,969	0,983
24	1	366,625	380,652	75,73	0,948	0,956	0,964	0,978

atomové hmotnosti: C = 12,0115, O = 15,9994, H = 1,0079

^a hmotnostní procento aktivních uhlíkových atomů (FAME)^b teoretická relativní odezva: $RRF_i = \%C_{ref} / \%C_i$

rozdělením fází přidat vnitřní standard. U pevných biologických vzorků – tkání, buněčných membrán, tuhých potravin – je třeba použít homogenizátor. U tkání, které obsahují poměrně mnoho vody, byla navržena extrakce lipidu směsí chloroformu a methanolu v poměru 1:2 (Bligh a Dyer 1959). Tato směs bývá někdy slangově nazývána „obrácený Folch“. Homogenizaci je také možné provést pouze v methanolu – vzhledem k jeho neomezené mísitelnosti s vodou je homogenizace snadnější a nemohou se vytvořit dvě fáze. Chloroform či dichlormethan jsou přidány ke zhomogenizovanému vzorku a další postup je stejný jako u krevního séra. Dosažené výtěžky jsou podle našich zkušeností rovnocenné.

2.5.2 Separace lipidových tříd

Pro medicínský výzkum obvykle bývá stanovení profilu FA v celkovém lipidu nedostatečné – metabolické změny mohou probíhat v jednotlivých lipidových třídách odlišně a ve směsi mohou být nevýznamné. Pro separaci lipidových tříd – esterů cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů – máme na výběr několik možností.

Tenkovrstevná chromatografie s fluorescenční detekcí, využívající klasické tenké vrstvy silikagelu impregnovaného detekčním činidlem o vlnové délce 254 a 366 nm jako stacionární fáze, je výhodnou separační technikou vzhledem k nenáročnosti na přístrojové vybavení. Složení mobilní fáze závisí na separovaných lipidech (Cartwright 1993):

- separace neutrálních lipidů (NL) s mobilní fází heptan-diethylether-kyselina octová (80:20:1), PL zůstávají na startu; pořadí eluce (klesající R_f) je: WE, SE, GEDE, TAG, FA, FS, DAG, MAG, PL,
- separace fosfolipidů s mobilní fází chloroform-methanol-kyselina octová, voda (60 : 50 : 1 : 4), NL se pohybují s čelem. Pořadí eluce: NL, CL, PE, PI, PS, PC, SM, LPL (lysoPL).

Zkratky názvů jednotlivých lipidových tříd jsou uvedeny v **tabulce 2.2**.

Desky pro TLC mohou být buď komerčně vyráběné, nebo připravené laboratorně (ve druhém případě je izolace lipidových tříd snadnější). Komerčně vyráběné desky mohou zapříčinit rozklad nenasycených mastných kyselin (Sowa a Subbaiah 2004), proto je vhodné jednotlivé sorbenty otestovat pomocí syntetických standardů.

Při práci s tenkou vrstvou je třeba mít na paměti, že je zde vzorek vystaven ve velké míře působení vzdušného kyslíku, což vede k destrukci především složek

Tab. 2.2 Zkratky názvů lipidových tříd

CL	kardiolipin
DAG	diacylglycerol
GEDE	glyceryletherdiester
FA	mastná kyselina
FS	volný sterol
LPC	lysofosfatidylcholin
MAG	monoacylglycerol
NL	neutrální lipidy
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylethanolamin
PI	fosfatidylinositol
PL	fosfolipid
PS	fosfatidylserin
SE	sterolester
SM	sřingomyelin
TAG	triacylglycerol
WE	vosk (waxester)

s více dvojnými vazbami. Dobu tohoto působení je třeba omezit na minimum. Destrukce je tím větší, čím menší množství vzorku máme k dispozici.

Při práci je třeba dodržovat tyto zásady:

1. Zásadně nepracujeme, pokud teplota v laboratoři přesáhne 25 °C. Vzorek nesmí být vystaven působení denního světla (UV složka urychlí rozpad dvojných vazeb); pracujeme v zatemněné místnosti při umělém osvětlení.
2. Pracujeme pouze v menších sériích.
3. Před nanášením nařídíme všechny vzorky, které budou zpracovány.
4. Na jednu desku nanese 2 extrakty z 0,8–1 ml plazmy, nebo 3 extrakty z 0,5–0,7 ml.
5. Do vany dáme vyvíjet pouze 2 desky současně. Při zpracování větší série vzorků pracujeme s více vyvíjecími vanami a vhodným časovým odstupem.
6. Desky po vyvinutí sušíme nejlépe ve vakuové sušárně; pokud není k dispozici, necháme vysušit v uzavřené digestoři.
7. Pokud je třeba UV lampu žhavit, izolujeme ji neprůhledným materiálem. Osvětlení desky UV světlem je třeba omezit na nejkratší možnou dobu.
8. Po obkreslení skvrn zpracováváme opět pouze materiál ze 2 desek, zbylé ponecháme ve vakuu.

Jako alternativa k TLC slouží sloupcová chromatografie, kde jednotlivé lipidové třídy musíme postupně eluovat pomocí charakteristických směsí rozpouštědel a vody, s příměsí kyselé nebo alkalické složky (Ingalls et al. 1993). Tyto eluční fáze jsou předem otestovány, při zpracování konkrétních vzorků však chybí vizuální kontrola eluátu.

Další možností je extrakce z pevné fáze (solid phase extraction, SPE) pomocí speciálních separačních kolonek, ze kterých je každá lipidová třída eluována vlastním elučním činidlem, které se protlačí kolonkou pomocí injekční stříkačky (Firl et al. 2013). Stejně jako u sloupcové chromatografie i zde chybí vizuální kontrola eluovaných frakcí.

O chromatografii je známo, že je to metoda kompromisu: určitá výhoda v některé části celého procesu bývá obvykle kompenzována nevýhodou v jiné části (např. zlepšené dělení jednotlivých složek za cenu prodloužení doby analýzy). Zde je u tenkovrstevné chromatografie složitější aplikace vzorku na tenkou vrstvu a pracnější separace jednotlivých lipidových tříd, ale možnost transmethylace izolovaných lipidů s materiálem vrstvy (Segura 1988, Sattler et al. 1996) tuto pracnost kompenzuje. Při eluci jednotlivých lipidových tříd sloupcovou chromatografií nebo pomocí SPE se vzorek nanáší injekční stříkačkou na kolonu a dále se jednotlivé frakce eluují systémem elučních směsí se stoupající polaritou, postupně nanášených na kolonu. Pro polární lipidy je třeba zvyšovat polaritu elučního činidla přidáním vody a kyselé nebo zásadité složky, což vede k určitému riziku rozkladu na lyzo-formu a mastnou kyselinu (Tichelaar et al. 1989) a dále k nutnosti lipidovou třídu z eluátu extrahovat do rozpouštědla nemísitelného s vodou (např. dichlormethan).

Další, méně častou možností je separace lipidových tříd za současné kvantifikace vysokoúčinnou kapalinnou chromatografií. Pro další zpracování nelze lipidy derivatizovat pro UV-Vis detektor, nejlépe se hodí evaporační detektor rozptylu světla na pevných částicích (ELSD, evaporative light-scattering detector). Tento

detektor je sice destruktivní, ale je opatřen speciálním děličem, který přivádí malou část vzorku (cca 10 %) do detektoru a větší část do sběrače frakcí (Beermann et al. 2003); potom je vzorek zpracován obdobně jako výše uvedenými metodami sloupcové chromatografie a extrakce na pevné fázi.

Příprava methylesterů

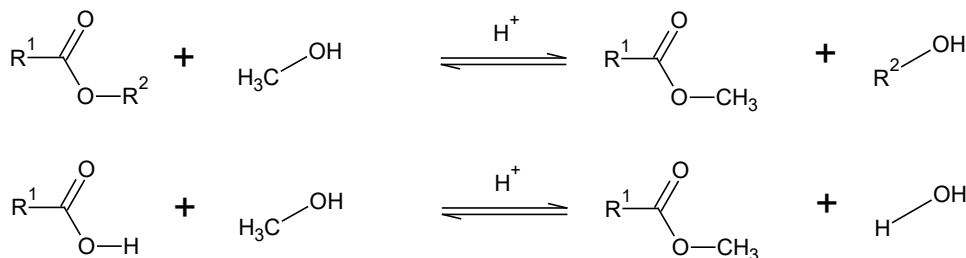
Methylestery k analýze připravujeme reakcí s methanolem za kyselé nebo alkalické katalýzy (Christie 1993, Liu 1994, Wang et al. 2000, Drechsel et al. 2003).

Za kyselé katalýzy probíhá reakce podle schématu na **obr. 2.1**. R^1 v obrázku je uhlíkový řetězec mastné kyseliny, R^2 pak alkoholická složka lipidu (např. cholesterol). Přítomnost i malého množství vody v reakční směsi reakci inhibuje (dochází k hydrolyze na volnou kyselinu a příslušný alkohol, efekt se zvyšuje s klesajícím množstvím lipidu). Nejčastěji využívaným činidlem je bezvodý methanol syčený plynným chlorovodíkem (5 % w/v) nebo 10% roztok acetylchloridu v bezvodém methanolu. Reakce probíhá za zvýšené teploty v těsně uzavřených zkumavkách, čas a teplota se řídí charakterem lipidu. Pro esterifikaci volných kyselin postačí výrazně kratší doba než pro transesterifikaci. Obecně je výhodnější kombinace delší doby a nižší teploty, která je šetrnější vůči vysoce nenasyceným kyselinám.

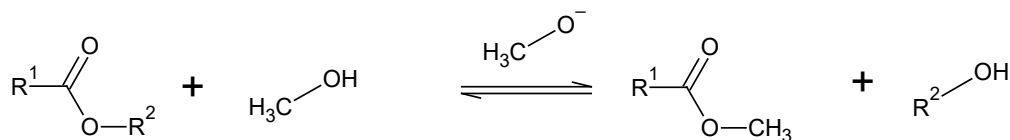
Alternací k roztoku HCl či acetylchloridu je roztok koncentrované kyseliny sírové v bezvodém methanolu (1–2% v/v). Je obzvláště výhodný pro esterifikaci volných kyselin (kyselina sírová váže vznikající vodu, reakce může probíhat za laboratorní teploty).

Další alternací je použití roztoku fluoridu boritého v bezvodém methanolu (12–14 % w/v); nevýhodou je menší stabilita činidla (možnost tvorby artefaktů) a riziko rozkladu polynenasycených kyselin – reakce probíhá za vysoké teploty (Christie 1993).

Za alkalické katalýzy probíhá reakce podle schématu na **obr. 2.2**. Také v obrázku 2.2. je R^1 uhlíkový řetězec mastné kyseliny a R^2 alkoholická složka lipidu. Reakce



Obr. 2.1 Kyselá katalýza tvorby methylesterů



Obř. 2.2 Alkalická katalýza tvorby methylesterů

probíhá rychleji a za nižších teplot než za kyselé katalýzy, nelze však methylovat volné mastné kyseliny. Ty vznikají za přítomnosti vody v reakční směsi; reakce je ireverzibilní, proto je třeba pracovat v bezvodém prostředí.

Za nejvýhodnější podle našich zkušeností považujeme transmethylyaci bezvodým methanolátem sodným za přítomnosti silikagelu z izolované tenké vrstvy. Methanolát připravíme snadno rozpuštěním čistého sodíku v bezvodém methanolu a skladujeme v lednici po dobu několika měsíců. U fosfolipidů a triacylglycerolů probíhá reakce za laboratorní teploty po dobu 60 minut, u esterů cholesterolu za zvýšené teploty (80 °C po dobu 20 minut). Pokud by methanolát obsahoval stopová množství vody, dojde k neúplné reakci a vedle methylesterů jsou ve vzorku i volné mastné kyseliny. K tomu dochází ve větší míře u esterů cholesterolu, a proto je vhodné po reakci s methanolátem přidat ke vzorku koncentrovanou kyselinu sírovou, která katalyzuje esterifikaci volných kyselin a navíc váže vodu, jež při reakci vzniká. Transmethylyace za kyselé katalýzy probíhá delší dobu za vysoké teploty (> 100 °C), a zvyšuje se tak riziko rozkladu vysoce nenasycených složek. Lze ji rovněž provést po předchozí separaci TLC bez izolace z materiálu vrstvy (Segura 1988, Sattler et al. 1996). Kyselé katalýza je nutná pro transesterifikaci plazmalogenové formy fosfolipidů, protože v alkalickém prostředí nejsou uvolněny aldehydicke složky (Christie 1993).

Po extrakci methylesterů z reakční směsi do uhlovodíku (hexan) vzorky skladujeme do analýzy GLC v malém množství uhlovodíku (heptan, isooktan), kde jsou stabilnější než v suchém stavu.

Závěrem je třeba zdůraznit, že v celém procesu práce s lipidy je třeba se vyvarovat působení přímého denního světla (pracujeme v zatemněné místnosti za umělého osvětlení). Největšímu riziku je vystaven materiál při nanesení na tenkou vrstvu, kdy je velmi malé množství lipidu rozprostřeno na velkém povrchu, a proto nejnáchylnější k rozkladu zvláště vysoce nenasycených složek.

Závěr

Chromatografie je vždy metodou kompromisu, a proto i popsaná technika stanovení FAME metodou GLC-FID

má své výhody i nevýhody. Plamenoionizační detektor reaguje na přítomnost každé organické látky ve vzorku, a proto je třeba ověřit čistotu každého rozpouštědla i vody porovnáním záznamu jednotlivých látek se záznamem směsi standardů stanovovaných FAME; nejdůležitější je vyloučit takovou chemikálii, kde přítomnost nečistoty se stejným či blízkým elučním časem jako u minoritní složky profilu FAME může významně zkreslit výsledek stanovení. Výhodou oproti metodě GC-MS, u které tento problém není, je výrazně nižší pořizovací cena aparatury i menší náklady na její údržbu.

Pro skladování vzorku platí, že stabilita nenasycených FA klesá v tomto pořadí: biologický vzorek – izolovaný celkový lipid – izolovaná lipidová třída – methylester FA.

Dále je třeba zdůraznit, že v celém procesu práce s lipidy je třeba se vyvarovat působení přímého denního světla. Největšímu riziku je vystaven materiál při nanesení na tenkou vrstvu, kdy je velmi malé množství lipidu rozprostřeno na velkém povrchu, a proto nejnáchylnější k rozkladu zvláště vysoce nenasycených složek. Neméně důležitá je i teplota laboratoře – pokud se blíží 25 °C, nelze se vzorky pracovat, naopak teplota výrazně pod 20 °C zhoršuje dělení jednotlivých lipidových tříd na tenké vrstvě. Spodní limit teploty je vhodné ověřit experimentálně.

Kvantitativní vyhodnocení bývá většinou vyjádřeno jako relativní zastoupení definovaného souboru metabolicky relevantních mastných kyselin. Pro absolutní kvantifikaci je nejpřesnější vnitřní standard tvořený všemi lipidovými třídami s exogenní mastnou kyselinou – s lichým počtem atomů uhlíku (17, 19, 21) a jednou dvojnou vazbou – např. kyselina heptadekanová (FA 17:0) je ve většině biologických vzorků obsažena. Kyselinu je třeba volit tak, aby ve výsledném profilu vytvořila kritický pár s některou ze stanovovaných složek. Vnitřní standard se přidává k biologickému vzorku před extrakcí celkového lipidu. Alternativně lze zvolit vnější standard ve formě lipidové třídy, který se přidává ke vzorku separovanému z tenké vrstvy. Pokud se rozhodneme pro vnitřní standard s nasycenou kyselinou, je třeba si uvědomit, že monoacidický triacylglycerol má