diagnostyka laboratoryjna Journal of Laboratory Diagnostics
2010 • Volume 46 • Number 2 • 125-130

Praca oryginalna • Original Article

Walidacja metody oznaczania kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidów w surowicy krwi

Validation of the method of determination of phospholipid fraction fatty acids in blood serum

[1]Jolanta Bugajska, [1]Joanna Berska, [2]Diana Hodorowicz-Zaniewska, [1]Krystyna Sztefko

[1]Zakład Biochemii Klinicznej Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii i
[2]I Katedra Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie

Cel: Określenie parametrów walidacyjnych metody oznaczania poszczególnych kwasów tłuszczowych (średniołańcuchowych, długołańcuchowych, mono- i wielonienasyconych oraz kwasów o konformacji trans) frakcji fosfolipidów surowicy krwi.

Metoda: Estry metylowe kwasów tłuszczowych uzyskane przez zmydlanie w środowisku zasadowym fosfolipidów wyekstrahowanych z surowicy krwi oznaczono ilościowo na chromatografie gazowym z kapilarną kolumną HP-88 wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny.

Wyniki: Wyznaczono granicę pomiaru (limit of detection, LOD) i granicę oznaczalności (limit of quantification, LOQ) oraz współczynniki zmienności (CV) wewnątrz serii i między seriami dla każdego kwasu tłuszczowego oraz obliczono odzysk dla próbek surowicy obciążonych 1,2-dipalmitylo-sn-glicero-3-fosfocholiną. Wartości LOD zawierają się w granicach 0,8 – 16,2 mol/l, LOQ w granicach 2,5 – 49,2 mol/l. Współczynniki korelacji (r^2) pomiędzy stężeniem kwasu a polem powierzchni piku mieszczą się w zakresie pomiędzy 0,9993 – 0,9999. Współczynniki zmienności wewnątrz serii były poniżej 10% (z wyjątkiem kwasów C12, C18:1 trans, C20 + C18:3 (n-6) i C20:2) natomiast między seriami poniżej 20% (z wyjątkiem kwasów C12, C18:2 trans i C24). Średni odzysk był w zakresie 96,9 – 115,3%.

Wniosek: Otrzymane parametry walidacyjne wykazały, że metoda nadaje się do ilościowego oznaczania indywidualnych kwasów tłuszczowych nasyconych, mono- i wielonienasyconych oraz kwasów o konformacji trans frakcji fosfolipidów w surowicy krwi.

Summary

Aim: Specifying the validation parameters of the method of determination of the individual fatty acids (medium and long-chain, mono- and polyunsaturated, of cis and trans configuration) of phospholipid fraction of blood serum.

Method: Methyl esters of fatty acids liberated by alkali hydrolysis from phospholipids extracted from blood serum have been determined on gas chromatograph with capillary column HP-88 and flame-ionization detector.

Results: Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), as well as variation coefficients (CV) within series and among series have been determined for each fatty acid. Also recovery was determined by loading serum samples with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. The values of LOD were within the range of 0.8-16.2 mol/l, those of LOQ between 2.5 and 49.2 µmol/l. The correlation coefficients (r^2) between the concentration of fatty acid and area under the peak were in the range of 0.9993-0.9999. For most fatty acids (with exception of C12, C18:1 trans, C20+C18:3 (n-6) and C20:2 acids) CV within series was below 10%, and CV among series below 20% (with exception of acids C12, C18:2 trans and C24). Mean recovery was between 96.9 and 115.3%.

Conclusion: The validation parameters obtained have shown that the method is suitable for the quantitative determination of the individual saturated and unsaturated, mono and polyunsaturated, cis and trans fatty acids of phospholipid fraction of blood serum.

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe, fosfolipidy, chromatografia gazowa

Key words: fatty acids, phospholipids, gas chromatography

Wstęp

Analiza składu kwasów tłuszczowych w materiale biologicznym (surowica, tkanki) wymaga zastosowania odpowiednich metod ekstrakcji i oczyszczania frakcji lipidowych. Najczęściej stosowaną metodą do ilościowej ekstrakcji składników lipidowych z surowicy krwi jest metoda *Folcha* i wsp. [7]. Aby zapobiec utlenianiu kwasów tłuszczowych w czasie ekstrakcji stosuje się antyutleniacze takie jak butylohydroksytoluen lub 2,6-di-tert-butyl-p-cresol albo każdy etap przygotowania wstępnego próbek wykonuje się w atmosferze azotu [4,18]. Rozdział lipidów w ekstraktach z materiałów biologicznych można przeprowadzić za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) lub chromatografii cieczowej z użyciem kolumienek z aminopropylową fazą stałą [10,15]. Rozdział lipidów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) jest metodą czasochłonną i powoduje utlenienie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) z powodu długotrwałej ekspozycji na powietrze. Bardziej polecany jest rozdział na aminopropylowej fazie stałej, co pozwala na uzyskanie dokładniejszych wyników oraz na skrócenie czasu analizy.

W celu oznaczenia stężeń poszczególnych kwasów tłuszczowych we frakcjach lipidowych, materiał uzyskany z płytek chromatograficznych lub rozdzielone na kolumienkach próbki poddaje się zmydlaniu i estryfikacji. Ilościowo uzyskane w ten sposób estry metylowe kwasów tłuszczowych oznacza się za pomocą chromatografii gazowej (GC) najczęściej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) [14,3] lub detektorem masowym (MS) [11,17]. W dotychczas publikowanych pracach przedstawiających metody oznaczania kwasów tłuszczowych pochodzących z poszczególnych klas lipidowych, brak jest danych o możliwości równoczesnego oznaczenia stężenia kwasów o konformacji *cis* oraz *trans*. Opisywane są metody pozwalające na ilościowe oznaczanie albo kwasów tłuszczowych o konformacji *cis* [1,11] albo kwasów o konformacji *trans* [12,2]. W większości prac wartości stężeń kwasów średniołańcuchowych, długołańcuchowych, mono- i wielonienasyconych oraz kwasów tłuszczowych o konformacji *trans* podawane są jako procent całkowitych kwasów tłuszczowych danej frakcji lipidowej, a nie jako bezwzględne stężenia [16,5]. Skład procentowy w odróżnieniu od bezwzględnego stężenia nie odzwierciedla jednak prawdziwych różnic zawartości kwasów tłuszczowych w różnych próbkach lub różnych materiałach biologicznych. W tym świetle określenie parametrów liniowości i powtarzalności metody ilościowego oznaczania stężenia kwasów tłuszczowych frakcji lipidowych surowicy krwi wydaje się celowe.

Materiały i metody

Odczynniki

Trifluorek boru w metanolu (14 % BF_3), heksan, chloroform i metanol (Sigma-Aldrich, Niemcy), NaCl (Merck, Niemcy), izopropanol (J.T.Baker, Holandia), eter dietylowy (Chempur, Polska), kwas octowy (Fluka, Niemcy), bezwodny siarczan sodu (Chempur, Polska), wodorotlenek potasu (POCH, Polska). Wszystkie zastosowane odczynniki było o czystości wymaganej w chromatografii. Wzorce kwasów tłuszczowych w roztworze metanol:chloroform (5:1) (Sigma-Aldrich, Niemcy): kwas laurynowy C12, kwas mirystynowy C14, kwas palmitynowy C16, kwas palmitooleinowy C16:1 n-7, kwas stearynowy C18, kwas elaidynowy C18:1 n-9 trans, kwas oleinowy C18:1 n-9 cis, kwas linolowy C18:2 n-6 trans, kwas linolowy C18:2 n-6 cis, kwas arachidowy C20, kwas alfa-linolenowy C18:3 n-3, kwas 11,14 eikozadienowy 20:2 n-6 cis, kwas arachidonowy C20:4 n-6, kwas timnodonowy C20:5 n-3, kwas behenowy C22, kwas cerwonowy C22:6 n-3, kwas lignocerynowy C24, kwas cerotynowy C26. Jako standard wewnętrzny zastosowano 1,2-dipentadekanoilo-sn-glicero-3-fosfocholinę o stężeniu 8,5 mmol/l (Sigma-Aldrich, Niemcy), a dla oceny odzysku użyto 1,2-dipalmitylo-sn-glicero-3-fosfocholinę (Sigma-Aldrich, Niemcy).

Materiały

Kolumienki ekstrakcyjne z aminopropylową fazą stałą – Sep-Pak NH_2, 500mg (Waters, USA)

Ekstrakcja lipidów z surowicy

Do ekstrakcji lipidów z surowicy zastosowano metodę Folcha i wsp. [7]. 10 ml mieszaniny chloroform-metanol (2:1, v/v) i 40 μl standardu wewnętrznego dodawano do 1 ml surowicy, mieszano 15 min. Następnie dodawano 5 ml 10% NaCl, ponownie mieszano i wirowano. Fazę organiczną zbierano, osuszano bezwodnym Na_2SO_4 i odparowywano w atmosferze azotu w temperaturze 37^{0}C.

Rozdział frakcji lipidowych na kolumienkach Sep-Pak NH_2

Suchą pozostałość rozpuszczano w 200 μl chloroformu i nakładano na kolumienkę z aminopropylową fazą stałą Sep-Pak NH_2. Kolumienki aktywowano poprzez trzykrotne przemycie 2 ml heksanu. Estry cholesterolu, monoglicerydy, diglicerydy i triglicerydy eluowano z kolumienki 4 ml mieszaniny chloroform-izopropanol (2:1, v/v), następnie wymywano kwasy tłuszczowe 6 ml 2% kwasu octowego w eterze. Ostatnim etapem było eluowanie fosfolipidów 4 ml metanolu.

Zmydlanie fosfolipidów

Próbki zawierające frakcję fosfolipidów odparowywano w atmosferze azotu w temp 37^{0}C. Do suchej pozostałości dodawano 1 ml 2M KOH w metanolu i przeprowadzano zmydlanie w szczelnie zamkniętych probówkach przez 20 minut w atmosferze azotu w temperaturze 70^{0}C.

Otrzymywanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Do każdej próbki zawierającej kwasy tłuszczowe pochodzące z frakcji fosfolipidów dodawano 1 ml 14 % BF_3 w metanolu. Metylację prowadzano w temperaturze 100^{0}C w szczelnie zamkniętych probówkach w atmosferze azotu przez 60 min, a następnie próbki doprowadzano do temperatury pokojowej.

Końcowe przygotowanie próbek do rozdziału na chromatografie gazowym

Do wszystkich probówek zawierających estry metylowe kwasów tłuszczowych dodawano 2 ml heksanu i 2 ml 10% NaCl i wytrząsano przez 15 minut. Zbierano warstwę organiczną i procedurę powtarzano. Zebrane warstwy organiczne odparowywano do sucha w atmosferze azotu w temperaturze 37°C, a następnie rozpuszczano w 100 μl heksanu.

Warunki rozdziału estrów metylowych na chromatografie gazowym.

Oznaczenia estrów metylowych kwasów tłuszczowych wykonano przy użyciu chromatografu gazowego (Agilent Technologies 6890 N Network GC Systems), wyposażonego w detektor płomieniowo jonizacyjny (FID) oraz dozownik 7683B. Do rozdziału zastosowano kolumnę HP-88 (100 m, 0,250mm, 0,20 µm).

Warunki rozdziału (zgodnie z zaleceniami producenta kolumny): objętość próbki nakładanej na kolumnę: 1 µl w trybie split (stosunek 1:5), temperatura dozownika: 250^{0}C, temperatura detektora: 280^{0}C. Temperatura kolumny utrzymywana była według następującego schematu: temperatura początkowa: 120^{0}C przez 1 minutę, wzrost o 10^{0}C/min do temperatury 175^{0}C utrzymywanej przez 10 minut, wzrost o 5^{0}C/min do temperatury 210^{0}C utrzymywanej przez 5 minut, wzrost o 5^{0}C/min do temperatury 230^{0}C utrzymywanej przez 7,5 minuty. Całkowity czas rozdziału jednej próbki wynosił 40 minut. Jako gaz nośny stosowano hel o przepływie 2 ml/min. Przepływ gazów przez detektor FID: wodór 40ml/min, powietrze 450 ml/min i gaz dopełniający (Hel) 30ml/min. Zbieranie oraz opracowywanie danych przeprowadzono za pomocą programu Chemstation firmy Agilent Technologies.

Identyfikacja kwasów tłuszczowych oraz obliczanie ich stężenia

Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie czasów retencji. Porównywano czasy retencji poszczególnych kwasów tłuszczowych próbki z czasami retencji kwasów wchodzących w skład mieszaniny kalibracyjnej. Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o zależność pomiędzy sygnałem z detektora, którego miarą jest powierzchnia piku a stężeniem mierzonej substancji. Zastosowano metodę wzorca wewnętrznego. Standard wewnętrzny (IS) dodawano zarówno do mieszaniny wzorcowej jak i do każdej analizowanej próbki przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji.

Kalibracja metody, ustalenie zakresu liniowości

Dla każdego kwasu tłuszczowego użytego do przygotowania mieszaniny kalibracyjnej ustalono zakres liniowości i współczynnik korelacji (r^2) pomiędzy stężeniem kwasu a polem powierzchni piku. Zastosowano serię roztworów wzorcowych o różnych stężeniach. Rozdział kwasów tłuszczowych w mieszaninie wzorcowej wykonano trzykrotnie dla każdego stężenia, a krzywe kalibracyjne ustalono w oparciu o wartości średnie.

Ustalenie granicy pomiaru (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ) dla każdego kwasu tłuszczowego

Granicę pomiaru (LOD) wyznaczono z krzywej kalibracyjnej dla każdego kwasu tłuszczowego na podstawie wzoru: LOD=3,3 x s_{yx}/α, gdzie: s_{yx} – odchylenie standardowe, α - współczynnik kierunkowy prostej (tangens kąta nachylenia). Granicę oznaczalności (LOQ) według wzoru: LOQ= 10 x s_{yx}/α

Określenie powtarzalności metody

Powtarzalność wewnątrz serii określono w oparciu o 21-krotne oznaczenie jednej próbki przeprowadzone w tych samych warunkach pomiarowych, natomiast powtarzalność między seriami określono w oparciu o 21 niezależnie przygotowanych próbek oznaczonych w ciągu 14 dni. Obliczono CV wewnątrz serii i między seriami.

Ocena odzysku

Próbki surowicy obciążano 1,2-dipalmitylo-sn-glicero-3-fosfocholiną w ilości odpowiadającej różnej zawartości kwasu palmitynowego: 203,5µmol/l, 407µmol/l, 814µmol/l. Każde obciążenie wykonano trzykrotnie.

Ocena swoistości oznaczenia

W celu wyznaczenia swoistości oznaczania kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidowej, w trzech niezależnych próbkach surowicy oznaczono stężenia kwasów tłuszczowych metodą GC-FID oraz na chromatografie gazowym Agilent Technologies serii 6890 sprzężonym z kwadrupolowym spektrometrem mas typu Agilent Network 5973 na kolumnie HP5 50mx0,32mmx0,25µm.

Obliczenia statystyczne

Do oceny statystycznej wykorzystano średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe i współczynniki zmienności. Stężenia kwasów tłuszczowych podano w µmol/l.

Wyniki

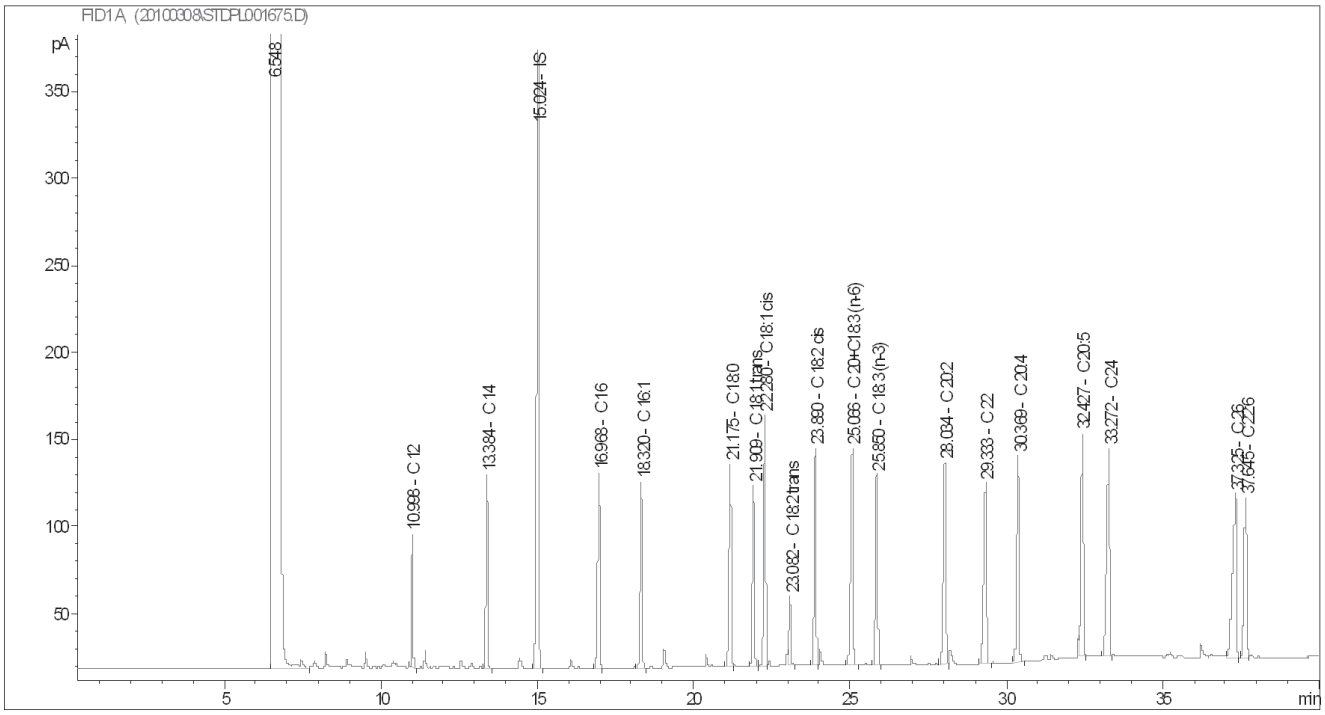
Przykład rozdziału chromatograficznego mieszaniny kalibracyjnej przedstawiono na ryc. 1. Uzyskano wyraźnie rozdzielone piki dla oznaczanych kwasów tłuszczowych z wyjątkiem dwóch składników mieszaniny, a mianowicie kwasu C20 i kwasu C18:3 (n-6), które w ustalonych warunkach nie rozdzielały się i występowały w postaci jednego piku.

W tabeli I podano wartości LOD, LOQ, CV wewnątrz serii i między seriami dla każdego kwasu tłuszczowego. Dla każdego kwasu uzyskano zakresy liniowości do 1000µmol/l, ale dla celów obecnej pracy wykorzystano zakres liniowości odpowiadający stężeniom, które występują w fosfolipidach surowicy krwi. Wartości LOD zawierają się w granicach 0,8 – 16,2µmol/l natomiast LOQ w granicach 2,5 – 49,2µmol/l. Współczynniki korelacji (r^2) pomiędzy stężeniem kwasu a polem powierzchni piku zawierają się pomiędzy 0,9993 – 0,9999.

Współczynniki zmienności wewnątrz serii były poniżej 10% dla większości oznaczanych kwasów tłuszczowych. Dla kwasów C12, C18:1 trans, C20 + C18:3 (n-6) i C20:2 wartości CV były wyższe niż 10%. Największą zmienność oznaczeń miedzy seriami stwierdzono dla kwasów C12, C18:2 trans i C24.

Średni odzysk dla próbek surowicy obciążonych 1,2-dipalmitylo-sn-glicero-3-fosfocholiną otrzymano w zakresie 96,9 – 115,3%.

Wyniki oznaczenia kwasów tłuszczowych z użyciem GC/MS jak również z użyciem GC-FID podano jako udział procentowy każdego kwasu. Obliczono różnicę pomiędzy uzyskanymi wynikami (tabela II). Największe różnice stwierdzono dla kwasów tłuszczowych występujących we frakcji fosfolipidów w najmniejszej ilości (poniżej 1,5%), takich jak: C16:1, C20:5, C22, C24. Dla kwasów o udziale procentowym powyżej 5% różnice były w granicach od 2,61 do 14,8%.



Rycina. 1
Chromatogram kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidów w mieszaninie kalibracyjnej

Tabela I
Krzywe kalibracyjne, LOD i LOQ, współczynniki zmienności wewnątrz serii i między seriami dla poszczególnych kwasów tłuszczowych

Kwas tłuszczowy	LOD [μmol/l]	LOQ [μmol/l]	CV wewnątrz serii [%]	CV między seriami [%]
C12	2,2	6,5	3,2	33,3
C14	2,7	8,2	9,2	12,4
C16	16,2	49,2	0,3	5,9
C16:1	2,6	7,9	1,8	8,1
C18:0	7,2	21,9	1,3	6,1
C18:1 trans	2,5	7,7	13,8	19,2
C18:1 cis	7,5	22,7	1,2	5,7
C18:2 trans	2,2	6,5	11,9	23,5
C18:2 cis	7,7	23,4	0,4	7,5
C20 + C18:3 (n-6)	2,2	6,8	19,0	19,6
C18:3 (n–3)	0,9	2,8	5,6	19,7
C20:2	1,1	3,2	4,2	11,8
C22	2,9	8,9	4,1	9,3
C20:4	12,5	37,9	0,4	6,8
C20:5	5,1	15,4	3,2	10,3
C24	1,3	4,0	5,4	23,7
C26	0,8	2,5	nie oznaczano	
C22:6	12,5	37,7	3,4	8,1

Dyskusja

Walidacja metody wymaga wyznaczenia zakresu liniowości, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności oraz określenia powtarzalności, dokładności i swoistości metody [8,9,6].

Wartości LOD i LOQ są istotne dla oceny bardzo niskich stężeń kwasów tłuszczowych, a w większości publikacji nie są one podawane albo podawane są tylko dla kwasów występujących w surowicy w wysokich stężeniach [11]. Często ocenia się metodę w oparciu tylko o obliczenie współczynników zmienności wewnątrz i zewnątrz serii oraz wielkości odzysku [1,13]. Jedynie *Sanchez-Avila* i wsp. podają wartości LOD i LOQ dla wszystkich kwasów tłuszczowych, zarówno

Tabela II
Średnie wartości różnicy ± SD [%] między wynikami oznaczenia kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidów metodą GC/MS i metodą GC-FID

kwas	Różnica ± SD [%]
C15 (IS)	3,16 ± 2,56
C16:1	15,57 ± 10,73
C16	14,49 ± 1,36
C18:2 cis	2,61 ± 1,21
C18:1 cis	5,34 ± 3,67
C18:0	10,93 ± 2,66
C20:4	6,64 ± 1,78
C20:5	24,52 ± 8,26
C20:2	3,62 ± 3,68
C22:6	14,80 ± 2,44
C22	28,12 ± 5,21
C24	22,57 ± 5,23

mono jak i wielonienasyconych oraz konformacji *trans*, lecz nie rozróżniają kwasów tłuszczowych pochodzących z poszczególnych frakcji lipidowych surowicy. Metoda opisana przez nich służy do oznaczania kwasów tłuszczowych zestryfikowanych i wolnych [17].

Uzyskane przez nas współczynniki zmienności (CV, %) wewnątrz serii dla poszczególnych kwasów tłuszczowych mieszczą się w granicach zmienności podawanych przez Horwitz [19] i uzyskanych przez *Bondia-Bons* i wsp [1]. Ci ostatni autorzy nie oznaczali jednak kwasu C12, oraz kwasów C18:1 trans i C18:2 trans. Podawane przez nich wartości CV wewnątrz serii były podobne do uzyskanych w stosowanej przez nas metodzie, z wyjątkiem kwasów C14 oraz C20 + C18:3 (n-6), dla których CV były znacznie wyższe. Stężenia kwasów o konformacji trans są we frakcji fosfolipidów niskie, dlatego też uzyskane wartości CV wewnątrz serii oraz między seriami są wysokie i wynoszą dla kwasu C18:1, n-7 trans + C18:1, n-9 trans odpowiednio 13,8% i 19,2% oraz dla C18:2 trans (9t,12t C18:2, n-6) 11,9%, 23,5%. *King* i wsp. [12] oznaczali w surowicy krwi tylko kwasy *trans* i uzyskali następujące wartości CV dla dwóch próbek o różnych stężeniach: dla kwasu C18:1, n-7 trans 4% i 9%, dla kwasu C18:1, n-9 trans 3% i 21 % oraz dla kwasu C18:2 trans (9t,12t C18:2, n-6) 13% i 28% [12]. Dla stosowanej przez nas metody oznaczania kwasów tłuszczowych uzyskano wysokie odzyski, które świadczą o dobrej dokładności.

Porównanie zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów oznaczonych metodą GC-FID oraz metodą GC/MS wykazało różnicę od 2,61 do 28,12%. Oznaczenia metodą GC/MS wykonane w innym laboratorium potwierdzają swoistość metody. Dopuszczalny całkowity błąd pomiaru dla rzadkich oznaczeń o wieloetapowej procedurze przygotowania próbek wynosi nawet do 30-35%. *Masood* i wsp. porównując oznaczenia kwasów tłuszczowych wykonane na dwóch różnych zestawach chromatograficznych w tym samym laboratorium otrzymali różnice sięgające 15,6% [13].

Przedstawiona metoda umożliwia oznaczanie kwasów tłuszczowych C12, C14, C16, 16:1, C18, C18:1 trans, C18:1 cis, C18:2 cis, C18:3 n-3, 20:2, C20:4, C20:5, C22, 22:6, C24, C26 we frakcji fosfolipidów surowicy z akceptowalną precyzją i dokładnością. Natomiast dla kwasu C18:2 *trans* uzyskane stężenia w surowicy są na granicy wykrywalności metody. Uzyskane w obecnej pracy wartości LOD i LOQ mogą stanowić punkt odniesienia dla innych metod oznaczania indywidualnych kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidów surowicy krwi.

Wnioski

Otrzymane parametry walidacyjne wykazały, że metoda nadaje się do ilościowego oznaczania indywidualnych kwasów tłuszczowych nasyconych, mono- i wielonienasyconych oraz kwasów o konformacji *trans* frakcji fosfolipidów w surowicy krwi.

Piśmiennictwo

1. Bondia-Pons I, Morera-Pons S, Castellote AI I wsp. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography.*J Chromatogr A 2006; 1116: 204-8.*
2. Bradbury KE, Skeaff CM, Green TJ I wsp.The serum fatty acids myristic acid and linoleic acid are better predictors of serum cholesterol concentrations when measured as molecular percentages rather than as absolute concentrations. *Am J Clin Nutr 2010; 91: 398-405.*
3. Brondz I; Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal Chim Acta 2002; 465: 1–37*
4. Burdge GC, Wright P, Jones AE i wsp. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *Br J Nutr 2000; 84: 781-7.*
5. Chajès V, Hultén K, Van Kappel AL i wsp. Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case-control study in Sweden. *Int J Cancer 1999; 83: 585-90.*
6. EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Method, First Internet Version, 1998.
7. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; *226: 497-509.*
8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A, Geneva 1994.
9. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Q2B, Geneva 1996.
10. Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV. i wsp.Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns; *J Lipid Res 1985; 26: 135-40.*
11. Kangani CO, Kelley DE, Delany JP.; New method for GC/FID and GC-C-IRMS analysis of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 873: 95-101.*
12. King IB, Kristal AR, Schaffer S i wsp. Serum trans-fatty acids are associated with risk of prostate cancer in beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 988-92.*

13. Masood A, Stark KD, Salem N Jr. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J Lipid Res* 2005; *46: 2299-305.*
14. Morrison WR , Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride—methanol. *J Lipid Res 1964; 5: 600-8.*
15. Ruiz-Gutiérrez V, Pérez-Camino MC. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J Chromatogr A 2000; 885: 321-41.*
16. Saadatian-Elahi M, Slimani N, Chajès V i wsp. Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intakes: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr 2009; 89: 331-46.*
17. Sánchez-Avila N, Mata-Granados JM, Ruiz-Jiménez J i wsp. Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography-mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum. *J Chromatogr A 2009; 1216: 6864-72.*
18. van Dooremalen C, Pel R, Ellers J. Maximized PUFA measurements improve insight in changes in fatty acid composition in response to temperature. *Arch Insect Biochem Physio. 2009; 72: 88-104.*
19. William Horwitz; Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs Anal. Chem *1982; 54: 67A–76A.*

Adres Autorów:
Zakład Biochemii Klinicznej
Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii CM UJ
ul. Wielicka 265
30-663 Kraków

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2010.07.01)
(Praca przekazana do opublikowania: 2010.07.09)