

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a zdravotnické techniky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních
tekutin pomocí plynové chromatografie**

*Analysis of Fatty Acids in Diacylglyceroles and Triacylglyceroles of Body
Fluids by Gas Chromatography*

Autor práce: Ivana Schneedorferová
Studijní obor: Biofyzika a zdravotnická technika
Forma studia: prezenční
Vedoucí práce: RNDr. Aleš Tomčala

2009

Abstract

Epinephrine is a well known a stress hormone of mammals. The adipokinetic hormone (AKH) has the same function in insects. AKH is a peptidic hormone; one species of insect possesses one or more types of AKH. Basically, AKH is responsible for the release of diacylglycerols (DGs) from body fat. Our experimental animal is a common model organism: a locust (*Locusta migratoria*). This insect synthesizes three AKH types: AKH I, II and III. They differ in the amino acid order in the peptide, but they each have a very similar influence on the organism.

I recently used a routine sulfovaniline method for unsaturated fatty acids (FA), This determination only quantitatively estimates the sum of the double bounds in fatty acids. Our proposed method, the perspective GC/FID (Gas Chromatography with Flame Ionization Detector), is very revolutionary in as much as it is able to determine the particular fatty acid of the species and also the relative ratio.

The aim of this study is to find a proper sample preparation method for the GC/FID technique and to investigate the influence of particular AKH to the locust organism and to statistically prove the differences in AKH influences.

A locust haemolymph was subjected to a very usual sample extraction by Folch and a routine SPE (solid phase extraction) method. An easy and rapid derivatization by sodium methanolate was the next step in the sample preparation followed by the GC/FID measurement. The acquired data were computed by means of the PCA (principal component analyses). We gained a well-arranged graphical output confirming our thesis that each AKH species has a different influence on the FA composition in locust heamolymph; the AKH II had the greatest influence.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních tekutin pomocí plynové chromatografie“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 17. 04. 2009

.....

Poděkování

Mé poděkování a vděčnost patří především RNDr. Aleši Tomčalovi za jeho čas, pozornost, neocenitelnou pomoc, rady, připomínky, ochotu, zájem a za totéž děkuji také Ing. Heleně Zahradníčkové, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Cimlové a Marii Texlové za pomoc v laboratoři. Mgr. Janu Okrouhlíkovi děkuji za poskytnutí metody SPE a za poskytnutí programu Canoco a cenné informace děkuji doc. Martinu Konvičkovi PhD. Také jsem velmi vděčná RNDr. Petru Šimkovi, CSc., vedoucímu Oddělení analytické biochemie Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR, v. v. i. v Českých Budějovicích, kterému děkuji za umožnění vzniku této bakalářské práce. Celému kolektivu tohoto oddělení děkuji za příjemné pracovní prostředí a milou společnost.

Obsah:

<i>Abstrakt</i>	1
<i>Prohlášení</i>	2
<i>Poděkování</i>	3
<i>Úvod</i>	6
1. Současný stav dané problematiky	7
1.1 Chromatografie a hmotnostní spektrometrie	7
1.1.1 Úvod do chromatografie.....	7
1.1.2 Základní pojmy.....	7
1.1.3 Rozdělení chromatografických metod.....	8
1.1.4 Princip chromatografické separace	8
1.1.5 Základní definice	10
1.1.6 Plynová chromatografie	12
1.1.7 Vnitřní standardizace.....	16
1.1.8 Derivatizace.....	17
1.1.9 Hmotnostní spektrometrie	17
1.2 Extrakce na tuhou fázi (SPE)	24
1.3 Metabolismus DG a TG u hmyzu (<i>Locusta migratoria</i>).....	25
1.3.1 Adipokinetické hormony	25
1.4 Mastné kyseliny.....	27
1.4.1 Struktura, výskyt a vlastnosti FA	27
1.4.2 Analýza mastných kyselin ve spojení s medicínskými aplikacemi.....	30
1.5 Analýza hlavních komponent (PCA)	33
2. Cíle práce a předpokládané hypotézy	35
3. Metodická část	36
3.1 Původ vzorku.....	36
3.2 Příprava vzorku	37
3.2.1 Použité chemikálie	37
3.2.2 Extrakce lipidů ze vzorku.....	37

3.2.3 SPE extraktu lipidů.....	38
3.2.4 Transmethylace	39
3.3 Analýza GC/FID.....	41
4. Výsledky	42
4.1 Analýza mastných kyselin v diglyceridech	42
4.1.1 Práce s komerčně dostupnými standardy	43
4.1.2 Linearita odezvy FIDu.....	45
4.1.3 Opakovatelnost metody	46
4.1.4 Porovnání výsledků analýzy hemolymfy před a po SPE	47
4.1.5 Porovnání výsledků analýzy hemolymfy před a po aplikaci AKH	50
4.2 Analýza mastných kyselin v triglyceridech.....	57
5. Diskuse	59
6. Závěr.....	61
7. Přehled použité literatury.....	63
8. Seznam použitých zkratk.....	68
9. Klíčová slova	70
10. Přílohy	71
10.1 Extrakce lipidů z biologického vzorku.....	71
10.2 SPE extrakce lipidů	72
10.3 Derivatizace vzorku.....	74

ÚVOD

Stejně tak jako adrenalin pro savce, je pro hmyz stresovým hormonem adipokinetický hormon (AKH). U druhu *Locusta migratoria* byly objeveny 3 druhy AKH – Locmi AKH I, -II, -III. Je známo, že se liší v síle svého působení. Doposud však byla k detekci diacylglycerolů v hemolymfě používána sulfovanilinová metoda, která poskytovala pouze kvantitativní nikoli kvalitativní data o zastoupení přítomných mastných kyselin. Pomocí námi aplikované techniky plynové chromatografie (GC) lze zmapovat zastoupení jednotlivých mastných kyselin po aplikaci různých AKH.

Cílem této práce je zvládnout metodiku GC/FID (flame ionization detector) a přípravu vzorků pro techniku GC/FID a GC/MS (mass spectrometry). Výsledkem by mělo být zjištění zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorku hemolymfy sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) před a po aplikaci různých druhů adipokinetického hormonu. Tato data budou použita do mezinárodní publikace.

Dá se předpokládat, že zastoupení mastných kyselin v hemolymfě sarančete se bude po aplikaci různých druhů AKH lišit. Výsledek napomůže k základnímu pochopení metabolismu lipidů u hmyzu a potažmo i u lidí. Hmyz se v poslední době stává vynikajícím modelem pro genetické, imunologické a také fyziologické studie, a to kvůli jeho lehké dostupnosti a krátké generační době.

Plynová chromatografie je analytická metoda, která v současné době nabízí celou řadu analýz různých metabolicky důležitých látek. Součástí metodiky je příprava samotného vzorku vhodného pro techniku GC. Obvykle se jedná o přípravu methylesterů mastných kyselin pomocí transesterifikační reakce.

GC analýza mastných kyselin dokáže poskytnout informace o velmi důležitých biomarkrech kardiovaskulárních nebo jiných závažných chronických onemocnění. Její praktické využití je tedy v medicíně zjevné.

1. SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

1.1 Chromatografie a hmotnostní spektrometrie

1.1.1 Úvod do chromatografie

Chromatografie patří mezi nejrozšířenější analytické dělicí metody poskytující kvalitativní a kvantitativní informaci o jednotlivých složkách směsi. Slouží k identifikaci, separaci a stanovení velkého množství jak organických tak anorganických látek. Za objevitele sloupcové chromatografie je pokládán ruský botanik M. S. Cvet (Tswett), který v roce 1903 zveřejnil práci o separaci listových barviv na sloupci sorbentu. V roce 1952 získali Nobelovu cenu za objev rozdělovací papírové chromatografie britští chemici A. J. P. Martin a R. L. M. Synge. Původní chromatografie na sloupci, na papíře, na tenké vrstvě, byla pro řadu nedostatků a malou účinnost odsunuta na pokraj zájmu. Teprve s rozvojem vysoce účinných sorbentů jako náplní kolon, citlivých detektorů a dokonalejších dávkovacích zařízení je možno analyzovat látky obsažené v širokém koncentračním rozmezí v nejrůznějších přírodních i technických směsích. ^(5, 9, 10, 15, 32)

1.1.2 Základní pojmy

Chromatografická separace využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá je mobilní. Rozdělovací proces probíhá kontinuálně v rozptýlené stacionární (nepohyblivé) fázi, kterou mohou být částičky tuhé fáze, film kapaliny na vnitřní straně kapiláry nebo tenká vrstvička kapaliny nanesená na pevných částicích. Pro jakoukoli formu stacionární fáze se užívá označení sorbent. Zmíněný proces probíhá za neustálého průtoku mobilní (pohyblivé) fáze, kterou je plyn nebo kapalina, přes sorbentem naplněnou kolonu. ^(5, 9, 15)

1.1.3 Rozdělení chromatografických metod

Roztřídění chromatografických metod není zcela jednoznačné, protože se někdy při separaci uplatňují současně dva mechanismy. Dělení v tabulce č. 1 je založeno na druhu skupenství mobilní a stacionární fáze. ^(9, 15)

Tab. 1.1

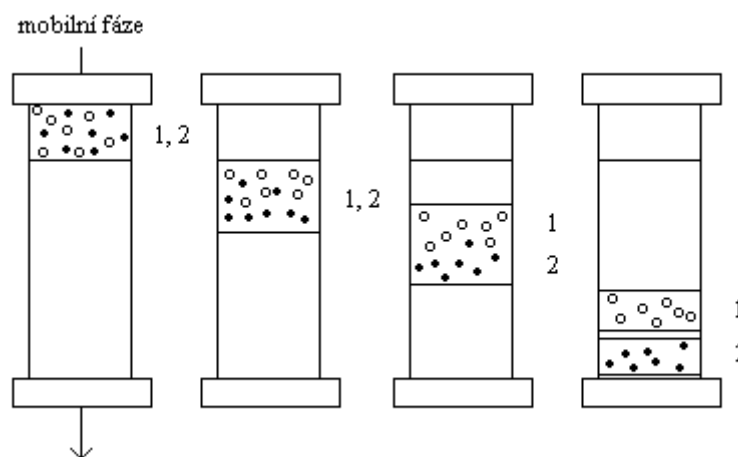
Fáze mobilní	Fáze stacionární	Separační mechanismus	Metoda	Symbol
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
plyn	tuhá látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
kapalina	kapalina	síťový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
kapalina	tuhá látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
kapalina	tuhá látka	chemisorpce	iontově výměnná chromatografie	IEC

1.1.4 Princip chromatografické separace

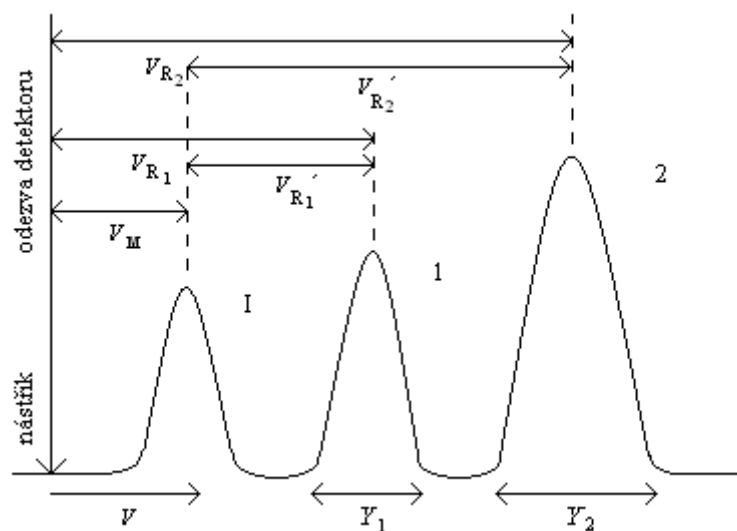
Při chromatografickém procesu dochází k opakovanému transportu molekul složek z jedné fáze do druhé. Čím déle setrvá separovaná látka v koloně, tím delší je hodnota retenčního (elučního) času. Tato doba závisí na četnosti a velikosti interakcí a určuje pořadí, ve kterém látky kolonu opouští.

Při nástřiku směsi např. dvojice látek do kolony se nejprve utvoří jedna zóna. Přes kolonu naplněnou sorbentem postupuje mobilní fáze, která unáší vzorek ke konci kolony, přičemž složka 1 postupuje pomaleji než složka 2, říkáme tedy, že je složka 1 oproti složce 2 více retardována nebo také, že složka 1 má vyšší afinitu ke stacionární fázi a proto tato složka vychází z kolony později, tudíž má delší retenční čas. Tento

příklad je zobrazen na obrázku č. 1.1. Znamená to, že každá složka směsi má svou rychlost. Po výstupu látky z kolony do detektoru je zaznamenán tzv. eluční pík. V našem případě jsou zaznamenány dva oddělené píky tvořící chromatografický záznam – chromatogram (obr. 1.2).



Obr. 1.1: Chromatografická separace vzorku o dvou složkách. ⁽⁹⁾



Obr. 1.2: Chromatogram separace dvou látek a nesorbujícího se inertu. ⁽⁹⁾

V – objem, Y – šířka eluční křivky, I – inertní nesorbující se složka, V_M – mrtvý objem, V_R – eluční objem, V_R' - redukovaný eluční objem.

Separace směsi dvou látek se dá ovlivnit dvěma způsoby, má dva aspekty – termodynamický a kinetický. Zvětšení rozdílu retenčních časů složek se dá dosáhnout upravením separačních podmínek tak, abychom ovlivnili velikost interakce mezi sorbentem a složkou (termodynamický aspekt). V případě, že chceme ovlivnit šířku píků a tím oddělit složky s blízkými hodnotami retenčních časů, musí být píky dostatečně úzké, aby nedocházelo k jejich překryvu. Jedná se o vliv průtoku mobilní fáze a vliv difuze složek v obou fázích (kinetický aspekt).^(9, 15)

1.1.5 Základní definice

K popisu distribuce složek mezi mobilní a stacionární fází slouží distribuční konstanta K_D . Ta vyjadřuje stav chromatografického systému, který je stále velmi blízký rovnováze:

$$K_D = \frac{(c_A)_s}{(c_A)_m} = \frac{(n_A)_s V_m}{(n_A)_m V_s} \quad (1)$$

kde V_m je objem mobilní fáze, V_s je objem stacionární fáze, $(n_A)_m$ a $(n_A)_s$ jsou látková množství složky A ve fázi mobilní a stacionární.

Trvalé termodynamické rovnováhy není dosaženo v důsledku stálého pohybu mobilní fáze, který zároveň posouvá molekuly k další části stacionární fáze a tam se stav systému opět znovu přiblíží rovnovážnému. Interakce složek a fází tak udává rychlost migrace jednotlivých složek a tím jejich rozdělení.

Charakteristickou veličinou v chromatografii je retenční čas t_R , kterému přísluší určitý retenční objem V_R . Retenční objem je objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku po maximum eluční křivky, obdobou je retenční čas. Dané veličiny spolu souvisejí vztahem:

$$V_R = t_R \cdot F_m ; V_M = F_m \cdot t_M = V_m \quad (2)$$

kde F_M je objemová rychlost, kterou protéká mobilní fáze kolonou a má rozměr např. $[\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}]$. K pojmu retenčního objemu zavedeme pojem mrtvý retenční objem V_M , což je retenční objem složky, která se pohybuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze (nesorbující se inertní složka). Mrtvému objemu přísluší mrtvý retenční čas t_M .

Mobilní fáze protéká kolonou s objemovou rychlostí (objemovým průtokem) a také s lineární rychlostí u , která má rozměr $[\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}]$. Pro lineární rychlost platí:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (3)$$

kde L je délka kolony $[\text{cm}]$ a t_M je mrtvý retenční čas. Pro libovolnou složku A , která se pohybuje kolonou s lineární rychlostí platí:

$$u_A = \frac{L}{t_{R_A}} \quad (4)$$

Pravděpodobnost výskytu složky A v mobilní fázi vyjadřuje retardační faktor R_F (relativní retence), jedná se o poměr lineárních rychlostí $\frac{u_A}{u}$ a užívá se především v tenkovrstvé chromatografii.

$$R_F = \frac{u_A}{u} = \frac{(n_A)_m}{(n_A)_m + (n_A)_s} = \frac{l_A}{l} \quad (5)$$

kde l je vzdálenost čela rozpouštědla od startu a l_A je vzdálenost startu od těžiště skvrny. Často používanou retenční veličinou je kapacitní poměr (kapacitní faktor). Jedná se o bezrozměrnou veličinu stanovitelnou na základě mrtvého objemu V_M .

$$\frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} = k = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} = \frac{V_{R_A} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R_A}}{V_M} \quad (6)$$

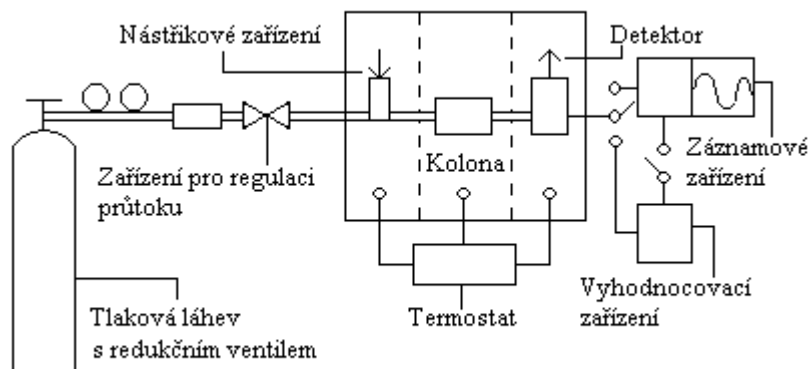
Ze vztahu (6) je patrné, jak lze kapacitní poměr vypočítat. Redukovaný retenční objem V'_R je rozdíl retenčního objemu a mrtvého retenčního objemu. ^(9, 15)

1.1.6 Plynová chromatografie (gas chromatography - GC)

GC je jednou z nejvýznamnějších analytických instrumentálních metod. Mezi její charakteristiky patří jednoduchost, citlivost a vysoká separační účinnost. Využívá se k identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i látek, které lze definovaným způsobem převést v páry. Podle druhu stacionární fáze dělíme GC na GLC (Gas-Liquid Chromatography), kde je stacionární fází kapalina zakotvená na nosiči a GSC (Gas-Solid Chromatography), kde je touto fází tuhá látka. Není velký rozdíl v pracovním postupu ani konstrukci zařízení, ale v principu dělení. V případě GSC se látky dělí na základě rozdílné adsorpční schopnosti jednotlivých složek směsi či síťovém efektu a u GLC je principem rozdělování látek mezi nosným plynem a kapalinou zakotvenou na inertním nosiči. ^(5, 15, 32)

1.1.6.1 Aparatura a pracovní postup

Plynový chromatograf se skládá z několika základních částí (viz. obr. 1.3). Zdrojem nosného plynu bývá nejčastěji tlaková nádoba spojená se zařízením na čištění plynu, regulaci a měření tlaku. Následuje zařízení pro dávkování vzorku, které jej vpraví do proudu nosného plynu a pokračuje s ním do kolony. Z kolony pokračuje rozdělená směs do detektoru, poté následuje vyhodnocovací zařízení. Důležitou součástí chromatografu je termostat potřebný k udržení přesné teploty dávkovače, kolony a detektoru. ^(9, 15, 32)



Obr. 1.3: Blokové schéma plynového chromatografu. ⁽³²⁾

1.1.6.2 Zdroj, čištění a regulace nosného plynu

Obvykle je zdrojem nosného plynu ocelová tlaková láhev s redukčním ventilem plněná např. dusíkem, vodíkem, heliem, argonem nebo oxidem uhličitým. Nosný plyn musí být vhodný pro použitý detektor. K čištění plynu se využívá reakce se speciálními katalyzátory a k sušení plynu molekulová síta. Ta zachycují nejen vodní páry, ale také nečistoty kyselé povahy. Konstantní průtokové rychlosti nosného plynu je dosahováno jehlovými ventily. Tlak plynu v koloně je ovlivňován průtokovou rychlostí plynu, průměrem, náplní a délkou kolony. ^(9, 15, 32)

1.1.6.3 Zařízení pro dávkování vzorku

Mezi podmínky, které by měla splňovat dávkovací zařízení, patří: rychlý převod kapalných a pevných vzorků v plynné (v malém objemu). Vzorek musí zachovat během převodu stejné kvalitativní i kvantitativní vlastnosti. Injektor by neměl působit tlakové rázy a měl by zajišťovat vysokou reprodukovatelnost metody. Toto zařízení je konstruováno jako nástřiková komůrka opatřená gumovým septem, které je propichováno injekční mikrostříkačkou (pro kapalné vzorky). V této komůrce je

dostatečně vysoká teplota k okamžitému odpaření vzorku (asi o 50° C vyšší než je bod varu analyzované látky) a je neustále proplachována nosným plynem. Dnes se před injektory zařazují automatické dávkovače (autosamplery).^(9, 15, 32)

1.1.6.4 Separační kolony

Úspěšnost analýzy závisí, mimo jiné, na správném výběru kolony. V GC se používají dva základní typy kolon: náplňové a kapilární. Kapilární kolony se vyrábějí ze syntetického taveného křemene a jsou potaženy polyimidovým obalem (zvyšuje pružnost). Stacionární fáze je tvořena tenkým filmem na vnitřním povrchu kolony. Jejich délka se pohybuje mezi 20 – 200 m a jejich vnitřní průměr je 0,1 – 0,3 mm. Náplňové kolony obsahují adsorbent – silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta (GSC) nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází (GLC). Nejrozšířenějšími nosiči v GC jsou křemeliny (mechanicky pevné, inertní vůči vzorku a stacionární fázi, tepelně stabilní). Tyto kolony jsou proti kapilárním kratší, dosahují délky desítek centimetrů až několika metrů a jejich vnitřní průměr je 3 – 8 mm. Náplňové kolony jsou vhodnější ke kvantitativnímu stanovení (mají větší sorpční kapacitu, ale menší dělicí schopnost) a kapilární kolony se lépe hodí ke kvalitativní analýze (k separaci složitých směsí). Dalším rozdílem těchto kolon je způsob výroby, kapilární kolony jsou na rozdíl od náplňových téměř výhradně dodávány specializovanými chemickými firmami. Naopak použitá stacionární fáze bývá často shodná. Volbě stacionární fáze je třeba věnovat značnou pozornost. Z obecného pravidla „podobné se rozpouští v podobném“ můžeme odvodit, že stacionární fáze by měla mít podobnou chemickou strukturu - polaritu jako dělené látky.^(9, 15, 32)

1.1.6.5 Termostatování

V GC hraje velmi důležitou roli hodnota a stabilita teploty. Pro přesnost měření je nezbytné udržování konstantního teplotního režimu nástřiku, kolony, detektoru a

regulátoru tlaku. Tyto části často vyžadují různé teploty, protože jejich rozdílná teplota ovlivňuje analýzu. S rostoucí teplotou kolony roste rychlost analýzy, ale klesá kvalita separace. ^(9, 15, 32)

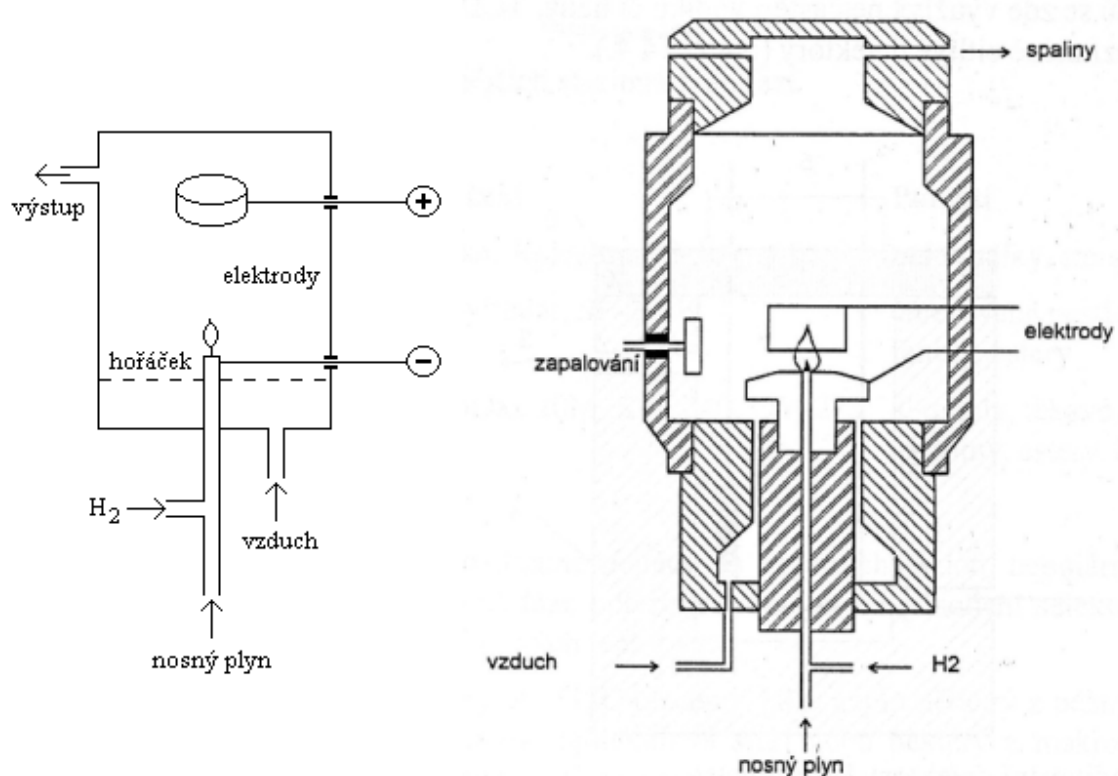
1.1.6.6 Detektory

Jednou z nejdůležitějších součástí chromatografu je detektor, který slouží k vyhodnocení analýzy. Výsledkem je chromatogram, který představuje závislost signálu detektoru na čase resp. množství plynu prošlého kolonou. K nejčastěji užívaným patří: tepelně vodivostní detektor – katarometr (TDC), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchyty (ECD) a velmi významnou aplikací je použití hmotnostního spektrometru (MS) jako detektoru k identifikaci látek rozdělených chromatografií. Podle starší klasifikace se uvedené typy detektorů řadí do skupiny diferenciálních, jejichž výsledný záznam se skládá ze série píků podobných Gaussově křivce. Dle jiné klasifikace je můžeme dělit na destruktivní – ve kterých dochází k ireverzibilním změnám složky (př. FID) a nedestruktivní (př. TDC). ^(9, 15, 32)

1.1.6.6.1 Plamenový ionizační detektor (flame ionization detector – FID)

FID patří k nejpoužívanějším detektorům v GC. Na obrázku č. 1.4 je uvedeno jednoduché schéma. U tohoto detektoru je nosný plyn z chromatografické kolony přiváděn do kyslíko-vodíkového plamene, který je realizovaný miniaturním hořáčkem v centru detektoru. V plameni probíhají důležité chemionizační reakce, které vedou ke vzniku iontů. Ionty a molekulové fragmenty vznikají spálením eluovaných složek vzorku a tím se mění ionizační proud procházející mezi hořáčkem (záporná elektroda) a kladnou elektrodou. V tom spočívá princip FID. Konstrukce detektoru se může lišit a to má vliv na velikost odezvy. Není to ovšem univerzální detektor, odezvu dávají téměř všechny organické látky (především uhlovodíky), ale odezvu nedává většina

anorganických plynů a par. Odezva detektoru je často menší u látek obsahující kyslík, dusík, síru nebo halogen. ^(9, 15, 32)



Obr. 1.4: Schéma plamenového ionizačního detektoru. ^(15, 9)

1.1.7 Vnitřní standardizace

Tato metoda eliminuje vliv změn pracovních podmínek, protože těmito změnami je ovlivněna jak stanovovaná látka, tak vnitřní standard. Vnitřního standardu se přidává ke vzorku známé množství. S takto vzniklou směsí provedeme nástřik a vyhodnotíme dané plochy. Vnitřní standard musí splňovat následující podmínky: musí se eluovat v blízkosti stanovované látky, musí mít koncentraci blízkou koncentraci stanovované látky, nesmí být přítomen v původním vzorku a nesmí reagovat se složkami vzorku. ⁽³²⁾

1.1.8 Derivatizace

Derivatizace slouží ke zlepšení nebo dokonce umožnění analýzy. Jedná se o zavedení určitých atomů či funkčních skupin do molekuly analyzované látky a tím její převedení na látku s odlišnými vlastnostmi. Změnou chemické struktury můžeme docílit zvýšení citlivosti a selektivity a tedy usnadnění identifikace řady látek. V plynové chromatografii se derivatizace provádí z několika důvodů. Především ke zvýšení těkavosti stanovovaných látek (mnoho organických látek se obtížně převádí do plynného stavu), k zamezení sorpce, ke zlepšení selektivity, zvýšení citlivosti a snížení meze detekce.

V plynové chromatografii mastných kyselin je nejobvyklejší derivatizační reakcí esterifikace. Estery patří k látkám s dobrými chromatografickými vlastnostmi (jsou těkavější než jim odpovídající kyseliny, netvoří vodíkové můstky, nedimerizují ani nedisociují). Nejvíce těkavé a nejčastěji připravované jsou methylestery mastných kyselin (FAME).⁽¹⁵⁾

1.1.9 Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry - MS) ve spojení s kolonovými separacemi

MS je fyzikálně chemická metoda, která má velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře látek. Spojení chromatografie a MS výrazně zlepšuje selektivitu a identifikaci i složitých směsí. Hmotnostní spektrometr v tomto spojení zastává funkci detektoru a umožňuje také identifikaci látek s využitím jejich hmotnostního spektra. Kombinované systémy chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS, LC/MS) jsou cenově přijatelné a v oblasti chemické analýzy mají široké uplatnění (především stopová analýza organických látek).

Princip metody spočívá v ionizaci molekul. Odštěpením valenčních elektronů vznikají ionty a dalším štěpením fragmenty. Tyto částice se poté dělí podle své efektivní

hmotnosti m/z (m je hmotnost ionu, z je jeho náboj) a vstupují do detektoru, kde jsou registrovány. Výsledkem je hmotnostní spektrum. ^(9, 26)

1.1.9.1 Instrumentace

Přes značnou rozmanitost v konstrukci určujeme tři hlavní části spektrometru: iontový zdroj, analyzátor a detektor. Kromě těchto částí je zapotřebí dávkovací zařízení, počítač a vakuový čerpací systém. ^(9, 26)

1.1.9.2 Iontový zdroj

Hmotnostní spektrometr podává informaci pouze o částicích nesoucích náboj, proto je jeho nezbytnou součástí iontový zdroj. Ten převádí analyzovanou látku do ionizovaného stavu a tak vznikají kladně či záporně nabitě molekulární ionty a fragmenty. Druh použitého iontového zdroje udává aplikovatelnost metody. Podle množství dodané energie dělíme ionizaci na měkkou a tvrdou (energie je již dostatečná ke značné fragmentaci primárního iontu). V GC se ionizuje plynná těkavá látka. Provádí se ionizace nárazem pomalých elektronů působením elektrostatického pole nebo chemická ionizace.

Nejběžnější je ionizace nárazem elektronů (EI), je běžně užívaná v GC-MS. V prostoru iontového zdroje je udržováno vysoké vakuum, které zajišťuje stabilitu mezičásticových interakcí. Dále je v tomto prostoru žhavená katoda a anoda, mezi kterými protéká proud elektronů o energii 10 – 70 eV. K tvorbě iontů dochází interakcí molekul analyzované látky M s elektrony e^- podle rovnice:



kde dochází obvykle k vyražení elektronu z molekuly látky a vzniku molekulového iontu. Ionizace může být vícenásobná. Dokud mají vznikající fragmenty přebytek energie, tak rozklad pokračuje.

Další běžně užívanou ionizační technikou v GC-MS je chemická ionizace (CI). Na rozdíl od EI se jedná o měkkou ionizaci. Stejně jako u EI jsou zdrojem energie urychlené elektrony, jejichž energie je předána analyzované molekule přes reakční medium. Toto medium je nejčastěji plyn nebo páry nízkovroucí kapaliny, které jsou z hlediska MS v ionizační komoře pod vysokým tlakem (50 – 150 Pa). Rozsah fragmentací v procesu CI závisí na množství energie, tedy na výběru reakčního media. Konstrukčně se zdroj EI a CI příliš neliší, proto se často setkáváme s kombinovaným zdrojem EI-CI. ^(9, 26, 33)

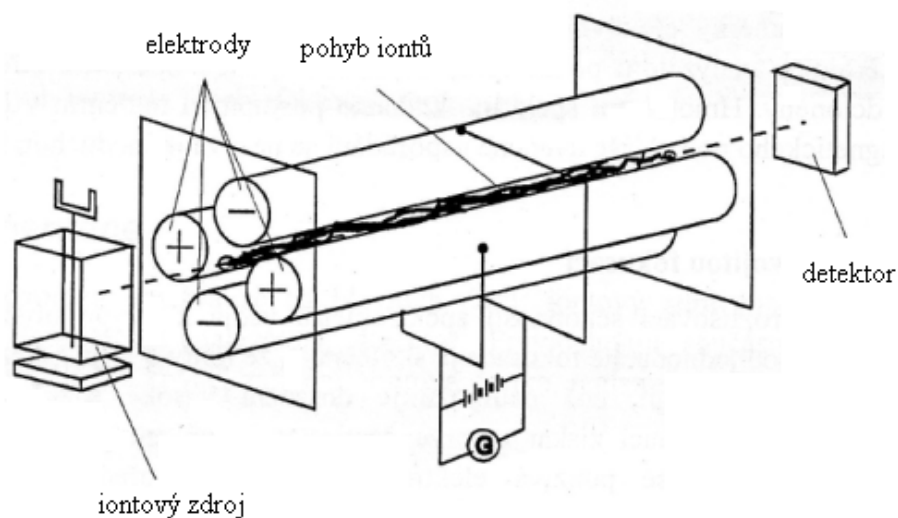
1.1.9.3 Separace iontů

K separaci iontů slouží analyzátory – hmotnostní filtry. Ionty, které opustí iontový zdroj, procházejí přes elektrostatický urychlovač, iontovou optiku a vstupují do analyzátoru, kde jsou děleny na základě své efektivní hmotnosti m/z .

Mezi nejstarší separátory iontů patří magnetický analyzátor. Ve spojení se separační technikou se užívá výjimečně. Jedná se o dělení v homogenním magnetickém poli s proměnlivou magnetickou indukcí. Ionty procházejí vstupní štěrbinou a podle velikosti jejich efektivní hmotnosti m/z se v magnetickém poli zakřívují dráhy jejich letu. Dostředivá síla působící na nabitou částici je úměrná intenzitě magnetického pole a je-li její hodnota konstantní, je poloměr zakřivení dráhy letící částice úměrný m/z . Výstupní štěrbinou procházejí ionty jen o určité hodnotě m/z a ostatní ionty jsou odcloněny. Proměněním určitého rozsahu intenzit magnetického pole získáme hmotnostní spektrum.

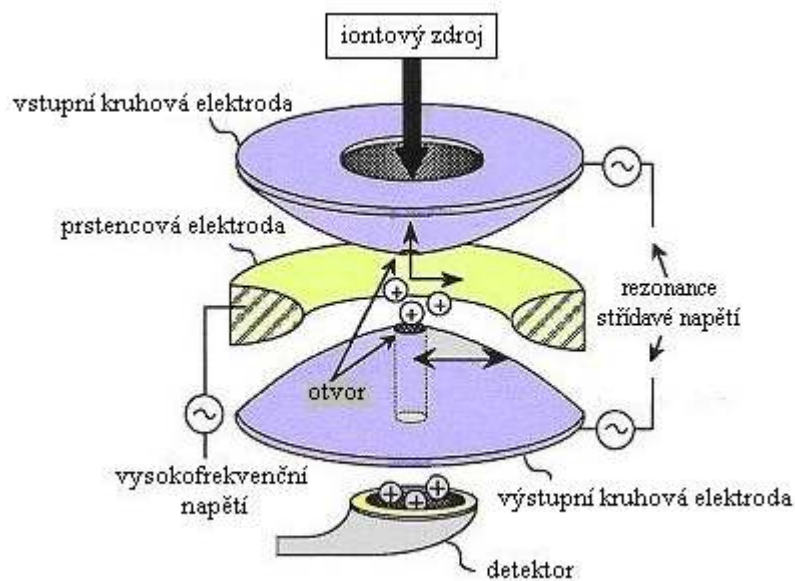
Analyzátor, který se často užívá v kombinaci GC/MS a LC/MS se nazývá kvadrupólový. Na rozdíl od předchozího typu je to nemagnetický analyzátor, ve kterém se ionty dělí ve vysokofrekvenčním elektrickém poli. Skládá se ze čtyř tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu, na které je přivedeno stejnosměrné a střídavé napětí. Tyto tyče jsou uloženy symetricky kolem osy, jak je uvedeno na obr. 1.5. Dvojice tyčí ležící naproti sobě mají stejný potenciál. Na ionty, které vstupují do prostoru mezi tyče,

působí pole o dvou složkách (statické a vysokofrekvenční). Při určité hodnotě stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodném poměru se po stabilní dráze pohybují pouze ionty o určité hodnotě m/z . Ostatní ionty provádějí příčné oscilace, dokud nedopadnou na elektrodu nebo na clonu separátoru. Hmotnostní spektrometr můžeme označit jako hmotností filtr nastavený na konkrétní hodnotu m/z . Změnou přivedeného napětí měníme hodnotu m/z , se kterou ionty procházejí.



Obr. 1.5: Kvadrupólový analyzátor. ⁽⁹⁾

Posledním nejčastěji používaným analyzátozem je iontová past. Využívá se v oblasti LC/MS a GC/MS. Iontová past je analogií kvadrupólového analyzátoru s tím rozdílem, že jsou ionty uzavřeny v prostoru pomocí střídavého elektrického pole. Z obr. 1.6 je patrné, že obsahuje tři elektrody – vstupní kruhovou, výstupní kruhovou a prstencovou. Na prstencovou elektrodu je přiváděno vysokofrekvenční střídavé napětí zprvu s nízkou amplitudou, kdy se ionty v prostoru pasti pohybují po stabilních uzavřených drahách, poté s vyšší amplitudou střídavého napětí. S rostoucí hodnotou napětí jsou pak postupně ionty s rostoucím m/z vypuzovány přes výstupní elektrodu do detektoru. ^(9, 26)



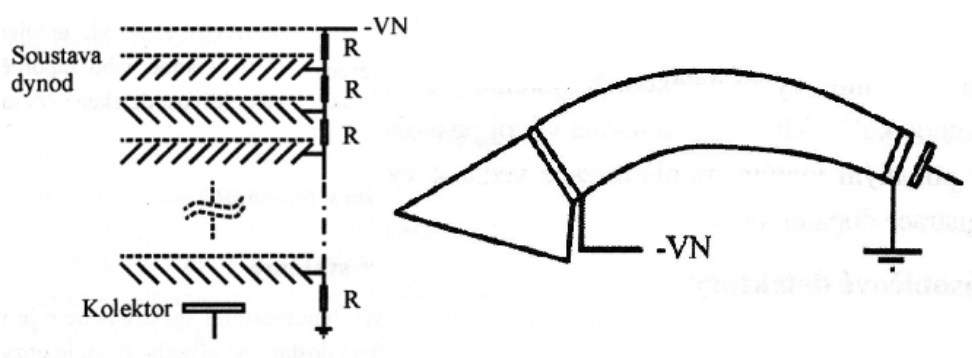
Obr. 1.6: Iontová past. ⁽³⁶⁾

1.1.9.4 Detekce

Iontový proud se nejčastěji detekuje pomocí násobičových detektorů. Jak je patrné z názvu, tyto detektory využívají efektu násobení elektronů, vznikajících po dopadu iontů (jsou schopné zaznamenat dopad i jednoho iontu). Tyto detektory jsou vhodné pro kombinované systémy LC/MS a GC/MS. Jedná se o elektronnásobičové a fotonásobičové detektory.

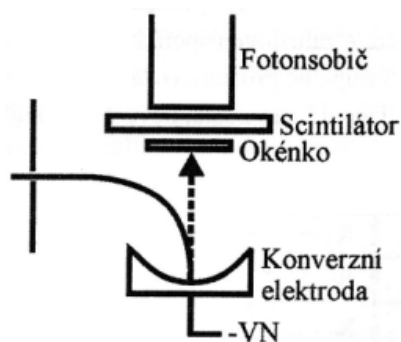
Podle konstrukce můžeme elektronnásobičové detektory dělit do dvou skupin: s diskretním dynodovým polem a s kontinuální dynodou. První zmíněný sestává z kovových destiček (dynod) žaluziově uspořádaných a druhý je tvořen zakřivenou trubicí z olovnatého skla podle obr. 1.7. U detektoru s dynodovým polem dopadne ion na první dynody, dojde k vyražení elektronů, jejichž počet se při odpadu na další dynody násobí. Detektor s kontinuální dynodou využívá opakovaných emisí elektronů při dopadu na stěnu trubice, přičemž počet elektronů také lavinovitě roste. Společné pro oba typy je vysoké napětí vložené, v prvním případě mezi první a poslední řadu dynod, a

ve druhém případě mezi kontakty při ústí a na konci trubice. Oba detektory vyžadují vhodný elektrický odpor. Dále je v konstrukci obou detektorů zařazen kolektor, který zachycuje elektrony vyražené iontem, buď z materiálu dynod nebo trubice. Zpětné emise kladných iontů do vstupního prostoru brání tvar detektoru (žaluziové uspořádání nebo zakřivení trubice). Účinnost detektorů je srovnatelná, ale citlivost (k iontům s vyšší hmotností) a životnost je u systému s kontinuální dynodou nižší.



Obr. 1.7: Elektronásobičové detektory. ⁽²⁶⁾

Fotonásobičové detektory mají na rozdíl od elektronových násobičů vyšší citlivost a delší životnost (díky tomu, že vnitřní část fotonásobiče není v kontaktu s vnitřním prostředím spektrometru). Nejprve ionty dopadají na kovovou elektrodu a jsou konvertovány na elektrony. Ty dopadem na scintilační stínítko způsobují uvolnění fotonů, které vstupují do fotonásobiče. Na obr. 1.8 je uspořádání fotonásobičového detektoru (tzv. Dalyho uspořádání). ⁽²⁶⁾



Obr. 1.8: Detekční uspořádání s fotonásobičem. ⁽²⁶⁾

1.1.9.5 Čerpací vakuové systémy

Vakuum uvnitř přístroje je velice důležité pro kvalitu výsledných hmotnostních spekter. Obvykle se u hmotnostních spektrometrů užívá dvoustupňového čerpacího systému. Běžné mechanické rotační pumpy zajišťují předčerpávání a dočerpávání na pracovní tlak je úkolem difúzní nebo turbomolekulární pumpy. Dostatečně nízký tlak je pro provoz zařízení nesmírně důležitý a jeho dosažení je obtížné především u kombinovaných systémů LC/MS a GC/MS. K získání dostatečného vakua lze čerpat zvlášť prostor hmotnostního analyzátoru a prostor iontového zdroje.

Vnitřní prostor mechanické rotační pumpy je rozdělen diskem, který excentricky rotuje ve válcové dutině a tím periodicky přečerpává vzduch od vstupu k výstupu. Difúzní pumpa má ohřívané dno a chlazené stěny. V prostoru dna je přiváděna k varu vhodná kapalina (s nízkou tenzí páry) a na stěnách pumpy zpětně kondenzují její páry. Páry zachycené do systému trysek je opouští vysokou rychlostí a strhávají s sebou okolní vzduch. Ten je odváděn do prostoru vstupního otvoru, odkud je odčerpán mechanickou rotační pumpou. S touto vysokovakuovou pumpou je možné dosáhnout tlaku až 10^{-6} Pa. Technicky náročnější je turbomolekulární pumpa. Má vyšší pořizovací i provozní náklady, než již uvedené typy. Principem této pumpy je rotace turbínky, jejíž lopatky se otáčejí proti opačně orientovaným lopatkám statoru. Rotaci turbínky

zajišťuje vysokofrekvenční elektromotor. Pomocí turbomolekulární pumpy je možné dosáhnout tlaku až 10^{-8} Pa. ⁽²⁶⁾

1.1.9.6 Hmotnostní spektrum

Základním informačním výstupem hmotnostního spektrometru je hmotnostní spektrum. Informace o funkčních skupinách v molekule analyzované látky získáme rozborem tohoto spektra. Hmotnostní spektrometrie umožňuje určit strukturu analyzované látky a využívá se k identifikaci chemických individuů. Využívá se tedy jak ke kvalitativní analýze (především organických látek), tak ke kvantitativní analýze. V kvantitativní analýze se využívá lineárního vztahu mezi iontovým proudem a koncentrací látky. Velmi významné je propojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kde látky rozdělené chromatografem vstupují do hmotnostního spektrometru, který slouží jako detektor ke stanovení jednotlivých součástí. Ze směsi chromatografem oddělená složka vstupuje do hmotnostního spektrometru a získání jejího spektra umožňuje její identifikaci. EI spektra mnohých sloučenin jsou obsažena v katalozích a tak předběžné přiřazení struktury i u složitých molekul není příliš obtížné. Hmotnostní spektrum vyhodnocené programově má na vodorovné ose hodnotu m/z a na svislé ose je vynášena relativní intenzita iontového proudu v procentech. Tato spektra většina programů zobrazí v podobě čárových píků. Pro tento proces je nezbytné počítačové vyhodnocení a porovnání získaných spekter se standardními knihovními spektry v katalogu. ^(9, 26)

1.2 Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction – SPE)

SPE je metoda, která slouží k přípravě vzorků, což je velmi důležitá fáze chromatografické analýzy. Princip SPE sorpce je podobný jako u kapalinové chromatografie. Analyty, které nás zajímají, jsou v kapalně fázi a jsou zadržovány na tuhém sorbentu. Tuhý sorbent je uložen v SPE kolonkách a má větší zrnění než sorbent

v kapalinové chromatografii, proto je možné pracovat při nízkém podtlaku. Mezi výhody této metody patří selektivnost, reprodukovatelnost, jednoduché provedení, možnost zpracování více vzorků najednou a oproti extrakci kapalina – kapalina především malá spotřeba organických rozpouštědel a časová nenáročnost. SPE je nejčastěji užívána při zpracování kapalných vzorků. Použití pevné fáze k předseparaci extraktu má několik předností - odstranění nežádoucích látek a odstranění látek s velkým retenčním objemem, zakoncentrování. Naopak nevýhodou zavedení SPE do analytického postupu může být to, že je možným zdrojem chyb.

Pro SPE je důležitá volba kolonky - sorbentu, který je uložen v obalu z polypropylenu nebo skla. Separační mechanismus této techniky spočívá ve vzájemné interakci mezi molekulami analytu a funkčními skupinami pevné fáze. Sorbenty využívané v SPE jsou podobné sorbentům v kapalinové chromatografii. Z toho je patrné, že stejně jako se používá chromatografie na normální, reverzní nebo iontově-výměnné fázi platí totéž i u SPE. ^(34, 35)

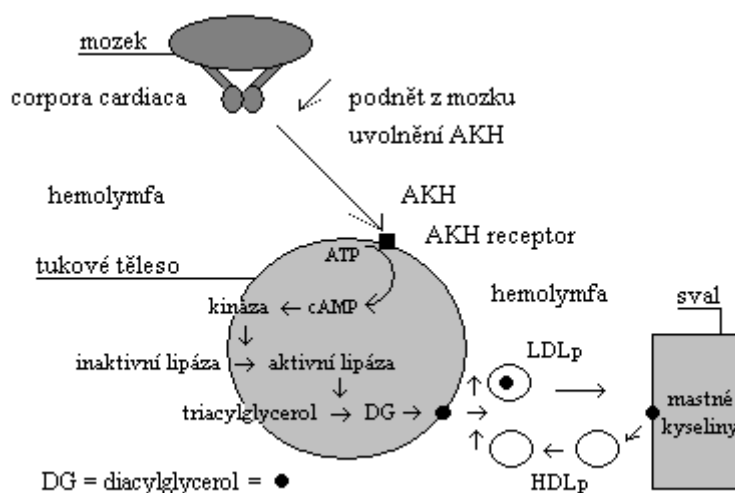
1.3 Metabolismus DG a TG u hmyzu (*Locusta migratoria*)

1.3.1 Adipokinetické hormony (AKH)

Jsou to peptidické hormony řídící metabolismus a homeostázu. Tyto hormony jsou označovány jako stresové. Jejich účinkem je stimulace reakcí za současného uvolnění energie a inhibice syntetických reakcí. Slouží k zajištění energie k pohybu. U sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) jsou známy tři AKH (AKH-I, AKH-II, AKH-III) a jsou syntetizovány ve stejných neurosekretorických buňkách v *corpora cardiaca*. Vzájemně se liší pouze sekvencí v určité části peptidu. AKH jsou chemicky okta až deka peptidy, na N-konci mají kyselinu pyroglutamovou a C-konec je amidovaný.

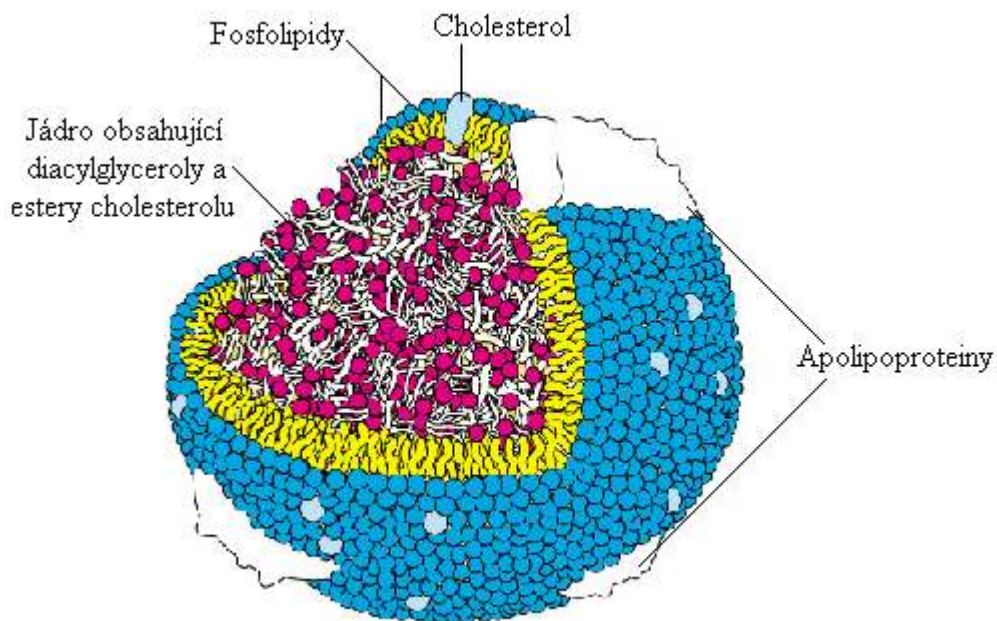
Hlavní funkcí AKH je mobilizace lipidů a jejich využití tkáněmi (především svalovinou při letu). Při pohybu se tyto hormony uvolňují do hemolymfy (jejich sekrece

je zpětnovazebně kontrolována). Lipidy se uvolňují z tukového tělesa po přenesení signálu z *corpora cardiaca* (uvolněním AKH), jak je naznačeno na obr. 1.10. V tukovém tělese proběhne řada reakcí, které vedou ke štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol (je transportní formou tuku). Diacylglycerol je umístěn na povrchu tukového tělesa, odkud je přenesen k cílovým orgánům.



Obr. 1.10: Působení adipokinetického hormonu. ⁽¹⁸⁾

K transportu lipidů slouží lipophoriny, které mají komplikovanou strukturu, viz obr. 1.11. Přenesení hemolymfou je zajištěno připojením diacylglycerolu na HDLp (high density lipophorin), jejichž spojením vzniká LDLp (low density lipophorin) a to zajistí přepravu diacylglycerolu. Diacylglycerol je na membráně svalové buňky hydrolyzován za katalýzy lipázy na glycerol a mastné kyseliny. LDLp se opět mění na HDLp a tento prázdný nosič se může opět účastnit transportu další molekuly. Mastné kyseliny poté slouží jako zdroj energie. Mezi další funkce AKH patří např. inhibice syntézy bílkovin, stimulace srdeční činnosti, zvýšení svalového napětí atd. ^(3, 8, 12, 18)



Obr. 1.10: Struktura lipophorinu. ⁽³⁷⁾

Existence tří druhů AKH doposud nebyla uspokojivě vysvětlena. Právě studium vlivu jednotlivých AKH na pozdější složení hemolymfy je cílem této práce. Revoluční částí je použití doposud na tento problém neaplikovaných chemicko-analytických metod a to konkrétně GC/FID a HPLC/MS. GC/FID a analýza mastných kyselin je ve zdravotnictví běžně používaným chemicko-analytickým nástrojem, který slouží například k detekci diabetes mellitus typu dva ⁽²⁸⁾, či jako biomarkeru možného výskytu BSE ⁽⁴⁾.

1.4 Mastné kyseliny (fatty acids – FA)

1.4.1 Struktura, výskyt a vlastnosti FA

Mastné kyseliny jsou organické monokarboxylové alifatické kyseliny s dlouhým hydrofobním uhlíkovým řetězcem. Struktura mastných kyselin je typu R-COOH, kde R je uhlíkový řetězec skládající se z lichého počtu uhlíků, což je dáno způsobem syntézy.

Biosyntéza těchto kyselin se uskutečňuje jako kondenzace jednotek C_2 - prekurzorem k syntéze FA je acetylkoenzym A (aktivovaná forma kyseliny octové). Převážně nerozvětvený řetězec těchto kyselin může být nasycený nebo může obsahovat jednu či více dvojných vazeb. Majoritní skupiny polynenasycených mastných kyselin mají dvojně vazby odděleny cis-methylenovou skupinou.

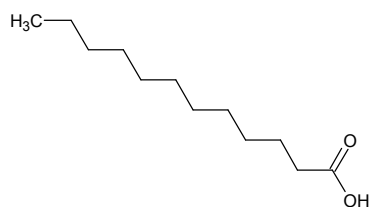
V přírodě se obvykle mastné kyseliny vyskytují ve formě esterů (většinou jako estery glycerolu), vázány v lipidech. Jejich malá část se vyskytuje v neesterifikované formě a jsou označovány jako volné mastné kyseliny (free fatty acids). Složené lipidy, jako např. fosfolipidy nebo glykolipidy, obsahují kromě alkoholů a mastných kyselin i další látky (např. kyselinu fosforečnou, dusíkaté látky, další alkoholy, aminokyselinu nebo sacharidy). Charakter kyselin ovlivňuje vlastnosti lipidů z nich vzniklých. Nasycené kyseliny způsobují vyšší body tání a odpovídají za větší stabilitu lipidů. Nenasycené kyseliny způsobují naopak nižší body tání a větší reaktivitu lipidů. ^(14, 25)

Acylglyceroly neboli tuky jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Glycerol je trojsytný alkohol a podle počtu $-OH$ skupin, které jsou esterifikované, rozlišujeme monoacylglyceroly, diacylglyceroly a triacylglyceroly. Mastné kyseliny obsažené v tuku mohou být různé a jejich složení udává skupenství tuku. ⁽²³⁾

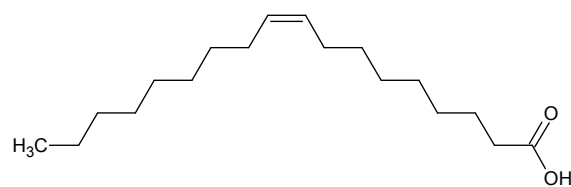
Příkladem nejběžnějších nasycených kyselin rostlinných a živočišných tuků jsou kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0), stearová (C18:0) a arachová (C20:0). Mononenasycené mastné kyseliny obsahují ve svém řetězci jednu dvojnou vazbu, která se téměř vždy vyskytuje v konfiguraci cis. Příkladem je kyselina olejová (C18:1, cis-9). Mezi polynenasycené patří kyselina linolová (C18:2, cis-9,12), linolenová (C18:3, cis-9,12,15) a např. arachidonová (C20:4, cis-5,8,11,14). ^(14, 23)

Tab. 1.2

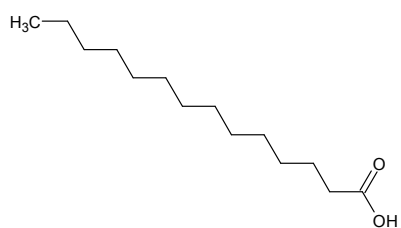
Struktura FA



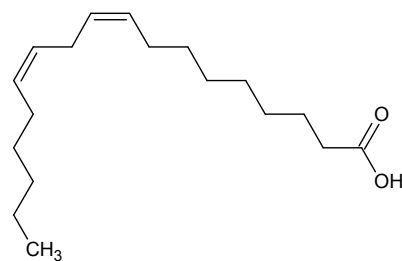
C12:0



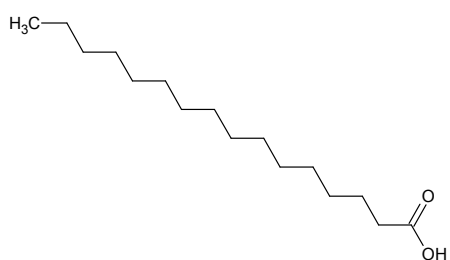
C18:1n9



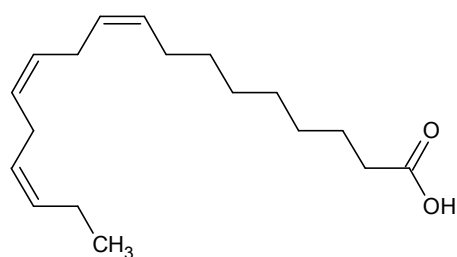
C14:0



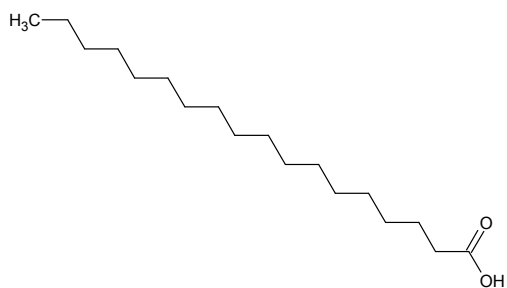
C18:2n6



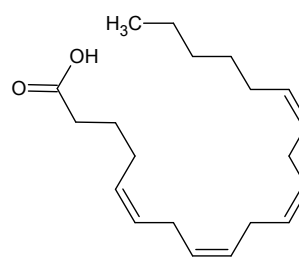
C16:0



C18:3n3



C18:0



C20:4n6

Fyzikální vlastnosti mastných kyselin závisí tedy na délce uhlíkového řetězce a na stupni nenasyčenosti. S rostoucím počtem uhlíků se zvyšuje bod tání a naopak s přibývajícím počtem dvojných vazeb bod tání klesá. ⁽²²⁾

1.4.2 Analýza mastných kyselin ve spojení s medicínskými aplikacemi

1.4.2.1 Plazmatické FA jako ukazatelé vývoje novorozenců

Mezi významné aplikace GC v medicínské oblasti patří určení mastných kyselin v krevní plazmě novorozenců. Součástí strukturálních lipidů ve všech buněčných membránách jsou polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA). Tyto kyseliny jsou tedy nezbytné pro správný vývoj a funkci centrální nervové soustavy (CNS), sítnice a různých žláz. Esenciální mastné kyseliny - kyselina linolová (C18:2n6) a linolenová (C18:3n3) jsou postupně metabolizovány na LC-PUFA, jako je kyselina arachidonová (C20:4n6, AA), eicosapentaenová (C20:5n3, EPA) a docosahexaenová (C22:6n3, DHA). Nedostatek uvedených kyselin se může u novorozence projevit nedostatečným vývinem mozku a nervového systému. Následkem tohoto deficitu jsou různé neurologické poruchy, proto je monitorování vývoje LC-PUFA v plazmě novorozenců tak významné. V případě, že je zjištěn tento nedostatek, je možné zařazení AA a DHA do dětské stravy.

Plynová chromatografie má pro stanovení mastných kyselin v krvi novorozenců řadu výhod. Umožňuje vysokou citlivost, přesnost a pomocí této analýzy nezjistíme pouze relativní, ale také absolutní množství FA. Kvalitativní a kvantitativní (využívá metodu vnitřního standardu) měření je relativně jednoduché a vyžaduje jen malé množství vzorku (100 µl). ⁽⁶⁾

1.4.2.2 FA mozkové tkáně jako biomarkery BSE

Dalším využitím GC v kombinaci s hmotnostním spektrometrem je strukturální analýza některých FA z tkáně CNS (tj. mozku a míchy) skotu. Tyto kyseliny slouží jako biomarkery onemocnění BSE. Tato nemoc patří mezi prionové choroby postihující skot. Šíření nákazy u zvířat a následná konzumace masných produktů z nakažených jedinců by mohla, podle mnohých, způsobit přenos původně čistě zvířecího onemocnění na člověka. Vznikla tak zřejmě nová varianta Creutzfeldz-Jakobovy choroby (CJD). Předpokládá se, že se BSE přenáší na člověka konzumací mozku či míchy dobytka. Všechny prionové choroby, zvířecí i lidské, vedou k degenerativnímu poškození CNS, které je doprovázeno poruchami paměti, pohyblivosti a chování. Všechny jsou smrtelné a v současné době proti nim není znám účinný lék. Jediným nástrojem v boji s tímto onemocněním je tedy účinná prevence. Je potřeba test, pomocí kterého by se kontrolovalo přidávání tohoto vysoce rizikového materiálu do masných výrobků.

Metody sloužící ke kontrole rizika BSE v masných výrobcích jsou převážně založené na imunochemické detekci specifických bílkovin CNS, především neurone specific enolase (NSE) a glial fibrillary acidic protein (GFAP). Jako velmi vhodná metoda ke kontrole potravin se ukázala NSE western blotting a GFAP ELISA. Nicméně tyto imunochemické procedury mají nevýhody. První nedostatek spočívá v tom, že výsledky jsou tkáňově specifické, zatímco právní úprava o SRM (specific risk material) nepoukazuje pouze na tkáň, ale také na druh a věk zvířete. Druhým nedostatkem je, že bílkovinné biomarkery jsou citlivé na teplotu a během technologického procesu úpravy masa může dojít k jejich ztrátě. Třetí nevýhodou je nesnadné stanovení množství bílkovinného markeru, protože jeho ztráta při zpracování není známá.

Tyto nevýhody se netýkají analýzy GC-MS. Lze předpokládat, že FA jako biomarkery jsou odolnější vůči teplotě. Tyto FA jsou přítomné v CNS jako komplex sfingolipidů a cerebrosidů. Ty jsou detekovány a kvantifikovány prostřednictvím GC-MS po extrakci na tuhé fázi a derivatizaci na methylestery mastných kyselin (FAME). Dále detekce poměru izomerů nervonové kyseliny umožňuje rozlišení druhu a věku CNS (např. odlišení skopového a hovězího mozku). Naopak nevýhodou metody je

vyšší cena a délka zpracování vzorků. V budoucnu by se mohlo úspěšně používat GC-MS k potvrzení pozitivních výsledků vzorků z imunochemického screeningu a tím zúžit možnost přítomnosti nebezpečného materiálu v potravinářských výrobcích. ^(4, 40)

1.4.2.3 Plazmatické FA jako biomarkery diabetes mellitus 2. typu

Dále je možné využití GC-MS k analýze plazmatických FA jako biomarkerů diabetes mellitus druhého typu (DM-2). Toto onemocnění je nejčastější metabolickou chorobou vyznačující se relativním nedostatkem inzulínu, který v organismu vede k nedostatečnému zpracování glukózy. Sekrece inzulínu je částečně zachována (na rozdíl od DM-1), ale tkáně jsou rezistentní vůči jeho působení. Podle statistických údajů je 90 % diabetiků 2. typu a za posledních 20 let narostl počet registrovaných diabetiků dvakrát. V době záchytu má 20 % diabetiků již pokročilé vaskulární komplikace. Hlavním cílem diabetologie je předejít pozdním komplikacím časnou diagnostikou diabetu.

Řada studií o této nemoci prokázala, že DM-2 má přímou souvislost s poruchou metabolismu lipidů, především FA, protože jsou zdrojem energie a hrají důležitou roli v buněčných procesech včetně sekrece inzulínu. Jakmile se rozvine DM, plazmatické neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) lineárně korelují s krevní glukózou a s produkcí jaterní glukózy, bez ohledu na to, zda je člověk hubený nebo obézní. Stanovení pomocí GC-MS následované multivariantní statistickou analýzou (tj. metoda parciálních nejmenších čtverců - lineární diskriminantní analýza, PLS-LDA) umožňuje komplexní kvantitativní analýzu metabolických NEFAs a EFAs a charakteristiku FA u diabetických pacientů obsahující různé biomarkery. Kromě toho PLS-LDA model vizuálně charakterizuje změnu v NEFA metabolické analýze diabetických pacientů s obezitou v oblasti břicha při léčbě rosiglitazonem. Rosignitazon je antidiabetický lék snižující rezistenci vůči inzulínu v tukových, jaterních a svalových buňkách. Multivariantní analýza komplexního biologického profilu má řadu využití v mnoha oborech. Slouží např. k rozlišení genotypu, toxikologickému screeningu nebo k určení diagnózy onemocnění.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je nejběžnější používanou technikou. Její hlavní výhodou je nedestruktivnost, umožňuje přesnou kvantitativní a kvalitativní analýzu metabolitů a je vhodná pro nepoškozené biomateriály. GC-MS je relativně levná alternativa k analýze metabolitů, která poskytuje vysoké rozlišení komplexní biologické směsi. ^(24, 28)

1.5 Analýza hlavních komponent (principal components analysis – PCA)

Tato analýza slouží ke statistickému zpracování dat. PCA patří mezi nejvíce používané metody vícerozměrné analýzy a zahrnuje matematický postup lineární transformace dat z původních proměnných do menšího počtu latentních proměnných (= hlavních komponent). Nové proměnné (hypotetické) – hlavní komponenty mají ty výhodné vlastnosti, že jsou vzájemně nekorelované, je jich výrazně méně a vystihují téměř celou variabilitu původních dat. Hlavní komponenty jsou řazeny od té, jež vysvětlí nejvyšší podíl původní variability, po tu, která vysvětlí podíl nejmenší. PCA slouží ke zjednodušení vyjádření lineárně závislých znaků pomocí rozkladu matice dat do strukturní a šumové matice. Ve strukturní matici jsou využité hlavní komponenty a v šumové ty nevyužité komponenty (obsahují malé množství informace – mají malý rozptyl objektů).

Hlavní komponenty jsou tedy lineární kombinace původních proměnných. První hlavní komponenta (osa) je vedena ve směru největší proměnlivosti mezi objekty a obsahuje největší množství informace. Druhá komponenta zachycuje další směr největší variability nekorelovaný s první osou. Stejným způsobem jsou konstruovány další hlavní komponenty. Osy v PCA pojímají největší možné množství informace. Nový systém os je otočen do směrů, které vyjadřují maximální variabilitu a minimalizují vzdálenosti mezi objekty a hlavními komponentami.

Celkový počet komponent je roven počtu proměnných. Zdrojová matice obsahuje objekty (př. vzorky) a znaky (př. měřená veličina, signál měření). Počet objektů musí být vyšší, než je počet znaků. Cílem PCA je redukce počtu znaků bez

velké ztráty informace. Rozptýlení dat se vyšetřuje pomocí analýzy symetrických matic (kovariačních nebo korelačních).^(41, 42, 43)

2. CÍLE PRÁCE A PŘEDPOKLÁDANÉ HYPOTÉZY

Cíle této bakalářské práce:

- zvládnutí metodiky GC/FID,
- příprava vzorků pro GC/FID a GC/MS,
- zjištění zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorku hemolymfy sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) před a po aplikaci různých druhů adipokinetického hormonu.

Předpokládané hypotézy:

- zastoupení mastných kyselin v hemolymfě sarančete stěhovavého se bude po aplikaci různých druhů AKH lišit.

3. METODICKÁ ČÁST

3.1 Původ vzorku

Jedinci *Locusta migratoria* byli po posledním svlékání (imaga) odebráni asi po osmnácti dnech. Byli krmeni stejnou potravou a drženi ve standardních podmínkách (přeplněné prostory při teplotě 30° C s dvanáctihodinovou fotoperiodou).

Hormonální léčba: 10 pmol Locmi-AKH rozpuštěných v 5 µl 20% methanolu ve fyziologickém roztoku bylo injekčně podáno do břišní oblasti sarančat. Kontrolním jedincům bylo podáno pouze 5 µl rozpouštědla (20% methanol ve fyziologickém roztoku - Ringerův). Vzorky hemolymfy byly odebrány deseti jedincům (5♂, 5♀) těsně před a po devadesáti minutách po vpichu roztoku. Odebraná hemolymfa (10 µl) byla extrahována s použitím roztoku chloroform : methanol (2 : 1) viz kap. 3.2.2.



Obr. 3.1: Pokusný hmyz - *Locusta migratoria*.⁽⁴⁴⁾

3.2 Příprava vzorku

3.2.1 Použité chemikálie

Pro opakovatelnost celé metodické části je nanejvýše důležité, aby byly použity přesně chemikálie, které jsou níže uvedeny. Jakékoliv nahrazení jinou látkou byt' třeba pouze změna výrobce, by mohlo vést ke zhoršení ba přímo dokonce k nefunkčnosti těchto metod.

Tab. 3.1

Látka	Značka	Firma
Kyselina octová	suprapur	MERCK
Kyselina chlorovodíková 37%	Trace select	FLUKA
n-Hexan	suprasolv	MERCK
Metanol	chromasolv	Reidel-deHaen
2-Propanol	LC-MS chromasolv	Reidel-deHaen
Diethylether	EC 200-467	ALDRICH
Octan amonný (NH ₄ AC) 99,9%		MERCK
Chloroform 99,8% stab. 1% etanolem	chromasolv	SIGMA-ALDRICH
Čistý sodík		LACHEMA
Isooktan		MERCK
H ₂ O destilovaná a deionizovaná		
Standardy methylesterů mastných kyselin		SIGMA-ALDRICH

3.2.2 Extrakce lipidů ze vzorku

Pro extrakci lipidů z biologického materiálu, v našem případě se jednalo o hemolymfu sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*), jsme použili metodu podle Folcha⁽¹¹⁾ upravenou Košťálem a Šimkem⁽¹⁹⁾ (Přílohy 10.1).

3.2.3 SPE extraktu lipidů

Výsledný extrakt byl pak pomocí metody SPE rozdělen na tři frakce (Přílohy 10.2). Přínos SPE metody spočívá v oddělení samotných metabolicky důležitých látek diacylglycerolů od jejich přenašečů v hemolymfě reprezentovaných lipophorinem zmíněným v kapitole 1.3.1, který obsahuje fosfolipidy. Při samotné transmethylaci dochází ke štěpení esterových vazeb mezi glycerolem a mastnou kyselinou a nahrazení glycerolu methylem, čímž vzniká měřitelný metylester mastné kyseliny. Tento proces funguje u všech glycerolipidů, tedy jak u diacylglycerolů, tak u fosfolipidů. Bez SPE by byl výsledek zkreslen přítomností mastných kyselin vyštěpených z fosfolipidů a nikoliv, jak je naším cílem, pouze z diacylglycerolů.

První z frakcí značená jako A obsahovala hlavně nepolární lipidy a to diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG). Ve frakci B lze detekovat pouze volné mastné kyseliny. Ve třetí frakci C se eluují polární lipidy a to fosfatidylethanolamin a fosfatidylcholin. Obsah jednotlivých frakcí byl v případě A a C potvrzen na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí (LC/MS) a v případě B pomocí radioaktivního standardu volné kyseliny palmitové a scintilačního přístroje⁽³⁰⁾.

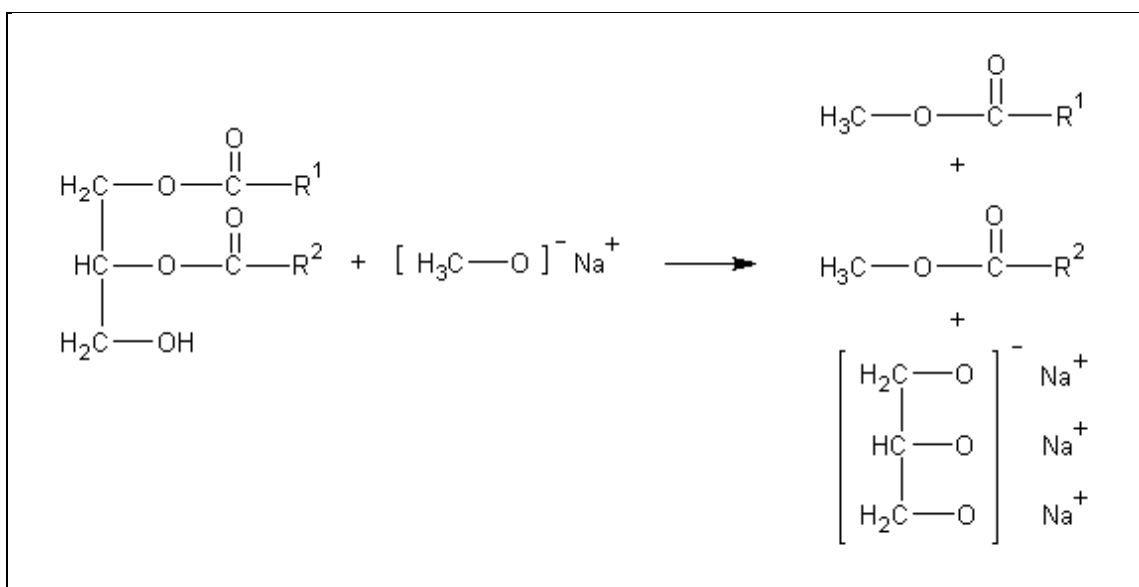
Pro naše účely se ukázaly velmi vhodné kolonky BondElut firmy Varian inc. s 500 mg sorbetu na bázi NH₂. Tyto kolonky mají velmi polární sorbent a užívají se ve dvou modech, extrakce na normální fázi nebo iontově výměnné. Sorbent se chová jako slabý aniont s pK_a 9,8. Při pH nižším než 9,8 je funkční skupina pozitivně nabitá. Protože ethylová skupina podporuje funkci NH₂ skupiny, může být použita i jako nepolární izolace od polárních skupin. NH₂ skupina je výborná na oddělení strukturních izomerů. Ionově výměnná kapacita je 1,10 meq/g a velikost pórů nosiče 60 Å.^(38, 39)



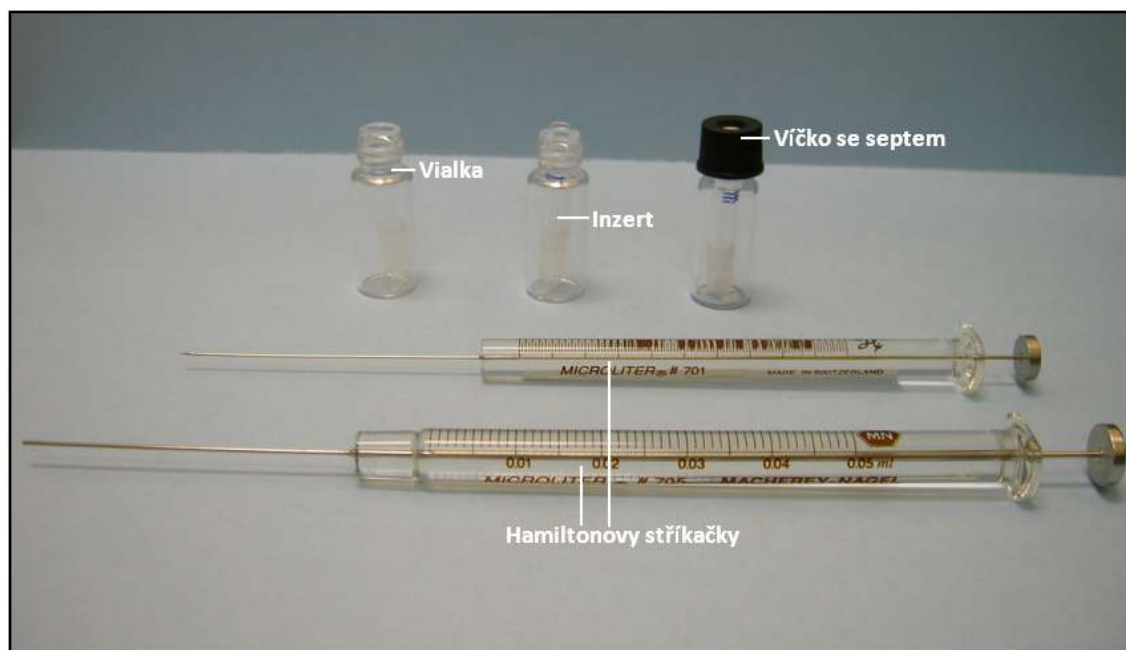
Obr. 3.2: Zařízení pro provádění SPE a detail kolonek. ^(45, 46)

3.2.4 Příprava vzorku pro analýzu pomocí GC/FID – transmethylace

Jelikož je naše práce zaměřena na sledování dynamiky mastných kyselin v diacylglycerolech aktivovaných u hmyzu po podání AKH, pro transmethylaci byla použita pouze SPE frakce A, se kterou byla provedena derivatizace podle přílohy 10.3. Reakce probíhá podle schématu uvedeného na obr. 3.3.



Obr. 3.3: Schéma transmethylační reakce s využitím methanolátu sodného.



Obr. 3.4: Laboratorní materiál používaný k derivatizacím.

3.3 Analýza GC/FID

Pro analýzu mastných kyselin pomocí GC/FID je nutné, aby byly mastné kyseliny převedeny na jejich methylestery. To zajišťuje předchozí krok derivatizace methanolátem sodným. Vzorek byl pomocí autosampleru (AOC – 20S, Shimadzu) a injektoru (AOC – 20i, Shimadzu) vstříknut na kolonu BPX-70 (SGE) do přístroje GC-2014 (Shimadzu), který je na obr. 3.5. Kolona byla kondiciována na 140°C a v průběhu patnáctiminutové analýzy je kontinuálně zahřívána na 230°C, což je dostatečný retenční čas a teplota i k eluci mastných kyselin s 22 uhlíky.



Obr. 3.5: Přístrojové zařízení - chromatograf Shimadzu GC-2014. ⁽⁴⁷⁾

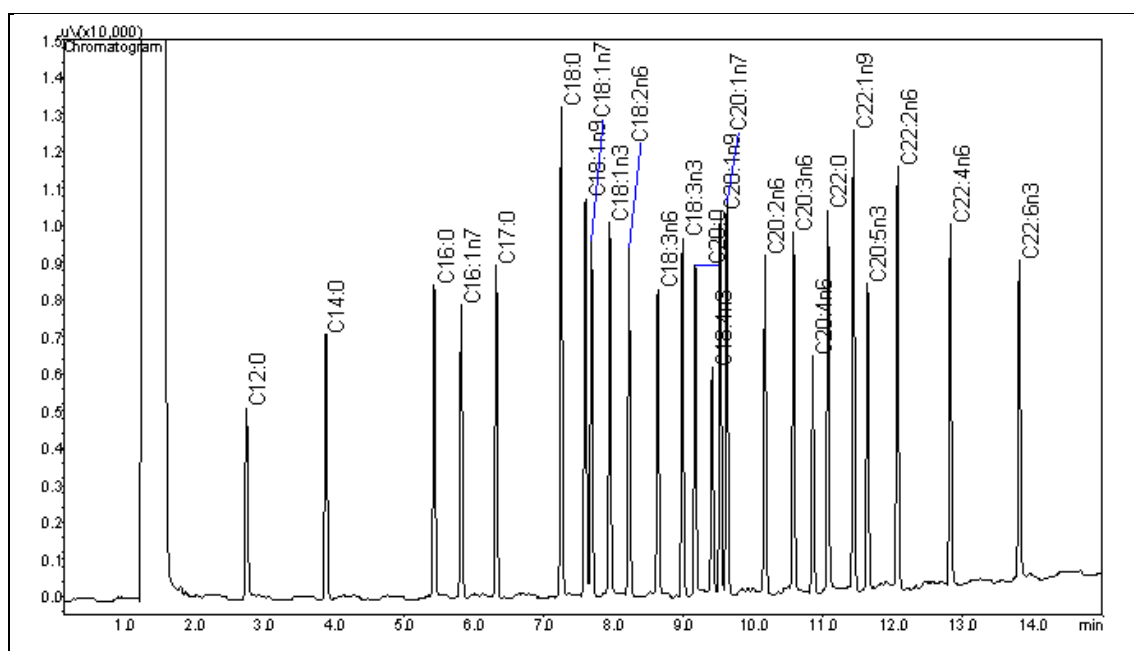
4. VÝSLEDKY

4.1 Analýza mastných kyselin v diglyceridech

Nejprve byly derivatizovány standardní roztoky FA podle postupu uvedeného v příloze 10.3 a analyzovány za podmínek zmíněných v kapitole 3.3. Získané retenční časy byly potřebné k identifikaci mastných kyselin v biologických vzorcích a jsou uvedené v tab. 4.1.

Vlastní biologické vzorky byly získány z jedinců *Locusta migratoria* (obr. 3.1), chovaných za podmínek uvedených v kapitole 3.1. Poté byl vzorek zpracován metodou dle Folcha⁽¹¹⁾ upravenou Košťálem a Šimkem⁽¹⁹⁾ popsanou v příloze 10.1. Pro naše účely důležité nepolární lipidy, diacylglyceroly a triacylglyceroly, jsme izolovali pomocí metody SPE podle postupu uvedeného v příloze 10.2. Následovala transmethylační reakce vzorků, která je uvedená v kapitole 3.2.4, jejíž postup je zaznamenán v příloze 10.3. Samotná analýza mastných kyselin proběhla za podmínek stanovených v kapitole 3.3. Identifikace mastných kyselin ve vzorku hemolymfy byla provedena pomocí retenčních časů získaných analýzou standardů a uvedených v tab. 4.1. Výsledná data byla zpracována pomocí statistického programu CANOCO for Windows v. 4.2.

4.1.1 Práce s komerčně dostupnými standardy



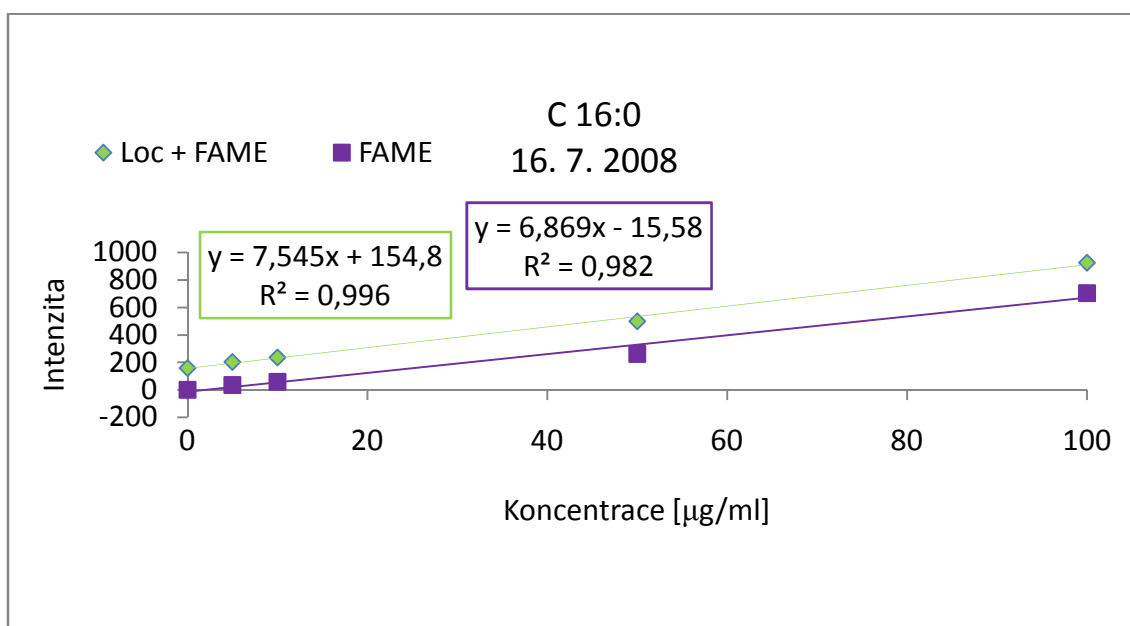
Obr. 4.1: Chromatografický záznam analýzy směsi standardů methylesterů FA.

Chromatogram byl získán s využitím metody Ing. Jany Cimlové (ústní sdělení). Eluční pořadí mastných kyselin závisí především na délce řetězce a v menší míře na stupni nenasycenosti. Nejprve opouštějí kolonu mastné kyseliny s kratším řetězcem a s menším počtem dvojných vazeb a nakonec mastné kyseliny s vyšším počtem uhlíků. Z chromatogramu na obr. 4.1 je patrné, že je možné, aby se kyselina s menším počtem uhlíků a pěti dvojnými vazbami (C20:5n3) zpozdila v koloně až za kyselinu s větším počtem uhlíků a jednou dvojnou vazbou (C22:1n9). Identifikace jednotlivých mastných kyselin spočívá v porovnávání retenčních časů. Nejprve se provede měření standardů po jednom, získají se retenční časy jednotlivých mastných kyselin, a poté se provede analýza celé směsi standardů (obr. 4.1). Pořadí mastných kyselin eluovaných na chromatografické koloně a retenční časy jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tab. 4.1

Mastná kyselina		
Označení	Název	RT [min]
C12:0	laurová	2,743
C14:0	myristová	3,876
C16:0	palmitová	5,420
C16:1n7	palmitoolejová	5,806
C17:0	margarová	6,305
C18:0	stearová	7,235
C18:1n9	olejová	7,581
C18:1n7	vaccenová	7,668
C18:1n3	cis-15-octadecenová	7,928
C18:2n6	linolová	8,206
C18:3n6	γ -linolenová	8,616
C18:3n3	linoleová	8,968
C20:0	arachidová	9,149
C18:4n3	cis-6,3,12,15-octadecatetraenová	9,393
C20:1n9	gondoová	9,509
C20:1n7	cis-13-eicosenová	9,602
C20:2n6	cis-11,14-eicosadienová	10,142
C20:3n6	cis-8,11,14-eicosatrienová	10,557
C20:4n6	arachidonová	10,832
C22:0	behenová	11,047
C22:1n9	eruková	11,413
C20:5n3	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	11,615
C22:2n6	cis-13,16-docosadienová	12,043
C22:4n6	cis-7,10,13,16-docosatetraenová	12,801
C22:6n3	cis-7,10,13,16,19-docosahexaenová	13,787

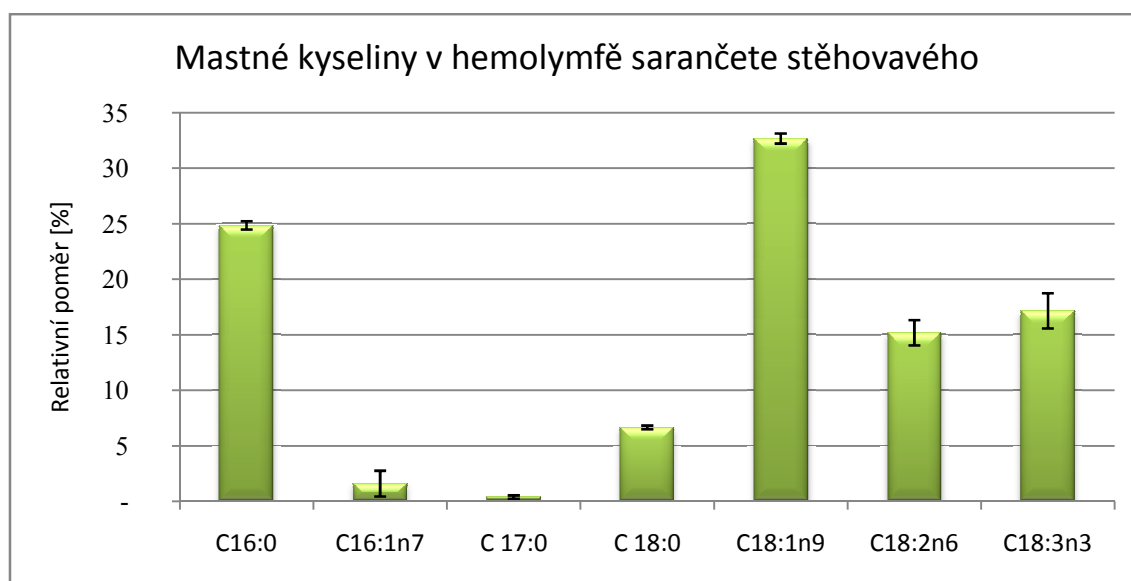
4.1.2 Linearita odezvy plamenového ionizačního detektoru



Obr. 4.2: Graf popisující linearitu odezvy FIDu.

Zelená křivka na obr. 4.2 reprezentuje vzorek získaný z hemolymfy sarančete stěhovavého s přidavkem vnitřního standardu kyseliny palmitové (C16:0) a to v koncentracích 5, 10, 50 a 100 µg/ml. Fialová křivka představuje čistý standard ve stejných koncentracích. Indexy korelace křivek jsou blízké krajní hodnotě a nabývají hodnot 0,998 a 0,991. R se blíží k jedné, což znamená, že jsou téměř všechny body na regresní přímce a chyba měření není výrazná. Na grafu lze také v rámci fyziologických koncentrací mastných kyselin pozorovat rovnoběžnost obou přímek, což poukazuje na linearitu odezvy detektoru v oblasti koncentrace vzorku. K vytvoření grafu byly použity hodnoty ploch píků přepočítané na vnitřní standard.

4.1.3 Opakovatelnost metody GC/FID

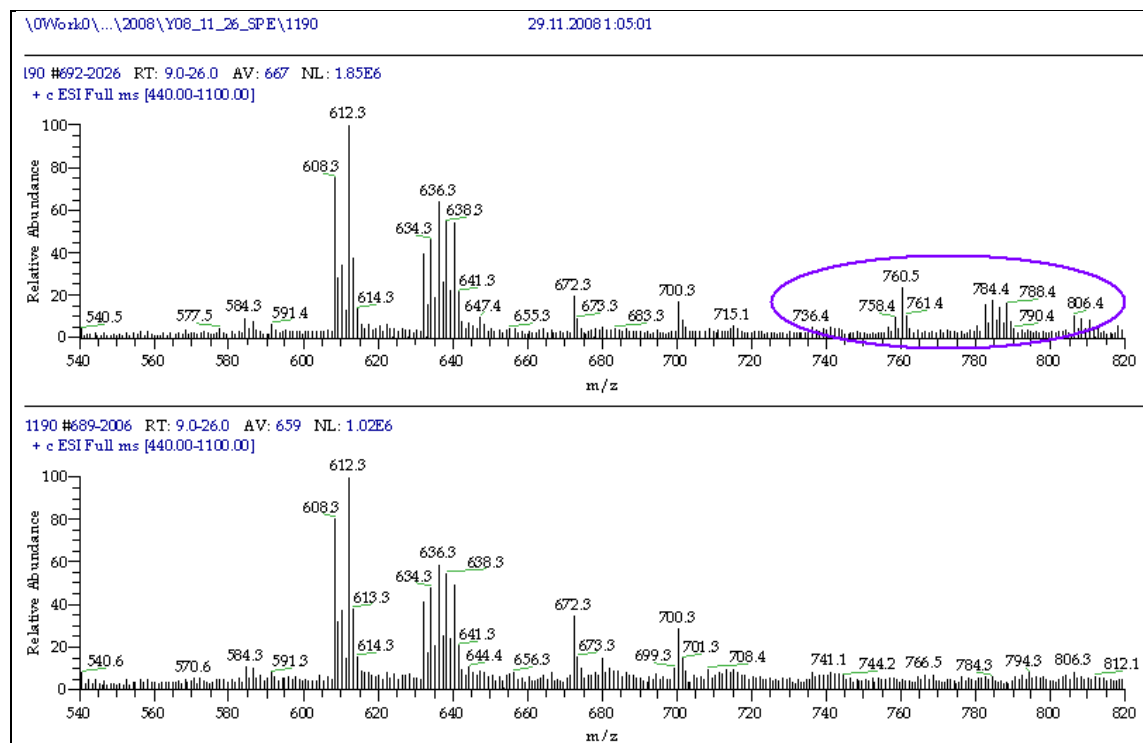


Obr. 4.3: Graf vyjadřující opakovatelnost metody.

Během tří týdnů byl měřen tentýž vzorek hemolymfy desetkrát, čímž jsme provedli kontrolu opakovatelnosti celého postupu stanovení FA (SPE, derivatizace i techniky GC/FID). Chybové úsečky v grafu na obr. 4.3 ukazují nevelké kolísání metody ve zmíněném časovém úseku na nejvíce zastoupených mastných kyselinách. Hodnoty využitě v grafu na obr. 4.3 jsou plochy píků přepočítané na vnitřní standard, poté na procenta, a tato procentuelní zastoupení FA z vzorků jsou zprůměrována.

4.1.4 Porovnání výsledků analýzy hemolymfy před a po SPE

4.1.4.1 Porovnání hmotnostních spekter

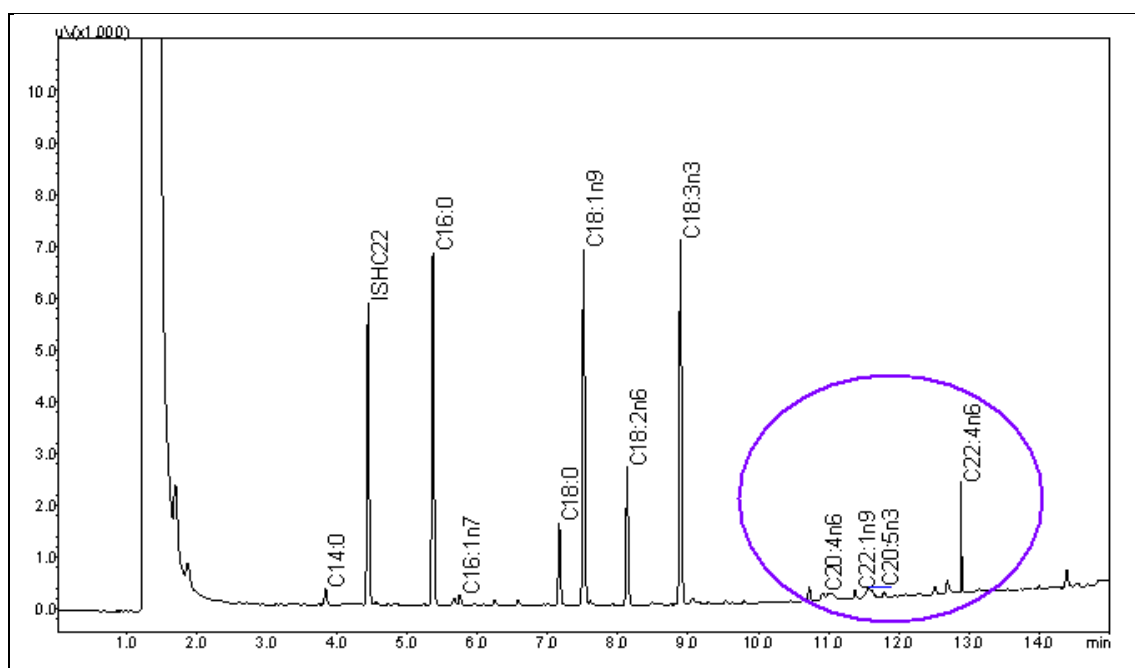


Obr. 4.4: Spektra analýzy vzorku hemolymfy před (horní) a po (dolní) provedení SPE.

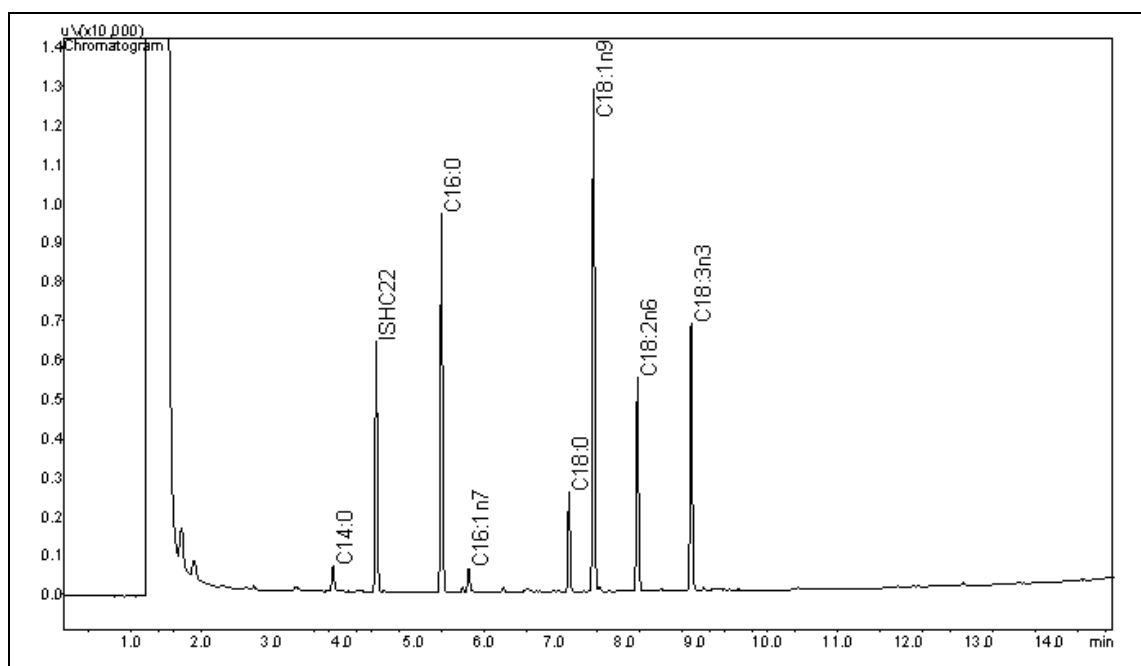
V horním spektru získaném pomocí techniky kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostním spektrometrem, jsou označeny hmoty 736 – 810, které korespondují s hodnotami fosfolipidů transportního lipoproteinu zvaného lipophorin (viz kapitola 1.3.1). Ve spektru jsou dále patrné píky DG, které nabývají hodnot 582-642. Metodou SPE jsou odděleny nežádoucí fosfolipidy od cílových metabolicky významných látek (DG), což je patrné z dolní části spektra, která ukazuje záznam stejného vzorku po provedení SPE.

4.1.4.2 Porovnání chromatografických záznamů

Podobných výsledků jako na obr. 4.4 nelze dosáhnout pomocí techniky GC/FID, jelikož plynová chromatografie není schopná ze svého principu analyzovat tak velké molekuly jako jsou DG. Pro GC/FID je nejprve nutná derivatizační reakce, při které dojde k vyštěpnutí mastných kyselin z molekuly DG a jejich následné methylaci. Jednotlivé methylestery mastných kyselin pak tvoří píky v stabilním retenčním čase. Na obr. 4.5 jsou označené píky methylesterů vyšších mastných kyselin, které se po provedení SPE na obr. 4.6 nevyskytují. Metoda SPE zajišťuje přesnější výsledky odstraněním mastných kyselin, které by byly vyštěpeny z fosfolipidů a analýzu by zkreslily. Obr. 4.5 reprezentuje surová data analýzy mastných kyselin v diglyceridech, na základě plochy píků jednotlivých methylesterů mastných kyselin byly vyhotoveny grafy a provedena PCA analýza.



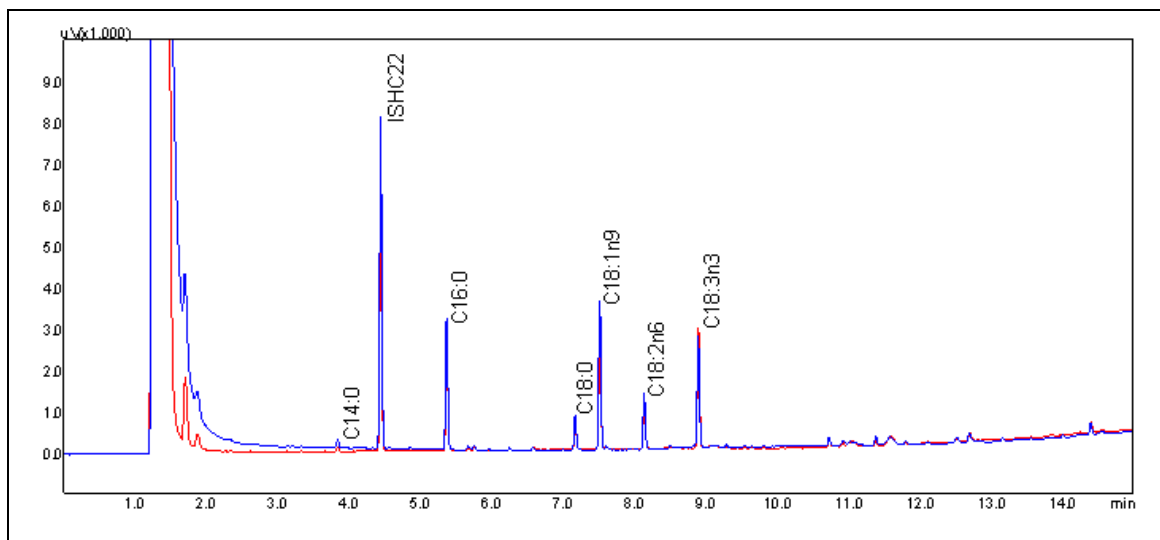
Obr. 4.5: Chromatografický záznam analýzy vzorku hemolymfy před provedením SPE.



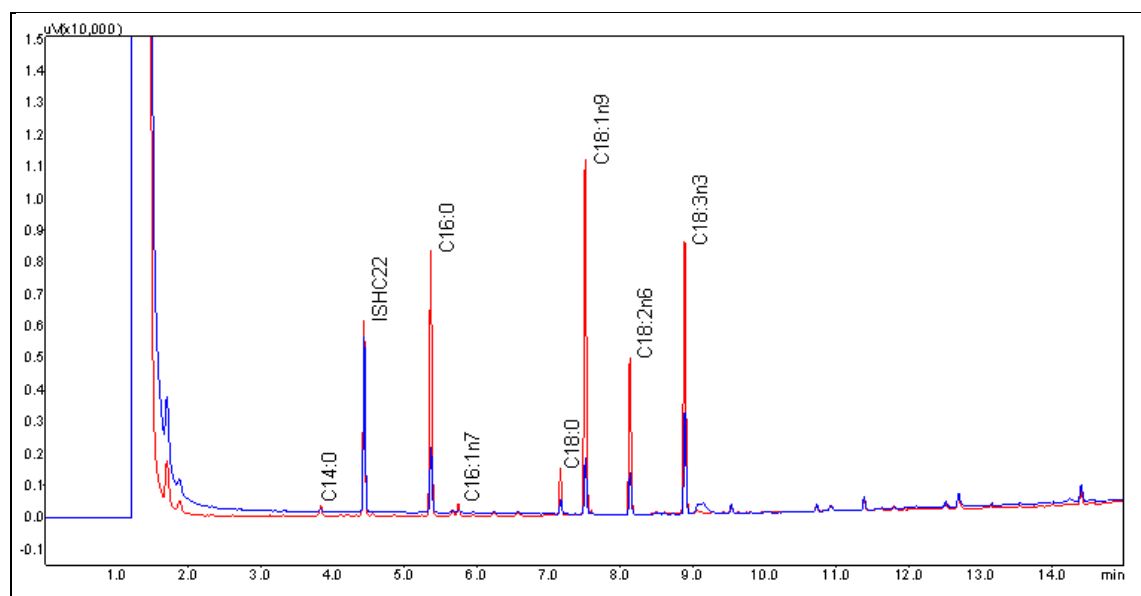
Obr. 4.6: Chromatografický záznam analýzy vzorku hemolymfy po provedení SPE.

4.1.5 Porovnání výsledků analýzy hemolymfy před a po aplikaci různých AKH

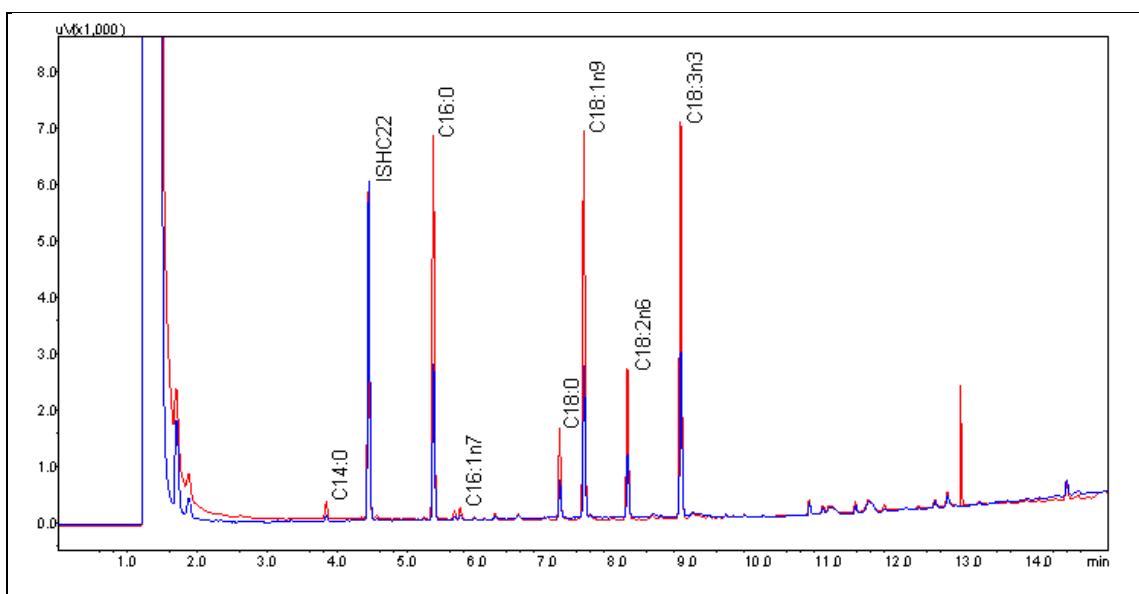
4.1.5.1 Porovnání chromatografických záznamů



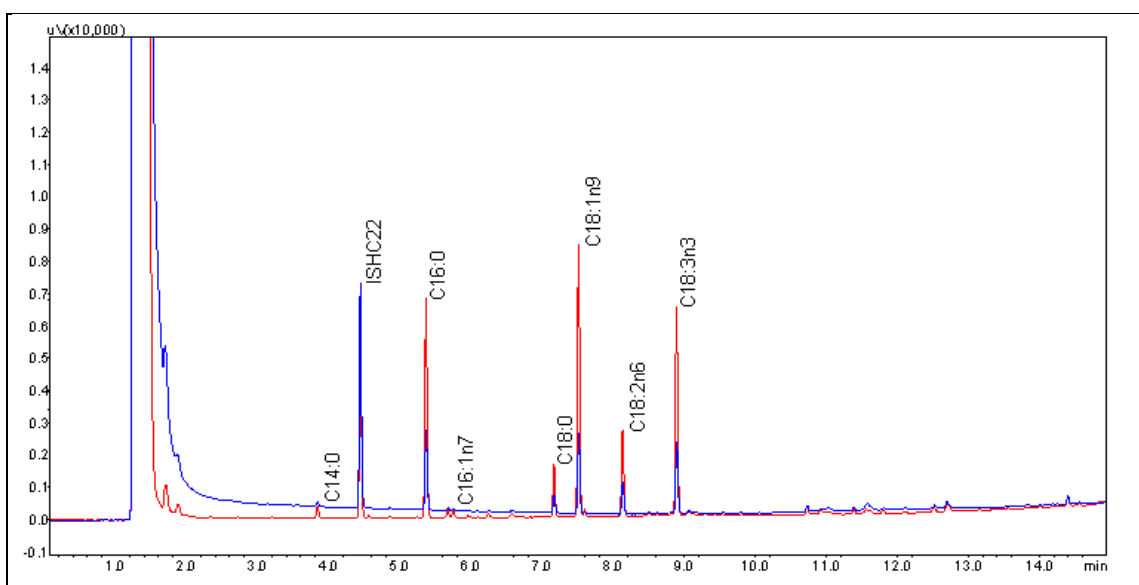
Obr. 4.7: Porovnání chrom. záznamů před (modrá) a po (červená) aplikaci Ringeru.



Obr. 4.8: Porovnání chrom. záznamů před (modrá) a po (červená) aplikaci AKH I.



Obr. 4.9: Porovnání chrom. záznamů před (modrá) a po (červená) aplikaci AKH II.

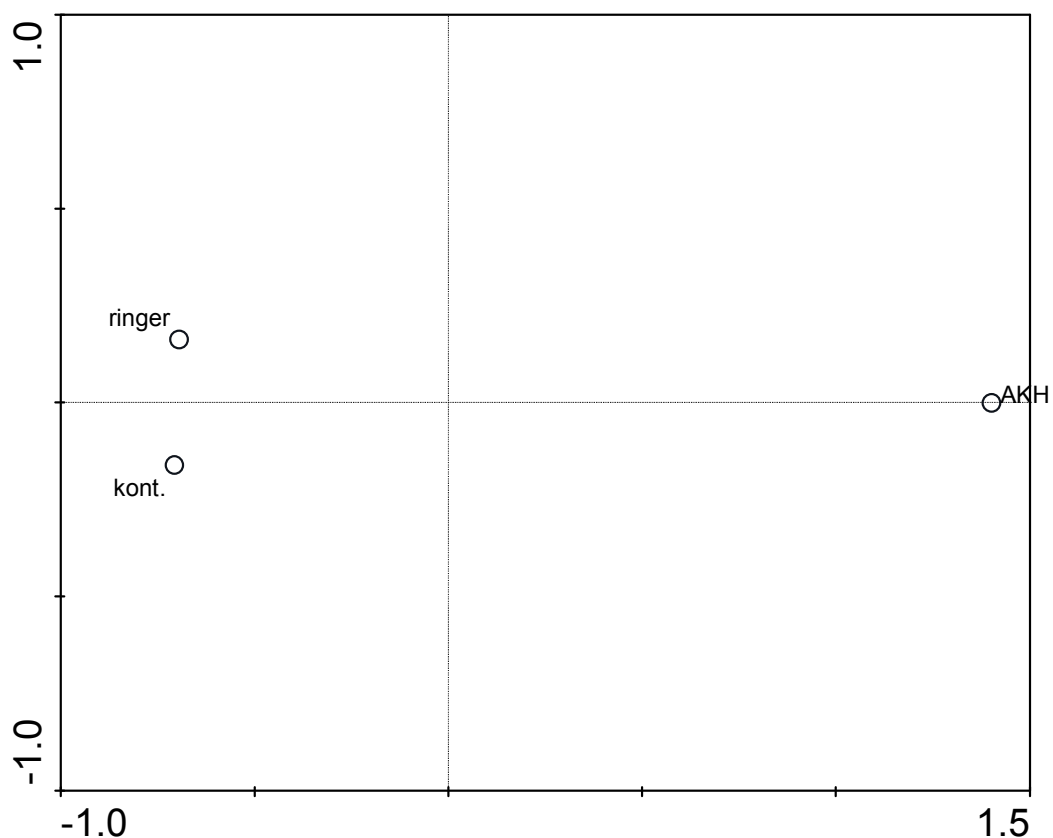


Obr. 4.10: Porovnání chrom. záznamů před (modrá) a po (červená) aplikaci AKH III.

Na předchozích čtyřech obrázcích (obr. 4.7, 4.8, 4.9 a 4.10) lze pozorovat nárůst odezvy mastných kyselin po aplikaci nejprve Ringerova roztoku a poté různých druhů adipokinetického hormonu. Modrá eluční křivka reprezentuje analýzu vzorku hemolymfy neošetřeného jedince a červená křivka ukazuje průběh analýzy vzorku odebraného jedinci, kterému byl do břišní oblasti injekčně podán hormon nebo Ringer. Z chromatogramů je patrný nárůst odezvy jednotlivých mastných kyselin po podání adipokinetického hormonu, kdežto po podání Ringerova roztoku se téměř nemění.

4.1.5.2 Výsledky PCA

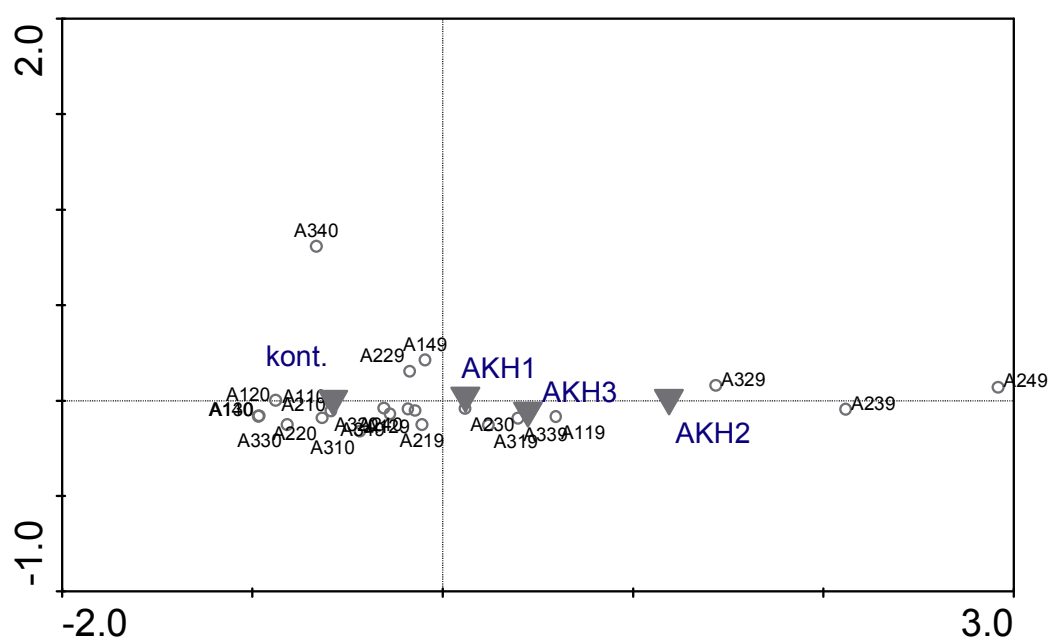
Pro vizualizaci výsledků jsme použili analýzu hlavních komponent (PCA) v programu Canoco for Windows v. 4.2. U lineární ordinační metody (PCA a RDA) se nejprve manipuluje s tabulkami druhových dat (před vlastním počítáním ordinace). Do analýzy vstoupilo složení vzorků jako druhová data. Analýza škálovala píky podle hodnot korelací mezi nimi, jejich skóre byla dělena směrodatnými odchylkami. Hodnoty druhových dat byly logaritmicky transformovány, druhová data centrována a standardizována.



Obr. 4.11: Výsledek PCA – porovnání před a po aplikaci Ringeru a AKH I.

Obrázek 4.11 prezentuje výsledky PCA analýzy provedené na datech získaných z pokusů na sarančeti stěhovavém. Kont. - znamená počáteční stav jedince před jakýmkoliv ošetřením. Dalším bodem v obrázku je Ringer, který označuje pokusná zvířata ošetřená vpichem Ringerova roztoku. Těmto jedincům byla odebrána hemolymfa po 90ti minutách. Poslední bod reprezentuje zvířata ošetřená pomocí hormonu AKH I a data jsou opět sbírána po uplynutí 90ti minut od vpichu. Obrázek jasně ukazuje, že vpich Ringerova roztoku má na složení hemolymfy jistý vliv, ovšem mnohem menší nežli, vpich adipokinetického hormonu.

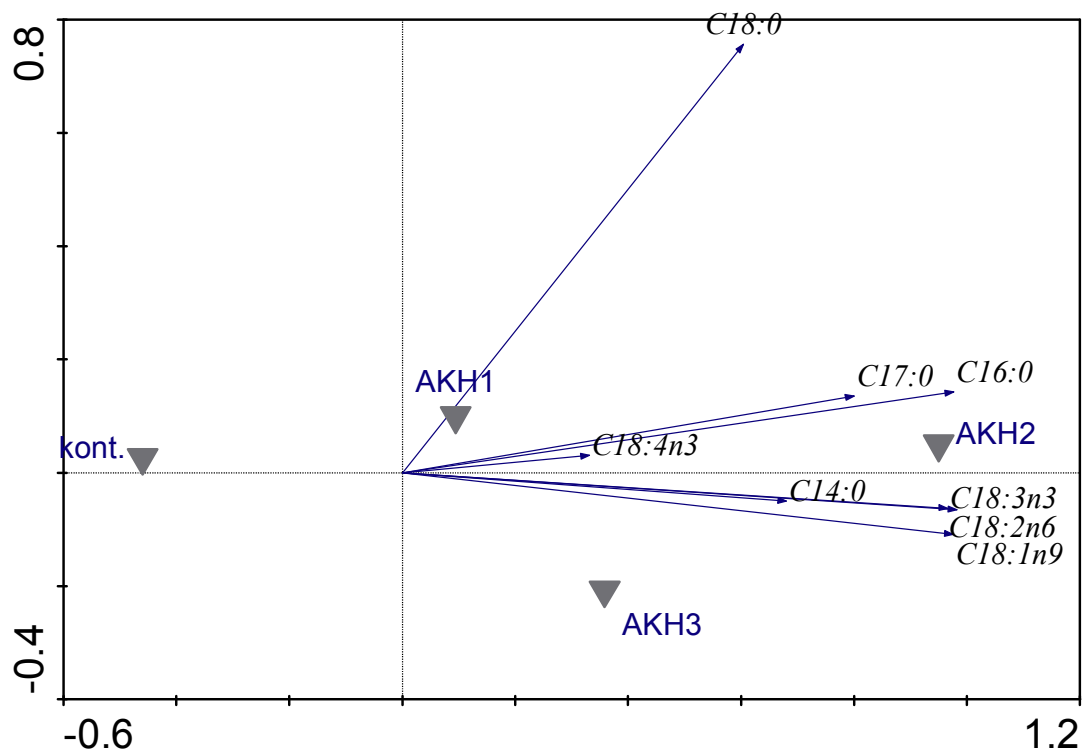
Pro porovnání všech vzorků mezi sebou byla použita výše zmíněná metoda PCA s podobným nastavením. PCA vysvětlila na prvních čtyřech osách celkem 46,3 % variability v datech s tím, že z této vysvětlené variability vysvětlila 1. ordinační osa 98,3 % (viz obr. 4.14). Znamená to, že hlavní variabilita ve vzorcích šla od počátečního stavu k ošetření AKH. Výsledky analýzy byly podrobeny RDA (redundancy analysis), která potvrdila jejich průkaznost hladinou statistické významnosti $p = 0,016$ (obr. 4.14).



Obr. 4.12: Výsledek PCA – porovnání před a po aplikaci AKH I, -II, -III u jednotlivých vzorků.

Obr. 4.12 prezentuje jednotlivé vzorky vynesené současně s typem ošetření (kont. - bez ošetření, AKH 1, 2, 3 – po ošetření příslušnými AKH). Grafické znázornění v prostoru ukazuje změnu ve složení mastných kyselin a to z 98,3 % vysvětlené variability ve směru osy x. Lapidárně řečeno, AKH I působí na sarančeti nejmenší

změnu, kdežto AKH II má na změnu složení mastných kyselin v hemolymfě největší vliv.



Obr. 4.13: Výsledek PCA – porovnání před a po aplikaci AKH se zaměřením na změnu v obsahu mastných kyselin.

Obr. 4.13 je grafickou reprezentací téže PCA analýzy, kde jsou vyneseny jednotlivé mastné kyseliny oproti ošetřením, což nám elegantně popisuje, které mastné kyseliny jsou nejvíce ovlivněny jednotlivými AKH. AKH I nejvíce působí na kyselinu C18:0 (stearová kyselina). AKH II působí obecně na všechny mastné kyseliny vyskytující se poblíž osy x, a AKH III působí nejvíce na nenasycené kyseliny s 18ti uhlíky a také na mastnou kyselinu C 14:0.


```

PCA analysis
**** Summary ****

Axes                1      2      3      4 Total variance

Species-environment correlations : 0.707  0.128  0.298  0.278
Cumulative percentage variance
of species data          : 91.0   94.8   97.7   98.8
of species-environment relation: 98.3   98.4   98.9   99.1

Sum of all          eigenvalues          1.000
Sum of all canonical eigenvalues          0.463

Among the four eigenvalues reported above, none is canonical

[Tue Apr 14 23:57:02 2009] CANOCO call succeeded
[Tue Apr 14 23:57:05 2009] Running CanoDraw
[Tue Apr 14 23:57:05 2009] CanoDraw call succeeded

RDA analysis

Cumulative percentage variancec
of species data          : 45.7   46.2   46.3   92.0
of species-environment relation: 98.7   99.8  100.0   0.0

Sum of all          eigenvalues          1.000
Sum of all canonical eigenvalues          0.463

Among the four eigenvalues reported above, there are 3 canonical eigenvalues

1

*** Unrestricted permutation ***

Seeds: 23239 945

**** Summary of Monte Carlo test ****

Test of significance of first canonical axis: eigenvalue = 0.457
                                                F-ratio   = 15.997
                                                P-value   = 0.0160

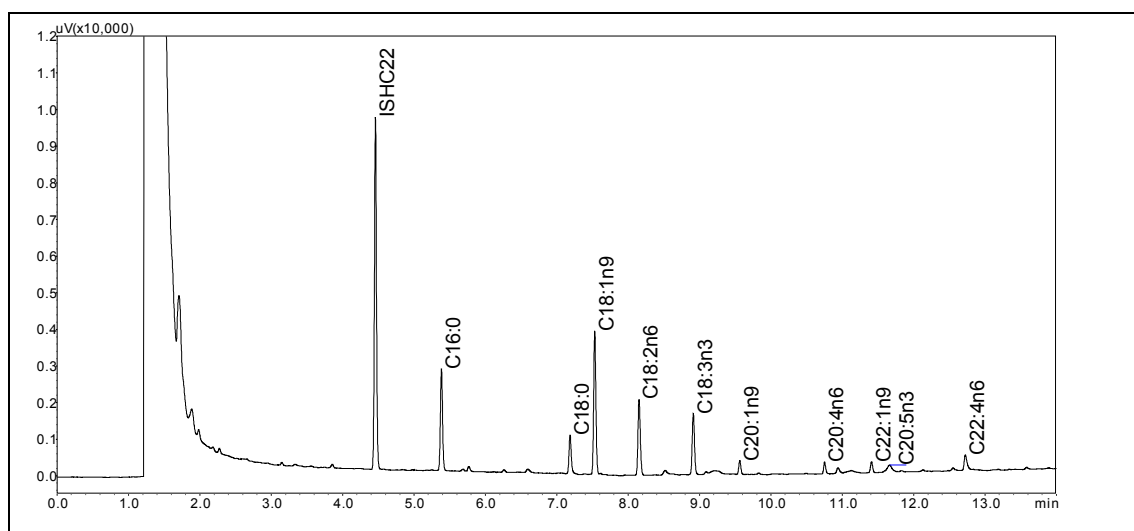
Test of significance of all canonical axes : Trace    = 0.463
                                                F-ratio   = 5.466
                                                P-value   = 0.0160

```

Obr. 4.14: Výsledná data PCA, RDA a Monte Carlo testu.

4.2 Analýza mastných kyselin v triglyceridech

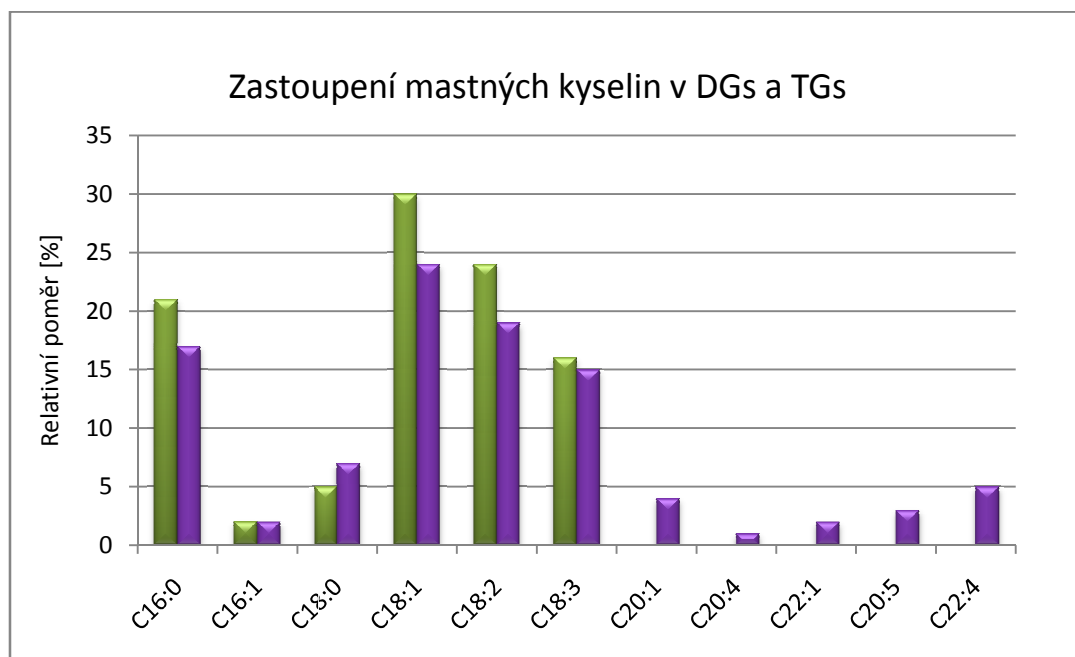
Mastné kyseliny, které se vyskytují v triglyceridech tukového tělesa, se stanovují stejnou metodou jako diglyceridy v hemolymfě. Nejdříve se vypitvá tukové těleso z pokusného hmyzu, které se podrobí stejným procedurám jako hemolymfa a to extrakce dle Folcha⁽¹¹⁾, separace pomocí SPE techniky (příloha 10.2), derivatizace příslušné frakce (příloha 10.3) a následovná plynová chromatografie s plamenovou detekcí - FID (kapitola 3.3). SPE provádíme kvůli přítomnosti fosfolipidů, které jsou obsaženy ve všech buněčných stěnách příslušné tkáně, tedy tukového tělesa. Výskyt samotných DG v tukovém tělese je pouze na metabolické úrovni a jejich množství je tak nízké, že v podstatě neovlivňuje zastoupení jednotlivých mastných kyselin.



Obr. 4.15: Chrom. záznam analýzy tukového tělesa (ISHC22 – interní standard)

Na obr. 4.15 je vidět výskyt mastných kyselin o vysokém počtu uhlíků, respektive vyšším jak 18, které se neúčastní samotné energetické aktivace, jelikož jejich přítomnost v transportní formě DG není pozorována (jak dokládá graf na obr. 4.16). Dá se tedy tvrdit, že tukové těleso obsahuje dva typy TG. Jeden typ slouží jako energetický

zásobník a druhý typ, který se podílí na vytváření metabolicky důležitých látek, jako jsou prostaglandiny vejcovodů či různé druhy feromonů. Toto tvrzení je pouze na bázi spekulace a je potřeba ještě dalšího výzkumu v této oblasti fyziologie a biochemie hmyzu.



Obr. 4.16: Sloupcový graf srovnávající zastoupení jednotlivých FA v hemolymfě a v tukovém tělese.

V grafu na obr. 4.16 je porovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin v triglyceridech tukového tělesa (fialové) a diglyceridech hemolymfy (zelené).

5. DISKUSE

Lipidy extrahované z biologického vzorku jsme separovali pomocí SPE. Využili jsme metodu uvedenou v příloze 10.2, která byla vyzkoušena (kolonky, sorbent a postup) a modifikována Mgr. Janem Okrouhlíkem (ústní sdělení). Pomocí této metody dosahujeme velmi dobrých výsledků separace lipidů do tří tříd podle polarit. K metodě není nutné složité vybavení a je obvyklou rutinní separační metodou^(1, 17).

V laboratoři existuje již zavedený postup derivatizace (příloha 10.3), jehož spolehlivost byla ověřena laboratorní praxí. Návod byl sestaven na základě práce Heleny Zahradníčkové *et al.*⁽³⁰⁾. K této metodě derivatizace není nutné speciální vybavení, není náročná na chemikálie a probíhá za laboratorní teploty na rozdíl od jiných složitých metod^(13, 16, 29), které přinášejí výsledky stejné kvality. Tato metoda derivatizace je tedy velmi rychlá, opakovatelná a svou jednoduchostí převyšuje ostatní derivatizační techniky.

Metoda ke stanovení obsahu mastných kyselin pomocí GC/FID trvá jen 15 min. a je vyhodnocována s použitím metody vnitřního standardu na základě ploch píků methylesterů příslušných mastných kyselin. Technika plynové chromatografie s využitím plamenového ionizačního detektoru se ukazuje jako velmi vhodná k analýze mastných kyselin, jak dokládají články Eduarda Kraffeho *et al.*⁽²⁰⁾, Wendy Applequist *et al.*⁽²⁾ a Guohua Zhao *et al.*⁽³¹⁾. Námi získané eluční pořadí FA jsou obdobné jako u chromatogramů prezentovaných v pracích M. A. Masooda, N. S. Jr⁽²¹⁾ a I. Bondia-Pons *et al.*⁽⁷⁾.

Vzhledem ke komplexnosti dat byla použita ordinační statistická analýza (PCA) viz obr. 4.11, která je vhodná právě pro tento typ dat. Byl použit program CANOCO for Windows v.4.2, tento program je designován a používán na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích již od roku 1998 a v praxi se mnohokrát osvědčil. PCA analýza jasně prokazuje naši hypotézu, a to, že zastoupení mastných kyselin v heamolymfě sarančete se bude po aplikaci různých druhů AKH lišit. Grafický výstup z PCA analýzy byl potvrzen redundanční analýzou (RDA, redundancy analysis),

kdy v Monte Carlo statistickém testu bylo dosaženo hladiny statistické významnosti $p = 0,016$. Podobných výsledků působení jednotlivých AKH bylo dosaženo i v práci Aleše Tomčaly *et al.* ⁽²⁷⁾ za pomoci HPLC/MS.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorku hemolymfy sarančete stěhovavého pomocí techniky GC/FID. Měření provedená v této práci prokázala, že použitá metodika poskytuje dostatečné informace k přesné identifikaci jednotlivých mastných kyselin a tím podává detailnější popis změn v obsahu mastných kyselin po podání adipokinetického hormonu. Zjištěné skutečnosti přispívají k rozšíření znalostí o metabolismu lipidů u hmyzu. Technika odběru, přípravy a samotného měření vzorků mohou posloužit k získání cenných informací v oblasti medicíny.

Analýza provedená pomocí GC/FID je účinná a časově nenáročná i pro detekci vyšších mastných kyselin. Tato metodika podává nejen informace o zastoupení mastných kyselin, ale také umožňuje získání reálných koncentrací jednotlivých kyselin s využitím metody standardního přídávku. Technika GC/FID poskytuje komplementární data k hmotnostním spektrům získaným pomocí LC/MS. Zjištění retenčních časů i hmotnostních spekter výrazně zjednodušuje identifikaci složek vzorku. Pomocí této metodiky lze analyzovat celou řadu mastných kyselin ve velmi malém objemu tělní tekutiny nebo tkáně.

Velmi dobře se osvědčila metoda SPE a také derivatizace methanolátem sodným. Metoda SPE umožňuje zpracování více vzorků najednou a velmi dobře oddělí molekuly cílových diglyceridů od, pro náš účel odpadních, fosfolipidů majících pouze funkci v transportním lipoproteinu. Derivatizace vzorku trvá přibližně 30 min., probíhá za laboratorní teploty a využívají se při ní pouze běžně dostupné chemikálie.

Předpokládaná hypotéza - dá se předpokládat, že zastoupení mastných kyselin v hemolymfě sarančete se bude po aplikaci různých druhů AKH lišit - se potvrdila. Zastoupení mastných kyselin v hemolymfě sarančete stěhovavého se po aplikaci různých druhů AKH změnilo, a to konkrétně navýšením obsahu všech sledovaných mastných kyselin. Pomocí ordinačních statistických metod (PCA) se nám také podařilo

prokázat, že každý ze tří druhů AKH má na složení mastných kyselin v DG v hemolymfě jiný vliv. Kvantitativně největší změnu pak působí hormon AKH II.

Získaná data budou použita v mezinárodní publikaci: Locust adipokinetic hormone mobilizes lipids selectively. Autoři: Aleš Tomčala, Iva Bártů, Petr Šimek a Dalibor Kodrík.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. ABDEL-REHIM, M., BIELENSTEIN, M., ARVIDSSON, T. Evaluation of Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography (SPME-GC) as a Tool for Quantitative Bioanalysis. *Journal of Microcolumn Separations*. 2000, č. 12, s. 308-315.
2. APPLEQUIST, W. L., AVULA, B., SCHANEBERG, B. T., WANG, Y.-H., KHAN, I. A. Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in common (shared) garden. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, č. 19, s. 606-611.
3. ARRESE, E. L., CANAVOSO, L. E., JOUNI, Z. E., PENNINGTON, J. E., TSUCHIDA, K., WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2001, č. 31, s. 7-17.
4. BIEDERMANN, W., LÜCKER, E., PÖRSCHMANN, J., LACHHAB, S., TRUYEN, U., HENSEL, A. Structural characterisation of some fatty acids from the brain as biomarkers of BSE risk material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, č. 379, s. 1031-1038.
5. BILYK, I., NEMEC, R. *Vybrané laboratorní metody*. 1. vyd. Praha: Avicium, zdravotnické nakladatelství, 1988. 472 s. ISBN 08-038-88.
6. BONDIA, E. M., CASTELLOTE, A. I., LOPEZ, M. C., RIVERO, M. Determination of plasma fatty acid composition in neonates by gas chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1994, č. 658, s. 369-374.
7. BONDIA-PONS, I., MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C., CASTELLOTE, A. I., LÓPEZ-SABATER, M. C. Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, č. 1157, s. 422-429.

8. CANAVOSO, L. E., JOUNI, Z. E., KARNAS, K. J., PENNINGTON, J. E., WELLS, M. A. Fat metabolism in Insects. *Annual Reviews of Nutrition*. 2001, č. 21, s. 23-46.
9. DRBAL, K., KRÍŽEK, M. *Analytická chemie*. 1. vyd. České Budějovice: Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Č. B., 1999. 186 s. ISBN 80-7040-352-7.
10. *Encyklopedie Diderot*. 1. vyd. Praha: DIDEROT, 1999. ISBN 80-902555-2-3.
11. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957, č. 226, s. 497-509.
12. GÄDE, G., GOLDSWORTHY, G. J. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Management Science*. 2003, č. 59, s. 1063-1075.
13. GARCIA DE LA CRUZ, C., LOPEZ HERNANDEZ, J., SIMAL LOZANO, J. Gas chromatographic determination of the fatty-acid content of heat-treated green beans. *Journal of Chromatography A*. 2000, č. 891, s. 367-370.
14. HOLEČEK, V., STÁRKA, L., BIELIK, E. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Avicium, zdravotnické nakladatelství, 1983. 304 s. ISBN 08-039-83.
15. CHURÁČEK, J. a kol. *Plynová a kapalinová chromatografie*. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, katedra analytické chemie, 1991. 295 s.
16. IMAI, H., YAMAMOTO, K., SHIBAHARA, A., MIYATANI, S., NAKAYAMA, T. Determining Double-Bond Positions in Monoenoic 2-Hydroxy Fatty Acids of Glucosylceramides by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Lipids*. 2000, Vol. 35, s. 233-236.

17. KIM, H.-Y., JR, N. S. Separation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*. 1990, Vol. 31, s. 2285-2289.
18. KODRÍK, D. *Fyziologie hmyzu učební texty*. České Budějovice: Entomologický ústav akademie věd ČR a Biologická fakulta, Jihočeská Univerzita v Č. B., 2004. 220 s.
19. KOŠTÁL, V., ŠIMEK, P. Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold – acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B*. 1998, č. 168, s. 453-460.
20. KRAFFE, E., SOUDANT, P., MARTY, Y. cis-4,7,10,trans-13-22:4 Fatty Acid Distribution in Phospholipids of Pectinid Species *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus*. *Lipids*. 2006, Vol. 41, s. 491-497.
21. MASOOD, M. A., JR, N. S. High-Throughput Analysis of Plasma Fatty Acid Methyl Esters Employing Robotic Transesterification and Fast Gas Chromatography. *Lipids*. 2008, č. 43, s. 171-180.
22. MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*. Přel. L. Fialová. 4. vyd. Jinočany: Nakladatelství H&H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
23. ODSTRČIL, J. *Biochemie*. 2. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. 161 s. ISBN 80-7013-425-9.
24. RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
25. ŠPIČKA, J. *Biochemie*. 1. vyd. České Budějovice: Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2004. 150 s. ISBN 80-7040-683-6.
26. ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum UK, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

27. TOMČALA, A., BÁRTŮ, I., ŠIMEK, P., KODRÍK, D. Locust adipokinetic hormone mobilizes diacylglycerols selectively. *In press*.
28. YI, L.-Z., HE, J., LIANG, Y.-Z., YUAN, D.-L., CHAU, F.-T. Plasma fatty acid metabolite profile and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA. *FEBS Letters*. 2006, č. 580, s. 6837-6845.
29. YOON, H.-R., PAIK, M.-J., SHIN, H.-S., YU, C., RINALDO, P. Analysis of Plasma Free Fatty Acid Cyanomethyl Derivatives by GC-NPD for the Diagnosis of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders. *Chromatographia*. 2000, Vol. 52, s. 211-216.
30. ZAHRADNÍČKOVÁ, H., TOMČALA, A., ŠIMEK, P., HODKOVÁ, M. Adaptation of HPTLC, SPE, GC and HPLC/ESI/MS methods for phospholipid analyses. The study of seasonal changes of phospholipid composition in *Pyrrhocoris apterus*. *In press*.
31. ZHAO, G., LIU, J.-F., NYMAN, M., JÖNSSON, J. Å. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2007, č. 846, s. 202-208.
32. ZÝKA, J. a kol. *Analytická příručka 1*. 3. vyd. Praha: SNTL Nakladatelství technické literatury, 1979. 680 s. ISBN 04-612-79.
33. ZÝKA, J. a kol. *Analytická příručka 2*. 3. vyd. Praha: SNTL Nakladatelství technické literatury, 1980. 832 s. ISBN 04-602-80.
34. http://www.hplc.cz/Tip/prepare_extr.htm#_2. SPE, 6. 10. 2008
35. www.labicom.cz/default.aspx?server=1§ion=20&artick=36, 6. 10. 2008
36. <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/ency/qit.html>, 4. 11. 2008
37. <http://www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/ch260/lipoprotein.jpg>, 3. 3. 2009

38. <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/consum/samprep/spe/packed/anion/nh2&cid=LJKOKFQ>, 5. 12. 2008
39. <http://www.chromtech.com/2001catalog/SeparatePgs/122.pdf>, 5. 12. 2008
40. <http://cs.wikipedia.org/wiki/BSE>, 13. 1. 2009
41. www.ibot.sav.sk/karolx/Prednasky/ZaFeKla3.ppt, 15. 2. 2009
42. <http://meloun.upce.cz/docs/research/chemometrics/methodology/4cmetody.pdf>, 15. 2. 2009
43. <http://meloun.upce.cz/docs/lecture/chemometrics/slidy/44pca.pdf>, 15. 2. 2009
44. <http://dic.academic.ru/dic.nsf/enwiki/559793>; 25. 1. 2009
45. <http://www.vwrsp.com/catjpg/h00/h0042.jpg>, 21. 3. 2009
46. <http://big5.varianinc.com.cn/products/consum/samprep/spe/shared/packed-180.jpg>, 21. 3. 2009
47. http://www.shimadzu.co.uk/product_range/Chromatography/GC/GC2014, 21. 3. 2009

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
AKH	adipokinetické hormony
CHCl ₃	chloroform
CI	chemická ionizace
CNS	centrální nervový systém
DG	diacylglycerol, diglycerid
DHA	kyselina docosahexaenová
DM-2	diabetes mellitus druhého typu
ECD	detektor elektronového záchyty
EFA	esterifikované mastné kyseliny
EI	ionizace nárazem elektronů
EPA	kyselina eicosapentaenová
EtOH	ethanol
FA	mastné kyseliny
FAME	methylestery mastných kyselin
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC/FID	plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HDLp	lipophorin o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC8	isooktan
LC	kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí MS
LC-PUFA	polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDLp	lipophorin o nízké hustotě
meq/g	miliekvivalent na gram sorbentu

MS	hmotnostní spektrometrie
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny
PCA	analýza hlavních komponent
PLS-LDA	metoda parciálních nejmenších čtverců - lineární diskriminantní analýza
RDA	redundanční analýza
RT	retenční čas
SPE	extrakce na tuhou fázi
TCD	tepelně vodivostní detektor – katarometr
TG	triacylglycerol, triglycerid

9. KLÍČOVÁ SLOVA

Derivatizace / derivatization

Extrakce na tuhou fázi (SPE) / solid phase extraction

Lipidy / lipids

Mastné kyseliny / fatty acids

Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID) /

gas chromatography with flame ionization detector

10. PŘÍLOHY

10.1 Extrakce lipidů z biologického vzorku

Extrakční medium: chloroform : methanol (2 : 1).

Vzhledem k použití chloroformu je velmi důležité vyvarovat se kontaktu extrakčního média s jakýmkoliv plasty, proto pro samotnou homogenizaci a extrakci použijeme skleněné nádoby.

Před samotnou extrakcí probubláme extrakční medium dusíkem, čímž odstraníme kyslík z média a zabráníme tak případné oxidaci lipidů.

Postup:

- 1) Vypreparovanou tkáň (cca 50 mg) převedeme do skleněného homogenizátoru s 0,5 ml extrakčního média. Homogenizátor je neustále podchlazen v ledu.
- 2) Provedeme homogenizaci tkáně (několika pohyby tloučku v homogenizátoru, záleží na povaze vypreparované tkáně).
- 3) Centrifugujeme na 5000 g po 10 minut při 4 °C, posbíráme supernatant S1 (použijeme hamiltonovy stříkačky).
- 4) Rehomogenizujeme zbylý pelet s nově přidaným 0,5 ml extrakčního média.
- 5) Centrifugujeme na 5000 g po 10 minut při 4 °C, posbíráme supernatant S2.
- 6) Spojíme supernatanty (S1+S2).
- 7) K supernatantům přidáme 0,5 ml 0,1M octanu amonného a promícháme.
- 8) Centrifugujeme na 5000 g po 10 minut při 4 °C, posbíráme spodní organickou fází obsahující lipidy.
- 9) Organickou část vysušíme v proudu dusíku a uskladníme za -80 °C do doby analýzy.

Příprava vzorku na analýzu: vzorek rozpustíme v 0,5 ml CHCl_3 stabilizovaného EtOH.

10.2 SPE (solid phase extraction) lipidů

Pro naši potřebu se nejlépe osvědčily kolonky BondElut firmy Varian inc. s 500 mg sorbetu na bázi NH_2 .

K extrakci je nutné zařízení na vytvoření podtlaku (obr. 3.2).

Vymývací roztoky: roztok A: chloroform : propanol (2 : 1),

roztok B: 2% kyselina octová < diethylether,

roztok C: methanol.

Postup:

- 1) Kondicionování kolonky: nanese 4 ml n-hexanu, necháme prokapat, dokud kolonka nezbělá (je suchá) a hned nanášíme vzorek.
- 2) Nanese vzorek 100 μl – vzorek musí být rozpuštěn v $\text{CHCl}_3 \sim \text{EtOH}$ (nanášíme hamiltonovou stříkačkou).
- 3) Hned za vzorkem nanese 4 ml roztoku A (skleněnou pipetou) a necháme prokapat.
- 4) Vypneme vakuum a nalijeme roztok B, poté vyměníme vialky na odběr jednotlivých frakcí. Pak opět zapojíme vakuum a necháme prokapat roztok B.
- 5) Opakujeme krok 3 s roztokem C.

Předpokládaný výsledek: frakce A: 4 ml – TG a DG,

frakce B: 4 ml – volné mastné kyseliny,

frakce C: 4 ml – fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin a sfingomyelin.

Příprava vzorku pro derivatizaci: všechny frakce pomocí vakuové odpařovačky speedvac odpaříme do sucha a rozpustíme ve 100 μl CHCl_3 stabilizovaného EtOH.

10.3 Příprava methylesterů mastných kyselin

Reakce je prováděna ve skleněných lahvičkách k derivatizaci o objemu 1 ml (obr. 3.4). Po několika měřeních byl jako optimální vnitřní standard vyhodnocen uhlovodík C:22 o koncentraci 20 ng/μl rozpuštěný v isooktanu. V postupu jsou k dávkování využívány hamiltonovy stříkačky (obr. 3.4) a k odběru hexanové vrstvy je používána automatická mikropipeta. Příprava slepé zkoušky probíhá podle uvedeného postupu s výjimkou v 1. bodě (je dávkován pouze vnitřní standard).

Postup:

- 1) Ke vzorku přidáme 50 μl interního standardu (20 ng/μl < IC8) a obsah odpaříme dusíkem.
- 2) Přidáme 50 μl n-hexanu.
- 3) Přidáme 100 μl 2M methanolátu sodného (sodium methoxide – připravíme tak, že rozpustíme 0,46 g čistého Na v 10 ml sušeného methanolu).
- 4) Utěsníme derivatizační lahvičku, silně protřepeme (10 vteřin) a poté nastavíme vortex na slabší třepání (15 minut).
- 5) Přidáme 100 μl n-hexanu.
- 6) Přidáme 240 μl HCl (1M ve vodě).
- 7) Protřepeme a upravíme pH na hodnotu 5.
- 8) Odebereme horní hexanovou vrstvu (do lahvičky).
- 9) Opět přidáme 200 μl n-hexanu.
- 10) Protřepeme, odebereme horní hexanovou vrstvu a přidáme ji k předchozí hexanové vrstvě.
- 11) Spojené hexanové fáze odpaříme do sucha.
- 12) Přidáme 100 μl IC8 a dáme měřit (nutné vialky s inzertem).