

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Využití plynové chromatografie pro stanovení
mastných kyselin a některých xenobiotik**

Mgr. Martin Jaček

Praha 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta

Obor: Biochemie a Patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.
Ústav lékařské biochemie 1. LF UK
Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Školící pracoviště: 3. lékařská fakulta UK
Ústav hygieny
Oddělení analytických metod
Ruská 87, Praha 10

Autor: Mgr. Martin Jaček

Školitel: prof. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

1 Obsah

1	Obsah	3
2	SOUHRN	4
3	SUMMARY	5
4	ÚVOD	6
5	HYPOTÉZY A CÍLE	8
6	MATERIÁL A METODIKA	9
	Přístroje	9
	Derivatizace FA	9
	Syntéza izomerů C18:1 pro identifikaci	9
	SPE extrakce cis/trans izomerů	10
	Studie OMEGA, parametry souboru	10
	Studie VEGGIE-2, parametry souboru	11
	Zastoupení TFA v mateřském mléce, parametry souboru	11
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	12
	Studie OMEGA	13
	Studie VEGGIE-2	16
	Vytvoření metody pro detailní analýzu TFA	19
	Analýza TFA v tukové tkáni veganů a omnivorů	21
	Stanovení zastoupení TFA v mateřském mléce	23
8	ZÁVĚR	25
9	POUŽITÁ LITERATURA	27
10	SEZNAM PUBLIKACÍ	31

2 SOUHRN

Předložená dizertační práce se zabývá využitím plynové chromatografie (GC) pro stanovení mastných kyselin (FA) v klinických vzorcích a studiem vlivu FA na vznik a prevenci vybraných onemocnění. Práce je zaměřena na metabolismus FA s ohledem na esenciální FA a vysoce prospěšné polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ze skupiny omega-3, jako je kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA), kterých je ve stravě západní populace nedostatek. V experimentální části se zabývá vývojem GC metod pro stanovení FA ve formě jejich methylesterů, a jejich využitím pro analýzu vzorků z intervenční klinické studie OMEGA a VEGGIE-2. Studie OMEGA je zaměřena na inkorporaci prospěšných omega-3 PUFA do potravního řetězce prostřednictvím mikrořas syntetizujících EPA a lněného semínka obsahujícího hlavně α -linolenovou kyselinu. Z těchto zdrojů byla připravena směs pro výkrm drůbeže a následně získaná vejce a kuřecí maso obohacené o omega-3 FA bylo použito jako surovina pro přípravu stravy. Po 8 týdenní dietní intervenci provedené na zdravých dobrovolnících byl nalezen statisticky významný nárůst v zastoupení DHA v erytrocytech, který činil 4,4 % před a 5,1 % po dietní intervenci u testovací skupiny. Zjištěný omega-3 index vykazoval také nárůst z 5,1 % na 5,8 % u testovací a z 5,3 % na 5,8 % u kontrolní skupiny. V rámci druhé studie VEGGIE-2 byl monitorován celkový profil FA u veganů jako modelové skupiny pro studium dietních faktorů s vlivem na inzulínovou rezistenci jako je intervence aminokyselinami s rozvětveným postranním řetězcem. Studie prokázala, že plazmatické hladiny omega-3 FA s delším řetězcem jsou u veganů sníženy z důvodu vyjmutí jejich hlavních zdrojů z diety a pomalé endogenní syntézy. Současně byla u veganů provedena detailní analýza *cis/trans* izomerů FA v tukové tkáni pomocí nově vyvinuté GC separace na dvou spojených stometrových kolonách. Analýzy ukázaly, že vegani mají srovnatelnou hladinu kyseliny elaidové 1 mg/g versus 1,2 mg/g u omnivorů a 3krát nižší hladinu kyseliny *trans*-vakcenové 0,4 mg/g versus 1,5 mg/g. Celková suma všech *trans* izomerů mastných kyselin (TFA) je 4,6 mg/g u veganů a 7,7 mg/g u omnivorů. Vegani mají také výrazně vyšší hladinu Σ PUFA s 92% zastoupením kyseliny linolové, a její koncentrace je 2krát vyšší v porovnání s omnivory. Závěrem byla vytvořená metoda aplikována pro stanovení TFA v mateřském mléce se stanovenou hladinou celkových TFA $0,9 \pm 0,27$ %, která je 3 - 4krát nižší než hodnota zjištěná na našem pracovišti v obdobné studii v roce 2007.

3 SUMMARY

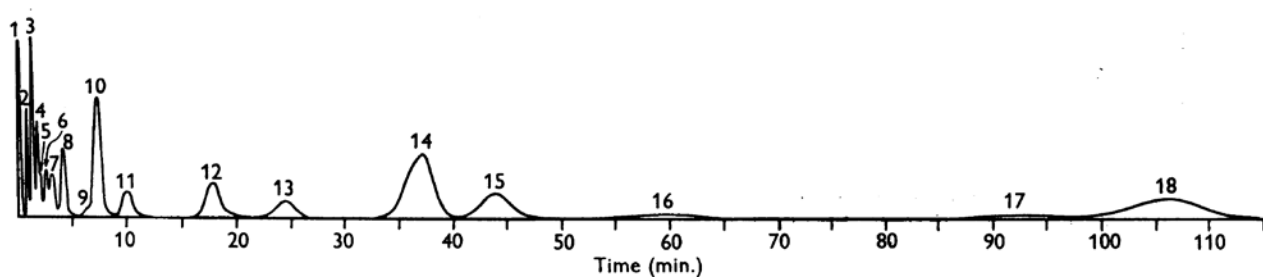
The submitted thesis is concerned with the use of gas chromatography (GC) to determine fatty acids (FA) in clinical samples and study of the effect of FA on the occurrence and prevention of selected diseases. The work is focused on FA metabolism in relation to essential FA and highly beneficial polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the omega-3 group, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are insufficiently represented in the nutrition of western populations. The experimental part is concerned with the development of GC methods for determining FA as their methyl esters and their use for analysis of samples in intervention clinical studies of OMEGA and VEGGIE-2. The study of OMEGA concentrates on the incorporation of beneficial omega-3 PUFA into the food chain through microalgae synthesizing EPA and linseed containing mainly α -linolenic acid. These sources were employed to prepare a mixture for feeding poultry and the obtained eggs and chicken meat enhanced in omega-3 FA were used as ingredients for preparing food. Following 8-week dietary intervention performed on healthy volunteers, a statistically significant increase was found in the content of DHA in erythrocytes, equal to 4.4 % before and 5.1 % after the dietary intervention in the test group. The determined omega-3 index also exhibited an increase from 5.1 % to 5.8 % in the tested group and from 5.3 % to 5.8 % in the control group. In the second study VEGGIE-2, the overall FA profile was monitored in vegans as a model group for studying dietary factors affecting insulin resistance, such as intervention by amino acids with branched side chains. The study demonstrated that the plasmatic levels of omega-3 FA with longer chains are reduced in vegans because of elimination of their main source from the diet and slow endogenic synthesis. Simultaneously, a detailed analysis of FA *cis/trans* isomers in fat tissue was performed amongst vegans using the newly developed GC separation on two connected hundred-metre columns. The analyses demonstrated that vegans have a comparable level of elaidic acid of 1 mg/g compared to 1.2 mg/g amongst omnivores and a 3-fold lower level of *trans*-vaccenic acid of 0.4 mg/g compared to 1.5 mg/g. The total sum of all the *trans* fatty acid isomers (TFA) is 4.6 mg/g amongst vegans compared to 7.7 mg/g amongst omnivores. Vegans also have substantially higher levels of Σ PUFA, with 92% content of linoleic acid, and their concentration is twice as high as for omnivores. In conclusion, the developed method was employed for determining TFA in breast milk with a determined level of total TFA of $0.9 \pm 0.27\%$, which is 3-4 times lower than the value determined at our workplace in a similar study in 2007.

4 ÚVOD

Plynová chromatografie (GC) je fyzikálně-chemická separační metoda používaná k analýze směsí látek v plynném stavu. Obecným principem chromatografických technik je rozdělování látky mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární (kapalná či pevná) a druhá je mobilní (plynná či kapalná). Každá separovaná látka má pak v ideálním případě rozdílný poměr zastoupení v mobilní a stacionární fázi a opouští separační prostředí (kolonu) v rozdílném retenčním čase. Retenční čas je tedy kvalitativní informací identifikující jednotlivé látky a plocha či výška píku (z angl. „*peak*“) je kvantitativní informací závislou na množství látky.

Objev chromatografie se datuje do roku 1903, kdy ji v průběhu své přednášky na Varšavské univerzitě představil botanik ruského původu M. S. Tswett, jako techniku pro separaci jednotlivých složek chlorofylu. Samotný termín „chromatografie“ byl Tswetem použit až v jeho publikaci z roku 1906 [1]. Často se uvádí, že základ tohoto slova je z řeckých slov „*chroma*“ (barva) a „*graphein*“ (psát). Tedy „psátí barvou“, což dokumentuje separaci zmíněných pigmentů na koloně naplněné uhličitanem vápenatým. Druhé vysvětlení zmiňuje ve svém článku Leslie S. Ettre a spočívá v příjmení autora. Jelikož „*Tsvet*“ znamená v ruštině „barvu“, jde vlastně o „Tswettovo psaní“ a jméno vynálezce metody se tak přeneseně stalo součástí jejího názvu. Tswettovi práce z roku 1906 a 1910 položili základy kapalinové adsorpční chromatografie. Možnost separace látek v plynném skupenství se objevila mnohem později. Jako objevitelé plynové chromatografie jsou nejčastěji citováni autoři Martin a Synge, díky svému článku z roku 1941 týkajícího se objevu kapalinové rozdělovací chromatografie [2]. Autoři v něm zmínili, že mobilní fází může být též plyn a těkavé sloučeniny mohou být separovány na koloně, kterou tento „permanentní“ plyn protéká. Za objev rozdělovací chromatografie byli oba autoři v roce 1952 oceněni Nobelovou cenou. Nicméně jak ve své knize „*Chapters in the Evolution of Chromatography*“ uvádí L. S. Ettre [3], zhruba ve stejné době mnoho dalších autorů publikovalo práce zabývající se adsorpcí látek na tuhou fázi, tedy tzv. „*gas solid chromatography*“ (GSC). Jedním z nich je Hesse et al. popisující ve své práci z roku 1941 separaci par bromu a jodu v koloně naplněné škrobem s CO₂ jako mobilní fází provázenou vznikem barevných zón těchto substancí [4]. V následujícím článku z roku 1942 je představena separace methylesterů mastných kyselin, které se nepodařilo oddělit destilací, a to na koloně naplněné silikagelem opět s CO₂ jako mobilní fází [5]. Další příklady adsorpční chromatografie, ale v jiných uspořádáních a často za jiným než analytickým účelem, jsou shrnuty v review „*Early stages in history of gas chromatography*“ [6]. První publikovaná zmínka týkající se plynové rozdělovací chromatografie (GLC) pochází z roku 1952, kde autoři James a Martin provedli chromatografickou separaci těkavých mastných kyselin v plynné fázi za použití kolony obsahující

křemelinu s 10% roztokem kyseliny stearové v silikonovém oleji označeném DC550 [7]. Jako mobilní fáze byl použit dusík a separována byla směs obsahující 8 karboxylových kyselin od kyseliny octové až po kyselinu valerovou. V článku je též popsána separace dalších nasycených mastných kyselin, C6 - C12. Retenční čas kyseliny dodekanové byl 817 minut, jelikož její teplota varu (225 °C při 40 mm Hg) byla už příliš vzdálená použité teplotě kolony, tj. 137 °C a použitý detektor neumožňoval její zvýšení. V roce 1955 proto stejní autoři představili nový typ detektoru nazvaný „*gas-density meter*“, pracující na stejném principu jako dnešní tepelně vodivostní detektor [8]. Ve stejném roce publikovali článek dokumentující použití nového detektoru při analýze mastných kyselin, nyní už v derivatizované podobě ve formě methylesterů a to pro kyseliny C1 - C18 [9]. Jeden z chromatogramů získaných při analýze methylesterů mastných kyselin z článku Jamese a Martina je na Obr. 1. Vzniklé methylestery jsou těkavější, jejich zóny v koloně a tedy i výsledné píky při jejich detekci jsou výrazně užší. Zároveň dochází ke zkrácení času analýzy, což je nezbytné pro analýzu delších mastných kyselin a zlepšení tvaru jejich píků. Esterifikace či transesterifikace různými činidly s následnou analýzou na plynovém chromatografu (GC) se postupně stala zlatým standardem pro analýzu mastných kyselin přetrvávající do dnešních dnů. Prvotní detektory byly vystřídány o několik řádů citlivějším plamenově ionizačním detektorem (FID) přinášejícím největší lineárně dynamický rozsah a majícím stále poměrně jednoduchou konstrukci. V posledních 10 - 15 letech je velmi rozšiřován selektivnější hmotnostní detektor (MS), umožňující identifikovat sloučeninu nejen dle jejího retenčního času, ale též dle její molekulové hmotnosti a jejího fragmentového spektra. Nicméně cena přístroje GC-MS v porovnání s GC-FID je minimálně čtyřnásobná.



Obrázek 1. Chromatogram separace methylesterů rozvětvených a nerozvětvených mastných kyselin C7-C18 z původní práce Jamese A. T. a A. J. P. Martina, 1956 [9]. Mobilní fází - N₂ o průtoku 133 ml/min, stacionární fází byl vysokovroucí lubrikační olej, teplota kolony 197 °C. 2. heptanoát, 3. oktanoát, 5. nonanoát, 6. dekanóat, 12. tetradekanoát, 15. hexadekanoát, 18. oktadekanoát

5 HYPOTÉZY A CÍLE

Pro projekt TAČR, TA03011027, s názvem: „Mikrořasy jako perspektivní zdroj omega-3 nenasycených mastných kyselin a jejich inkorporace do potravního řetězce člověka“ bylo provedeno stanovení profilu mastných kyselin v lidské krevní plazmě a ve fosfolipidech krevních buněk. Dobrovolníci se po 8 týdnů stravovali kuřecím masem a vejci obohacenými o omega-3 mastné kyseliny. Kontrolní skupina se stravovala běžným kuřecím masem a běžnými vejci a dílčím cílem bylo dokumentovat změnu v zastoupení omega-3 FA.

V rámci grantového projektu AZV, NT14416, s názvem: „Vliv větvených aminokyselin a satureovaných mastných kyselin na rozvoj inzulínové rezistence“ byl za využití GC s FID stanoven základní profil mastných kyselin ve frakci volných mastných kyselin (FFA) krevní plazmy, ve fosfolipidech erytrocytů a v tukové tkáni skupiny veganů a omnivorů. Naším samostatným cílem bylo vypracovat metodu detailního stanovení *trans* mastných kyselin (TFA) v tukové tkáni. Vytvořená metoda byla dále aplikována i na vzorky mateřského mléka za účelem stanovení procentuálního zastoupení TFA.

Cíle lze shrnout do těchto bodů:

- 1) stanovit a porovnat profil celkových FA krevní plazmy a fosfolipidů krevních buněk u kontrolní a testovací skupiny před a po dietní intervenci (studie OMEGA)
- 2) stanovit a porovnat profil FA frakce FFA krevní plazmy a fosfolipidů krevních buněk mezi skupinou veganů a omnivorů, před a po dietní intervenci rozvětvenými aminokyselinami (studie VEGGIE-2)
- 3) vypracovat metodu pro detailní stanovení TFA, jejíž součástí je i syntéza standardů izomerů C18:1
- 4) aplikovat metodu pro detailní stanovení TFA na vzorky tukové tkáně veganů a omnivorů
- 5) aplikovat metodu pro detailní stanovení TFA na vzorky mateřského mléka pražských matek

6 MATERIÁL A METODIKA

Přístroje

Veškerá stanovení FA byla provedena na plynovém chromatografu GC-17A Verze 3 (Shimadzu, Japonsko) vybaveném autosamplerem AOC-20i upraveným pro 15 vzorků a standardním FID. K ovládání, měření a vyhodnocování chromatogramů byl použit software ClassVP 4.3. Teplota nástřikového portu a detektoru byla 250 °C a 260 °C. Pro stanovení základního profilu FA byla použita kolona Stabilwax 15 m × 0,25 mm × 0,1 μm (Restek, Bellefonte, PA, USA), nosným plynem bylo helium o průtoku 1,2 ml/min. Teplotní program začínal na 120 °C s následným gradientem 10 °C/min na 190 °C a finálním gradientem 40 °C/min na 250 °C, držených 15,4 min.

Detailní analýza jednotlivých *trans/cis* izomerů C18:1 byla provedena na dvou kolonách, SLB-IL111 (100 m × 0,25 mm × 0,2 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) a SP-2560 (100 m × 0,25 mm × 0,2 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA), za sebou spojených spojkou Vu2 Union Connector (Restek). Jako nosný plyn byl použit vodík o průtoku 1,7 ml/min. Teplotní program začínal na 140 °C, držených 50 min, s následným gradientem 3 °C/min na 170 °C, držených 60 min, s následným gradientem 3 °C/min na 220 °C, držených 26 min.

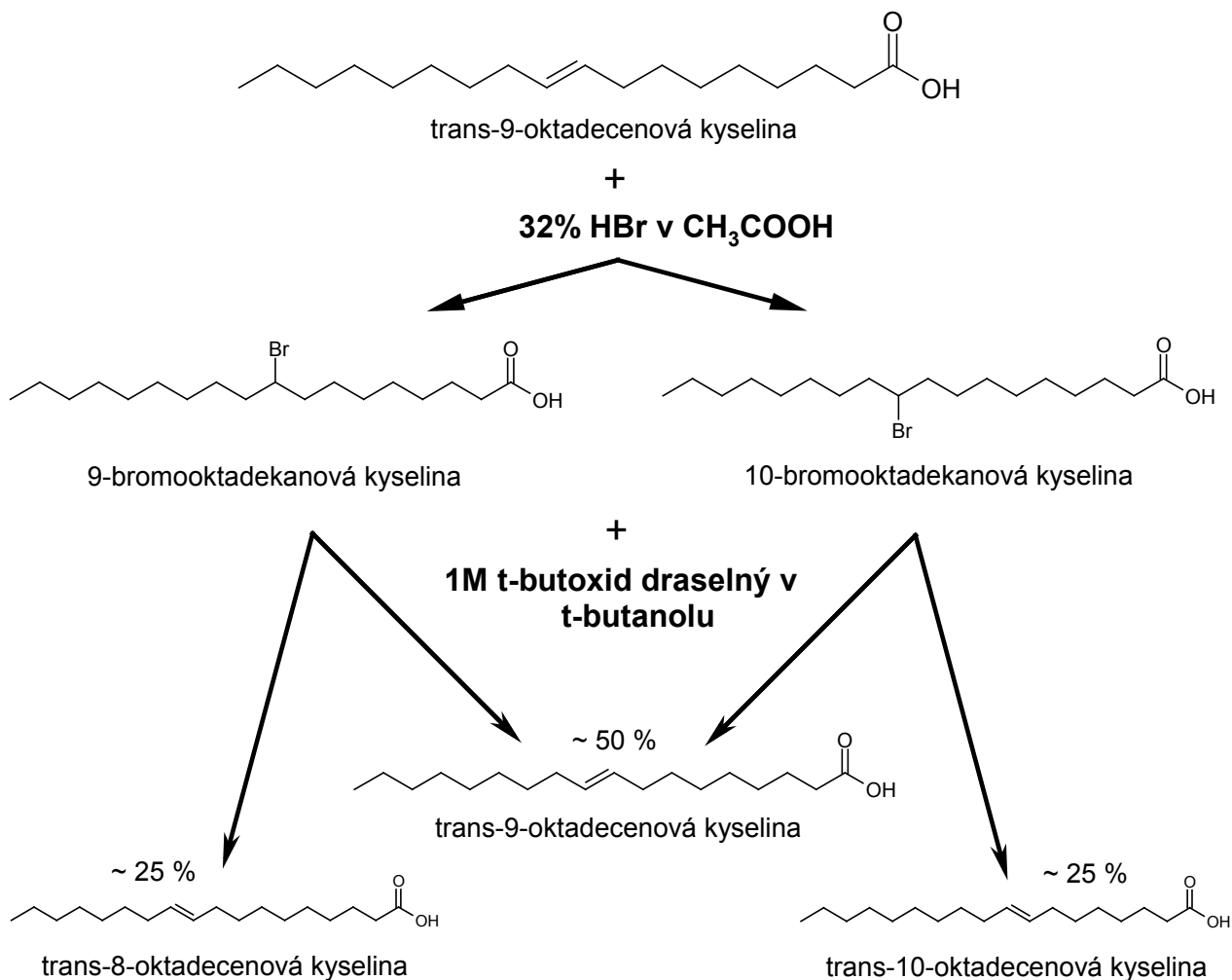
Derivatizace FA

Všechny standardy FA pro kalibraci či identifikaci, vzorky plasmy či extrakty lipidů z tukové tkáně byly před analýzou na GC esterifikovány (transesterifikovány) stejným postupem. K tomu sloužila vždy nově připravená směs methanol/toluen/acetylchlorid (3,2/0,8/0,2; v/v/v). Matrice obsahující analyzované FA byla odpipetována do bakteriologické zkumavky se závitkem GL18 o rozměrech 16 × 120 mm společně s interním standardem (C13:0) a kontrolním standardem (C17:0). Následně bylo přidáno 4,2 ml esterifikační směsi. Uzavřená zkumavka byla 10 min třepána na horizontální třepačce. Následně byly zkumavky zahřívány na vodní lázni při 100 °C po dobu 1 h. Po ochlazení a neutralizaci 12% (m/v) vodným roztokem K₂CO₃ byly zkumavky třepány 10 min na horizontální třepačce a centrifugovány. Vrchní organická fáze obsahující v toluenu rozpuštěné FAME byla analyzována na GC.

Syntéza izomerů C18:1 pro identifikaci

Jelikož nejsou všechny izomery kyseliny oktadecenové komerčně dostupné, byly laboratorně připraveny dle postupu založeného na opakované adici a eliminaci HBr [10], viz.

schema na Obr. 2. Původní postup byl upraven a vycházel z 250 mg kyseliny elaidové a 40 mg kyseliny *trans*-vakcenové. Šestinásobným opakováním byla připravena směs obsahující *cis/trans* izomery C18:1 s dvojnou vazbou na uhlíku 3 - 17. Připravená směs byla poté esterifikována výše uvedeným postupem.



Obrázek 2. Schema adice a eliminace HBr při přípravě izomerů C18:1

SPE extrakce *cis/trans* izomerů

Syntetizovaná směs izomerů kyseliny oktadecenové obsahovala jak *cis*, tak *trans* izomery. Jejich separace byla provedena extrakcí na tuhé fázi (SPE) s obsahem stříbrných iontů. Kolonka Discovery Ag-ION 750 mg / 6 ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA) byla nejprve ekvilibrována 2 ml acetonitrilu, 4 ml acetonu a 4 ml hexanu. Následně na ní byl nanesen vzorek vytvořený odpipetováním 10 μ l toluenu obsahujícího methylestery syntetizovaných izomerů C18:1. Toluén byl odpařen pod proudem dusíku a FAME byly rozpuštěny v 0,5 ml hexanu a naneseny na kolonku. Frakce *trans* izomerů byla eluována 7 ml směsí hexan/aceton (96:4, v/v). Frakce *cis* izomerů byla eluována 5 ml aceton/acetonitril (60:40, v/v) a 1 ml čistého acetonitrilu v závěru. Obě frakce byly

odpařeny do sucha pod proudem dusíku a rozpuštěny ve 100 µl toluenu a následně analyzovány na GC.

Studie OMEGA, parametry souboru

Dobrovolníci pro klinickou část studie OMEGA pocházeli z řad studentů lékařské fakulty. Celkem šlo o 33 zdravých dobrovolníků mužského pohlaví, netrpících chronickým onemocněním, neužívajících léky ani potravinové doplňky s obsahem omega-3 FA bez jakékoliv dietní restriktce a omezením fyzické aktivity do 12 h týdně. Dobrovolníci byli rozděleni na dvě skupiny, viz. Tabulka 1. První skupina se stravovala experimentální dietou obsahující vejce a kuřecí maso obohacené o omega-3 FA. Kontrolní skupina se stravovala běžnými vejci a běžným kuřecím masem v dávce 4krát týdně 1 vejce a 100 g masa/den. Obohacení masa a vajec o omega-3 FA bylo provedeno přidáním lněného semínka do krmné směsi jatečních brojlerů a nosnic firmou RABBIT Trhový Štěpánov a.s. Pokrmy byly navrženy nutriční terapeutkou. Stravování probíhalo ve stravovacím provozu Fakultní nemocnice Královské Vinohrady pod dozorem člena řešitelského týmu. Nutriční intervence trvala celkem 8 týdnů. Vzorky krve byly dobrovolníků odebrány celkem 4krát: před zahájením intervence, po 4 týdnech, na konci dietní intervence a jeden měsíc po jejím ukončení. V každém odběru byla provedena analýza celkových plazmatických hladin FA. Ve vstupním odběru a odběru po skončení dietní intervence byla provedena analýza fosfolipidů z krevních buněk.

Tabulka 1. Vstupní charakteristiky obou skupin dobrovolníků pro studii OMEGA

Parametr	Testovací skupina ($n = 16$)	Kontrolní skupina ($n = 17$)
Věk [rok]	21,82	21,51
Tělesná hmotnost [kg]	75,33	73,19
BMI [kg/m ²]	22,46	22,38

Studie VEGGIE-2, parametry souboru

Do skupiny veganů byli zařazeni jedinci konzumující veganskou stravu minimálně 3 roky, s průměrnou dobou 8,3 roku. Kontrolní skupina omnivorů byla bez dietních omezení a konzumovala maso a jiné živočišné produkty. Skupinu veganů tvořilo 12 mužů a 6 žen s průměrným věkem $32,8 \pm 5,1$ roku a průměrným BMI $23,4 \pm 2,8$ kg/m². Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 12 mužů a 8 žen s průměrným věkem $32,5 \pm 6,4$ a BMI $23,3 \pm 3,1$ kg/m².

Do intervenční části studie bylo zařazeno 8 veganů a 8 omnivorů. Intervence spočívala v podávání aminokyselin s rozvětveným postranním řetězcem (BCAA) v množství 15 g/den pro ženy a 20 g/den pro muže po dobu 3 měsíců. Vzájemný poměr leucin/valin/isoleucin byl 4 : 1 : 1. Použité tablety měly hmotnost 2 g a obsahovaly 1000 mg leucinu, 250 mg valinu, 250 mg isoleucinu a 500 mg plniv a pomocných látek. Kontroly subjektů probíhaly každý týden formou telefonního rozhovoru a každých šest týdnů byl subjekt navštíven členem výzkumného týmu. Vzorky krve pro analýzu FA byly odebrány před zahájením intervence a po jejím skončení.

Zastoupení TFA v mateřském mléce, parametry souboru

Několik odběrů zmrazeného mateřského mléka od jednoho subjektu bylo rozmraženo, homogenizováno, rozpipetováno a znovu zamraženo k dalším analýzám. Průměrný věk kojících matek byl 30 let v rozmezí 21 - 37 let. Průměrný věk dítěte v době odběru byl 30 dnů v rozmezí 4 - 60 dnů. Průměrné BMI matek bylo 24 kg/m² a to v rozmezí 19 - 41 kg/m². Třicet devět matek bylo v oblasti normálního BMI, 11 v oblasti preobezity, 4 v oblasti obezity 1. stupně a jedna v oblasti obezity 3. stupně. Subjekty vyplnily detailní dotazník stravovacích návyků.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

Studie OMEGA

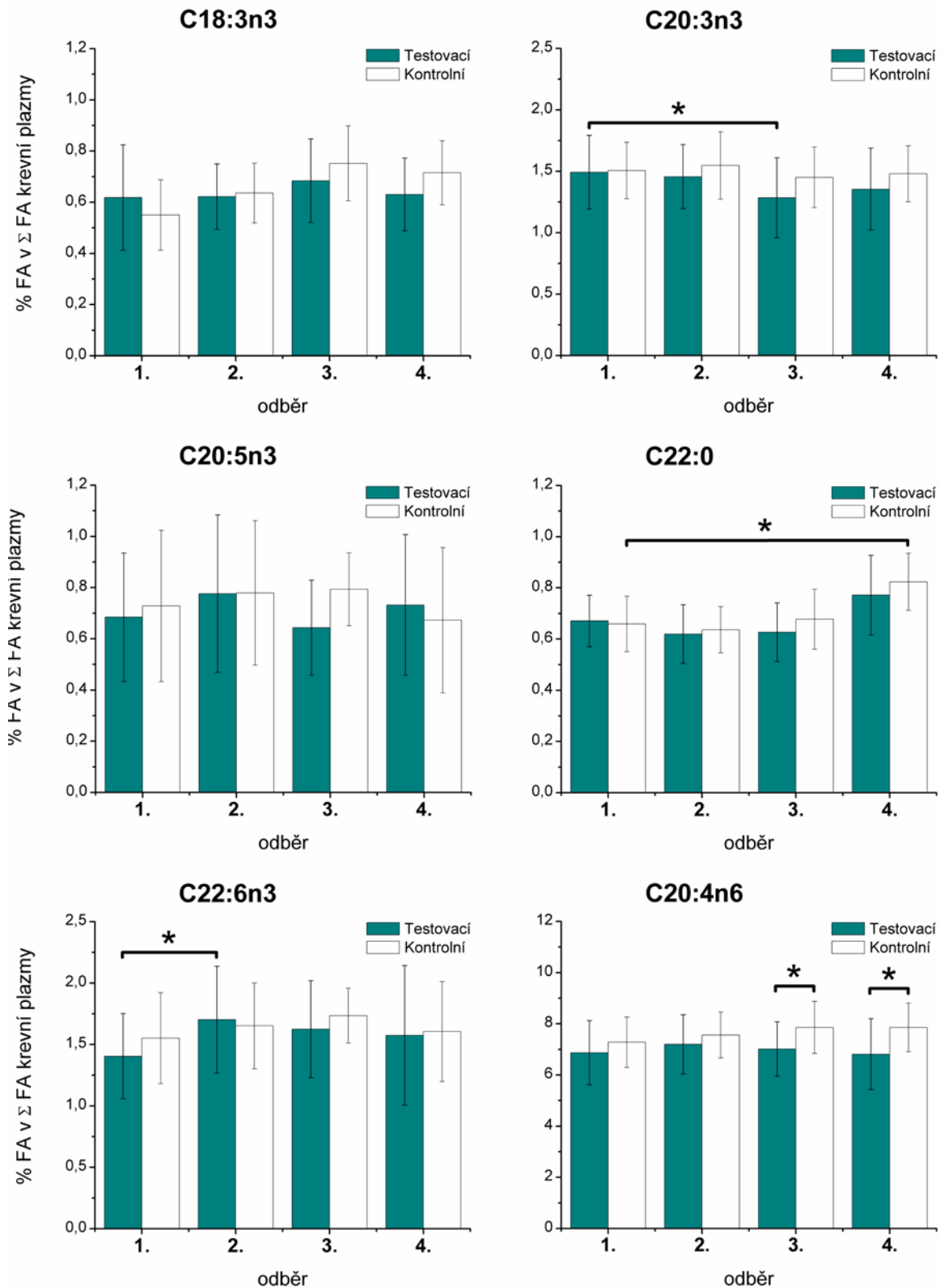
Cílem projektu bylo vytvoření doplňků krmných směsí na bázi mikrořas a lněného semínka pro produkci funkčních potravin a to OMEGA vajec a OMEGA kuřecího masa. Tím by vznikla surovina zabezpečující přísun polynenasycených mastných kyselin (PUFA) s dlouhým řetězcem jako je kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosahexaenová (DHA), které jsou nezbytné pro vývoj mozku a očí u dětí, případně jsou benefitem pro kardiovaskulární a nervový systém dospělých. Běžně dostupným zdrojem těchto FA je rybí tuk, který je součástí některých potravinových doplňků používaných i pro těhotné či kojící ženy. Ten je dobře známý svou nepříjemnou chutí a vůní. Naší úlohou v projektu bylo provedení analýz biologického materiálu získaného od dobrovolníků v průběhu klinické části studie se záměrem stanovit hladiny FA v odebraném biologickém materiálu a tím potvrdit či vyvrátit smysluplnost obohacování krmných směsí.

Klinická část studie OMEGA měla celkem tři části, v jejichž průběhu dobrovolníci konzumovali maso a vejce získané z kuřic krmených za pomoci třech různých krmných směsí. V rámci této kapitoly dizertační práce předkládám výsledky pouze z druhé fáze studie OMEGA, v jejím průběhu byla testovací skupina kuřat krmena směsí obsahující 0,3 % řasy *Trachydiscus minutus* a 1 % lněného semínka. Směs kontrolní skupiny pak obsahovala pouze 1 % lněného semínka. Výkrm probíhal v první části roku 2015, klinická část s odběrem vzorků v druhé polovině téhož roku a analýzy začátkem roku 2016. Sledování FA v odebrané krevní plazmě odráží jejich krátkodobý příjem [11]. Jako indikátor dlouhodobého příjmu byly použity FA z erytrocytů [12-14], jejichž životnost se pohybuje mezi 110 - 120 dny. V průběhu 8 týdenní dietní intervence tak došlo k výměně přibližně poloviny z nich. Běžným střednědobým ukazatelem příjmu FA jsou fosfolipidy krevní plazmy [11], jejichž analýza po prvotní extrakci dále vyžaduje separaci lipidových frakcí buď pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) [15], extrakce na tuhé fázi (SPE) [15, 16] nebo HPLC s odběrem frakce fosfolipidů [17, 18]. Získané fosfolipidy jsou esterifikovány a vzniklé FAME následně analyzovány na GC. Jelikož erytrocyty nepoužívají jako energetický substrát FA, neměly by obsahovat ani FFA a TAG, což potvrzují publikace Holčapek et al. [19] a Chamorro et al. [18]. Lipidový profil erytrocytů je tvořen cholesterolem, fosfolipidy a sřingomyelinem. Proto byla zvolena metoda extrahující lipidy z erytrocytů podle modifikovaného postupu z článku Rosé a Oklander [20]. Metoda se vyznačuje nižší kontaminací extraktu hemem oproti běžné používané extrakci dle Folche [21].

Ze sledovaných omega-3 FA jsme našli signifikantní změnu v hodnotách koncentrací pouze u C20:3n3 v testovací skupině mezi 1. a 3. odběrem. Jde pravděpodobně o pokles vyvolaný mírně zvýšeným příjmem EPA (C20:5n3) z mikrořas, který vedl k nižší endogenní syntéze. Přibližně 13 g sušených řas obsahuje cca 88 mg EPA [22]. Přestože rozdíly mezi minimální a maximální plazmatickou hodnotou Σ FA nejsou statisticky významné, normalizovali jsme výsledky převedením na procentuální zastoupení jednotlivých FA. Procentuální zastoupení sledovaných omega-3 FA, společně s těmi FA u kterých došlo k signifikantní změně, jsou vyneseny v grafech na Obr. 3. V případě ALA, pocházející z lněného semínka v krmné směsi, byl pozorován vzestup koncentrace v průběhu dietní intervence u 2. a 3. odběru především u kontrolní skupiny. Nicméně žádný z rozdílů, ať už mezi skupinami nebo mezi jednotlivými odběry stejné skupiny, není statisticky významný. Stejný závěr platí i pro EPA (C20:5n3). V případě DHA (C22:6n3) je pozorovatelný vzestupný trend u kontrolní skupiny, ale bez statistické významnosti. Ovšem zvýšení plazmatické hladiny v první polovině dietní intervence u testovací skupiny už statisticky významné je. Signifikantní zůstává pokles hladiny C20:3n3 u testovací skupiny mezi 1. a 3. odběrem, viz. Obr. 3. Jediným rozdílem pozorovaným mezi testovací a kontrolní skupinou je postupné rozevírání nůžek v zastoupení ARA, které je signifikantní ve 3. a ve 4. odběru. Shodný rozdíl mezi skupinami platí pro jedinou nasycenou kyselinu C22:0, jejíž koncentrace v první polovině intervence nejprve klesá a následně ve 3. odběru stoupá a nejvyššího vzestupu dosahuje po vymývací periodě, tj. ve 4. odběru. Statisticky signifikantní je ovšem pouze rozdíl mezi 1. a 4. odběrem u kontrolní skupiny. Pro sledování dlouhodobého vlivu byly analyzovány FA v erytrocytech. Zde byl odhalen statisticky signifikantní vzestup Σ všech FA mezi 1. a 3. odběrem u obou skupin a z tohoto důvodu byly výsledky normalizovány na procentuální zastoupení FA v extraktu z erytrocytů, viz. Obr. 4. Jedná se především o signifikantní nárůst DHA o 4,4 % v prvním a o 5,1 % ve třetím odběru u testovací skupiny. Omega-index testované skupiny vzrostl z 5,1 % na 5,8 % mezi 1. a 3. odběrem a u kontrolní skupiny z 5,3 % na 5,8 %. Podobný nárůst byl také pozorován u ARA: z 16,4 % na 16,7 % u testovací a z 16,8 % na 17,9 % u kontrolní skupiny. Jako signifikantní vychází rozdíl u kontrolní skupiny mezi 1. a 3. odběrem a mezi testovací a kontrolní skupinou ve 3. odběru, tj. na konci dietní intervence. Změny u obou FA v erytrocytech jsou i v dobré shodě s plazmatickými změnami FA v průběhu studie.

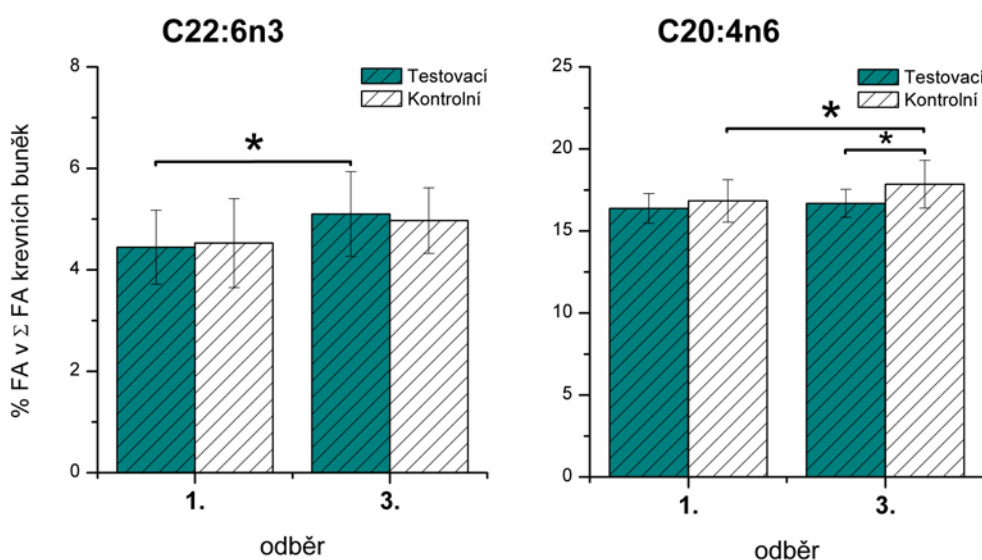
Kladným efektem přidavku mikrořasy do krmné směsi je faktor efektivnosti výkrmu (FEV), uvedený v Příloze 1A závěrečné zprávy za Rabbit Trhový Štěpánov a.s., počítaný dle vzorce:

$$FEV = \frac{\% \text{ dožitých kuřat} \times \text{živá hmotnost}}{\text{stáří (dny)} \times \text{konverze krmiva}} \times 100 \quad (1)$$



Obrázek 3. Rozdíly v procentuálním zastoupení plazmatických hladin FA u testovací a kontrolní skupiny v průběhu 4 odběrů. Statisticky významné rozdíly zjištěné pomocí ANOVA ($\alpha = 0,05$) mezi odběry i mezi skupinami jsou označeny *.

Dle závěrečné zprávy FEV vychází 244 pro testovací a 227 pro kontrolní skupinu. Vzhledem k zdokumentovanému nízkému vzestupu hladiny omega-3 FA a to pouze u DHA se nabízí otázka ekonomické výhodnosti obohacování masa a vajec o omega-3 FA, byť ekologická návaznost ve zpracování fugátu z anaerobní digesce prasečí kejdy, využití odpadních sacharidů, hydrolyzátů celulózy, polyalkoholů a CO₂ ze spalných plynů pro kultivaci řas produkujících PUFA, jistě smysl dává.

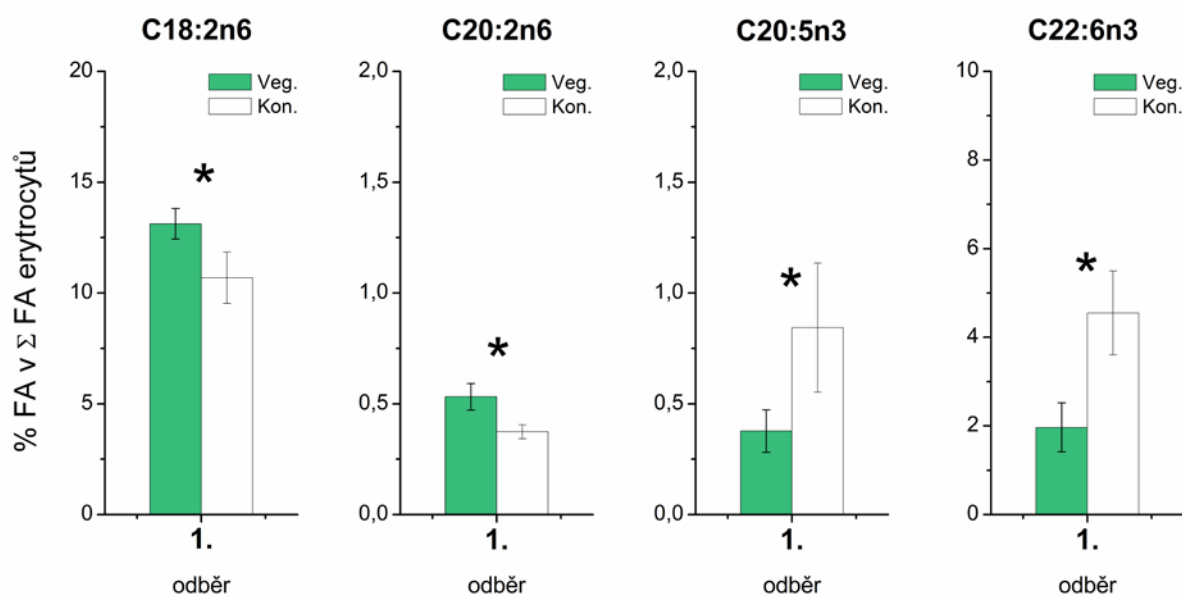


Obrázek 4. Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení FA v krevních buňkách. Rozdíly otestovány za pomoci ANOVA ($\alpha=0,05$). Signifikantní rozdíly vyznačené *.

Studie VEGGIE-2

Naše společnost je sužována výskytem diabetu mellitu a komplikacemi s ním spojenými. Ty často zkracují délku života nebo snižují jeho kvalitu. Zpráva WHO z roku 2014 hovoří o 422 milionech lidí zasažených některou z forem diabetu, což činí asi 8,5 % veškeré dospělé populace na Zemi [23]. Odhady pro rok 2018 mluví už o více než 500 miliónech [24] a predikce pro rok 2045 dle IDF činí 629 milionů diabetiků s nejvyšším nárůstem v rozvojových zemích [25]. Předstupněm T2D je vznik tzv. inzulínové rezistence (IR), nazývané též jako porušená glukózová tolerance (IGT). V ČR připadalo v roce 2017 na 718 tisíc diabetiků zhruba dalších 185 tisíc lidí s IGT [26]. U lidí stravujících se veganskou či lakto-ovo-vegetariánskou stravou je prokázán nižší výskyt diabetu 2. typu (T2D) [27-31] a nižší inzulínová rezistence [32-35]. Příjem masa a masných výrobků je spojován se vznikem IGT a T2D [36], ale dietních faktorů majících vliv na rozvoj IGT je celá řada a jejich vliv je komplexní. V rámci studie VEGGIE-2 byly vybrány dva faktory spojené s příjmem masa a to nasycené mastné kyseliny (SFA) a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA) a byl

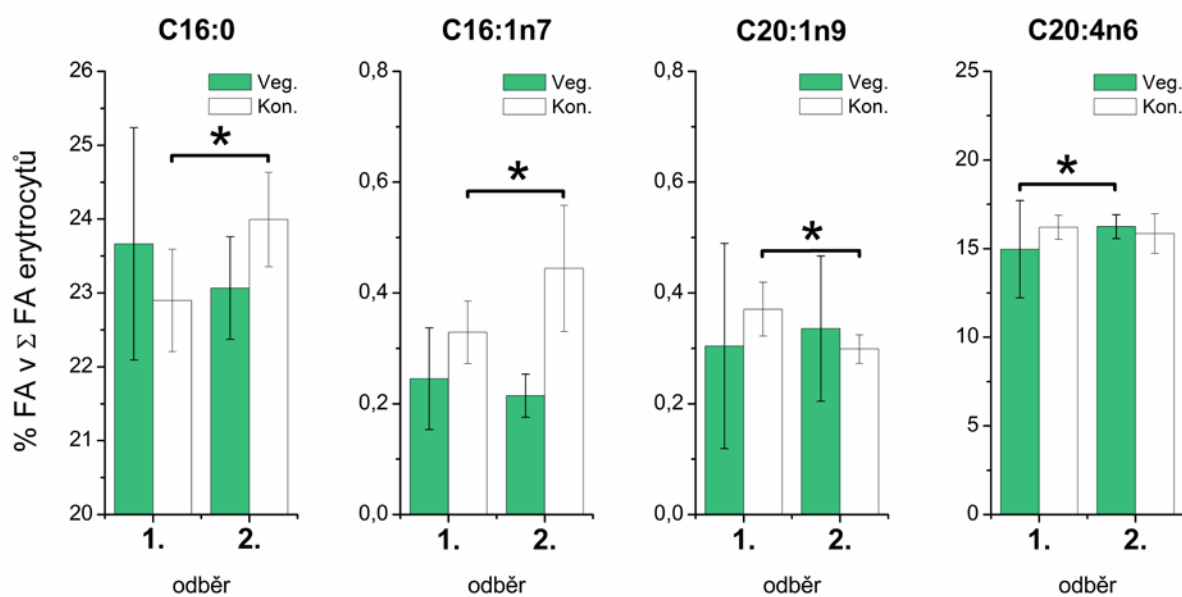
sledován jejich vliv na inzulínovou senzitivitu, markery oxidativního stresu a mitochondriální biogeneze u veganů. Studii VEGGIE-2 vedl dr. Gojda s finančním podporou MZČR, grant NT/14416. Naší úlohou bylo stanovení FA ve frakci FFA krevní plazmy, v erythrocytech a ve vzorcích odebrané tukové tkáně. Díky časové náročnosti projektu se spektrum plánovaných úkolů zúžilo na intervenci BCAA. Na počátku byl porovnán profil FA u skupiny veganů a omnivorů vycházející ze vstupních odběrů. U veganů byly očekávány nižší hladiny SFA a naopak vyšší hladiny PUFA oproti kontrolní skupině, což potvrzuje analýza tukové tkáně i analýza plazmatických FFA. Omnivoři mají o 65 % vyšší sumární hladinu SFA ve frakci FFA oproti veganům. V tukové tkáni tento rozdíl činí 53 %. V případě PUFA mají vegani vyšší hladinu ve frakci FFA krevní plazmy o 29 % a v tukové tkáni tento rozdíl činí dokonce 95 %. Mezi tukovou tkání a frakcí FFA existuje samozřejmě úzké propojení z důvodu vyplavování zásobních lipidů při lačnění. Zajímavé je, že se tento fakt výrazně nepromítá do lipidového profilu erythrocytů. Signifikantní rozdíly v absolutních koncentracích FA se zde sice objevují, ale po přepočtení na procentuální zastoupení jsou sumární hladiny jednotlivých skupin FA již statisticky shodné. Výjimkou jsou omega-3 FA, jejichž sumární zastoupení je na úrovni 55 % kontrolní skupiny. Průměrná hodnota omega-3 indexu je 2,3 % pro vegany a 5,4 % pro omnivory. Nedostatek omega-3 FA s dlouhým řetězcem tak patří mezi jednu z nevýhod veganské stravy. Konkrétně jde o EPA a DHA, jejichž procentuální zastoupení v erythrocytech je přibližně poloviční oproti omnivorům, viz. Obr. 5.



Obrázek 5. FA se signifikantně odlišným procentuálním zastoupením v erythrocytech veganů a omnivorů (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

U intervence BCAA se nám podařilo zachytit dvě statisticky signifikantní změny ve frakci FFA a to vzestup kyseliny myristové u veganů a pokles kyseliny stearové v kontrolní skupině. Stejný pokles C18:0 se objevuje i v absolutních koncentracích v erythrocytech, při porovnání procentuálního zastoupení ovšem nebyl odhalen rozdíl. V absolutních koncentracích byl zaznamenán pokles C18:1n9, C20:4n6, C24:0 a C24:1n9 u kontrolní skupiny.

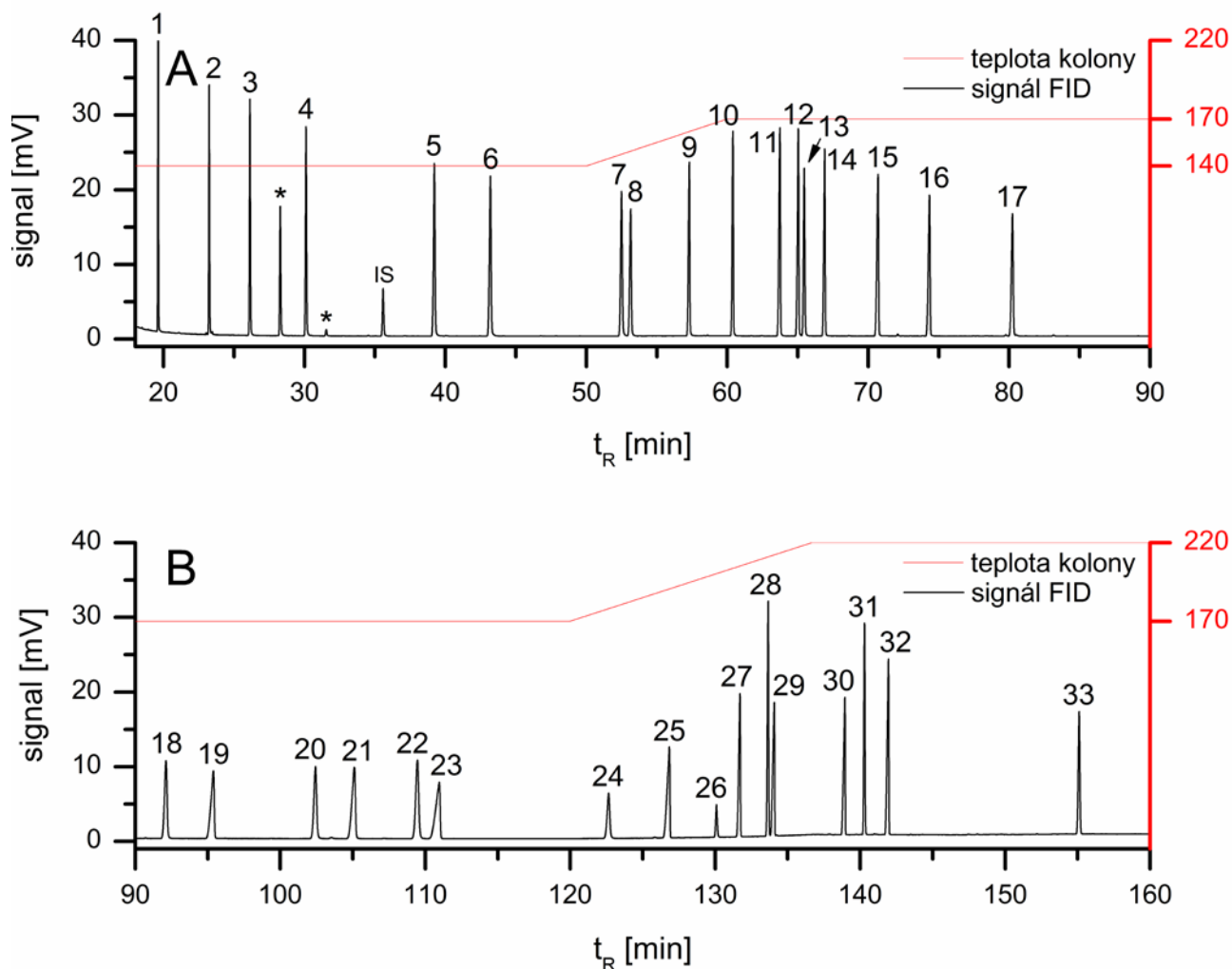
Ze změn v procentuálním zastoupení FA v erythrocytech byl odhalen statisticky významný nárůst kyseliny palmitové a palmitolejové u kontrolní skupiny, viz Obr. 6. Jelikož BCAA nejsou metabolizovány v játrech, ale především kosterním svalstvem a tukovou tkání, je jejich přebytek spojen s *de novo* lipogenezí [37]. To pravděpodobně vedlo k navýšení zastoupení C16:0 a C16:1n7 v erythrocytech po 3 měsíční intervenci, ale pouze u kontrolní skupiny omnivorů. Tento výsledek je v dobré shodě s analýzou exprese genů tukové tkáně publikované v článku Gojda et al. [38], kde došlo ke zvýšení exprese syntázy mastných kyselin (FAS), stearyl-CoA-desaturázy 1 (SCD1), diglyceridacyltransferázy (DGAT-2) a to vše pouze u kontrolní skupiny omnivorů. Hypotéza vysvětlující odlišné reakce na BCAA u těchto dvou skupin pravděpodobně spočívá v nižší bazální hladině BCAA u veganů. Na druhé straně u omnivorů vede jejich přebytek ke zvýšení lipogeneze v tukové tkáni [38], ale faktorů majících vliv je samozřejmě více. Jedním z dalších může být nižší hladina některých vitamínů (kobalamin 4) ovlivňující diferenciaci adipocytů a následně vedoucí k nižšímu lipogennímu efektu u veganů [38].



Obrázek 6. Rozdíly v procentuálním zastoupení FA v erythrocytech po intervenci BCAA u skupiny veganů a omnivorů. * signifikantní rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

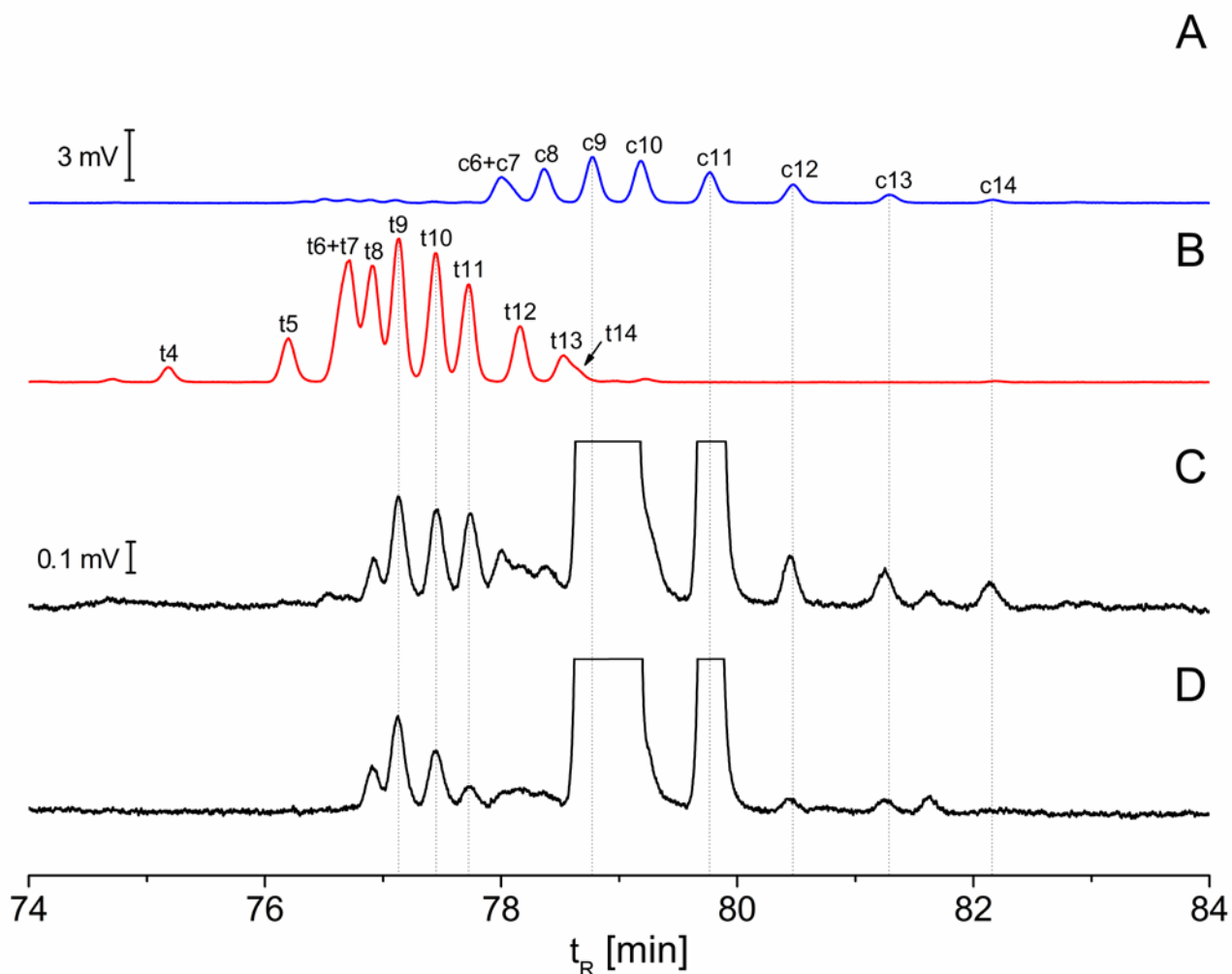
Vytvoření metody pro detailní analýzu TFA

Vývoj metody pro GC s dvěma různými spojenými kolonami vycházel z metod pro přímou GC analýzu *trans* izomerů FA na 100 metrové koloně s polární SF. *Cis* izomery FA vykazují vyšší afinitu k polární SF v porovnání s *trans* a navíc malé rozdíly v polaritě molekuly, dle pozice dvojné vazby v molekule, vedou k oddělení jednotlivých polohových izomerů. Dosahováno je vyššího rozlišení pro *cis* polohové izomery v porovnání s *trans*. Z používaných SF jde především o kyanopropylovou fázi CP-Sil88, SP-2560 a zatím nejvíce polární fázi IL111. Pro všechny tyto kolony existují metody umožňující stanovit sumu *trans* C18:1 izomerů ve vzorku. Separace všech pozičních *trans* či *cis* izomerů kyseliny oktadecenové v přírodním či biologickém materiálu se na těchto kolonách dosáhnout nepodařilo. Yoshinaga et al. [39] byl tomuto cíli nejbližší: Z 13ti pozičních *trans* izomerů bylo plně odděleno 9 izomerů, částečně separovány byly izomery *trans*-8 a *trans*-9 a izomery *trans*-6 a *trans*-7 koeluovaly. To vše při době analýzy 165 min pro vzorek obsahující pouze C18:1 izomery. Rozdělení některých pozičních izomerů v mléce dosáhl Delmonte et al. [40] při spojení dvou 100 metrových kolon SLB-IL111. Přesto např. izomery *trans*-8 a *trans*-9, *trans*-13 a *trans*-14 a *cis*-6 a *cis*-7 koeluovaly. S cílem provést co nejlepší separaci jednotlivých *trans* izomerů jsme se rozhodli vydat stejnou cestou. Pro analýzu jsme použili starší kolonu SLB-IL111 a zcela novou kolonu SP-2560, které jsme spojili spojkou. Vývoj teplotního programu vycházel ze znalosti ideální teploty pro separaci C18:1 izomerů při izotermální eluci. Pro kolonu SP-2560 je to teplota 180 °C, zatímco pro kolonu SLB-IL111 je to 168 - 170 °C. Při této teplotě ale docházelo ke koeluci C14:1n5c a C15:0. Z tohoto důvodu začínal teplotní program na nižší teplotě 140 °C držených až do eluce tohoto kritického páru, následoval gradient na teplotu 170 °C. Zde se ukázalo jako klíčové rozlišení kyseliny elaidové, *trans*-10-oktadecenové a kyseliny *trans*-vakcenové od ostatních izomerů kyseliny oktadecenové. Tyto zmíněné tři *trans* izomery C18:1 totiž společně tvoří téměř polovinu všech TFA přítomných v našich vzorcích. Výřez zóny chromatogramů ukazující separaci C18:1 izomerů je na Obr. 8. Při teplotě 170 °C sice dochází ke koeluci C18:3n6ac, C18:3n3tct a C20:1n9t, nicméně chyba při kvantifikaci majoritní C18:3n6 je díky jejich malému výskytu nízká. Plato 170 °C bylo drženo až do eluce dalšího kritického páru C18:3n3 a C21:0, pro jejichž rozdělení je tato teplota také vhodná. Následoval opět teplotní gradient, v jehož průběhu dochází k eluci C20:3n3, C20:4n6 a C23:0. Poslední teplotní plato 220 °C bylo zvoleno s ohledem na co nejrychlejší eluci zbývajících FAME a zároveň s ohledem na životnost kolony.



Obrázek 7. Chromatogramy kalibračního vzorku 6. kalibrační úrovně, rozdělený v čase 90 min na obrázek A a obrázek B. Pořadí FA je následující: C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, isoC14:0, C14:0, C14:1n5c, C15:0, isoC16:0, C16:0, isoC17:0, C16:1n9c, anteisoC17:0, C17:0, isoC18:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6cc, C20:0, C18:3n6, C20:1n9c, C18:3n3, C21:0, C20:2n6, C22:0, C20:3n6, C22:1n9c, C20:4n6, C23:0, C24:0 C20:5n3, C24:1n9, C22:6n3.

Chromatogram jednoho z kalibračních vzorků společně s průběhem teplotního programu je na Obr. 7. Autoři již citovaného článku Delmonte et al. [40] navíc využili pro zkrácení analýzy průtokový gradient na výsledný průtok 3 ml/min. Dosahují tak v porovnání s námi výrazně kratšího času analýzy, tj. 87,5 min. Bohužel tato cesta pro nás byla uzavřena, díky limitu tlakového regulátoru našeho GC systému. Jeho hodnota udaná výrobcem je 400 kPa a při průtoku vodíku 1,7 ml/min a splitu 1:100 byl tlak na počátku kolony 381 kPa. Další zvyšování průtoku tedy nebylo možné.

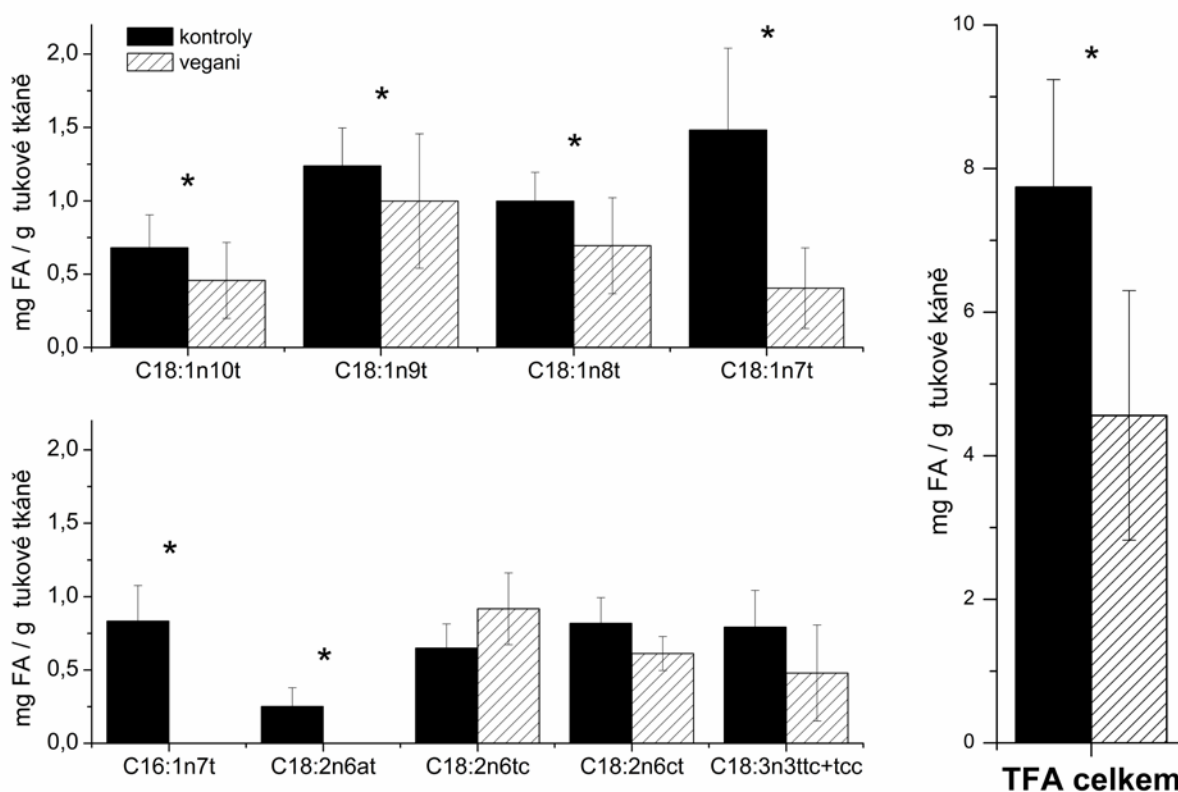


Obrázek 8. Detail oblasti C18:1 izomerů v chromatogramech získaných při analýze na spojených kolonách SLB-IL111 + SP2560; **A** - frakce *cis* izomerů po Ag-SPE, **B** - frakce *trans* izomerů po Ag-SPE, **C** - analýza tukové tkáně omnivora, **D** - analýza tukové tkáně vegana.

Analýza TFA v tukové tkáni veganů a omnivorů

Vzorky tukové tkáně získané v rámci studie VEGGIE-2 byly po svém zpracování, esterifikaci a analýze na 15 m koloně uschovány v mrazáku při $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla provedena detailní GC analýza TFA na dvou spojených stometrových kolonách. Předpokládali jsme nižší hladiny TFA u veganů díky vyloučení mléka a mléčných výrobků, které jsou jejich přírodním zdrojem. Zároveň odlišný způsob přípravy pokrmů u veganů s omezeným smažením či fritováním, by měl také snižovat hladinu TFA. První analýza byla provedena na 100 m koloně SLB-IL111. Získané výsledky prokázaly téměř poloviční hladinu TFA u veganů a byly předběžně prezentovány na 69. zjazdu chemikov ve Starém Smokovci. Skutečná detailní analýza byla provedena až na spojených kolonách SLB-IL111 a SP-2560. Příslušný chromatogram se zvětšeným výřezem zóny

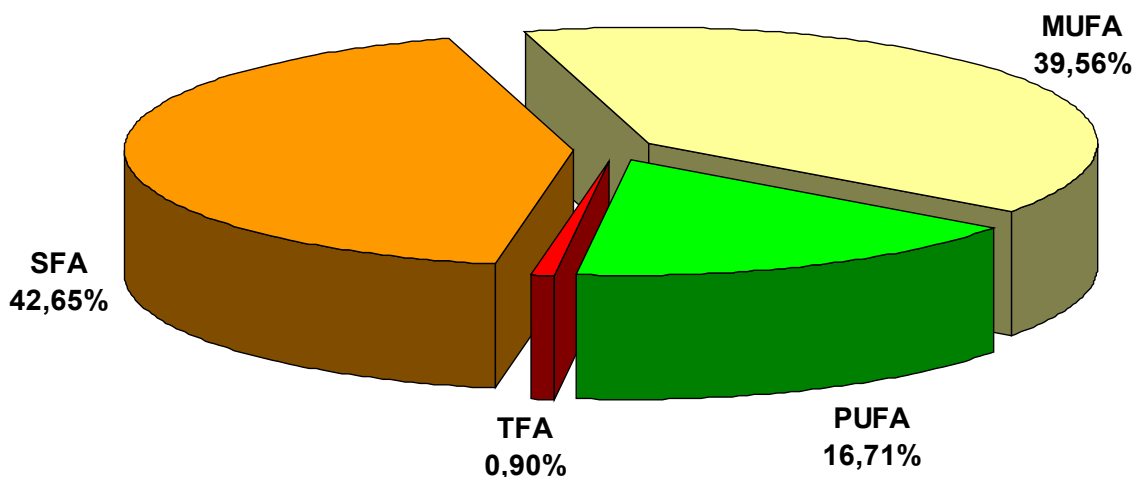
obsahující C18:1 izomery vzorku vegana je na Obr. 8D a Obr. 8C zobrazuje stejnou část chromatogramu ze vzorku od omnivora. Nejnižší rozlišení je mezi t_8 a t_9 s hodnotou $R_{t_8, t_9} = 0,9$. Zjištěná koncentrace TFA v tukové tkáni je u veganů 4,6 mg/g oproti 7,7 mg/g u omnivorů. *Trans* C18:1 izomery se podílí na sumě všech TFA přibližně z 56 % pro obě skupiny. U veganů je nejvíce zastoupená kyselina elaidová (22 %) zatímco u omnivorů je to kyselina vakcenová (19 %). Koncentrace jednotlivých TFA společně se sumou TFA u obou skupin jsou vyneseny v grafu na Obr. 9. Kyselina vakcenová je dominantní TFA kravského mléka [40], proto je její koncentrace u veganů třetinová oproti omnivorům, což potvrzují i nižší hladiny rozvětvených FA pocházející z tohoto zdroje. Oproti tomu je kyselina elaidová dominantní TFA ve ztužených tucích, či potravinách vystavených vysokým teplotám, např. ze smažení či fritování. Zde však není mezi skupinou veganů a omnivorů žádný rozdíl, přestože byl očekáván vzhledem k rozdílným technikám přípravy pokrmů. Některé další TFA jako je C16:1n7t a C18:2n6at nebyly u veganů vůbec detekovány. Zvláštností je vyšší hladina C18:2n6tc u veganů oproti omnivorům. Tento rozdíl není statisticky významný a vysvětlení pro něj zatím nemáme. Tyto výsledky včetně Obr. 8 a Obr. 9 jsou společně s metodou pro spojené kolony shrnuty v publikaci Jaček et al. [41] uvedené v příloze dizertační práce.



Obrázek 9. Porovnání jednotlivých izomerů TFA ve vzorcích tukové tkáně veganů a omnivorů vyjádřené v mg/g tukové tkáně; * signifikantní rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$)

Stanovení zastoupení TFA v mateřském mléce

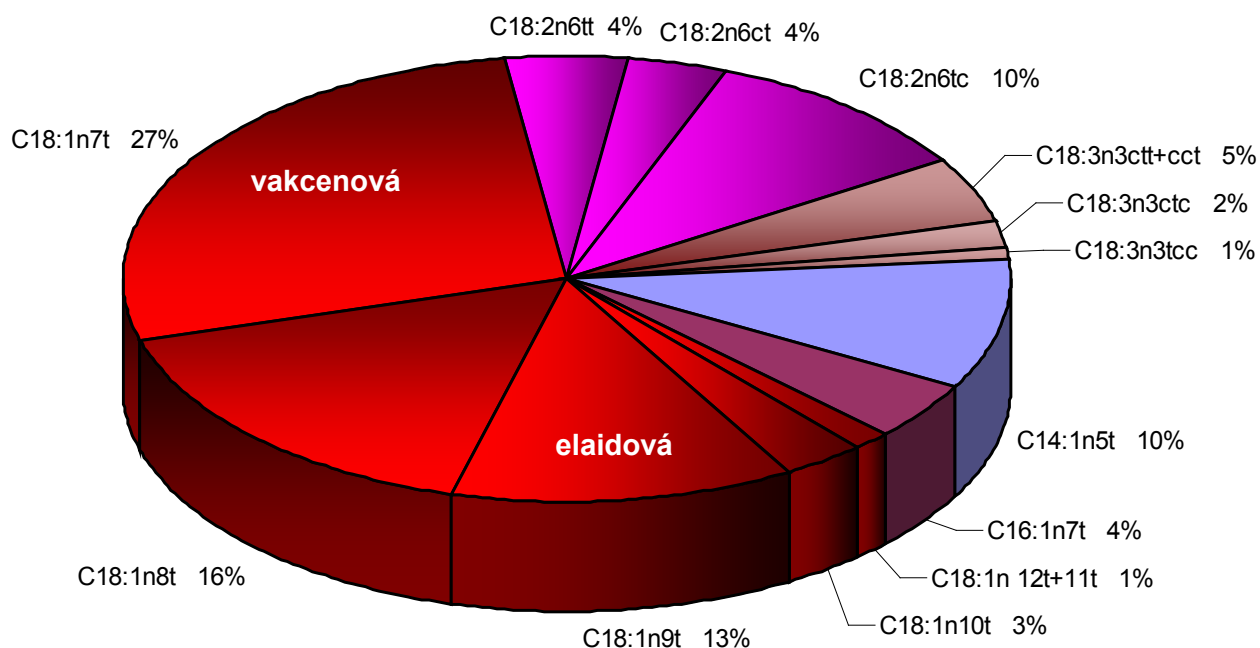
Vyvinutá metoda pro spojené kolony SLB-IL111 a SP-2560 byla použita i pro sledování hladiny TFA v mateřském mléce pražských matek v roce 2017. Postup odběru a zpracování vzorků je společně s charakteristikou celého souboru subjektů uveden v experimentální části. Mateřské mléko odráží jak FA aktuálně přijímané z potravy, tak v mnohem větší míře FA deponované v tukové tkáni matky. Díky tomu se stává dobrým markerem dlouhodobého příjmu TFA naší populace. Další výhodou je získání vzorků neinvazivním způsobem. Zajištění odběru a celého projektu bylo v gesci prof. Černé, v rámci spolupráce Ústavu hygieny 3. lékařské fakulty a Státního zdravotního ústavu. Kojící matky, které se průzkumu účastnily, vyplnily podrobný dotazník konzumace vybraných potravin za uplynulé 3 měsíce. Celkem bylo analyzováno 50 vzorků mateřského mléka s celkovým obsahem FA v rozmezí 13,5 - 80,3 mg/ml. Široké rozmezí koncentrací je dáno širokým rozmezím stáří kojeného dítěte, které se pohybovalo od 4 do 60 dnů. Tuk je obecně v mateřském mléce nejvíce variabilní položkou. Jeho zastoupení vzrůstá v průběhu vývoje od kolostra (1. – 5. den), přes přechodné mléko (6. – 15. den) až po mateřské mléko (> 15. den), kde tvoří 3 - 5 hmot. % [42, 43] a zároveň stoupá množství tuku v průběhu kojení v tzv. předním, středním a zadním mléce [44]. Námi stanovené průměrné procentuální zastoupení TFA bylo $0,9 \pm 0,27$ %. Zastoupení dalších tříd FA v mateřském mléce je vyneseno v grafu na Obr. 10.



Obrázek 10. Procentuální zastoupení jednotlivých tříd FA v mateřském mléce pražských matek.

Více než polovinu všech TFA tvořili *trans* izomery C18:1, viz Obr. 11. Díky detailní analýze na spojených kolonách bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou TFA je kyselina vakcenová tvořící 27,3 % ze všech TFA. Na dalších dvou místech se umístila kyselina *trans*-10-oktadecenová

(16,3 %) a kyselina elaidová (12,6 %). Zastoupení dalších TFA podílejících se na sumě TFA je vyneseno v grafu na Obr. 11. Podobný průzkum byl na našem pracovišti proveden v roce 2007 se zaměřením na skladbu FA v mateřském mléce Rómských matek versus majoritní části populace [45]. Analýza byla provedena na 100 m koloně CP-Sil 88 a poskytla informaci o sumě *trans* C18:1 izomerů a některých dalších TFA. Námi zjištěná hodnota je 3 - 4krát nižší než procentuální zastoupení v mateřském mléce běžné populace v roce 2007. Můžeme tedy říci, že jak doporučení WHO, tak evropské agentury EFSA ohledně množství TFA v denním energetickém příjmu nesou své ovoce v podobě lepšího a zdravějšího profilu FA v naší populaci.



Obrázek 11. Procentuální zastoupení jednotlivých TFA v mateřském mléce pražských matek.

8 ZÁVĚR

V průběhu celé studie OMEGA bylo na našem pracovišti analyzováno celkem přes 600 vzorků, v nichž byl stanoven základní profil FA. V rámci této dizertační práce uvádím pouze výsledky z II. fáze této studie. V ní se nám podařilo po statistické analýze získaných dat nalézt malý, ale přesto signifikantní nárůst v procentuálním zastoupení DHA v krevní plazmě mezi 1. a 2. odběrem. Můžeme zároveň konstatovat, že tento nárůst byl potvrzen i signifikantním nárůstem DHA v erytrocytech testovací skupiny. FA v erytrocytech slouží jako marker dlouhodobého příjmu omega-3 FA po 8 týdenní intervenci vejci a masem obohaceným o omega-3 FA s delším řetězcem. V době vypracování této práce jsme měli pouze informaci o rozdílech v krmné směsi nosnic a jatečných brojlerů. Výsledky analýzy vzniklých omega-vejec a omega-kuřecího masa provedené na VŠCHT nám nebyly poskytnuty, tudíž nevíme kolik kyseliny α -linolenové z lněného semínka bylo v kuřatech transformováno v EPA a DHA, případně kolik EPA z řasy bylo dále přeměněno na DHA. Stejně tak nemáme povědomí o efektivitě kultivace mikrořasy či výsledcích napojení na využitování odpadů při její kultivaci. Proto utváření komplexnějších závěrů z této studie je z důvodu nedostatku informací velmi obtížné.

V rámci studie VEGGIE-2 bylo analyzováno přes 150 vzorků, v nichž byl opět stanoven základní profil FA. Zdokumentovali jsme rozdíly mezi oběma skupinami a prokázali dvakrát vyšší hladiny kyseliny linolové a naopak významně nižší hladiny SFA u veganů oproti běžné populaci. V návaznosti na studii OMEGA zmíním pozorovaný deficit omega-3 FA s dlouhým řetězcem jako je EPA a DHA v erytrocytech veganů. Jejich dostatečný přísun nelze zabezpečit pouze z konzumace rostlinné stravy, a proto možnost jejich příjmu z jiných než živočišných zdrojů zůstává lákavá. Po předchozí intervenci BCAA byla v erytrocytech omnivorů nalezena zvýšená hladina kyseliny palmitové a palmitolejové, což koresponduje se zvýšenou aktivitou lipogenních genů tukové tkáně vedoucích ke zvýšení syntézy FA.

Pro stanovení TFA jsme vyvinuli metodu na spojených kolonách, která je i přes dlouhou dobu analýzy aplikovatelná na běžné GC-FID přístroje. Navíc metoda poskytuje detailní informaci o C18:1 izomerech jako dominantní frakci TFA. Vegani kromě zmíněných rozdílů v základním profilu FA mají signifikantně nižší hladinu TFA a zhruba třetinovou hladinu kyseliny vakcenové, což koresponduje s absencí masa, mléka a mléčných výrobků v jejich stravě. Hladina kyseliny elaidové je u obou skupin totožná a tudíž nesouvisí s odlišnou technikou přípravy pokrmů. Můžeme konstatovat, že z hlediska analýzy FA jsme z poměrně cenných vzorků tukové tkáně vytěžily maximum. Vzniklá metoda je použitelná i pro analýzu FA v jiných maticích, což jsme prokázali

analýzou mateřského mléka od pražských matek. Bohužel za uplynulých 5 let mého postgraduální studia se mi nepodařilo dostat druhé části názvu této práce. Veškerá xenobiotika, která byla v uplynulých letech stanovována, nebyla vhodná pro stanovení na GC a byla analyzována metodou HPLC. Z důvodu udržení konzistence této práce a nerozměňování jejího obsahu nejsou další analytické techniky uváděny. Přesto byla na našem pracovišti úspěšně analyzována anestetika na GC-NPD.

Snad tedy i tato má práce dokazuje, že GC od svého vzniku zůstává přes dlouhých 60 let úzce spojená s analýzou FA a je stále zlatým standardem pro tuto oblast.

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. TSWETT, M. Adsorptionsanalyse und Chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 1906. **24**, 384-393. DOI: doi:10.1111/j.1438-8677.1906.tb06534.x.
2. MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*. 1941. **35**(12), 1358-1368. DOI: 10.1042/bj0351358.
3. ETTRE, L. S. *Chapters in the evolution of chromatography*. HINSHAW, J. V. (ed.). London: Imperial College Press, 2008. ISBN 978-1-86094-943-2.
4. HESSE, G.; EILBRACHT, H.; REICHENEDER, F. Das krystallisierte Calotropis-Harz. III. Mitteilung über afrikanische Pfeilgifte. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1941. **546**(3), 233-252. ISSN 0075-4617. DOI: 10.1002/jlac.19415460302.
5. HESSE, G.; TSCHACHOTIN, B. Adsorptionsanalyse von Gasen und Dämpfen. *Naturwissenschaften*. 1942. **30**(25), 387-392. ISSN 1432-1904. DOI: 10.1007/bf01475303.
6. KOLOMNIKOV, I. G.; EFREMOV, A. M.; TIKHOMIROVA, T. I.; SOROKINA, N. M.; ZOLOTOV, Y. A. Early stages in the history of gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018. **1537**, 109-117. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.01.006.
7. JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*. 1952. **50**(5), 679-690. ISSN 0264-6021. DOI: 10.1042/bj0500679.
8. MARTIN, A. J. P.; JAMES, A. T. Gas-liquid chromatography: the gas-density meter, a new apparatus for the detection of vapours in flowing gas streams. *Biochemical Journal*. 1956. **63**(1), 138-143. DOI: 10.1042/bj0630138.
9. JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to *n*-octadecanoic acid. *Biochemical Journal*. 1956. **63**(1), 144-152. DOI: 10.1042/bj0630144.
10. DELMONTE, P.; HU, Q.; KIA, A. R. F.; RADER, J. I. Preparation, chromatographic separation and relative retention times of cis/trans heptadecaenoic (17:1) fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 2008. **1214**(1-2), 30-36. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.086.
11. SERRA-MAJEM, L.; NISSENSOHN, M.; OVERBY, N. C.; FEKETE, K. Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *The British journal of nutrition*. 2012. **107**(2), S64-76. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1017/s000711451200147x.
12. POPPITT, S. D.; KILMARTIN, P.; BUTLER, P.; KEOGH, G. F. Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in health and disease*. 2005. **4**, 30. ISSN 1476-511x. DOI: 10.1186/1476-511x-4-30.

13. RISÉ, P.; ELIGINI, S.; GHEZZI, S.; COLLI, S.; GALLI, C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2007. **76**, 363-369. DOI: 10.1016/j.plefa.2007.05.003.
14. SCHUCHARDT, J. P.; HAHN, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2013. **89**(1), 1-8. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1016/j.plefa.2013.03.010.
15. RUIZ, J.; ANTEQUERA, T.; ANDRES, A. I.; PETRON, M. J.; MURIEL, E. Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*. 2004. **520**(1), 201-205. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2004.04.059.
16. BONDIA-PONS, I.; MORERA-PONS, S.; CASTELLOTE, A. I.; LOPEZ-SABATER, M. C. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of chromatography A*. 2006. **1116**(1-2), 204-208. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.023.
17. GERITS, L. R.; PAREYT, B.; DELCOUR, J. A. Single run HPLC separation coupled to evaporative light scattering detection unravels wheat flour endogenous lipid redistribution during bread dough making. *LWT - Food Science and Technology*. 2013. **53**(2), 426-433. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.03.015.
18. CHAMORRO, L.; GARCIA-CANO, A.; BUSTO, R.; MARTINEZ-GONZALEZ, J.; ALBILLOS, A.; LASUNCION, M. A.; PASTOR, O. Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis. *Clinica chimica acta*. 2013. **421**, 132-139. ISSN 0009-8981. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.007.
19. HOLCAPEK, M.; CIFKOVA, E.; CERVENA, B.; LISA, M.; VOSTALOVA, J.; GALUSZKA, J. Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2015. **1377**, 85-91. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.023.
20. ROSE, H. G.; OKLANDER, M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *Journal of lipid research*. 1965. **6**, 428-431. ISSN 0022-2275.
21. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1957. **226**(1), 497-509. ISSN 0021-9258.
22. REZANKA, T.; PETRANKOVA, M.; CEPAK, V.; PRIBYL, P.; SIGLER, K.; CAJTHAML, T. *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia microbiologica*. 2010. **55**(3), 265-269. ISSN 0015-5632. DOI: 10.1007/s12223-010-0039-0.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes. [online]. WHO, ©2016. [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=EACC47F4F27E44679A774DE8B17FB726?sequence=1.

24. KAISER, A. B.; ZHANG, N.; DER PLUIJM, W. V. Global Prevalence of Type 2 Diabetes over the Next Ten Years (2018-2028). *Diabetes*. 2018. **67**(1), 202-LB. DOI: 10.2337/db18-202-LB.
25. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas - Global Fact Sheet. [online]. IDF, ©2017. [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: <https://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
26. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Czech Rep. Country report 2017 & 2045. [online]. IDF, ©2017. [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: <https://reports.instantatlas.com/report/view/704ee0e6475b4af885051bcec15f0e2c/CZE>.
27. HUA, N. W.; STOOHS, R. A.; FACCHINI, F. S. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *The British journal of nutrition*. 2001. **86**(4), 515-519. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1079/bjn2001421.
28. TONSTAD, S.; BUTLER, T.; YAN, R.; FRASER, G. E. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009. **32**(5), 791-796. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc08-1886.
29. TONSTAD, S.; STEWART, K.; ODA, K.; BATECH, M.; HERRING, R. P.; FRASER, G. E. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2013. **23**(4), 292-299. ISSN 0939-4753. DOI: 10.1016/j.numecd.2011.07.004.
30. APPLEBY, P. N.; KEY, T. J. The long-term health of vegetarians and vegans. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2016. **75**(3), 287-293. ISSN 0029-6651. DOI: 10.1017/s0029665115004334.
31. MELINA, V.; CRAIG, W.; LEVIN, S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2016. **116**(12), 1970-1980. ISSN 2212-2672. DOI: 10.1016/j.jand.2016.09.025.
32. GOFF, L. M.; BELL, J. D.; SO, P. W.; DORNHORST, A.; FROST, G. S. Veganism and its relationship with insulin resistance and intramyocellular lipid. *European journal of clinical nutrition*. 2005. **59**(2), 291-298. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602076.
33. VALACHOVICOVA, M.; KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA, M.; BLAZICEK, P.; BABINSKA, K. No evidence of insulin resistance in normal weight vegetarians. A case control study. *European journal of nutrition*. 2006. **45**(1), 52-54. ISSN 1436-6207. DOI: 10.1007/s00394-005-0563-x.
34. GOJDA, J.; PATKOVÁ, J.; JAČEK, M.; POTOČKOVÁ, J.; TRNKA, J.; KRAML, P.; ANDĚL, M. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European Journal Of Clinical Nutrition*. 2013. **67**, 1310. DOI: 10.1038/ejcn.2013.202.
35. CUI, X.; WANG, B.; WU, Y.; XIE, L.; XUN, P.; TANG, Q.; CAI, W.; SHEN, X. Vegetarians have a lower fasting insulin level and higher insulin sensitivity than matched omnivores: A cross-sectional study. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2019. **29**(5), 467-473. ISSN 0939-4753. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.01.012.

36. AUNE, D.; URSIN, G.; VEIEROD, M. B. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia*. 2009. **52**(11), 2277-2287. ISSN 0012-186x. DOI: 10.1007/s00125-009-1481-x.
37. GREEN, C. R.; WALLACE, M.; DIVAKARUNI, A. S.; PHILLIPS, S. A.; MURPHY, A. N.; CIARALDI, T. P.; METALLO, C. M. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature chemical biology*. 2016. **12**(1), 15-21. ISSN 1552-4469. DOI: 10.1038/nchembio.1961.
38. GOJDA, J.; ROSSMEISLOVA, L.; STRAKOVA, R.; TUMOVA, J.; ELKALAF, M.; JACEK, M.; TUMA, P.; POTOCKOVA, J.; KRAUZOVA, E.; WALDAUF, P.; TRNKA, J.; STICH, V.; ANDEL, M. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European journal of clinical nutrition*. 2017. **71**(5), 594-601. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/ejcn.2016.274.
39. YOSHINAGA, K.; ASANUMA, M.; MIZOBE, H.; KOJIMA, K.; NAGAI, T.; BEPPU, F.; GOTOH, N. Characterization of cis- and trans-octadecenoic acid positional isomers in edible fat and oil using gas chromatography-flame ionisation detector equipped with highly polar ionic liquid capillary column. *Food chemistry*. 2014. **160**, 39-45. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.069.
40. DELMONTE, P.; FARDIN-KIA, A. R.; KRAMER, J. K.; MOSSOBA, M. M.; SIDISKY, L.; TYBURCZY, C.; RADER, J. I. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *Journal of chromatography A*. 2012. **1233**, 137-146. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.012.
41. JAČEK, M.; GOJDA, J.; DLOUHÝ, P.; TŮMA, P. The use of coupled gas chromatography columns for the determination of individual isomers of trans fatty acids in the adipose tissue of vegans. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2019. **150**(8), 1417-1424. ISSN 1434-4475. DOI: 10.1007/s00706-019-02481-9.
42. WEI, W.; YANG, J.; XIA, Y.; CHANG, C.; SUN, C.; YU, R.; ZHOU, Q.; QI, C.; JIN, Q.; WANG, X. Tocopherols in human milk: Change during lactation, stability during frozen storage, and impact of maternal diet. *International Dairy Journal*. 2018. **84**, 1-5. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.03.009.
43. JENSEN, R. G. The lipids in human milk. *Progress in lipid research*. 1996. **35**(1), 53-92. ISSN 0163-7827.
44. NEVILLE, M.; P KELLER, R.; SEACAT, J.; E CASEY, C.; C ALLEN, J.; P.C, A. Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk. *The American journal of clinical nutrition*. 1984. **40**, 635-646. DOI: 10.1093/ajcn/40.3.635.
45. MARHOL, P.; DLOUHY, P.; RAMBOUSKOVA, J.; POKORNY, R.; WIEREROVA, O.; HRNCIROVA, D.; PROCHAZKA, B.; ANDEL, M. Higher content of C18:1 trans fatty acids in early human milk fat of Roma breast-feeding women. *Annals of nutrition & metabolism*. 2007. **51**(5), 461-467. ISSN 0250-6807. DOI: 10.1159/000111167.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

JAČEK, Martin; GOJDA, Jan; DLOUHÝ, Pavel; TŮMA, Petr. The use of coupled gas chromatography columns for the determination of individual isomers of trans fatty acids in the adipose tissue of vegans. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2019, **150**(8), 1417-1424. ISSN 0026-9247. e-ISSN 1434-4475. DOI: [10.1007/s00706-019-02481-9](https://doi.org/10.1007/s00706-019-02481-9). IF: **1.501/2018**.

GOJDA, Jan; ROSSMEISLOVÁ, Lenka; STRAKOVÁ, Radka; TŮMOVÁ, Jana; ELKALAF, Moustafa; JAČEK, Martin; TŮMA, Petr; POTOČKOVÁ, Jana; KRAUZOVÁ, Eva; WALDAUF, Petr; TRNKA, Jan; ŠTICH, Vladimír; ANDĚL, Michal. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017, **71**(5), 594-601. ISSN 0954-3007. e-ISSN 1476-5640. DOI: [10.1038/ejcn.2016.274](https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.274). IF: **2.954/2017**.

GOJDA, Jan; PATKOVÁ, Jana; JAČEK, Martin; POTOČKOVÁ, Jana; TRNKA, Jan; KRAML, Pavel; ANDĚL, Michal. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013, **67**(12), 1310-1315. ISSN 0954-3007. e-ISSN 1476-5640. DOI: [10.1038/ejcn.2013.202](https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.202). IF: **2.950/2013**.

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

KURZOVÁ, Alice; MÁLEK, Jiří; HESS, Ladislav; JAČEK, Martin; SLÍVA, Jiří. Non-traditional administration of remifentanyl in an experimental setting. *Physiological Research*. 2019, **68**(Suppl. 1), S97-S103. ISSN 0862-8408. e-ISSN 1802-9973. DOI: [10.33549/physiolres.934330](https://doi.org/10.33549/physiolres.934330). IF: **1.701/2018**.

JELÍNEK, Michael; BALUŠÍKOVÁ, Kamila; DANIEL, Petr; NĚMCOVÁ-FÜRSTOVÁ, Vlasta; KIRUBAKARAN, Palani; JAČEK, Martin; WEI, Longfei; WANG, Xin; VONDRÁŠEK, Jiří; OJIMA, Iwao; KOVÁŘ, Jan. Substituents at the C3' and C3''N positions are critical for taxanes to overcome acquired resistance of cancer cells to paclitaxel. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018, **347**(May), 79-91. ISSN 0041-008X. e-ISSN 1096-0333. DOI: [10.1016/j.taap.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.002). IF: **3.585/2018**.

TŮMA, Petr; JAČEK, Martin; FEJFAROVÁ, Vladimíra; POLÁK, Jan. Electrophoretic stacking for sensitive determination of antibiotic ceftazidime in human blood and microdialysates from diabetic foot. *Analytica Chimica Acta*. 2016, **942**(October), 139-145. ISSN 0003-2670. e-ISSN 1873-4324. DOI: [10.1016/j.aca.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.008). IF: **4.950/2016**.

GOJDA, Jan; ROSSMEISLOVÁ, Lenka; TŮMOVÁ, Jana; KRAJČOVÁ, Adéla; ELKALAF, Moustafa; ŽIAK, Jakub; JAČEK, Martin; BALUŠÍKOVÁ, Kamila; DUŠKA, František; TRNKA, Jan; ANDĚL, Michal. Postavení perkutánní biopsie kosterního svalu v diabetologickém výzkumu. Metodologický přehled. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2015, **18**(4), 167-176. ISSN 1211-9326. e-ISSN 1212-6853.

JÁČEK, Martin, MATĚJČKOVÁ, Jana, MÁLEK, Jiří, HESS, Ladislav, SAMCOVÁ, Eva. Determination of midazolam in rabbit plasma by GC and LC following nasal and ocular administration. *Journal of Separation Science*. 2013, 36(20), 3366-3371. ISSN 1615-9306. DOI: 10.1002/jssc.201300401. **IF: 2.591/2012.**

Přednášky, postery

JÁČEK, Martin; TŮMA Petr: Stanovení bisfenolů v energetických nápojích pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. *ChemZi* 2019, 15 (1): 140. ISSN 1336-7242. *Konference: 71. Zjazd chemikov, Horný Smokovec, SR, 09.09.2019 – 13.09.2019.*

JÁČEK, Martin; ČERNÁ Milena; DLOUHÝ Pavel; TŮMA Petr: Monitoring of trans fatty acids in breast milk of prague mothers. *ISC 2018, Konference: 32nd International Symposium on Chromatography 2018. Cannes-Mandelieu, FR, 23.09.2018 – 27.09.2018.*

JÁČEK, Martin; ČERNÁ Milena; DLOUHÝ Pavel; TŮMA Petr: Sledování hladiny trans mastných kyselin v mateřském mléce. *e-sborník: ISBN 978-80-86241-59-3. Konference: 6. Česká Lipidomická konferenc., UOCHB AV ČR, Praha, ČR, 14.06.2018 – 15.06.2018.*

JÁČEK, Martin; GOJDA Jan; ROSSMEISLOVÁ Lenka; TŮMA Petr: Stanovení spektra mastných kyselin v tukové tkáni veganů a ominovorů pomocí plynové chromatografie. *ChemZi* 2017, 13 (1): 139 – 140. ISSN 1336-7242. *Konference: 69. Zjazd chemikov, Horný Smokovec, SR, 11.09.2017 – 15.09.2017.*

JÁČEK, Martin; POLÁK Jan; STRAKOVÁ Radka; SAMCOVÁ Eva; TŮMA Petr: Stanovení ceftazidimu a ampicilinu v perfuzátu z mikrodialyzační sondy. *ChemZi* 2015, 11 (1): 112 – 113. ISSN 1336-7242. *Konference: 67. Zjazd chemikov, Horný Smokovec, SR, 07.09.2015 – 11.09.2015.*

GOJDA, Jan; PATKOVÁ, Jana; JÁČEK, Martin; MATĚJČKOVÁ, Jana; TŮMA, Petr; KRAML, Pavel; TRNKA, Jan; ANDĚL, Michal: Vegani mají vyšší citlivost k inzulinu při stejném množství svalových lipidů a mitochondriální aerobní kapacitě než jejich protějšky stravující se bez omezení. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2013, 16 (Suppl. 1): 25. ISSN 1211-9326. *Konference: 49. diabetologické dny, Luhačovice, 18.04.2013 -20.04.2013.*

JÁČEK, Martin; MATĚJČKOVÁ, Jana, MÁLEK, Jiří, HESS, Ladislav, SAMCOVÁ, Eva: Stanovení midazolamu v králičí plazmě metodou GC-NPD a HPLC-UV po nazální a konjunktivální aplikaci. *ChemZi* 2013, 9 (1): 145 – 146. ISSN 1336-7242. *Konference: 65. Zjazd chemikov, Tatranské Matliare, SR, 09.09.2013 – 13.09.2013.*