

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**STANOVENÍ SPEKTRA MASTNÝCH KYSELIN  
V MATEŘSKÉM MLÉČE**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové, 2011

Barbora Šmídová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum

Podpis

Chtěla bych poděkovat RNDr. Mgr. Aleně Tiché, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala v průběhu práce. Dále Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. za cenné rady, MUDr. Radomíru Hyšplerovi, Ph.D. a všem pracovníkům Výzkumné laboratoře kliniky gerontologické a metabolické za podporu a pomoc při vypracování praktické části.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Mastné kyseliny.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Klasifikace mastných kyselin .....	3
2.1.1.1. Nasycené mastné kyseliny .....	3
2.1.1.2. Mononenasycené mastné kyseliny.....	4
2.1.1.3. Polynenasycené mastné kyseliny .....	5
2.1.1.4. Konjugované mastné kyseliny .....	6
2.1.2. Biologický význam mastných kyselin .....	7
2.1.3. Mastné kyseliny omega-3 a omega-6 .....	8
2.1.4. Metabolismus mastných kyselin.....	9
2.1.4.1. Syntéza mastných kyselin.....	9
2.1.4.2. $\beta$ -oxidace mastných kyselin.....	11
<b>2.2. Mateřské mléko.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Plynová chromatografie .....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Instrumentace v plynové chromatografii .....	16
2.3.1.1. Mobilní fáze.....	17
2.3.1.2. Dávkovací zařízení .....	17
2.3.1.3. Kolony .....	17
2.3.1.4. Detekční zařízení .....	18
2.3.2. Vyhodnocení chromatogramu.....	20
2.3.2.1. Kvalitativní vyhodnocení.....	20
2.3.2.2. Kvantitativní vyhodnocení.....	20
2.3.3. Derivatizace v plynové chromatografii.....	21
<b>2.4. Chromatografické stanovení celkových mastných kyselin .....</b>	<b>22</b>
<b>3. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>24</b>

<b>4. METODIKA A MATERIÁL .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Protokol studie .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Přístroje a pomůcky.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Chemikálie.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Příprava vzorků k analýze .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5. Analytický postup .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6. Chromatografické podmínky.....</b>	<b>27</b>
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Přesnost stanovení celkových mastných kyselin .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2. Výsledky vlastní analýzy mastných kyselin v mateřském mléce.....</b>	<b>36</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
<b>7. ZÁVĚRY.....</b>	<b>47</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>48</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>49</b>
<b>10. PŘÍLOHY.....</b>	<b>52</b>

# 1. ÚVOD

Množství tuků přijímaných potravou se v současné době vlivem životního stylu dlouhodobě zvyšuje. Tuky však tvoří nedílnou součást potravy. Mají pro organismus různý význam, ne všechny jsou příčinou kardiovaskulárních onemocnění. Důležité není pouze snížit jejich obsah, ale také sledovat zastoupení jednotlivých mastných kyselin (MK) v potravě. Mezi ty s negativním působením na organismus patří nasycené MK, jejich příjem je třeba omezit. Význam nenasycených MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 je především účinek vazodilatační, protizánětlivý a dále také snižují cholesterol.

V případě potřeby si je lidské tělo schopno většinu MK syntetizovat. To však neplatí pro MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6, které jsou esenciální a tělo je musí přijímat v dietě. Důležitý je především optimální příjem MK  $\omega$ -3, které by měly být v dostatečné míře obsaženy již v první přijímané potravě, tj. v mateřském mléce, neboť jsou významné pro správný vývoj dítěte. Klíčové jsou zejména kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA), které představují nutné komponenty pro normální vývoj mozku. V případě nedostatečného příjmu těchto MK potravou, dojde velmi rychle k vyčerpání jejich zásob. Deficit EPA a DHA pak může vést k nedostatečnému zásobení dětského organismu.

Předkládaná práce se zabývá zastoupením mastných kyselin v mateřském mléce matek z České republiky. Především je pak řešena otázka hladin EPA a DHA, které jsou pro zdravý vývoj dítěte nezbytné. Zastoupení těchto MK se výrazně liší v jednotlivých zemích dle dietních návyků, především v závislosti na konzumaci ryb.

Celkové MK, včetně těch esterifikovaných, lze stanovit metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí. Vzorek mateřského mléka se před vlastní analýzou derivatizuje transmethylovanou katalyzovanou acetylchloridem a následně extrahuje do toluenu.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 Fakultní nemocnice Hradec Králové.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou organické sloučeniny obsahující jednu karboxylovou skupinu, jejich skelet je tvořen uhlíkovým řetězcem o délce 2 až 36 atomů.

MK představují podstatnou složku lipidů, které spolu s bílkovinami a sacharidy představují základní stavební kameny živé hmoty. Dále se vyskytují v podobě vyšších organizovaných struktur, jako jsou například plazmatické membrány či lipoproteiny. V malém množství se MK vyskytují i v neesterifikované formě jako tzv. volné MK, především v krevní plazmě vázané na albumin (TVRZICKÁ a kol. 2009).

U vyšších živočichů a rostlin dominují převážně MK se 16 a 18 uhlíkovými atomy, především se jedná o kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou. Kyseliny, které mají řetězec kratší než 14 a delší než 22 uhlíkových atomů představují jen minoritní část. Většina MK obsahuje sudý počet atomů uhlíku, což je způsobeno syntézou z dvouuhlíkatých jednotek. Přibližně polovina MK je nenasycených, tělo si je neumí syntetizovat samo a je nutné je dodávat ve stravě (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Kromě triviálních názvů se v názvosloví MK užívá i označení číslicemi a řeckými písmeny, tzn.  $x: y$ , kdy  $x$  udává počet uhlíků a  $y$  počet dvojných vazeb. U nenasycených MK se vyznačuje i poloha dvojných vazeb. Polohu dvojně vazby lze označit buď od uhlíku karboxylové skupiny, kdy použijeme řecké písmeno  $\Delta$  (delta), za kterým následuje číslice označující uhlík, ze kterého dvojná vazba vychází, nebo lze vycházet z druhého konce, od krajní methylové skupiny, a použijeme řecké písmeno  $\omega$  (omega). Podle označení polohy první dvojně vazby rozeznáváme MK třídy  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 a  $\omega$ -9 (KRAML 2008).

Velmi často diskutovanou oblastí v rámci výživy je stálá vysoká spotřeba tuků, ale zároveň nedostatečný příjem nenasycených MK, především  $\omega$ -3 (MOUREK a kol. 2009).

## 2.1.1. Klasifikace mastných kyselin

MK se dělí dle struktury na nasycené, které neobsahují žádnou dvojnou vazbu, a nenasycené, které ve své molekule dvojnou vazbu obsahují. Ty se dále dělí na mononenasyčené, které obsahují jednu dvojnou vazbu a polynenasycené, které dvojných vazeb obsahují více. Dále se dělí do několika skupin podle jejich biologických účinků a fyziologické úlohy v organismu.

### 2.1.1.1. Nasycené mastné kyseliny

Nasycené MK dělíme do několika podskupin na základě délky uhlíkového řetězce.

- a) Mezi *MK s krátkým řetězcem* (SCFA, short-chain fatty acids) řadíme kyseliny s délkou řetězce do 6 uhlíkových atomů. Hlavními zástupci jsou kyselina octová (2:0), propionová (3:0) a máselná (4:0). Tyto kyseliny vznikají v proximální části tlustého střeva během fermentace vlákniny. Jsou rychle absorbovány, kyselina octová a částečně i propionová jsou navíc resorbovány portální cirkulací, transportovány do jater a tam metabolizovány na MK a glukózu (TVRZICKÁ a kol. 2009).
- b) *MK se středním řetězcem* (MCFA, medium-chain fatty acids) jsou kyselina kapronová (6:0), kaprylová (8:0) a kaprinová (10:0). Tyto MK jsou přímo resorbovány a transportovány portální žilou. K intramitochondriálnímu přenosu těchto MK není potřeba přítomnost karnitinu ani karnitin-palmitoyl transferázy (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Jejich zdrojem v potravě je olej z kokosového ořechu a palmového jádra. Tukové emulze obsahující MCFA a triacylglyceroly se využívají jako nutriční podpora. Důvodem je vysoká stabilita vůči lipoperoxidaci a jejich krátký poločas rozpadu (TVRZICKÁ a kol. 2009).



- c) Mezi *MK s dlouhým řetězcem* (LCFA, long-chain fatty acids) patří kyselina laurová (12:0), myristová (14:0), palmitová (16:0) a stearová (18:0). Představují 80-90% všech nasycených MK přijímaných potravou. Tyto kyseliny mají vysoký aterogenní a trombogenní účinek (GERMAN & DILLARD 2010, TVRZICKÁ a kol. 2009).

Jejich zdrojem v potravě je především vepřové sádlo, máslo a hovězí lůj. Pravidelná konzumace LCFA zvyšuje hladinu cholesterolu a tím zvyšuje riziko kardiovaskulárních chorob, především ischemické choroby srdeční (GERMAN & DILLARD 2010, TVRZICKÁ a kol. 2009).

- d) *MK s velmi dlouhým řetězcem* (VLCFA, very long-chain fatty acids) zahrnují kyselinu arachovou (20:0), behenovou (22:0), lignocerovou (24:0), cerotovou (26:0), metanovou (28:0) a melissovou (30:0). Jsou obsaženy v krevním séru osob s vrozenými metabolickými poruchami, mezi které patří např. Refsumova choroba, Menkesova choroba či Zellwegerův syndrom. K léčbě těchto poruch mohou být využity mononenasyčené MK (např. Lorenzův olej), (TVRZICKÁ a kol. 2009).

### 2.1.1.2. Mononenasyčené mastné kyseliny

Mononenasyčené MK rozlišujeme podle konfigurace dvojné vazby na *cis* a *trans*.

- a) Hlavními zástupci MK v *cis* konfiguraci jsou kyselina olejová (18:1  $\omega$ -9) a palmitolejová (16:1  $\omega$ -7). Dalšími zástupci MK endogenního původu jsou v minoritním množství i kyselina myristolejová (14:1  $\omega$ -5), gondoová (20:1  $\omega$ -9), eruková (22:1  $\omega$ -9) a nervonová (24:1  $\omega$ -9c). Zástupci mononenasyčených MK exogenního původu jsou kyseliny gadolová (20:1  $\omega$ -11), eruková a cetolová (22:1  $\omega$ -11), (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Kyselina olejová ze stravy má antiaterogenní i antitrombotické účinky, tzn., že zvyšuje poměr HDL-C/LDL-C (cholesterol v lipoproteinu o vysoké hustotě/cholesterol v lipoproteinu o nízké hustotě) a snižuje agregabilitu destiček. Zabudování kyseliny olejové do plazmatických lipidů zvyšuje jejich odolnost vůči lipoperoxidaci. Kyselina olejová je nejhojněji zastoupenou kyselinou olivového

oleje, kultivovaného řepkového oleje, oleje z lískových ořechů a sladkých mandlí. Kyselina eruková je považována za kardiotoxickou, najdeme ji v oleji nekultivované řepky olejné (TVRZICKÁ a kol. 2009).

- b) Hlavními zástupci MK v *trans* konfiguraci jsou kyseliny elaidová (18:1  $\omega$ -9) a trans-vakcenová (18:1  $\omega$ -7). Pro lidský organismus jsou *trans*-MK exogenními kyselinami s vyšším aterogenním účinkem než je u nasycených MK. Zároveň jsou asi dvakrát účinnější pro vzrůst LDL-C a snížení HDL-C než nasycené MK (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Exogenním zdrojem kyseliny elaidové jsou převážně margaríny a ztužené pokrmové tuky. Kyselina trans-vakcenová je obsažena v mléčných výrobcích (TVRZICKÁ a kol. 2009).

### 2.1.1.3. Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené MK (PUFA, polyunsaturated fatty acids) obsahují v molekule 2 a více dvojných vazeb. PUFA exogenního původu dělíme do dvou skupin:  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6. Mají výrazný antitrombotický a antiaterogenní účinek, který je způsoben jejich souhrnným působením na fluiditu membrán, koncentrace lipoproteinů, funkci enzymů membrán a receptorů, metabolismus minerálů a regulaci krevního tlaku. Negativní stránkou vyššího počtu dvojných vazeb v molekule je zvyšující se možnost lipoperoxidace (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Endogenní PUFA jsou řady  $\omega$ -9 a jsou syntetizovány při nedostatku esenciálních PUFA ( $\omega$ -3 a  $\omega$ -6), (TVRZICKÁ a kol. 2009).

#### a) Polynenasycené MK řady $\omega$ -6

Základní kyselinou je kyselina linolová (LA; 18:2  $\omega$ -6), jejími hlavními metabolickými produkty jsou kyselina  $\gamma$ -linolenová (18:3  $\omega$ -6), dihomogamma-linolenová (20:3  $\omega$ -6) a arachidonová (AA; 20:4  $\omega$ -6). V minoritním množství jsou zde zastoupeny i kyselina adrenová (22:4  $\omega$ -6) a dokosapentaenová (22:5  $\omega$ -6). Vysoký obsah PUFA  $\omega$ -6 (> 60%) nalezneme v sojovém a slunečnicovém oleji, dále v oleji z hroznových jadérek, máku setého a černého rybízu. O něco nižší obsah (40-

50%) se nachází v oleji z vlašských ořechů, pšeničných klíčků, kukuřice a semen sezamu (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Metabolický účinek PUFA  $\omega$ -6 se vyznačuje především zvýšenou syntézou cholesterolu, vyšší aktivitou LDL-receptorů a sníženou přeměnou VLDL na LDL (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Kyselina arachidonová je hlavním prekurzorem eikosanoidů, což jsou účinné signální molekuly. Řadíme mezi ně prostaglandiny a leukotrieny (TVRZICKÁ a kol. 2009).

#### **b) Polynenasycené MK řady $\omega$ -3**

Mateřskou kyselinou je kyselina  $\alpha$ -linolenová (ALA; 18:3  $\omega$ -3). Její hlavní metabolické produkty jsou kyselina eikosapentaenová (timnodonová, EPA, 20:5  $\omega$ -3) a dokosaheptaenová (klupadonová, DHA, 22:6  $\omega$ -3), v minoritním množství pak kyselina dokosapentaenová (22:5  $\omega$ -3). Kyselinu  $\alpha$ -linolenovou nalezneme v sojových bobech, lněném semenu, černém rybízu a brutnáku (TVRZICKÁ a kol. 2009).

MK  $\omega$ -3, především DHA, jsou ve vysokém podílu součástí nervové tkáně a sítnice, kde zajišťují správnou funkci těchto orgánů. Dále mají podstatný význam v signálové transdukci, pravděpodobně regulují signalizaci G-proteinu (TVRZICKÁ a kol. 2009).

#### **2.1.1.4. Konjugované mastné kyseliny**

MK s konjugovaným systémem dvojných vazeb jsou v největší míře zastoupeny izomery LA. Konjugované MK jsou obsaženy převážně v červeném mase a mléčných produktech. Nejčastěji se vyskytujícím izomerem je kyselina rumenová, izomer *cis* 9, *trans* 11 CLA (RA), který vzniká desaturací kyseliny *trans*-vakcenové (18:1 *trans* 11). Ostatní izomery se vyskytují jen v minoritním množství. Vyšší hladiny CLA mohou redukovat lipogenezi a zvýšit lipolýzu v tukové tkáni (TVRZICKÁ a kol. 2009).

### 2.1.2. Biologický význam mastných kyselin

Mastné kyseliny představují podstatnou složku lipidů, dále jsou součástí plazmatických membrán a lipoproteinů. Jednoduché lipidy jsou tvořeny estery MK a alkoholů, patří mezi ně např. cholesterol, glycerol a sfingosin (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Lipidy se v krvi transportují v podobě **lipoproteinů**, tedy navázané na příslušný apoprotein. Lipoproteiny se skládají z nepolárního jádra (estery cholesterolu a triacylglyceroly) a polárního obalu (fosfatidylcholin, sfingomyelin a volný cholesterol). Přítomnost MK v lipoproteinech zajišťuje možnost atero- či antiaterogenního působení (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Estery cholesterolu (CE) představují v organismu zásobní a transportní formu cholesterolu. Nejvíce zastoupenou kyselinou v transportních CE je kyselina linolová (cca 50%), která je následována kyselinou olejovou (18%), palmitovou (15%) a arachidonovou (7%), (TVRZICKÁ a kol. 2009).

Triacylglyceroly (TAG) jsou majoritní složkou jader chylomikronů a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Nejhojněji zastoupenou MK v TAG je kyselina olejová (40%), palmitová (22%) a linolová (20%). MK slouží v TAG tukové tkáni jako zdroj energie a izolátor (TVRZICKÁ a kol. 2009).

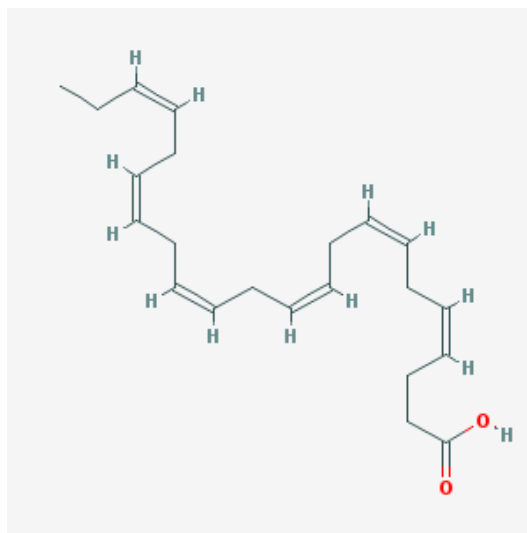
Nejdůležitější funkcí **membránových lipidů** je zajištění fluidity membrán. Mezi hlavní fosfolipidy plazmatických membrán patří fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a sfingomyelin. Minoritní část pak tvoří fosfatidylserin, fosfatidylinositol, lyzofosfatidylcholin a lyzofosfatidylethanolamin. Zastoupení MK v jednotlivých lipidových třídách má výrazný vliv na fluiditu membrán. Významnou složkou membránových lipidů jsou i kyselina palmitová a vysoký obsah PUFA. PUFA odštěpené z fosfolipidů jsou zdrojem pro syntézu eikosanoidů, dále jsou důležitými ligandy receptorů, účastní se transkripce genů a hrají roli v přenosu signálů. Zastoupení fosfolipidů a jejich MK je charakteristické pro každý živočišný druh i pro jednotlivé tkáně (TVRZICKÁ a kol. 2009).

**Neesterifikované MK** (NEFA) neboli tzv. volné MK jsou vázány na plazmatický albumin. Tyto MK vznikají jako produkty lipolýzy a zároveň slouží jako zdroj pro syntézu lipidů. V plazmě jsou přítomny pouze ve velmi nízkých koncentracích. NEFA mohou být oxidovány, reesterifikovány, nebo mohou podléhat elongaci či desaturaci. Zvýšené hladiny NEFA mají toxický účinek na plazmatické membrány, což může vyvolávat arytmie, protrombogenní účinky a jiné (TVRZICKÁ a kol. 2009).

### 2.1.3. Mastné kyseliny omega-3 a omega-6

Polynenasycené MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 jsou esenciální kyseliny. Lidé ani ostatní savci je neumí syntetizovat v těle a musí je získávat z potravy. MK  $\omega$ -6 jsou zastoupeny LA, MK  $\omega$ -3 ALA. Obě tyto esenciální MK jsou metabolizovány na MK s dlouhým řetězcem o 20 a 22 uhlících. LA je metabolizována na AA, ALA na EPA a DHA (SIMOPOULOS 2002).

Lidé a ostatní savci s výjimkou masožravců jako jsou lvi, mohou přeměňovat LA na AA a ALA na EPA a DHA, ale tento proces je pomalý. Nastává soutěž mezi MK  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 o desaturační enzymy. Nicméně desaturasy  $\Delta$ -4 a  $\Delta$ -6 upřednostňují MK  $\omega$ -3 před  $\omega$ -6. Ale vysoký příjem LA ztěžuje desaturaci a elongaci ALA. Trans MK zasahují do desaturace a elongace obou, LA i ALA (SIMOPOULOS 2002).



**Obr. 1.** Kyselina dokosaheptaenová

Převzato z: web National center for biotechnology information

LA, ALA a jejich deriváty s dlouhým řetězcem jsou důležité složky buněčných membrán zvířat i rostlin. ALA se nachází v TAG, esterech cholesterolu a ve velmi malém množství i ve fosfolipidech. EPA se vyskytuje v esterech cholesterolu, TAG a fosfolipidech. DHA můžeme nalézt především ve fosfolipidech. U savců včetně člověka jsou na DHA bohaté zejména mozková kůra, sítnice, varlata a spermie. DHA je jedna z nejhojnějších komponent strukturálních lipidů mozku (SIMOPOULOS 2002).

Buňky savců nemohou přeměňovat MK  $\omega$ -6 na  $\omega$ -3, protože mají nedostatek konvertujícího enzymu  $\omega$ -3 desaturasy. MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 jsou metabolicky a funkčně rozdílné a jejich důležité fyziologické funkce jsou často protichůdné. Složení MK v buněčných membránách je do značné míry závislé na příjmu potravy. AA a EPA jsou základní sloučeniny pro produkci eikosanoidů (SIMOPOULOS 2002).

V šedé hmotě CNS je vysoké zastoupení PUFA. Dieta chudá na MK  $\omega$ -3 vede poměrně rychle k depleci těchto kyselin v mozkové kůře. Crawford spolu s Harbigem (1988) vyslovili jasnou představu o tom, že MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 o dlouhém řetězci, především EPA a DHA, představují nutné komponenty pro normální vývoj mozku. Nedostatek esenciálních MK především během maturace CNS vede nepochybně k retardaci tohoto procesu. Vzájemný poměr v membránách obou řad nenasycených MK ( $\omega$ -6 i  $\omega$ -3) a pravděpodobně i jednotlivých MK (AA, EPA, DHA) je zřejmě důležitý pro správnou funkční aktivitu nervových elementů. Absence nebo i pouhá deplece těchto kyselin představuje riziko poškození daných orgánů a struktur s možnými následnými vážnými dopady na kvalitu života (MOUREK 2009).

## **2.1.4. Metabolismus mastných kyselin**

### **2.1.4.1. Syntéza mastných kyselin**

Biosyntéza mastných kyselin probíhá v játrech, tukové tkáni, laktující mléčné žláze a v menší míře i v ledvinách, mozku a plicích. Na úrovni buňky probíhá syntéza MK pouze v cytosolu. Biosyntéza MK je sérií probíhajících reakcí, při kterých se uhlíková kostra MK prodlouží vždy o 2 uhlíky, které pocházejí z acetyl-CoA. Acetyl-CoA je zároveň i molekula stojící na počátku syntézy MK, vzniká převážně v cytoplazmě jako produkt glykolýzy,

substrátem této reakce je glukóza. Další způsoby tvorby acetyl-CoA jsou degradace MK, ketolátek či uhlíkatých zbytků aminokyselin (KRAML 2008).

Úvodním a zároveň regulačním krokem syntézy MK je karboxylace acetyl-CoA na malonyl-CoA, při reakci je spotřebována jedna molekula ATP a katalyzátorem je enzym acetyl-CoA-karboxylasa. Poté se účastní reakce multienzymový komplex syntasy MK, tzv. FAS (fatty acid synthasa), který se skládá ze dvou podjednotek. Aktivní je pouze dimer. Každá podjednotka je tvořena sedmi různými enzymy, které katalyzují jednotlivé kroky syntézy, a acyl carrier proteinem (ACP). ACP je protein o 77 aminokyselinách, důležitý pro přenos acylových zbytků. ACP obsahuje důležité thiolové (-SH) skupiny, na které jsou vázány intermediáty syntézy MK. Vlastní syntéza MK probíhá v sedmi cyklech za vzniku palmitátu, ze kterého pak dále vznikají ostatní MK. Syntéza probíhá v těchto krocích:

1. Vazba acetyl-CoA a malonyl-CoA na FAS. Prvním krokem je navázání iniciační molekuly acetyl-CoA na ACP-SH, reakci katalyzuje acetyltransacylase.
2. Kondenzace acetyl-CoA a malonyl-CoA za vzniku acetacetyl-ACP, reakci katalyzuje  $\beta$ -ketoacylsynthasa.
3. Redukce ketoacylové skupiny na  $\beta$ -uhlíku pomocí  $\beta$ -ketoacylreduktasy, následná dehydratace enzymem  $\beta$ -hydroxyacyldehydratasou a opět redukce, tentokrát katalyzovaná enoylreduktasou. Koenzymem v obou redukcích je NADPH, který je produktem pentosafosfátové cesty.
4. Přesun acylového zbytku na vedlejší -SH skupinu cysteinu kondenzačního enzymu  $\beta$ -ketoacylsynthasy.
5. Vazba nového malonyl-CoA.

Opakováním kroků 2-5, celkem v sedmi cyklech, postupně dochází k prodlužování acylového řetězce vždy o dva uhlíky až do vzniku kyseliny palmitové, která je konečným produktem sledu těchto reakcí (KRAML 2008).

K tvorbě dalších MK s vyšším počtem uhlíků je potřeba tzv. mikrosomální systém neboli elongasa, který se nachází v endoplazmatickém retikulu. Má podobnou funkci jako

FAS, prodlužuje acyl-CoA o dva uhlíky pomocí malonyl-CoA. Dalším možným místem, kde dochází k prodlužování MK, jsou mitochondrie. Zde reakce probíhají v podstatě obráceným sledem než  $\beta$ -oxidace. Substrátem je acetyl-CoA (KRAML 2008, LEDVINA a kol. 2009).

Tvorba nenasycených MK probíhá v játrech v hladkém endoplazmatickém retikulu pomocí enzymů desaturas. Jde o řetěz enzymatických reakcí, který umožňuje transport páru elektronů. Rozlišujeme několik desaturas, které se liší polohou vytvářené dvojné vazby. U savců může být dvojná vazba vložena pomocí desaturas na uhlík  $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  a  $\Delta 9$ . Lidský organismus není schopný vytvořit osmnáctiuhlíkaté polynenasycené MK, protože tvorba dvojné vazby končí u devátého uhlíku. Takovéto MK musí být dodávány ve stravě. Mezi polynenasycené MK nezbytné pro organismus, které musíme přijímat v dietě, patří kyselina linolová a  $\alpha$ -linolenová (KRAML 2008, LEDVINA a kol. 2009).

#### **2.1.4.2. $\beta$ -oxidace mastných kyselin**

$\beta$ -oxidace je proces degradace MK. Jedná se o opakující se sled reakcí, jehož následkem je zkracování uhlíkového řetězce pokaždé o dva uhlíky. Uhlíky se odštěpují v podobě acetyl-CoA.  $\beta$ -oxidace se tento katabolický biochemický proces nazývá proto, že k oxidaci dochází vždy na  $\beta$ -uhlíku (C3) acylu MK.  $\beta$ -oxidace MK je podobná jejich syntéze, jen probíhá v obráceném pořadí (LEDVINA a kol. 2009).

Předtím, než jsou MK katabolizovány, musí být nejdříve aktivovány acyl-CoA-synthetasou, která je přítomna v endoplazmatickém retikulu a ve vnější mitochondriální membráně. Aktivace MK je dvoufázový děj. První reakce probíhá za přítomnosti ATP a produktem je acyladenylát. Druhým krokem aktivace je výměna AMP za koenzym A, a tím dochází k tvorbě konečného produktu aktivace MK, kterým je makroergní sloučenina acyl-S-CoA (KRAML 2008, LEDVINA a kol. 2009).

Po aktivaci MK, která probíhá v cytosolu, následuje transport do matrix mitochondrie, kde probíhá vlastní  $\beta$ -oxidace. Pro MK s kratším acylovým řetězcem (do 12 C) je membrána mitochondrie propustná přímo. To však neplatí pro MK s dlouhým řetězcem, pro které je membrána nepropustná. Je nutné nejdříve MK převést na deriváty karnitinu, tzv. acylkarnitiny. Po průchodu membránou se karnitin, který v reakci působí



pouze jako specifický přenašeč, odštěpí a MK se vrátí do původní podoby, kterou měla před transportem (KRAML 2008, LEDVINA a kol. 2009).

Oxidace nasycených MK se sudým počtem uhlíků začíná dehydrogenací a tvorbou dvojně vazby mezi  $\alpha$  a  $\beta$  uhlíkem na acyl-CoA, enzymem katalyzujícím tuto reakci je acyl-CoA-dehydrogenasa. Následným krokem je hydratace pomocí enoyl-CoA-hydratasy, při které dochází k adici molekuly vody na vzniklou dvojnou vazbu za tvorby produktu  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA. Ten podléhá další oxidaci, kterou katalyzuje  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa. Při této reakci se hydroxylová skupina na  $\beta$ -uhlíku přemění na ketoskupinu a vznikne příslušný  $\beta$ -ketoacyl-CoA. Konečným krokem je rozštěpení  $\beta$ -ketoacyl-CoA účinkem thiolasy na acetyl-CoA a acyl-CoA, který bude kratší o 2 atomy uhlíku. Takto vzniklý acyl-CoA opět vstupuje do  $\beta$ -oxidace a celý proces se opakuje až do té doby, dokud není MK kompletně oxidována na poslední 2 molekuly acetyl-CoA (KRAML 2008).

Oxidace MK s lichým počtem uhlíků probíhá totožně jako v případě MK se sudým počtem uhlíků, ale s tím rozdílem, že při závěrečném cyklu vzniká 1 molekula acetyl-CoA a 1 propionyl-CoA, místo 2 molekul acetyl-CoA. Tato  $\beta$ -oxidace má pro člověka jen malý význam (KRAML 2008).

Oxidace nenasyčených MK je o něco složitější. Téměř všechny nenasyčené MK obsahují dvojně vazby cis, které jsou překážkou v dalším zpracování. Důležitým krokem je zde tedy izomerace, převod dvojných vazeb v cis konfiguraci na trans, pomocí specifické isomerasy a následná redukce. Dále už reakce probíhá stejně jako u nasycených řetězců, a to až do doby, než dorazí k místu další dvojně vazby (LEDVINA a kol. 2009).

B-oxidace MK, které jsou delší než 18 uhlíku, probíhá v peroxisomu. Dlouhé acyly se zde zkrátí a následně přesunou do mitochondrie, kde pokračuje katabolismus již klasickým způsobem (LEDVINA a kol. 2009).

Energetický výtěžek  $\beta$ -oxidace MK je velmi vysoký. První redoxní reakce produkuje  $\text{FADH}_2$ , který nám následně poskytne 2ATP, druhá reakce vytváří  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , ten poskytne dokonce 3ATP. Zisk na jednu otočku  $\beta$ -oxidace je tedy 5ATP. Ale ve skutečnosti je celkový zisk z vyšších MK ještě vyšší, než je násobek pěti ATP připadající na jednu otočku. Z řetězce MK totiž vznikají i molekuly acetyl-CoA, které oxidací v citrátovém cyklu produkují 10 ATP (LEDVINA a kol. 2009).

## 2.2. Mateřské mléko

Mateřské mléko (MM) je nejhodnotnější výživou pro novorozence a kojence v plném rozsahu. Představuje jeden z nejdokonalejších zdrojů bioaktivních a imunoaktivních látek přírodního původu. Podílí se na správné funkci, výstavbě a posílení imunitního systému, tím snižuje riziko vzniku viróz, bakteriálních infekcí a alergií. Tvorba MM začíná v posledních týdnech před porodem a v prvních dnech po něm, je ovlivňována hormonem prolaktinem, jeho uvolňování z prsní žlázy pak ovlivňuje oxytocin. Pro správný vývoj dítěte je doporučováno kojení po dobu minimálně půl roku od narození, žádná umělá výživa nemůže plně nahradit kvalitu MM a její proměnlivost závislou na potřebách dítěte. Pro novorozence je také velmi dobře stravitelné, díky enzymu lipáze, který je v něm obsažen (DOČKALOVÁ 2005: web ordinace; MYSLIVEČEK a TROJAN 2004).

Velký význam má MM především brzy po porodu, kdy bývá označováno jako mlezivo neboli kolostrum, jedná se o hustý žlutý sekret mléčných žláz, který předchází tvorbě MM. Kolostrum se od zralého mléka odlišuje složením, obsahuje více bílkovin a solí, zato méně tuků a sacharidů. Celou čtvrtinu bílkovin kolostra tvoří obranné látky, jako jsou sekreční imunoglobulin A, lysozym nebo laktoferin (DOČKALOVÁ 2005: web ordinace; ŽÁDNÍKOVÁ 1997: web přírodovědecký časopis vesmír).

Složení mléka se mění a přizpůsobuje v závislosti na frekvenci a délce kojení (Tab. 1.). Syrovátková bílkovina tvoří 60-80% zralého MM, zbývající proteinovou část tvoří kasein, který má schopnost transportovat vápník (BUKÁČKOVÁ: web agape).

Laktóza v MM může za sladkou chuť, je jí zde obsaženo dvakrát tolik než v mléce kravském. Další cukernou složkou jsou oligosacharidy, které mají příznivý vliv na zamezení infekčních onemocnění a zároveň ovlivňují složení střevní mikroflóry (BUKÁČKOVÁ: web agape).

Tuky tvoří v MM složku proměnlivou, jsou závislé na stravovacích návycích matky a jsou považovány za nejdůležitější živinu v MM. Hlavní část tuků je tvořena polynenasycenými mastnými kyselinami, které jsou důležitými faktory pro správný rozvoj mozku a zraku. Nedostatečný příjem PUFA v raném stádiu života může v dospělosti způsobit kardiovaskulární onemocnění nebo onemocnění CNS. Kromě PUFA je další

lipidovou složkou cholesterol, nemusí tedy docházet k syntéze cholesterolu organismem novorozence a tím jsou šetřena jeho játra. Za energetickou složku lze považovat především triacylglyceroly a saturevané MK o kratším či středním řetězci (web *AskDrSears*; BUKÁČKOVÁ: web agape; MOUREK a kol. 2009).

Další složkou jsou vitamíny a stopové prvky, dítě je schopno zcela je využít. Jedinými vitamíny, které nejsou v MM obsaženy, jsou vitamin D a vitamin K (BUKÁČKOVÁ: web agape; DOČKALOVÁ 2005: web ordinace).

**Tab. 1.** Složení mateřského mléka v různých fázích kojení.

Průměr	15. den - 15. měsíc	6. den - 10. den	do 5. dne (Kolostrum)	Jednotky
Energie	747	735	671	kcal/L
pH	7,01		7,29	
Voda	897			g/L
Suchá hmota	129	133	128	g/L
Popel	2,02	2,67	3,08	g/L
Proteiny	10,6	15,9	22,9	g/L
Aminokyseliny	12,8	9,4	12	g/L
Laktóza	71	64	57	g/L
Tuky	45,4	35,2	29,5	g/L
Cholesterol	139	241	280	mg/L

Převzato z: LENTER, 1984

Tabulka ilustruje zastoupení jednotlivých složek mateřského mléka a charakterizuje jeho vlastnosti v různých fázích laktace.

## 2.3. Plynová chromatografie

Chromatografické metody jsou jedny z nejvýznamnějších analytických separačních metod. Charakteristickým jevem chromatografických metod je postupné, mnohonásobně opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma fázemi. Jednou fází je fáze stacionární, která je nepohyblivá a je tvořena částicemi tuhé látky umístěnými v koloně nebo je zakotvena na vnitřním povrchu kapiláry. Druhá fáze je pohyblivá, nazýváme ji mobilní. Tato fáze unáší separované látky vrstvou stacionární fáze. Při styku mobilní i stacionární fáze se separovanými látkami dochází k vzájemným interakcím. Doba, po kterou separovaná látka setrvává v koloně, závisí na velikosti interakcí a určuje pořadí, v jakém jednotlivé složky směsi vychází z kolony ven. Mezi nejčastěji užívané chromatografické metody patří chromatografie plynová a kapalinová (HOLZBECHER a kol. 1987).

Při plynové chromatografii (GC, Gas Chromatography) jsou separované složky a mobilní fáze v plynném stavu. Stacionární fází může být buď tuhá látka (GSC, Gas-Solid Chromatography) nebo kapalina zakotvená na nosiči (GLC, Gas-Liquid Chromatography). Plynová chromatografie umožňuje identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i látek kapalných nebo tuhých, které lze bez rozkladu převést do plynného stavu při teplotě do 400 C°. Aby mohly být látky separovány pomocí GC, je podmínkou jejich těkavost a tepelná stabilita. Pro látky, které jsou málo těkavé, se využívá derivatizace, kdy se analyzované složky převedou na těkavé deriváty, které již je možné stanovovat pomocí GC. Hlavními výhodami této metody je vysoká citlivost, jednoduchost, velmi vysoká separační účinnost a rozsáhlé aplikační možnosti (HOLZBECHER a kol. 1987, SMOLKOVÁ a FELTL 1991).



**Obr. 2.** Plynový chromatograf Výzkumné laboratoře kliniky gerontologické a metabolické, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

### 2.3.1. Instrumentace v plynové chromatografii

Mezi nejpodstatnější části přístroje plynového chromatografu patří:

- zdroj a regulace mobilní fáze,
- dávkovací zařízení,
- kolona,
- detekční zařízení,
- termostat,
- registrační a vyhodnocovací systém.

Před separací a vlastním stanovením každé dělené směsi je nutná optimalizace systému a volba správných chromatografických podmínek. Pro úspěšnou analýzu je rozhodující především volba vhodné chromatografické kolony a detektoru (SMOLKOVÁ a FELTL 1991).

### 2.3.1.1. Mobilní fáze

Mobilní fází v plynové chromatografii je nosný plyn. Měl by mít takové vlastnosti, které se co nejvíce blíží ideálnímu plynu. Zdrojem nosného plynu jsou nejčastěji tlakové lahve naplněné dusíkem, vodíkem, argonem či heliem. Je nutné udržovat čistotu těchto plynů a zbavovat je vodních par. Dalším kritériem pro správnou analýzu je zajištění definovaného průtoku nosného plynu regulací. Průtokovou rychlost nosného plynu lze měřit buď na vstupu do kolony před dávkovacím zařízením, nebo na výstupu kolony za detektorem. Nejčastěji se měří pomocí rotametrů nebo mýdlových průtokoměrů (SMOLKOVÁ a kol. 1983).

### 2.3.1.2. Dávkovací zařízení

Volba dávkovacího zařízení je dána jak typem použité kolony, tak vlastnostmi analyzované látky a účelem analýzy. V současné době se nejčastěji používají injektory nebo různé typy dávkovacích kohoutů. Pro sériové analýzy je vhodné použít automatická dávkovací zařízení. V případě zavádění kapalných vzorků do systému GC je třeba dbát na jeho okamžité zplynění a rychlé zavedení par do kolony. Proto je nutné, aby byl dávkovač vyhříván (SMOLKOVÁ a kol. 1983).

### 2.3.1.3. Kolony

V plynové chromatografii rozlišujeme dva základní typy kolon, jsou jimi kolony náplňové a kolony kapilární. Tyto kolony se od sebe liší především jejich permeabilitou. U náplňových kolon závisí permeabilita na velikosti částic náplně, zatímco u kapilárních je funkcí vnitřního průměru kapiláry a řádově je 100 až 1000 krát větší.

- *Náplňové kolony* tvoří trubice, které jsou nejčastěji skleněné či nerezové. Vlastní náplň může být buď povrchově aktivní adsorbent (GSC) nebo nosič pokrytý kapalnou stacionární fází (GLC). Jako adsorbent se nejčastěji používá aktivní uhlík nebo silikagel. Délka kolon bývá od desítek centimetrů až po několik metrů, vnitřní průměr je nejčastěji od 3 do 8 mm.

- *Kapilární kolony* jsou kapiláry tvořené z nerezové oceli nebo skla, v poslední době našly uplatnění i kapiláry křemenné. Funkci nosiče u tohoto typu kolon zastává vnitřní stěna kapiláry, která je pokryta stacionární fází. Požívají se kapiláry o vnitřním průměru 0,16 až 0,26 mm a délce 20 až 200 m. Příprava kapilárních kolon je poměrně složitá, v dnešní době bývají tyto kolony dodávány komerčně přímo od výrobce (HOLZBECHER a kol. 1987, SMOLKOVÁ a kol. 1983).

Rozlišujeme tři základní typy kapilárních kolon, liší se způsobem uložení stacionární fáze. Nejrozšířenější jsou kapilární kolony *WCOT* (Wall Coated Open Tubular), funkci nosiče u nich zastávají vnitřní stěny kapiláry, na kterých je zakotvena stacionární fáze v podobě tenkého filmu. Dalším typem jsou kolony *SCOT* (Support Coated Open Tubular), kdy je na vnitřní stěně kapiláry vrstvička nosiče, na kterém je zakotvena stacionární fáze. Kolony typu *SCOT* mají větší povrch, a tím i větší kapacitu, než kolony *WCOT*. Třetím typem jsou kolony *PLOT* (Porous Layer Open Tubular), u kterých je na vnitřní stěně kapiláry pórovitá vrstva, kterou lze smočit kapalnou stacionární fází (SMOLKOVA a FELTL 1991).

Při výběru vhodné stacionární fáze musíme myslet na to, že sorpce látek je podmíněna silami, kterými na sebe vzájemně působí stacionární fáze a separovaná látka. Stacionární zakotvenou fází tedy vybíráme podle charakteru separovaných složek. Polární látky dělíme na polárních fázích a nepolární na fázích nepolárních (HOLZBECHER a kol. 1987).

#### **2.3.1.4. Detekční zařízení**

Vysoce citlivá a dokonalá detekce je jedním z nejdůležitějších a zároveň nejobtížnějších úkolů chromatografických metod. Základní podmínkou pro vhodnou volbu detektoru je lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci analyzované látky. Funkcí detektoru je převést analytické vlastnosti stanovované látky na hodnoty, které lze registrovat. K detekci složek při plynové chromatografii se nejčastěji využívá ionizace

plamenem, tepelné vodivosti, teploty, hustoty či radioaktivního záření apod. (HOLZBECHER a kol. 1987, SMOLKOVÁ a FELTL 1991).

Mezi nejčastěji používané detektory patří:

- *Plamenový ionizační detektor*
- *Tepelně vodivostní detektor*
- *Detektor elektronového záchytu*
- *Heliový ionizační detektor*
- *Plamenový fotometrický detektor*
- *Hmotnostní spektrometr*

*Plamenový ionizační detektor* (FID, Flame Ionization Detector) patří do skupiny ionizačních detektorů, které jsou dnes nejrozšířenějšími univerzálními i selektivními detekčními systémy. Princip ionizačních detektorů je založen na tom faktu, že elektrická vodivost v plynech je dána počtem nabitých částic, tudíž je úměrná celkovému množství analyzované složky, která přichází do detektoru. Zdrojem ionizovaných částic u FID je plamen. Nosný plyn se po výstupu z kolony vstává do plamene, ve kterém je přítomný vodík, který po zapálení hoří nesvitivým plamenem. Ionty, radikály a elektrony, které se vytvoří spálením složek analytu, umožní průchod elektrického proudu mezi elektrodami. Signálem detektoru je tedy intenzita proudu (HOLZBECHER a kol. 1987).

Vznik iontů probíhá následovně: v redukční zóně plamínku dochází ke krakování a hydrogenaci uhlíkatých látek za vzniku radikálů ( $\text{CH}_3^\bullet$ ,  $\text{CH}_2^\bullet$  a  $\text{CH}^\bullet$ ), energeticky bohatých iontů  $\text{H}^+$  a fragmentů  $\text{OH}$  a  $\text{O}_2\text{H}$ . Mezi vzniklými uhlíkatými radikály a kyslíkatými fragmenty dochází během spalování v oxidační zóně plamínku k exotermické reakci za vzniku dalších radikálů a energie. Uvolněná energie způsobuje ionizaci daných radikálů za vzniku kationtu a elektronu (HOLZBECHER a kol. 1987).

Rozlišujeme několik konstrukčních typů FID detektorů, které se vzájemně liší především tvarem a umístěním elektrod. FID je použitelný zejména k detekci organických látek, je vhodný i pro stopovou analýzu, protože vyniká vysokou citlivostí (HOLZBECHER a kol. 1987).



## 2.3.2. Vyhodnocení chromatogramu

Chromatografickým záznamem je příslušný chromatogram, který představuje závislost odezvy detektoru na čase. Jednotlivé složky analytu jsou v něm v ideálním případě zobrazeny jako oddělené píky. Chromatogram slouží jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní vyhodnocení analýzy (KARLICEK a kol. 2009).

### 2.3.2.1. Kvalitativní vyhodnocení

Základním požadavkem pro úspěšnou kvalitativní analýzu je úplná separace všech složek analytu. Umístění maxima píku při identifikaci látek lze vyjádřit pomocí retenčních dat, kterými jsou retenční čas ( $t_R$ ), což je doba od nástřiku vzorku až po maximum jeho elučního píku, a retenční objem ( $V_R$ ). Hodnoty retenčních dat závisí na mnoha okolnostech, proto nelze retenční čas (či objem) srovnávat s pevnými tabulkovými hodnotami. Využíváme relativních retenčních dat, kdy jsou retence jednotlivých látek srovnávány se standardem, který je buď přímo součástí analyzovaného vzorku, nebo je alespoň analyzován za stejných chromatografických podmínek. Použití standardu a relativní vyjádření retence nám eliminuje chyby vzniklé nepřesným měřením. Relativní retenci lze zjistit přímo z chromatogramu (SMOLKOVÁ a kol. 1976).

Identifikace pomocí retenčních dat však není vhodná pro složité vícesložkové směsi a nelze ji použít univerzálně. Jednoznačnou identifikaci složek směsi lze provést v zařízeních spojujících plynový chromatograf s infračerveným spektrofotometrem nebo hmotnostním spektrometrem (GC-MS), (KARLICEK a kol. 2009, SMOLKOVÁ a kol. 1976).

### 2.3.2.2. Kvantitativní vyhodnocení

Kvantitativní vyhodnocení chromatogramů je založeno na určení plochy, popř. výšky píku, a na zjištění vztahů těchto údajů k množství dané složky v analyzovaném vzorku. Počítačové programy nebo digitální integrátory umožňují automatický záznam

retenčních dat pro přesnou kvantifikaci analýzy (KARLICEK a kol. 2009, SMOLKOVÁ a kol. 1976).

Obsah látky ve vzorku stanovujeme relativně s použitím standardů, a to metodou vnějšího standardu nebo vnitřního standardu (KARLICEK a kol. 2009).

### 2.3.3. Derivatizace v plynové chromatografii

Derivatizace je proces, při kterém se analyzované látky převedou specifickou reakcí za působení různých činidel na příslušné deriváty, které budou mít odlišné fyzikálně – chemické vlastnosti, vhodnější pro analýzu.

V plynové chromatografii má derivatizace velký význam, značně totiž rozšířila její aplikační možnosti. Uplatnění má zejména při analýze netěkavých látek, které by se plynovou chromatografií bez převedení na příslušné deriváty stanovit nedaly. Derivatizace se dále využívá i ke zvýšení tepelné stability látek, citlivosti detekce, zlepšení účinnosti separace a tím i zvýšení přesnosti celé analýzy. Dalším možným využitím derivatizačních reakcí je zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně a tím snížení chvostování píků u látek, které ve své struktuře obsahují karboxylové či hydroxylové skupiny (SMOLKOVÁ a kol. 1976).

Pro různé typy látek byly navrženy různé deriváty. Nejčastěji se používají silylderiváty, acylderiváty, methylderiváty, oximy, hydraziny a kovové cheláty.

- *Silylderiváty*

Trimethylsilylderiváty (TMS) se v chromatografii využívají velmi často. Ve srovnání s ostatními deriváty mají řadu výhod, patří mezi ně rychlá příprava, reprodukovatelnost, jednoduchost a nepřítomnost nežádoucích vedlejších reakcí. TMS deriváty mohou být připraveny z látek, které ve své molekule obsahují aktivní vodík, tj. tyto funkční skupiny: -OH, -COOH, =NH, -NH<sub>2</sub>, -SH. Náhradou aktivního vodíku za TMS skupinu dochází ke snížení polaritě látky a zároveň i možnosti tvorby vodíkových vazeb.

- *Acylderiváty*

Využívají se ke snížení adsorpce amino- a hydroxysloučenin na koloně. Příprava probíhá reakcí s acetanhydridem za přítomnosti pyridinu. Pro zvýšení citlivosti detekce se využívají chloracetáty, trifluoracetáty nebo heptafluorbutyráty.

- *Methylderiváty*

Mezi další velmi rozšířené deriváty v plynové chromatografii patří methylestery a ethery. Methylderiváty se vzhledem ke své stálosti a těkavosti nejvíce využívají při analýze mastných kyselin, polykarboxylových kyselin, hydroxykyselin, sulfonových kyselin atd. (SMOLKOVÁ a kol. 1976).

## **2.4. Chromatografické stanovení celkových mastných kyselin**

Nejčastěji používanou metodou pro analýzu mastných kyselin je plynová chromatografie methylesterů MK s plamenově ionizační detekcí. Analýza mastných kyselin probíhá ve dvou hlavních krocích, těmi jsou: příprava methylesterů MK a vlastní analýza methylesterů MK pomocí GC (SANTHA & NAPOLITANO 1992).

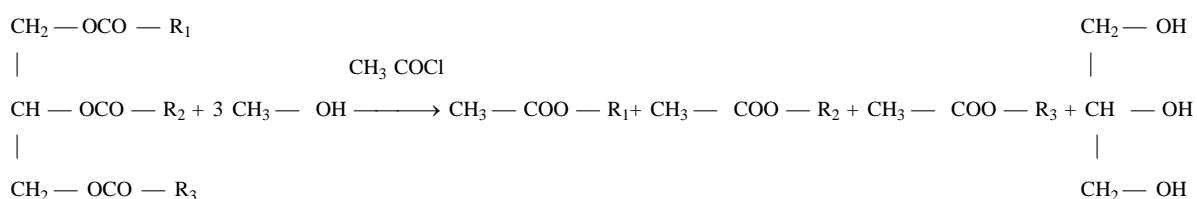
Při derivatizaci MK používáme esterifikační činidla, která konvertují volné MK na jejich estery, nebo transesterifikační činidla, ta převádějí acylglyceroly na methylestery MK (viz reakce str. 23). Neexistuje žádná metoda esterifikace, která by byla univerzální a ideální pro každý derivatizační proces. Proto je k získání přesných kvantitativních výsledků vždy nutné derivatizační krok optimalizovat. Při nevhodně provedené derivatizaci může docházet k takovým komplikacím jako je neúplná konverze MK na jejich methylestery, změna původního složení MK či vznik artefaktů, které mohou být následně chybně identifikovány jako MK (SANTHA & NAPOLITANO 1992).

Konvenční techniky pro stanovení složení mastných kyselin v biologickém vzorku pomocí GC vyžadují extrakci do rozpouštědla, čištění, hydrolýzu a derivatizační postupy, které jsou velmi zdlouhavé a těžkopádné. Jako derivatizační činidla se nejčastěji užívají methoxid sodný či hydroxid draselný v methanolu jakožto transesterifikační činidla.

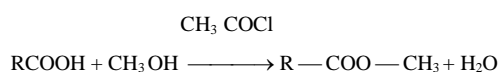
Esterifikaci můžeme provádět převedením MK na kvarterní amoniové soli či za využití diazomethanu v přítomnosti methanolu. Fluorid boritý - methanol našel uplatnění jako transesterifikační i esterifikační činidlo (LEPAGE & ROY 1986, SANTHA & NAPOLITANO 1992)

### Reakce:

- transesterifikační



- esterifikační



R - uhlovodíkový řetězec mastné kyseliny

Většinu přírodních MK úspěšně oddělíme pomocí kapilárních kolon typu WCOT vyráběných z taveného křemene, nejčastěji se stacionární fází střední polaroty nebo nepolární stacionární fází. Tyto kolony nabízejí vynikající rozlišovací schopnost bez ohledu na typ vzorku. Příkladem polárních stacionárních fází je polyethylenglykol či dimethyl-kyanopropylsilikonové sloučeniny, nejčastěji používanou nepolární stacionární fází je methylsilikon. Speciální aplikace, jako je např. oddělení komplexu směsi cis-trans mastných kyselin, vyžadují zvláštní chromatografické podmínky, např. použití velmi dlouhých kapilárních kolon nebo více polárních stacionárních fází (SANTHA & NAPOLITANO 1992).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zjistit zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích mateřského mléka odebraného matkám v prvním, třetím, šestém a devátém měsíci laktace. Předpokládanou hypotézou je, že se bude zastoupení jednotlivých MK lišit v závislosti na délce kojení a výživě matek v ČR.

Stěžejní je především zastoupení  $\omega$ -3 MK, které mají důležitou úlohu pro správný vývoj dítěte. V případě zjištění nízkých hladin je předpokládána edukace českých matek o dietetických doporučeních.

## 4. METODIKA A MATERIÁL

### 4.1. Protokol studie

Ve spolupráci s FN HK, Laboratoří klinické fyziologie výživy a metabolismu a Výzkumnou laboratoří kliniky gerontologické a metabolické, byla provedena studie sledující vliv diety na metabolismus kojících matek. V rámci této studie bylo jedním z cílů stanovit obsah celkových mastných kyselin v mateřském mléce.

Vzorky mateřského mléka pro stanovení MK byly odebírány elektrickou odsávačkou Lactina Electric Plus v množství 20 ml. Vzorky byly odebrány v prvním, třetím, šestém a devátém měsíci od počátku laktace.

Celkem bylo vyšetřeno 100 vzorků od 25 kojících matek.

### 4.2. Přístroje a pomůcky

Elektrická odsávačka mateřského mléka Lactina Electric Plus (Medela AG, Švýcarsko)

Automatické pipety 50 – 3000  $\mu$ l (Bihohit Proline, Finsko)

Skleněné pasteurovy pipety – 1,5 ml (Kavalier, ČR)

Skleněné zkumavky se šroubovacím uzávěrem – 12 ml

Teflonové zátky

Odměrné baňky

Labdancer (IKA, Německo)

Laboratorní rotátor Stuart SB3 (Biolote, Velká Británie)

Termoblok QBT ( Tectra a.s., ČR)

Chlazená centrifuga Labofuge 400 R (Heraeus Instruments, Německo)

Vialky s crimpovacími hliníkovými víčky - 11 mm, 1,5 ml (Supelco, USA)

Kleště crimpovací 11mm Crimper (Perkin Elmer, USA)

Helium 5,5 (Siad, ČR)

Vzduch 2,2 a (Siad, ČR)

Vodík 4,0 (Siad, ČR)

Kapilární kolona Supelco SP<sup>TM</sup> 2330 - 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm film thickness (Supelco, USA)

Plynový chromatograf GC 8000 series (Fisons Instruments, Prago LAB, ČR)

Chromatografický software Clarity (Data Apex, USA)

### **4.3. Chemikálie**

Methanol p.a. (Penta, ČR)

Acetylchlorid p.a. (Merck, USA)

Toluen p.a. (Merck, USA)

Uhličitan draselný p.a. (Penta, ČR)

Standard F. A. M. E. MIX, C8 - C24 (Sigma, USA)

### **4.4. Příprava vzorků k analýze**

Vzorky mateřského mléka byly po odebrání zamrazeny a uchovány při – 86 C° v mrazuvzdorných zkumavkách bez přítomného jakéhokoli aditiva či konzervantu. Před analýzou byly vzorky rozmrazeny při laboratorní teplotě a homogenizovány zahřátím na 37 C° a vložení do rotátoru. Tím byl získán reprezentativní vzorek.

### **4.5. Analytický postup**

Do označených skleněných zkumavek se šroubovacím uzávěrem je napipetováno 3 ml methanolu, 100 µl zhomogenizovaného mateřského mléka a 1 ml směsi toluen-acetylchlorid (4:1). Protřepe se na labdanceru a umístí do rotátoru, na 15 min při 40 otáčkách. Poté se vzorky vloží na 1 hod do termostatu, který je vytemperován na 100 C°. Nechají se vychladnout na laboratorní teplotu.

Následuje extrakce 6 ml 12%  $K_2CO_3$  a třepání po dobu 15 min při 40 otáčkách. Po důkladném promísení se zkumavky centrifugují v chlazené centrifuze (3500 rcf, 10 min, 4 C°). Poté se odpipetuje horní organická vrstva pomocí skleněných pasteurových pipet do připravených autosamplerových vialek a důkladně, pomocí krimpovacích kleští, se viale uzavřou hliníkovými víčky.

Obsah vialek s transmetylovanými a extrahovanými MK se analyzuje pomocí plynového chromatografu s FID detekcí.

#### **4.6. Chromatografické podmínky**

Tlak nosného plynu (He): 300 kPa

Teplota injektoru: 280 °C

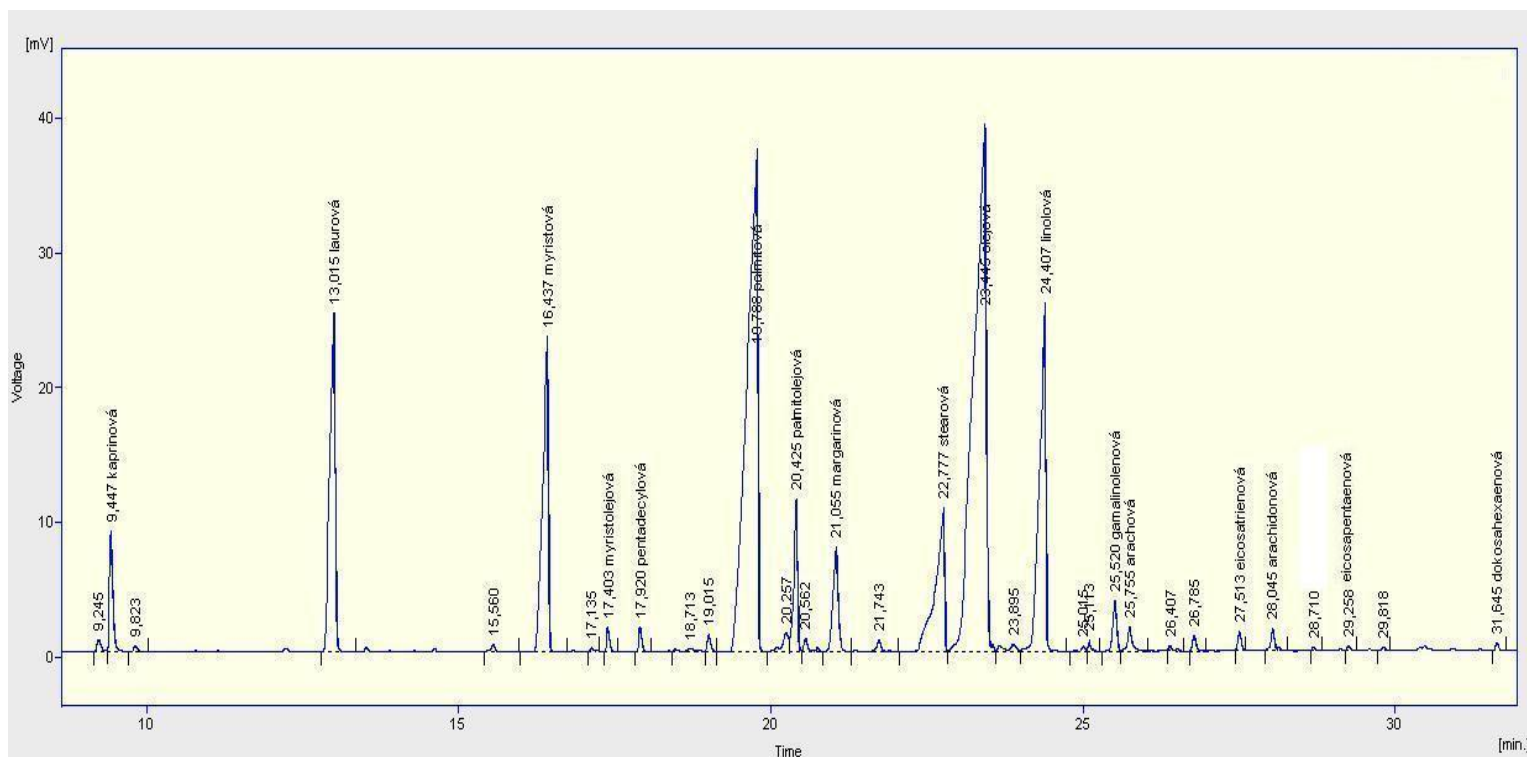
Teplota termostatu kolony: počáteční teplota 110 °C po dobu prvních 2 min, poté dochází ke vzestupu teploty po 14 °C až na konečných 250 °C

Teplota plamenově ionizačního detektoru: 330 °C



## 5. VÝSLEDKY

Chromatografický záznam spektra methylesterů celkových mastných kyselin v mateřském mléce je uveden na Obr. 3.



**Obr. 3.** Chromatogram spektra methylesterů celkových mastných kyselin v mateřském mléce.

Chromatogram je závislostí odezvy detektoru (osa y) na retenčním čase (osa x). Retenční časy konkrétních methylesterů MK jsou uvedeny v popisu na obrázku nad jednotlivými píky. Analýza byla prováděna za podmínek uvedených v kapitole 4.6.

## 5.1. Přesnost stanovení celkových mastných kyselin

Metodou uvedenou v kapitole 4. byla stanovena přesnost stanovení MK. Byl použit směsný vzorek mateřského mléka. Opakování bylo provedeno 10 krát. Data byla statisticky zpracována pomocí softwaru Sigma Stat (SyStat, USA). Statistická data stanovení přesnosti jsou uvedena v Tab. 2a. a 2b. Grafické znázornění přesnosti stanovení jednotlivých mastných kyselin je uvedeno na Obr. 4. - 8.

**Tab. 2a.** Statistické zhodnocení stanovení přesnosti analýzy mastných kyselin.

Area %	Průměr	SD	CV
kaprinová	2,025	0,0251	1,24
laurová	8,516	0,0767	0,90
myristová	8,784	0,109	1,24
myristolejová	0,391	0,00835	2,14
pentadecylová	0,413	0,00463	1,12
palmitová	24,958	0,116	0,46
palmitolejová	2,898	0,0296	1,02
margarinová	2,42	0,177	7,31
stearová	5,946	0,0977	1,64
olejová	30,84	0,129	0,42
linolová	10,675	0,0529	0,50
gamalinolenová	0,88	0,0227	2,58
arachová	0,518	0,0128	2,47
eikosatrienová	0,309	0,0189	6,12
arachidonová	0,358	0,0183	5,11
eikosapentaenová	0,07	0,0022	3,21
dokosaheptaenová	0,11	0,0056	5,00

SD – směrodatná odchylka

CV – variační koeficient (%)

Analýza směsného vzorku mateřského mléka pro stanovení přesnosti byla prováděna 10 krát podle metody uvedené v kapitole 4.

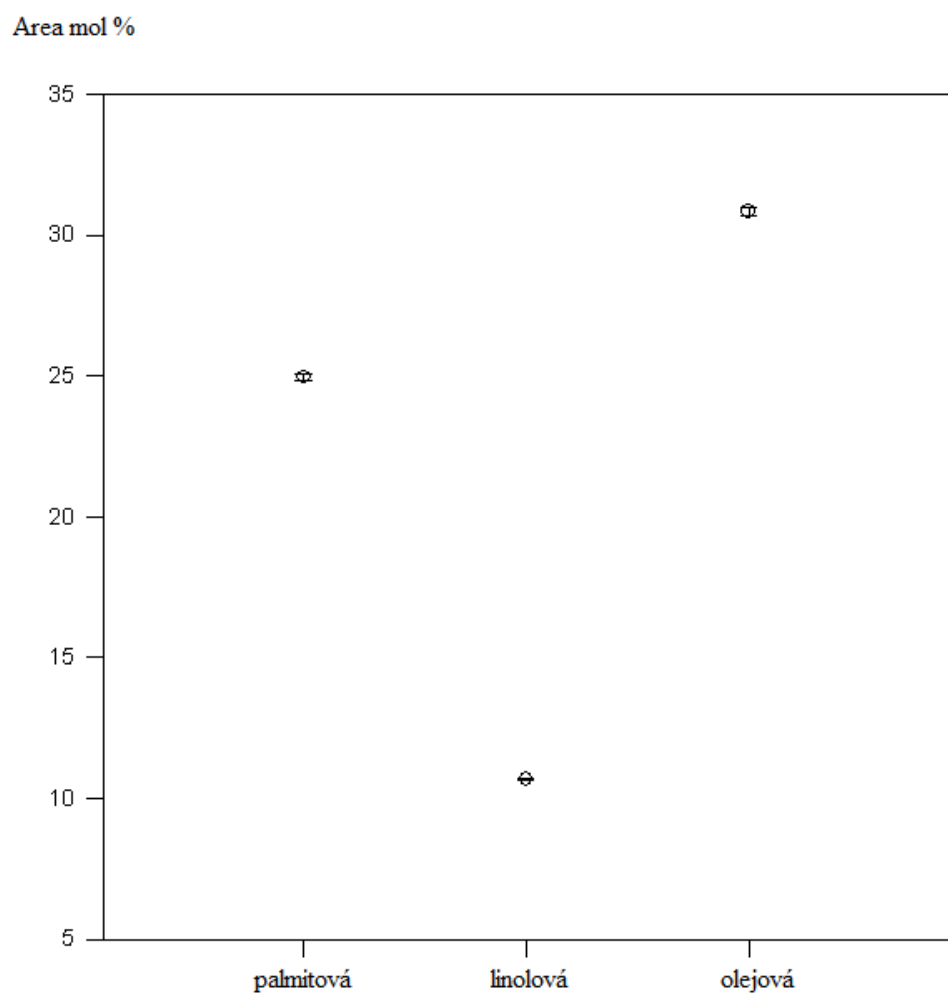
**Tab. 2b.** Statistické zhodnocení stanovení přesnosti analýzy mastných kyselin.

Area %	Max	Min	Median	25%	75%	Šikmost	Špičatost
kaprinová	2,07	1,99	2,02	2,01	2,04	0,689	0,389
laurová	8,66	8,43	8,505	8,455	8,56	0,772	0,538
myristová	8,9	8,56	8,8	8,74	8,865	-1,248	2,053
myristolejová	0,4	0,38	0,39	0,385	0,4	-0,277	-1,392
pentadecylová	0,42	0,41	0,41	0,41	0,415	1,44	-1,48E-13
palmitová	25,19	24,8	24,965	24,88	24,99	0,962	2,007
palmitolejová	2,93	2,85	2,9	2,875	2,925	-0,379	-1,226
margarinová	2,65	2,1	2,405	2,335	2,565	-0,453	0,384
stearová	6,12	5,82	5,935	5,885	5,995	0,582	0,261
olejová	31,03	30,63	30,835	30,765	30,93	-0,202	-0,205
linolová	10,74	10,57	10,69	10,65	10,705	-1,169	1,463
gamalinolenová	0,9	0,84	0,89	0,865	0,895	-1,176	-0,0778
arachová	0,53	0,49	0,52	0,515	0,525	-1,56	3,028
eikosatrienová	0,33	0,28	0,32	0,29	0,32	-0,616	-1,646
arachidonová	0,4	0,34	0,35	0,35	0,36	2,16	5,349
eikosapentaenová	0,073	0,067	0,0695	0,0685	0,0720	0,320	-1,092
dokosahexaenová	0,12	0,10	0,11	0,110	0,113	-0,313	2,211

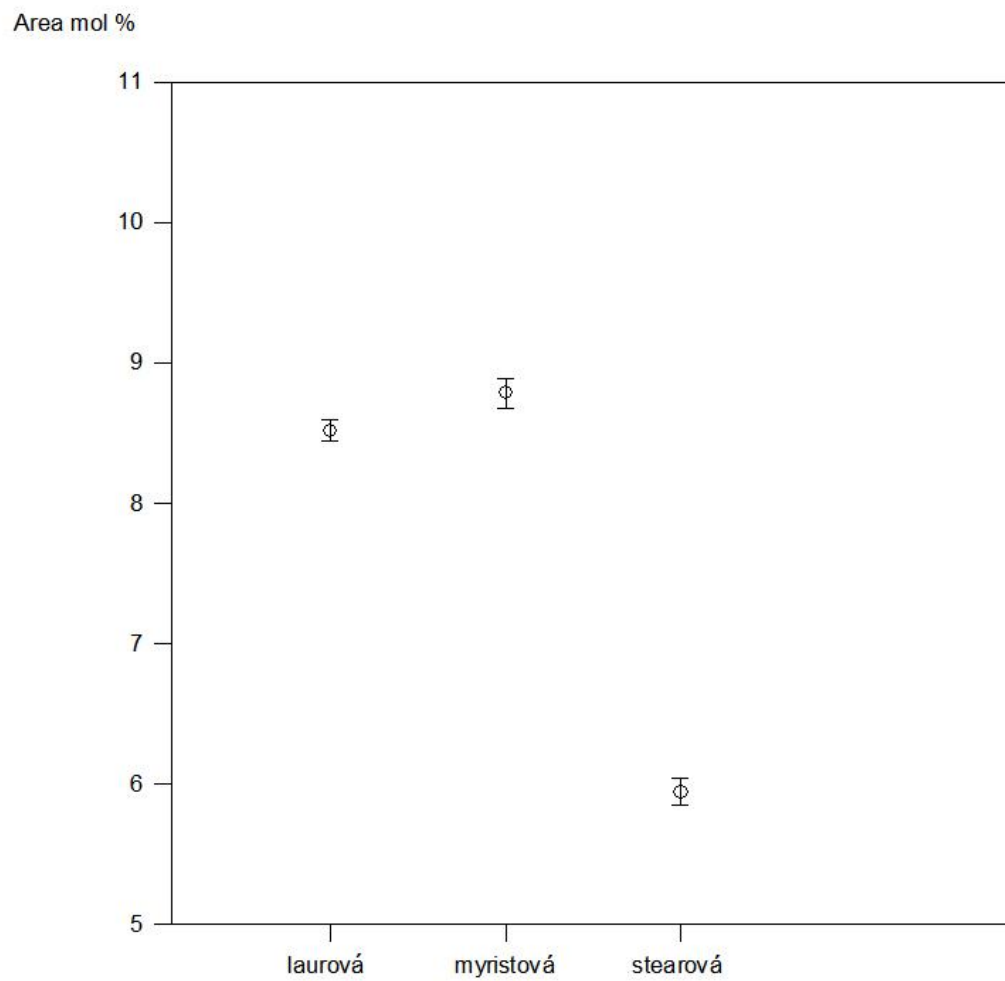
Max a Min – maximální a minimální naměřená hodnota

Median – střední hodnota

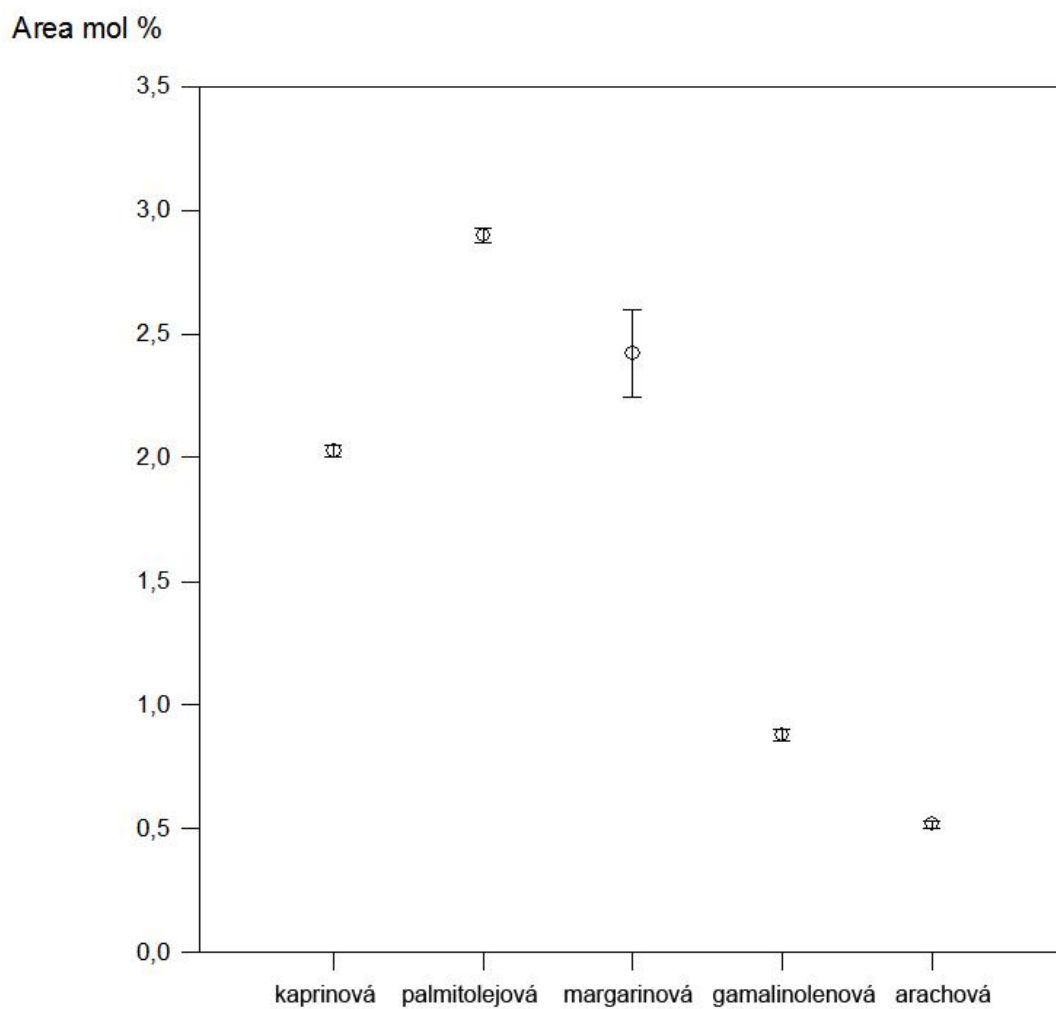
Analýza směsného vzorku mateřského mléka pro stanovení přesnosti byla prováděna 10 krát podle metody uvedené v kapitole 4.



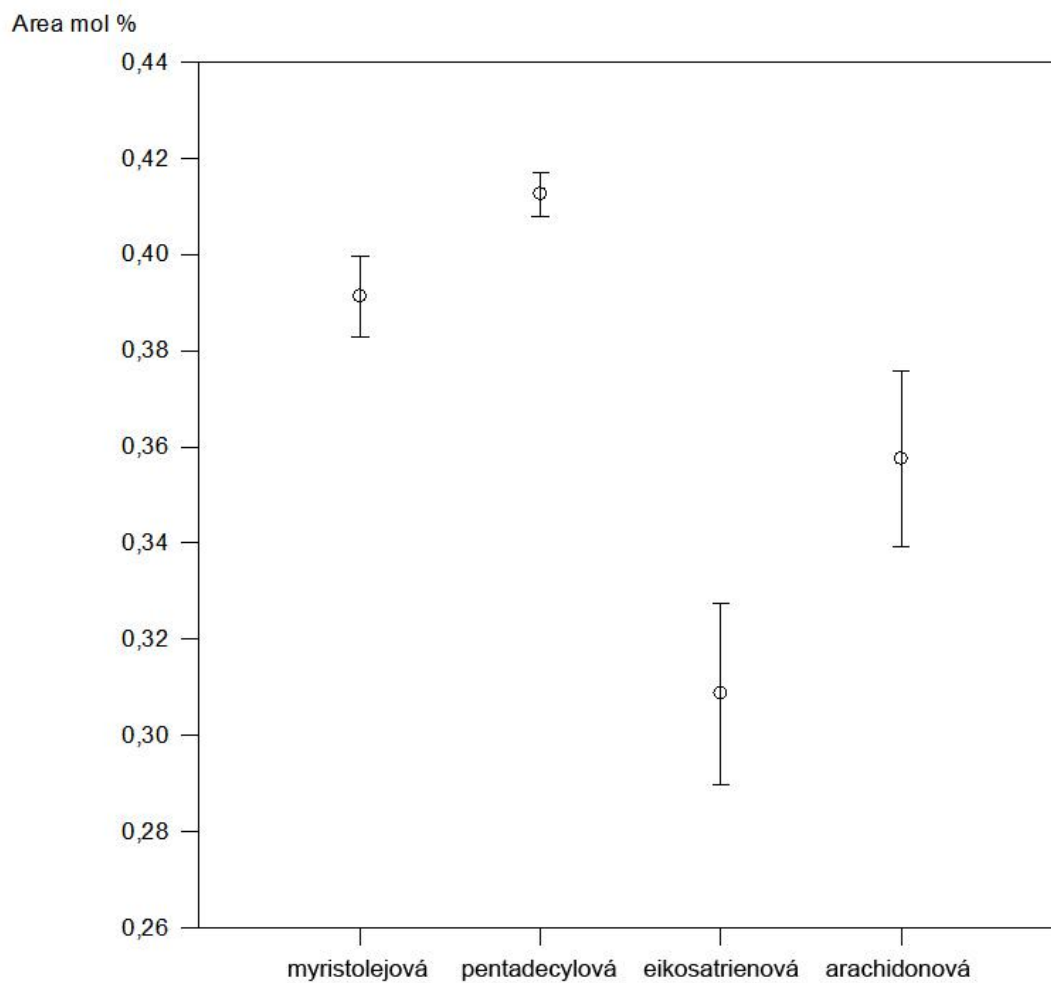
**Obr. 4.** Přesnost stanovení kyseliny palmitové, linolové a olejové – bodový graf.



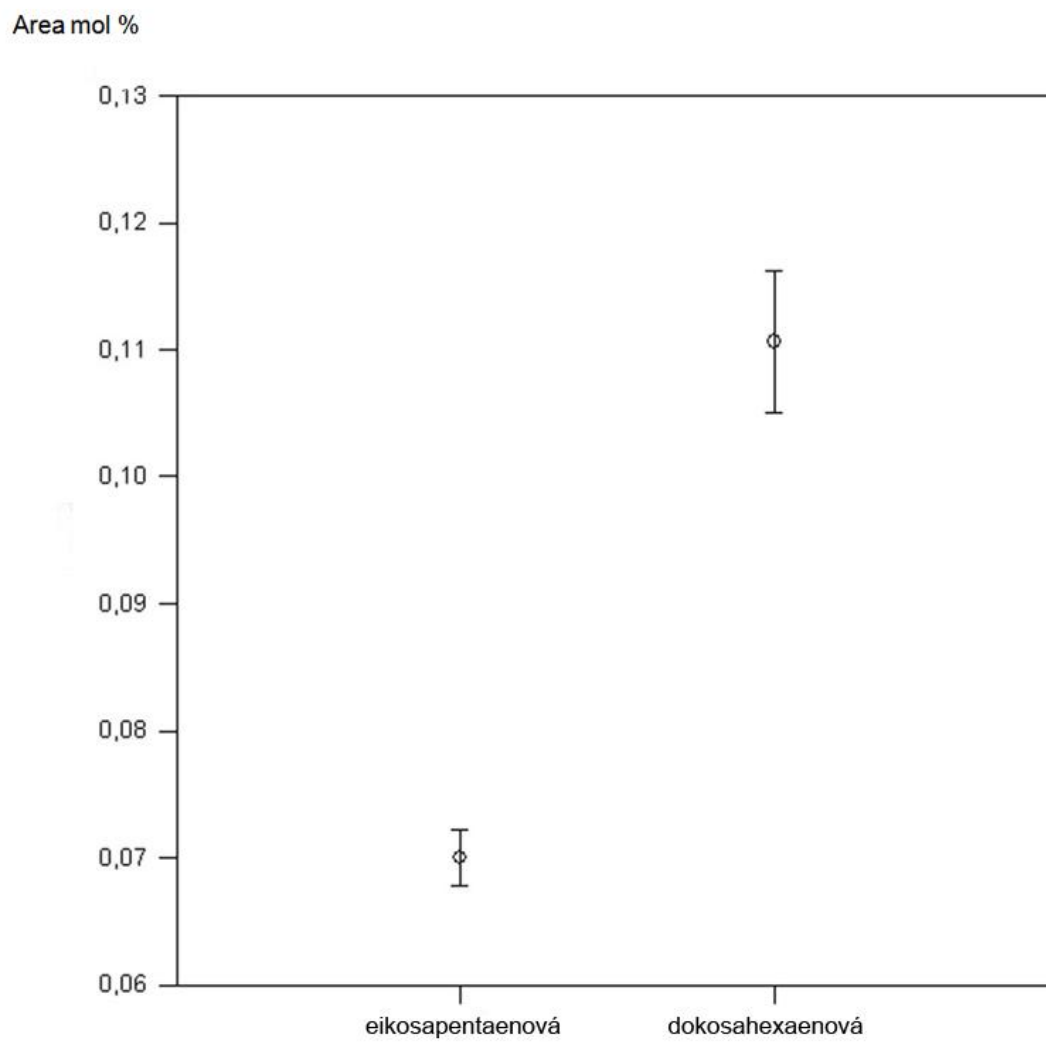
**Obr. 5.** Přesnost stanovení kyseliny laurové, myristové a stearové – bodový graf.



**Obr. 6.** Přesnost stanovení kyseliny kaprinové, palmitolejové, margarínové,  $\gamma$ -linolenové a arachové – bodový graf.



**Obr. 7.** Přesnost stanovení kyseliny myristolejové, pentadecylové, eikosatrienové a arachidonové – bodový graf.



**Obr. 8.** Přesnost stanovení kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové – bodový graf.



## 5.2. Výsledky vlastní analýzy mastných kyselin v mateřském mléce

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí softwaru SigmaStat (SyStat, USA). Pro porovnání byl použit test One Way Repeated Measures Analysis of Variance. Obecné zastoupení skupin mastných kyselin je uvedeno v Tab. 3. Statistické zhodnocení všech stanovovaných MK je uvedeno v Tab. 4a. a 4b. a na Obr. 9. – 12.

Z výsledků vyplývá, že významné změny hladin MK v závislosti na stupni laktace nastaly pouze u kyseliny laurové, myristové, margarínové a dihomog-linolenové. Hladina kyseliny myristové se s délkou laktace signifikantně zvyšuje (ze  $7,84 \pm 2,17$  na  $11,05 \pm 2,16\%$ , Obr. 10.), naopak hladina kyseliny dihomog-linolenové se snižuje (z  $0,38 \pm 0,07$  na  $0,26 \pm 0,06$ , Obr. 12.). Hladiny kyselin laurové a margarínové se během laktace snižují a zvyšují. (Obr. 9. a 11.).

Dále bylo zjištěno významné snížení hladin polynenasycených  $\omega$ -3 MK EPA a DHA. Průměrná hodnota EPA během devítiměsíční periody činila 0,087%, DHA 0,130%. V porovnání s přímořskými státy jsou tyto koncentrace výrazně nižší (viz kapitola 6.).

**Tab. 3.** Procentuální zastoupení základních skupin MK.

	Zastoupení v %	Rozsah (%)
Nasycené MK	51.7	48,7; 55,4
Mononenasycené MK	34.9	32,6; 37,2
Polynenasycené MK $\omega$ -3	0.20	0,17; 0,25
Polynenasycené MK $\omega$ -6	12.6	10,5; 14,6

Průměrné zastoupení základních skupin MK, které bylo zjištěno analýzou (provedenou dle kapitoly 4.) 100 vzorků mateřského mléka. Hodnoty jsou uvedeny v %.

**Tab. 4a.** Statistické zhodnocení dat z analýzy mastných kyselin v mateřském mléce – One Way Repeated Measures Analysis of Variance.

Průměr ± SD	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	9. měsíc
kaprinová	2,117 ± 0,406	2,000 ± 0,372	2,078 ± 0,330	1,954 ± 0,222
laurová	7,976 ± 2,679	6,880 ± 1,877	8,318 ± 2,198	9,279 ± 1,828
myristová	7,836 ± 2,168	7,679 ± 1,919	9,289 ± 2,536	11,051 ± 2,155
myristolejová	0,413 ± 0,109	0,449 ± 0,141	0,482 ± 0,166	0,404 ± 0,112
pentadecylová	0,419 ± 0,0942	0,477 ± 0,159	0,482 ± 0,171	0,418 ± 0,112
palmitová	25,256 ± 2,335	25,901 ± 2,519	26,073 ± 2,662	25,096 ± 2,863
palmitolejová	3,148 ± 0,889	3,017 ± 1,234	2,800 ± 1,068	2,573 ± 0,958
margarinová	0,327 ± 0,0561	0,354 ± 0,0843	0,350 ± 0,111	0,318 ± 0,0688
stearová	5,698 ± 0,982	6,133 ± 1,233	6,063 ± 0,895	6,146 ± 1,087
olejová	32,797 ± 4,659	32,676 ± 2,859	31,559 ± 4,108	29,775 ± 2,304
linolová	11,572 ± 3,205	11,861 ± 2,353	10,211 ± 1,939	10,858 ± 2,741
γ-linolenová	0,985 ± 0,306	1,022 ± 0,386	1,014 ± 0,400	0,993 ± 0,460
arachová	0,495 ± 0,129	0,543 ± 0,272	0,462 ± 0,137	0,407 ± 0,145
arachidonová	0,464 ± 0,156	0,484 ± 0,181	0,385 ± 0,151	0,350 ± 0,123
dokosaheptaenová	0,122 ± 0,0333	0,145 ± 0,0496	0,131 ± 0,0330	0,123 ± 0,0311
eikosapentaenová	0,0742 ± 0,0261	0,105 ± 0,0669	0,0912 ± 0,0449	0,0773 ± 0,0384
dihomo-γ-linolenová	0,382 ± 0,0654	0,365 ± 0,0906	0,294 ± 0,0835	0,260 ± 0,0582

Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka (SD)

1., 3., 6. a 9. měsíc – měsíc laktace, ve kterém bylo mateřské mléko odebráno

Tabulka poskytuje informace o procentuálním zastoupení mastných kyselin obsažených v mateřském mléce v různém stádiu laktace. Analýza byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.

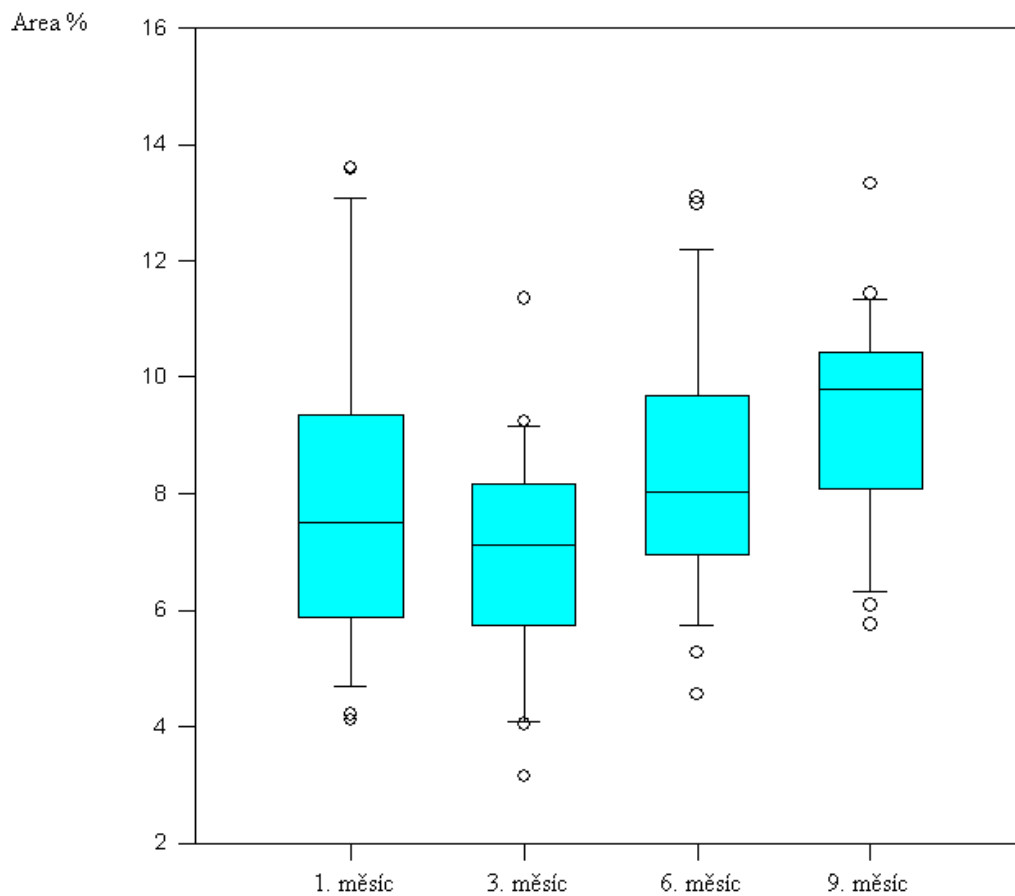
**Tab. 4b.** Statistické zhodnocení dat z analýzy mastných kyselin v mateřském mléce – One Way Repeated Measures Analysis of Variance.

<b>MK</b>	<b>P</b>
kaprinová	0,061
laurová	0,01 *
myristová	<0,001 *
myristolejová	0,081
pentadecylová	0,097
palmitová	0,412
palmitolejová	0,46
margarinová	0,024 *
stearová	0,706
olejová	0,096
linolová	0,317
$\gamma$ -linolenová	0,86
arachová	0,112
arachidonová	0,194
dokosahexaenová	0,176
eikosapentaenová	0,341
dihomo- $\gamma$ -linolenová	<0,001 *

P - hladina statistické významnosti

\* statisticky významné změny v různých stádiích laktace

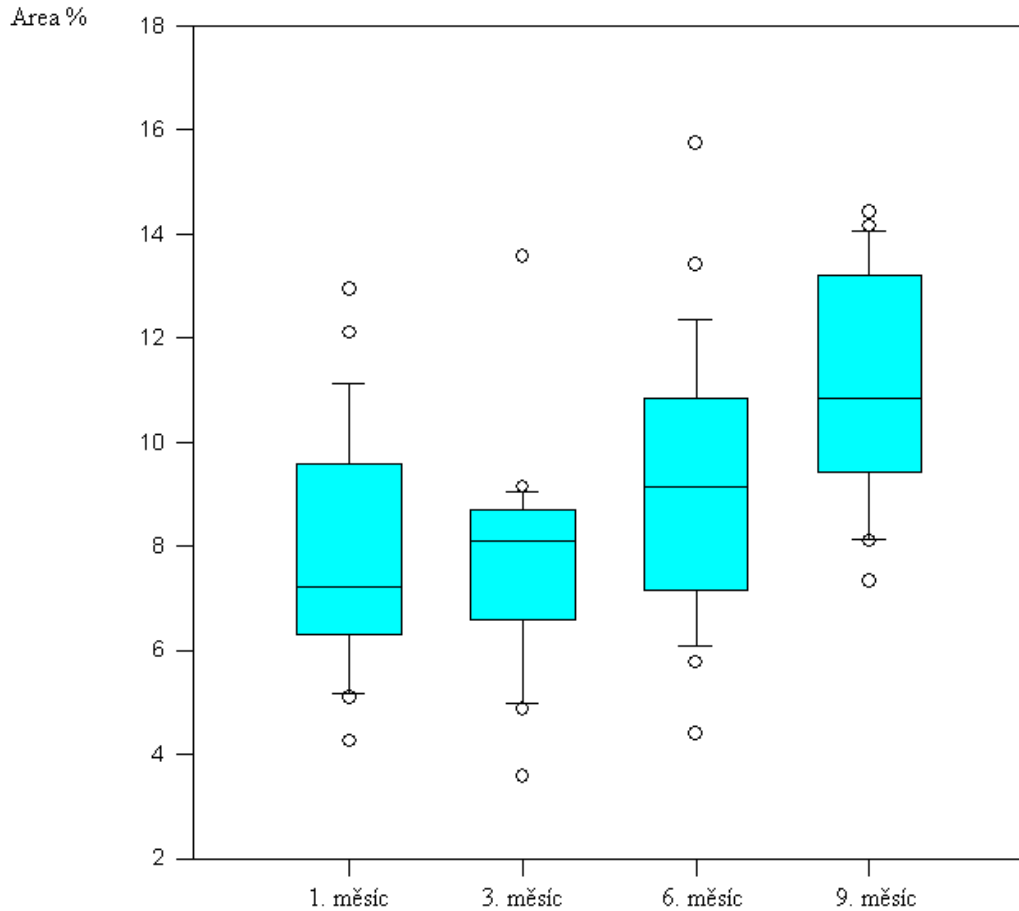
### kyselina laurová



**Obr. 9.** Kyselina laurová – krabicový graf.

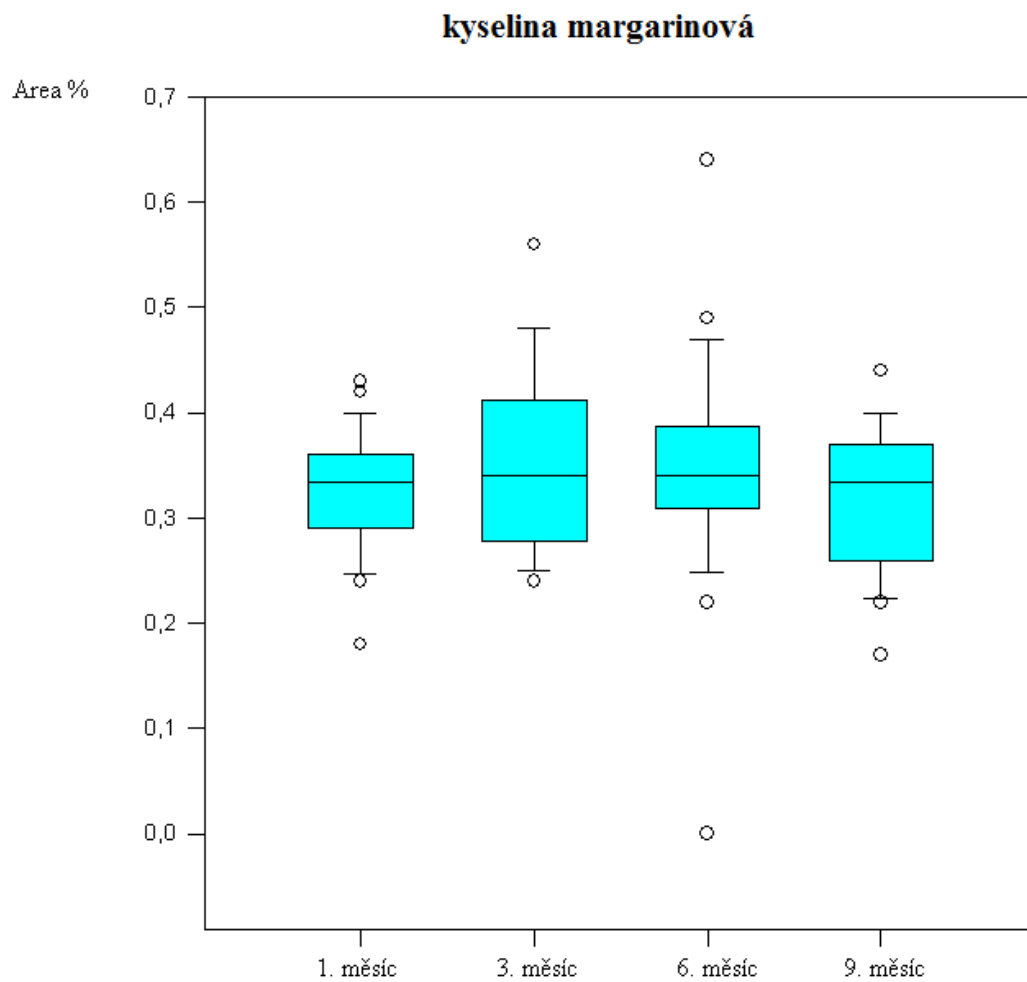
Porovnání významnosti výsledků podle měsíce laktace: významně se liší hladina kyseliny laurové ve 3. a 9. měsíci laktace.

### kyselina myristová



**Obr. 10.** Kyselina myristová – krabicový graf.

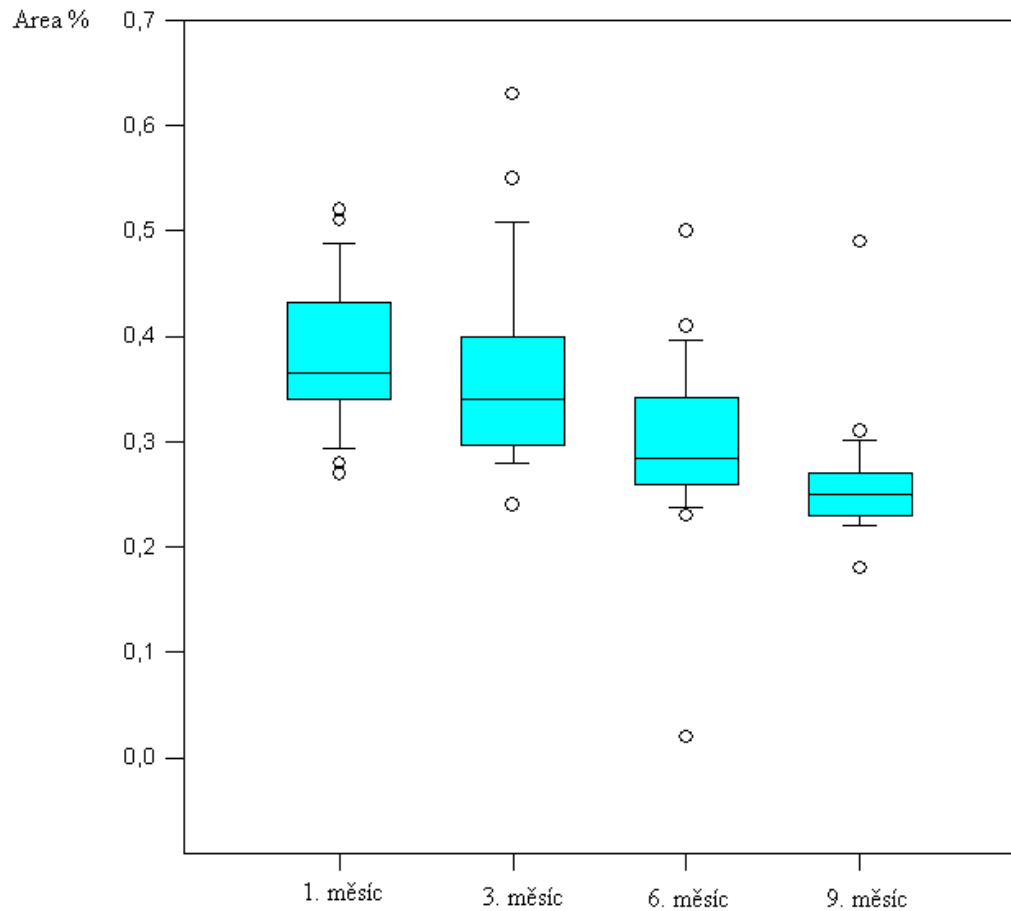
Porovnání významnosti výsledků podle měsíce laktace: významně se liší hladina kyseliny myristové v 1. a 9. měsíci, 3. a 9. měsíci, 6. a 9. měsíci a v 3. a 6. měsíci laktace.



**Obr. 11.** Kyselina margarínová – krabicový graf.

Porovnání významnosti výsledků podle měsíce laktace: signifikantně se liší hladina kyseliny margarínové ve 3. a 9. měsíci laktace.

### kyselina dihomogamma-linolenová



**Obr. 12.** Kyselina dihomogamma-linolenová – krabicový graf.

Porovnání významnosti výsledků podle měsíce laktace: významně se liší hladina kyseliny dihomogamma-linolenové v 1. a 9. měsíci, 1. a 6. měsíci, 3. a 9. měsíci a v 3. a 6. měsíci laktace.

## 6. DISKUZE

Ve srovnání s přímořskými zeměmi byly ve vzorcích mateřského mléka českých matek nalezeny významně snížené koncentrace  $\omega$ -3 MK (EPA a DHA), konkrétní hodnoty jednotlivých MK v různých stádiích laktace jsou uvedeny v Tab. 4a. To má do budoucna velký význam. Kojící matky by měly být seznámeny s dietetickými doporučeními, protože zdravý vývoj dítěte je na příjmu těchto MK závislý. Vzhledem k tomu, že obyvatelstvo přímořských států má v dietě mnohem větší obsah rybího masa, ve kterém jsou tyto MK obsaženy, netrpí na rozdíl od České republiky jejich nedostatkem.

Pro porovnání byly použity studie provedené ve Španělsku, Portugalsku, Německu a Číně.

Španělská studie, která byla publikována v časopise *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* se zabývala zastoupením MK v mateřském mléce 40 španělských žen. Vzorky byly odebírány v období mezi 20. - 30. dnem po porodu. V Tab. 5. je uvedeno procentuální zastoupení základních skupin MK v porovnání s hodnotami v naší práci. Ve srovnání s naší studií, konkrétně s výsledky mateřských mlék odebíraných v 1. měsíci laktace, jsou tyto hodnoty výrazně vyšší. Studie došla k závěru, že u matek, které měly v dietě zvýšenou konzumaci ryb, bylo nalezeno významné zvýšení hladin EPA a DHA (DE LA PRESA-OWENS et al. 1996).

**Tab. 5.** Porovnání zastoupení základních skupin MK v ČR (viz Tab. 3.) a ve Španělsku.

	Nasyčené MK	MUFA	PUFA	PUFA $\omega$ -3	PUFA $\omega$ -6
ČR	51.7 %	34.9%	12,80%	0.20%	12.6%
Španělsko	41,09%	41,97%	15,23%	1,39%	13,73%

Hodnoty jsou uváděné jako medián molárního procenta základních skupin MK.

MUFA - mononenasyčené MK

PUFA - polynenasycené MK



Další zemí, která byla v práci použita pro porovnání a zhodnocení našich výsledků, je Portugalsko. Cílem jejich studie bylo zjistit profil zastoupení MK v mateřském mléce portugalských žen v období od 1. týdne do 16. týdne laktace. Zastoupení DHA v 1. měsíci laktace bylo  $0,42 \pm 0,26\%$ , ve 3. měsíci  $0,45 \pm 0,35\%$ . Koncentrace EPA v 1. měsíci  $0,16 \pm 0,15\%$ , ve 3. měsíci  $0,16 \pm 0,18\%$ . Hodnoty DHA jsou až třikrát vyšší oproti výsledkům prezentovaným v této práci (RIBEIRO et al. 2008).

Studie prováděná v Německu se zabývala zastoupením MK v mateřském mléce odebraném mezi třetím a čtvrtým měsícem laktace. Hodnoty mediánu pro EPA byly 0,04%, pro DHA 0,22%. V naší studii (ve 3. měsíci laktace) byla naměřena několikanásobně vyšší hladina EPA (0,105%), ale naopak nižší hladina DHA (0,145%), (BERTHOLD KOLETZKO et al. 1988).

Další německá studie porovnávala složení MK v souboru vzorků mateřského mléka odebraného v 6. týdnu a v 6. měsíci laktace. Vzorky byly odebrány od 462 kojících matek. Získaná data ukazují na zvyšující se obsah tuku ve vzorcích mateřského mléka mezi 6. týdnem a 6. měsícem laktace. Hodnoty  $\omega$ -3 MK a  $\omega$ -6 MK se mezi 6. týdnem a 6. měsícem laktace významně zvýšily. Podobně i procentuální hodnoty kyseliny EPA a nejdůležitější  $\omega$ -3 MK, DHA, byly signifikantně vyšší v šestém měsíci, než v šestém týdnu kojení (Tab. 6.). Nacházíme zde podobné výsledky jako u první zmíněné německé studie, u té byly též ve srovnání s ČR nižší hladiny EPA a vyšší hladiny DHA (SZABÓ et al. 2010).

**Tab. 6.** Zastoupení kyselin EPA a DHA v mateřském mléce německých žen v 6. týdnu a 6. měsíci laktace.

% w/w	6. Týden	6. Měsíc
EPA	0,04%	0,07%
DHA	0,17%	0,23%

% w/w – procentuelní zastoupení MK

Čínská srovnávací studie zahrnuje porovnání složení MK v mateřském mléce dvou oblastí, a to Hong Kongu a Chongqing. Vzorky byly odebrány v různých fázích laktace. Studie prokázala, že Hong Kong a Chongqing měly odlišný profil mastných kyselin v mnoha směrech, což do značné míry odráží odlišné dietní zvyky a životní styl těchto dvou oblastí (Tab. 7.). Ve srovnání se zveřejněnými údaji pro kanadské a další západní země, mléko čínských matek z obou oblastí obsahovalo vyšší hladinu  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 MK, zejména DHA a AA. Oproti ČR vykazuje zastoupení DHA v čínské studii též vyšší obsah, ale EPA je v ČR naopak vyšší než v oblasti Chongqing v Číně (CHEN et al. 1997).

**Tab. 7.** Zastoupení kyselin EPA a DHA (wt %) v mateřském mléce čínských žen (ze dvou oblastí) v 1. měsíci laktace.

	Hong Kong	Chongqing
EPA	0,13%	0,04%
DHA	0,23%	0,18%

MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 byly po mnoho let v rovnováze, ovšem během posledních asi 150 let došlo ke zvratu a tato rovnováha se porušila. Lidé dnes žijí v nutričním prostředí, které je odlišné od toho, pro které byla vybudována naše genetická výbava. Příčinou je změna životního stylu, stravovacích návyků a vyšší expozice škodlivým látkám. Výživa je nejvýznamnějším vnějším faktorem, který má vliv na stav našeho organismu. V dnešní době strava obsahuje nadměrné množství MK  $\omega$ -6 a zároveň je nedostatečná na MK  $\omega$ -3. Nadměrné množství MK  $\omega$ -6 a velmi vysoký podíl  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, které jsou v současné době nacházeny v dietě západních zemí, podporují patogenezi mnoha nemocí, včetně kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Zatímco zvýšená množství MK  $\omega$ -3 a snížený podíl  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 mají účinek supresivní (SIMOPOULOS 2002).

Výsledky předkládané práce byly prezentovány na kongresu ESPEN (European Society of Parenteral and Enteral Nutrition), který se konal 5. - 8. září 2010 v Nice, ve Francii. Abstrakt byl ohodnocen odbornou komisí v pořadí 189. ze 488. přijatých abstrakt. Následně byl abstrakt publikován v časopise Clinical Nutrition (2010, Volume 5), (viz příloha 10. 1.).

Dále byly výsledky prezentovány na XIV. kongresu o ateroskleróze, který se konal 9. – 11. prosince 2010 ve Špindlerově mlýně (viz příloha 10. 2.).

## 7. ZÁVĚRY

Jedním z cílů této práce bylo zjistit zastoupení jednotlivých MK v mateřském mléce matek z ČR a závislost jejich koncentrace na délce kojení a výživě matky. Významné změny hladin MK jsme prokázali jen u některých MK, a to konkrétně u kyseliny laurové, myristové, margarínové a dihomu- $\gamma$ -linolenové. Hladina kyseliny myristové se s délkou laktace signifikantně zvyšuje. Kyselina dihomu- $\gamma$ -linolenová se naopak při stejné závislosti snižuje. Hladiny kyselin laurové a margarínové neměly konstantní hladinu, snižovaly se a zvyšovaly. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4a. a na Obr. 9. – 12.

Dalším důležitým cílem bylo stanovit v mateřském mléce hladiny  $\omega$ -3 MK. Koncentrace  $\omega$ -3 MK, především DHA, nám v porovnání s přímořskými státy vyšly významně snížené. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4a. Tyto nálezy svědčí o případných deficitech během prvních měsíců vývoje dítěte. Při nedostatečném množství kyseliny DHA a EPA může docházet k poruchám ve vývoji dítěte. Je třeba edukovat české matky o dietetických doporučeních. Ta zahrnují zejména zvýšenou konzumaci rybího masa, olivového oleje a případně i doporučení užívání doplňků stravy obsahujících MK  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6, především vyšší obsah EPA a DHA.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

acetyl-CoA	acetyl - koenzym A
acyl-CoA	acyl - koenzym A
ACP	přenašečový protein acylových zbytků
ATP	adenosin-trifosfát
CE	estery cholesterolu
FAS	multienzymový komplex synthasa mastných kyselin
FID	plamenový ionizační detektor
FADH <sub>2</sub>	flavin adenin dinukleotid (redukováná forma)
GC	plynová chromatografie
OH-	hydroxylová skupina
AA	kyselina arachidonová
DHA	kyselina dokosahexaenová
EPA	kyselina eikosapentaenová
LA	kyselina linolová
ALA	kyselina $\alpha$ -linolenová
malonyl-CoA	malonyl - koenzym A
MK	mastná kyselina
MM	mateřské mléko
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny (volné mastné kyseliny)
NADH+H <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
SD	směrodatná odchylka
SH-	thiolová skupina
TAG	triacylglyceroly
TMS	trimethylsilylderiváty
CV	variační koeficient
WCOT	kapilární kolona s tenkým filmem stacionární fáze

## 9. LITERATURA

*AskDrSears.com*, Breastfeeding, Comparison of human milk and formula [online]. [cit. 2010-10-18]. Dostupné z: <<http://www.askdrsears.com/html/2/t021600.asp>>.

BERTHOLD KOLETZKO, M. D., et al. Fatty acid composition of mature human milk in Germany. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1988, vol. 47, s. 954-959.

BUKÁČKOVÁ, K. *Agape-výživové poradenství* [online]. [cit. 2010-10-18]. Dostupné z: <[http://www.agape-poradna.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=30%3Asloeni-mateskeho-mleka&catid=3&Itemid=34](http://www.agape-poradna.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=30%3Asloeni-mateskeho-mleka&catid=3&Itemid=34)>.

CRAWFORD, M. A., HARBIGE, L. S. n-3 fatty acids and evolution of the brain. *Pro.Clin.Biol.Res.*, 1988, 288, s. 335-354. (převzato z MOUREK, 2009)

DE LA PRESA-OWENS, S., LOPÉZ-SABATER, M. C., RIVERO-URGELL, M. Fatty acid composition of human milk in Spain. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1996, vol. 22, no. 2, s. 180-185.

DOČKALOVÁ, J. *Ordinace.cz*, Kojení [online]. Datum publikování 30. 10. 2005. [cit. 2010-10-18]. Dostupné z: <<http://www.ordinace.cz/clanek/kojeni/>>.

GERMAN, J. B., DILLARD C. J. Saturated fats: A perspective from lactation and milk composition. *Lipids*, 2010, vol. 45, s. 915-923.

HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. *Analytická chemie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1987. 664 s. ISBN 04 - 612 – 87. Kapitola 12: Chromatografie, s. 413-480.

CHEN, Z. Y., et al. Breast milk fatty acid composition: A comparative study between Hong Kong and Chongqing Chinese. *Lipids*, 1997, vol. 32, no. 10, s. 1061-1066.

KARLÍČEK, R., POLÁŠEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., SOLICH, P. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vydání. UK v Praze, 2009. 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3. Kapitola 10: Separační metody: Plynová chromatografie, s. 272-276.

KRAML, P. *Hyperlipoproteinémie v klinické praxi*. 1. vydání. Praha: Tigris, 2008. 128 s. ISBN 978 - 80 - 903750 - 5 – 5. Kapitola 1.3: Přehled metabolismu lipidů, s. 12 – 25.

LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I. Díl*. 2. vydání. Praha: nakladatelství Karolinum, 2009. 269 s. ISBN 978-80-246-1416-8. Kapitola 10: Metabolismus lipidů, steroidů a lipoproteinů, s. 156-172.

LENTER, C. Geigy Scientific Tables, Vol. 3: Physical Chemistry Composition of Blood, Hematology Somatometric Data. Basilej, Švýcarsko, Ciba-Geigy, 1984. ISBN 0-914168-52-5.

LEPAGE, G., ROY, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one - step reaction. *Journal of Lipid Research*, 1986, vol. 27, no. 1, s. 114 – 120. ISSN 0022 - 2275.

MOUREK, J., a kol. *Mastné kyseliny OMEGA-3: Zdraví a vývoj*. 2. vydání. Praha: TRITON, 2009. 186 s. ISBN 978-80-7387-310-3.

MYSLIVÉČEK, J., TROJAN, S. *Fyziologie do kapsy*. 1. vydání. Triton, 2004. 472 s. ISBN 80-7254-497-7.

National center for biotechnology information (NCBI), Pubchem, Compound summary [online]. [cit. 2011-4-25]. Dostupné z: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=445580>>.

RIBEIRO, M., et al. Fatty acid profile of human milk of Portuguese lactating women: Prospective study from the 1st to the 16th week of lactation. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2008, vol. 53, s. 50-56.

SANTHA, N. C., NAPOLITANO, G. E. Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography*, 1992, 624, s. 37 – 51. ISSN 0021 – 9673.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, October 2002, vol. 56, no. 8, 365-379 s.

SMOLKOVÁ, E., FELTL, L., PACÁKOVÁ, V. *Plynová chromatografie III.: Kvalitativní a kvantitativní analýza*. 1. vydání. UK v Praze, 1976. 123 s. 17-080-76.

SMOLKOVÁ, E., FELTL, L., PACÁKOVÁ, V. *Plynová chromatografie II.: Instrumentální část*. Druhý dotisk 1. vydání. UK v Praze, 1983. 109 s. 60-152-82.

SMOLKOVÁ, E., FELT, L. *Analýza látek v plynném stavu*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1991. 480 s. ISBN 04-607-91. Kapitola 10: Plynová chromatografie, s. 229-462.

SZABÓ, E., et al. Fatty acid profile comparisons in human milk sampled from the same mothers at the sixth week and the sixth month of lactation. *JPGN*, 2010, vol. 50, no. 3, s. 316-319.

TVRZICKÁ, E., STAŇKOVÁ, B., VECKA, M., ŽÁK, A. Mastné kyseliny: 1. Výskyt a biologický význam. *Časopis lékařů českých*, 2009, roč. 148, č. 1, s.16-24. ISSN 0008-7335.

ŽÁDNÍKOVÁ, R. *Přírodovědecký časopis Vesmír*, Mateřské mléko a imunita: Imunologické vlastnosti mléka a význam kojení pro obranu novorozence [online]. Datum publikování květen 1997. [cit. 2010-10-18]. Dostupné z: <<http://www.vesmir.cz/clanek/materske-mleko-a-imunita>>.



## 10. PŘÍLOHY

### 10.1.

Prezentace z mezinárodního kongresu Evropské společnosti pro parenterální a enterální výživu, 32nd ESPEN Congress– Nice, Francie, 5. - 8. 9. 2010.

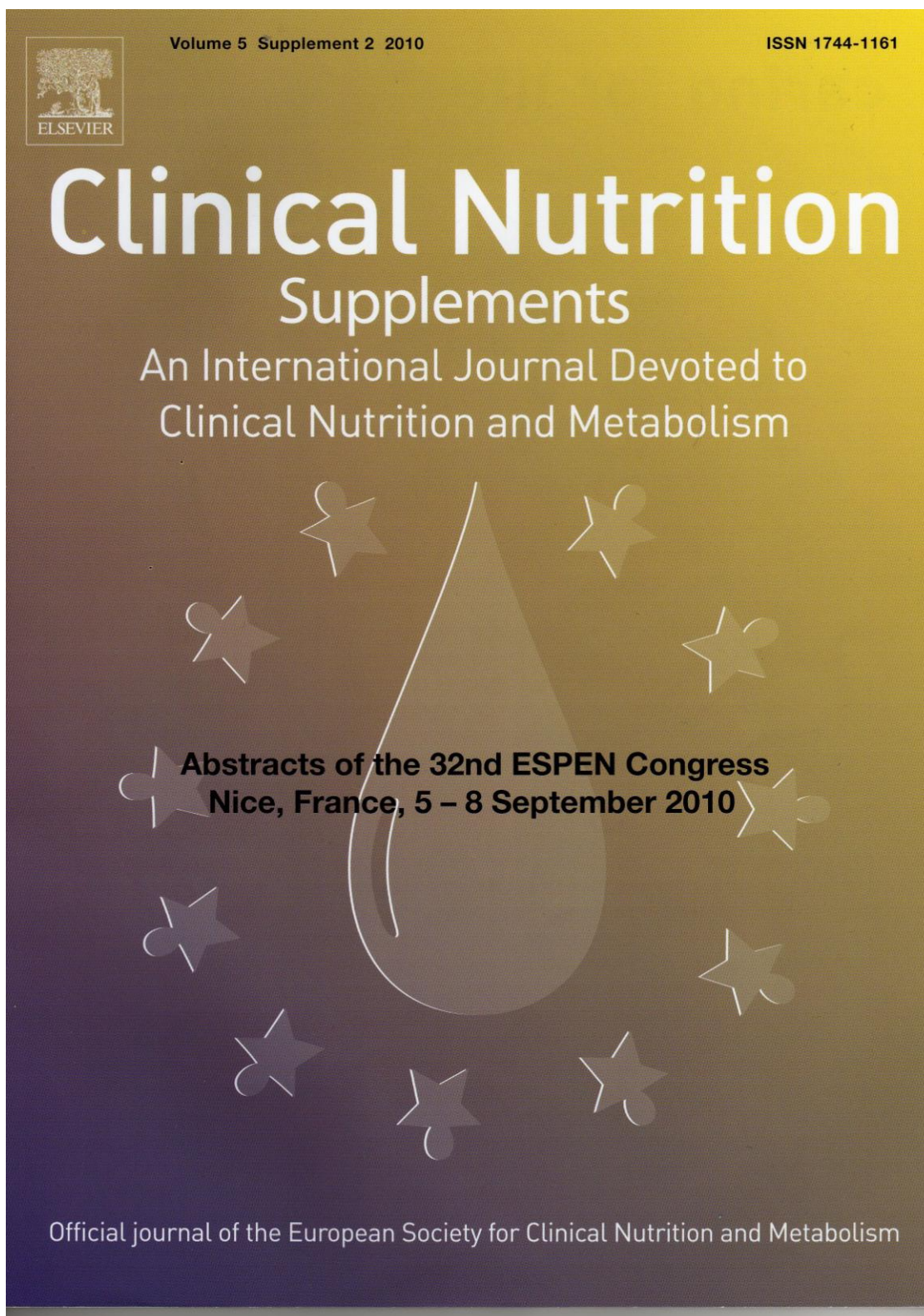
Hyspler, R., et al. Fatty Acid Composition of Human Milk of Mothers from Czech Republic. *Clinical Nutrition*, 2010, vol. 5, sup. 2, s. 74. ISSN 1744-1161.

### 10.2.

Posterová prezentace z XIV. Kongresu o ateroskleróze, konaném 9. – 11. prosince 2010 ve Špindlerově mlýně, pořádaném Českou společností pro aterosklerózu.

Hyšpler, R., a kol. *Deficitní zastoupení  $\omega$ -3 mastných kyselin v mateřském mléce českých žen*. Abstrakt bude prezentován v časopise Vnitřní lékařství.

**Příloha 10.1.**





**PP130**  
**EVALUATION OF AMARANTH PROTEIN QUALITY IN AN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL**

A. Ticha<sup>1</sup>, R. Hyspler<sup>1</sup>, Z. Zadak<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpt. of Gerontology and metabolic care, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

**Rationale:** The biological value of proteins is the decisive factor in the effect of supplemented proteins on nitrogen balance. Amaranth is considered acceptable for the gluten-free diet. The protein content of Amaranth grain is higher compared to common grains apart from soybeans. The purpose of the study was to prepare a protein with high biological value from the plant (amaranth) and compare it with casein. We observed effect on the growth and nitrogen metabolism of rats.

**Methods:** Fourteen male Wistar rats (45 day age) were separated into 2 diet groups of 7 animals each. A mixture of amaranth protein with an autolysate of yeast diet (A-Y diet) (1:1) was tested in comparison with casein protein. Daily dietary intakes and body weight (BW) of the rats were investigated over 5 weeks. Biochemical parameters of nitrogen metabolism in blood and urine and total nitrogen in the sterces of the terminal small intestine and faeces were determined.

**Results:** See the table.

Group	A-Y diet	CASEIN
BW beginning (g)	215±8	205±14
BW end (g)	392±20	360±38
Nitrogen balance	0.79±0.05	0.81±0.04
Nitrogen losses (g)	0.29±0.07	0.26±0.04
Total protein in plasma (g/l)	62.71±1.19	65.03±3.53
Albumin in plasma (g/l)	40.31±0.89	41.25±1.55
Urea in plasma (mmol/l)*	7.07±1.3	9.27±0.76
Creatinine in plasma (mmol/l)	27.57±1.4	28±3.6

Values are presented as mean±SD. \*P < 0.05.

**Conclusion:** Amaranth protein contains a high amount of the essential amino acid lysin (3 times higher than cereals and legumes). In comparison with casein, our tested A-Y diet had a similar effect on the growth curves and nitrogen metabolism. Statistically significant changes were not detected in the comparisons of both diet groups, except urea in plasma. This exchange can be explained by lower oxidative deamination of aminoacids in A-Y diet. Supported by research project MZO 00179906 and grant MPO CZ FI-IM5/098.

**Disclosure of Interest:** None declared

**PP131**  
**FATTY ACID COMPOSITION OF HUMAN MILK OF MOTHERS FROM THE CZECH REPUBLIC**

R. Hyspler<sup>1</sup>, A. Ticha<sup>1</sup>, B. Smidova<sup>2</sup>, M. Hronek<sup>1</sup>, Z. Zadak<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpt. of Gerontology and Metabolic Care, University Hospital Hradec Kralove, <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

**Rationale:** A sufficient supply of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) and especially eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in early life is

an important factor for the development of the brain and its functions. The PUFA composition of human milk varies considerably among different countries and is largely dependent on maternal diet and body stores. The aim of this study was to determine the fatty acid composition of human milk in the Czech Republic as a basis for consideration of a possible nutritional supplement recommendation.

**Methods:** Samples of human milk were obtained from mothers after the 1st, 3rd, 6th and 9th month of lactation. Fatty acids were extracted, transmethylated and their composition was determined using capillary gas-liquid chromatography. The results are expressed as the mean±SD or the median (interquartile range) of molar percentage.

**Results:** During the lactation period, the only significant changes were a decrease in dihomogamma-linolenic acid (0.382±0.065 to 0.260±0.058) and an increase in myristic acid (7.34±2.18 to 11.0±2.16) during the whole nine month period. The overall fatty acid composition is presented in the Table. The molar percentage of long chain n-3 fatty acids (EPA+DHA) was found to be only 0.2%, which is rather low compared to other populations.

Table: The median (interquartile range) of molar percentage of fatty acid groups

Saturated fatty acids	51.7 (48.7; 55.4)
Monounsaturated fatty acids	34.9 (32.6; 37.2)
Polyunsaturated fatty acids n-6	12.6 (10.5; 14.6)
Polyunsaturated fatty acids n-3 (EPA+ DHA)	0.20 (0.17; 0.25)

**Conclusion:** The EPA and DHA contents in the samples of milk obtained from Czech mothers were low compared to other populations. An additional supplementation of these fatty acids to late pregnant and lactating women should be recommended.

Supported by research project MZO 00179906 and grant MPO CZ FI-IM5/195.

**Disclosure of Interest:** None declared

**PP132**  
**COMPLIANCE AND PROTEIN INTAKE FROM A MILK-BASED DRINK DURING A 3-DAY TRIAL IN PATIENTS AT NUTRITIONAL RISK**

L.L. Kristiansen<sup>1</sup>, J.M. Sorensen<sup>1</sup>, J. Kondrup<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Department of Human Nutrition, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

**Rationale:** Studies have shown the clinical benefit of nutritional supplements in patients at nutritional risk, but compliance is often low. In particular, protein intake is often inadequate in patients at nutritional risk. The aim of this study was to determine compliance and total protein intake from drinks with varying protein content.

**Methods:** Patients (N=20) at nutritional risk (NRS-2002) were randomised and single-blinded to receive 3 x 200 g daily of either a milk-based 5.7% (g protein) Protin<sup>®</sup> Standard (PS) drink or a milk-based 10.2% (g protein) Protin<sup>®</sup> Plus (PP) drink for three days (Arla Foods, Denmark). PP consisted of Protin<sup>®</sup> Standard to which whey (LACPRODAN DI-9224<sup>®</sup>, Arla Foods, Denmark) had



## DEFICITNÍ ZASTOUPENÍ $\omega$ -3 MASTNÝCH KYSELIN V MATEŘSKÉM MLÉČE ČESKÝCH ŽEN

Radomír Hyšpler<sup>1</sup>, Alena Tichá<sup>1</sup>, Barbora Šmídová<sup>2</sup>, Miloslav Hronek<sup>1</sup>, Zdeněk Zadák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika gerontologická a metabolická, Fakultní nemocnice Hradec Králové  
<sup>2</sup> Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

### Úvod

Dostatečný příjem  $\omega$ -3 mastných kyselin, především eicosapentaenové (EPA) a docosahexaenové kyseliny (DHA) v mateřském mléce je důležitým faktorem podmiňujícím zdravý vývoj dítěte. Zvláště DHA (22:6  $\omega$ -3) je nezbytná pro vývoj mozku a sítnice. Její zásoby v tukových depozitech matky stoupají v první polovině těhotenství a následně jsou uvolňovány pro potřeby plodu, především rychle rostoucího mozku, v druhé polovině těhotenství a potom i do mateřského mléka (1,2). V případě jejího relativního nedostatku v dietě matky jsou tyto zásoby rychle vyčerpány. Zastoupení této mastné kyseliny v mateřském mléce se liší v různých zemích dle dietních návyků (především míry konzumace tučných ryb) a její deficit může vést k suboptimálnímu zásobování dětského organismu tímto esenciálním nutriem (3).

### Cíl

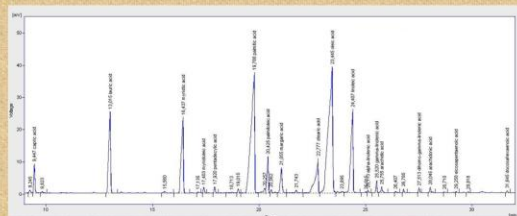
Cílem práce bylo stanovení zastoupení mastných kyselin v mateřském mléce českých žen jako podklad pro případná dietní doporučení.

### Metodika

Mateřské mléko bylo získáno od matek po jednom, třech, šesti a devíti měsících laktace a důkladně homogenizováno. Vzorky byly skladovány při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Spektrum mastných kyselin bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie (GC 8000, Fisons Instruments, United Kingdom, obr. 1) po transmethylaci katalyzované acetylchloridem a extrakci do toluenu (4). Výsledky jsou prezentovány jako medián (interkvartilový interval) nebo průměr  $\pm$  standardní odchylka molárního procenta dané mastné kyseliny (skupiny).

### Výsledky

V průběhu sledovaného období laktace byl zjištěn pokles zastoupení kyseliny dihomu- $\gamma$ -linolenové (z  $0,382 \pm 0,065$  na  $0,260 \pm 0,058$  %, obr. 2) a vzestup zastoupení kyseliny myristové (z  $7,34 \pm 2,18$  na  $11,0 \pm 2,16$  %, obr. 3) v průběhu celé devítiměsíční periody. Celkové složení vzorků mateřského mléka je prezentováno v Tab. 1. Zastoupení  $\omega$ -3 polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (EPA+DHA) představovalo pouze 0,20 (0,17; 0,25) %, což tvoří ve srovnání s přímořskými populacemi přibližně polovinu (1).

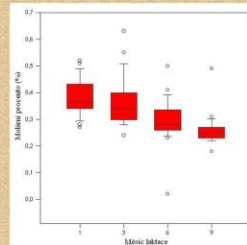


Obr. 1 Chromatogram analýzy methylesterů mastných kyselin z mateřského mléka

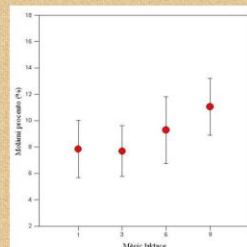
Saturované mastné kyseliny	51.7 (48.7; 55.4)
Mononenasycené mastné kyseliny	34.9 (32.6; 37.2)
Polynenasycené mastné kyseliny $\omega$ -6	12.6 (10.5; 14.6)
Polynenasycené mastné kyseliny $\omega$ -3 (EPA+ DHA)	0.20 (0.17; 0.25)

Tab. 1 Medián (interkvartilový interval) molárního procenta základních skupin mastných kyselin

Obr. 2 Změny dihomu- $\gamma$ -linolenové kyseliny během laktace



Obr. 3 Změny myristoové kyseliny během laktace



### Závěr

Obsah  $\omega$ -3 polynenasycených mastných kyselin ve zkoumaných vzorcích mateřského mléka byl nízký ve srovnání s jinými populacemi, což může vést k řadě negativních důsledků. Těhotným a kojícím ženám by měla být doporučována zvýšená konzumace výrobků z rybiho masa, případně dietní suplementace rybím tukem.

Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906.

### Literatura

- Bergmann RL et al Supplementation with 200 mg/Day Docosahexaenoic Acid from Mid-Pregnancy through Lactation Improves the Docosahexaenoic Acid Status of Mothers with a Habitually Low Fish Intake and of Their Infants. *Ann Nutr Metab* 2008;52:157–166.
- Herrera E et al Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006; 65:S59–S64.
- Holman RT, Johnson SE, Osburn PL Deficiency of essential fatty acids and membrane fluidity during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4835–4839.
- Lepage G, Roy CC Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1996;27(1):114-20.