

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Klinická a toxikologická analýza

**SROVNÁNÍ RŮZNÝCH ZPŮSOBŮ METHYLACE
MASTNÝCH KYSELIN
COMPARISON OF VARIOUS METHYLATION PROCEDURES
OF FATTY ACIDS**

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc

Konsultant: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Praha 2008

Petra Vaindlová

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 125 B/08 stud
(anal.)*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a RNDr. Evy Tvrzické, CSc a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne...*3.9.2008*.....

Barbora
.....
podpis

Chtěla bych poděkovat Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za poskytnutí možnosti a Prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc. za umožnění realizace této práce ve Výzkumné angiologické laboratoři IV. interní kliniky 1. LF UK. Velké poděkování dále patří RNDr. Evě Tvrzické, CSc. za odborné vedení, cenné rady, velkou ochotu a trpělivost; Mgr. Barboře Staňkové za užitečné připomínky a rady, také pomoc, ochotu a trpělivost, kterou se mnou měla. Rovněž i celému kolektivu Výzkumné angiologické laboratoře IV. interní kliniky za milé přijetí.

Ještě bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich velkou podporu a pomoc a to nejen během studia. Všichni uvedení velkou měrou přispěli a bez jejich pomoci by tato práce nevznikla.

SEZNAM ZKRATEK

AI	Atherogenní index
EFA	Esenciální mastná kyselina
EPA	Eikosapentaenová kyselina
FA	Mastná kyselina
GC	Plynová chromatografie
HDL	Lipoproteiny o velké hustotě
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICHS	Ischemická choroba srdeční
LCFA	Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDL	Lipoproteiny o malé hustotě
MCFA	Mastné kyseliny se středním řetězcem
MCT	MCFA obsahující triglyceridy
MFA	Mononenasyčené MK
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NEFA	Neesterifikované mastné kyseliny
PUFA	Vícenenasyčené mastné kyseliny
RSD	Relativní směrodatná odchylka
RT	Retenční čas
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SFA	Nasyčené mastné kyseliny
TI	Trombogenní index
VLCFA	Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1. Mastné kyseliny	5
2.1.1. Biosynthesa	7
2.1.2. Klasifikace a biologická funkce	8
2.1.3. Fyzikálně chemické vlastnosti	10
2.2. Analytický přístup	11
2.2.1. Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií	11
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
3.1. Použité chemikálie	13
3.2. Přístrojové vybavení	13
3.3. Pracovní postupy	13
3.3.1. Příprava methylesterů mastných kyselin transmethylocí MeONa	14
3.3.1.1. Vliv doby a teploty	14
3.3.1.2. Vliv separace triglyceridů na tenké vrstvě	14
3.3.1.3. Vliv přidání kyseliny sírové	14
3.3.1.4. Vliv separace methylesterů a kyselin na tenké vrstvě	14
3.3.2. Příprava methylesterů mastných kyselin za kyselých katalysů	15
3.3.2.1. Vliv doby methylocce volných kyselin	15
3.3.2.2. Vliv doby methylocce triglyceridů za katalysů BF ₃	15
3.3.2.3. Vliv doby methylocce triglyceridů za katalysů H ₂ SO ₄	15
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	16
4.1. Transmethylocce methoxidem sodným – vliv doby a teploty reakce	16
4.2. Vliv separace tenkovrstevnou chromatografií a přítomnosti materiálu tenké vrstvy na výsledek transmethylocce	19
4.3. Přímá methylocce volných kyselin fluoridem boritým	22
4.4. Transmethylocce triglyceridů za kyselých katalysů	22
5. ZÁVĚR	25
6. LITERATURA	26

1. ÚVOD

Mastné kyseliny (FA) jsou strukturní součástí lipidů, které spolu s bílkovinami a uhlovodany představují základní stavební kameny živé hmoty. Termín lipid pochází z řeckého slova lipos = tuk a používá se obecně pro všechny přírodní nepolární sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v organických rozpouštědlech, např. v chloroformu, ethanolu, etheru apod. Z důvodu strukturní i funkční rozmanitosti lipidů není možné formulovat přesnější definici tohoto pestrého souboru biologicky aktivních látek (1).

Fysiologická funkce lipidů:

- hlavní zásobárna uhlíku a energie
- ochranný obal organismů či buněk vůči infekci nebo dehydrataci
- isolační bariéra vůči teplotnímu, elektrickému nebo jinému fyzikálnímu šoku
- součást buněčných membrán
- prekursory dalších důležitých látek (vitaminů, hormonů, regulačních látek)

Z hlediska strukturního lze lipidy rozdělit do tří hlavních skupin (viz tab.1):

- jednoduché lipidy
- složené lipidy
- odvozené lipidy

Patofysiologické působení FA přímo souvisí s úlohou jednotlivých lipidů. V lidském (obecně savčím) organismu rozlišujeme lipidy na cirkulující a membránové.

Cirkulující lipidy ve formě lipoproteinů se skládají z esterů cholesterolu (60-70% celkového cholesterolu) a triglyceridů v nepolárním jádru a z fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a volného cholesterolu v polárním obalu. Neesterifikované FA (produkty lipolysy a zdroj pro syntézu lipidů) jsou v plasmě vázány na albumin. Za fyziologických podmínek jsou přítomny pouze ve velmi nízkých koncentracích. Zvýšené koncentrace NEFA působí toxicky na plasmatické membrány, což může mít za následek arytmie a protrombogenní účinky. V kombinaci se zvýšenou koncentrací glukózy urychlují vznik reaktivních kyslíkatých a dusíkatých sloučenin (2). Membránové lipidy, které zajišťují fluiditu i další funkce membrán, zahrnují jako hlavní fosfolipidové třídy fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, sfingomyelin a jako minoritní fosfolipidy fosfatidylserin, fosfatidylinositol, lysofosfatidylcholin a lysofosfatidylethanolamin (2). Složení FA jednotlivých lipidových tříd výrazně ovlivňuje fluiditu membrán, vedle dalších faktorů (poměr protein/lipid a poměr cholesterol/glycerofosfolipid).

Tab. 1: Přehled lipidů

JEDNODUCHÉ LIPIDY
1. Acylglyceroly → glycerol, mastné kyseliny
2. Vosky → alkohol (např. cetyl- a myricylalkohol), mastné kyseliny (dlouhé řetězce)
SLOŽENÉ LIPIDY
3. Glykoacylglyceroly → sacharid, glycerol, mastné kyseliny
4. Fosfoacylglyceroly → glycerol, mastné kyseliny, $H_2PO_4^{2-}$, organické sloučeniny: cholin, ethanolamin, serin, inositol, glycerol apod.
5. Sfingomyeliny → sfingosin, mastné kyseliny, $H_2PO_4^{2-}$, cholin
6. Cerebrosidy → sfingosin, mastné kyseliny, sacharidy
7. Gangliosidy → sfingosin, mastné kyseliny, sacharidy, kyselina sialová
ODVOZENÉ LIPIDY
8. Prostaglandiny
9. Steroidy
10. Karotenoidy
11. Lipofilní vitaminy

Pozn.: skupiny 4 a 5 jsou někdy díky přítomnosti fosfátu též označovány jako fosfolipidy; skupiny 5,6 a 7 jsou někdy díky přítomnosti sfingosinu označovány jako sfingolipidy; skupiny 6 a 7 jsou někdy díky přítomnosti cukrů označovány jako glykolipidy; skupiny 9 a 10 patří díky stavební jednotce isoprenu do skupiny terpenů (isoprenoidů); šipka naznačuje směr hydrolýsy

Pro metabolické studie je velmi důležité dostatečně přesné i správné stanovení profilu FA. Pro obě využitelné metody – GC i HPLC – je třeba provést derivatisaci. V případě GC jsou nejvýhodnější methylestery FA, vzhledem k nejnižšímu bodu varu. Druh methylačního činidla i reakční podmínky mohou ovlivnit výsledek analýsy. Tomuto problému je věnována předkládaná bakalářská práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mastné kyseliny

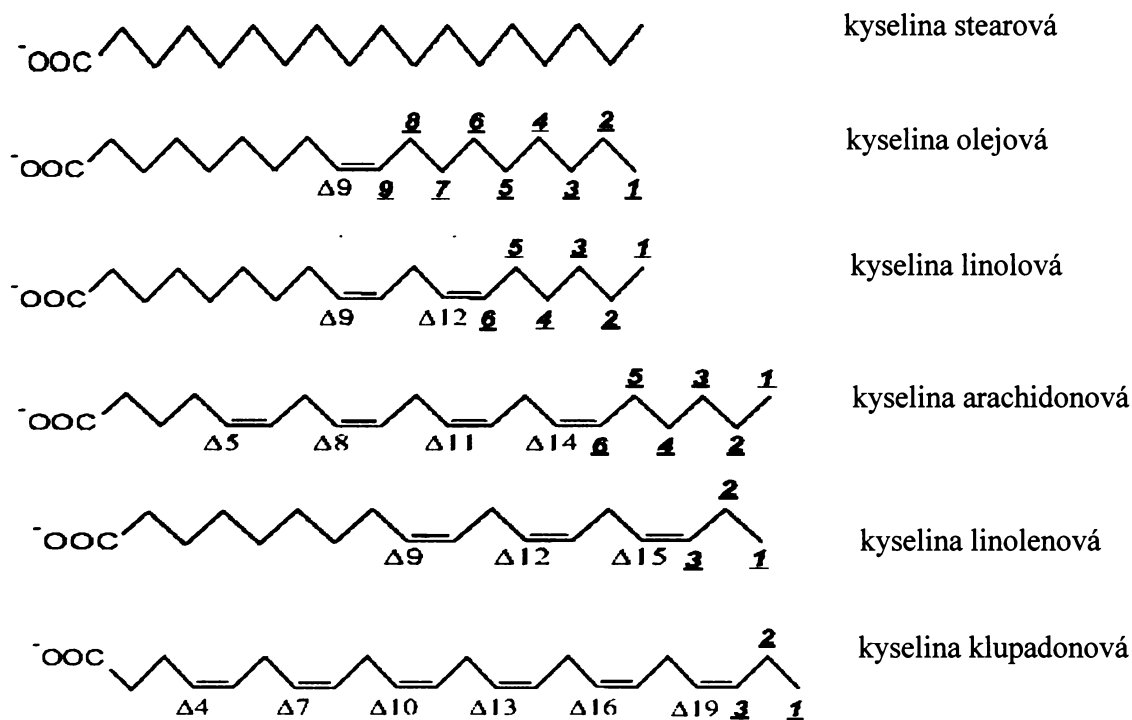
Mastné kyseliny jsou základní složkou jednoduchých a složených lipidů (i některých odvozených), neboť právě jejich výrazná hydrofobicita je odpovědná za celkový hydrofobní charakter molekuly lipidu. První je izoloval roku 1818 francouzský chemik M. E. Chevreul. V přírodě se vyskytuje více než 100 mastných kyselin. Název mastná kyselina má původ v jejich hlavním zdroji – tuku (tučný = mastný). Chemicky jsou mastné kyseliny alifatické monokarboxylové kyseliny. Jedná se o poměrně širokou skupinu látek, kterou lze klasifikovat z několika hledisek podle charakteru uhlíkatého řetězce (1).

Mastné kyseliny můžeme rozdělit podle charakteru uhlíkatého řetězce:

- lineární, větvené nebo alicyklické
- nasycené nebo nenasycené (mono-, di- nebo polynenasycené)
- s konfigurací dvojných vazeb *cis* nebo *trans*

Mastné kyseliny jsou velmi často vyjadřovány schematickým vzorcem CN:p n-x, kde CN (uhlíkové číslo, carbon number) představuje celkový počet atomů uhlíku, p – počet dvojných vazeb, x – polohu první dvojně vazby od methylové skupiny (n). Strukturální vzorce a značení vybraných FA jsou uvedeny na obr. 1. Mastné kyseliny relevantní pro metabolické pochody jsou přehledně uvedeny v Tab. 2 (3).

Obr. 1: Strukturální vzorce mastných kyselin



Tab. 2: Přehled mastných kyselin

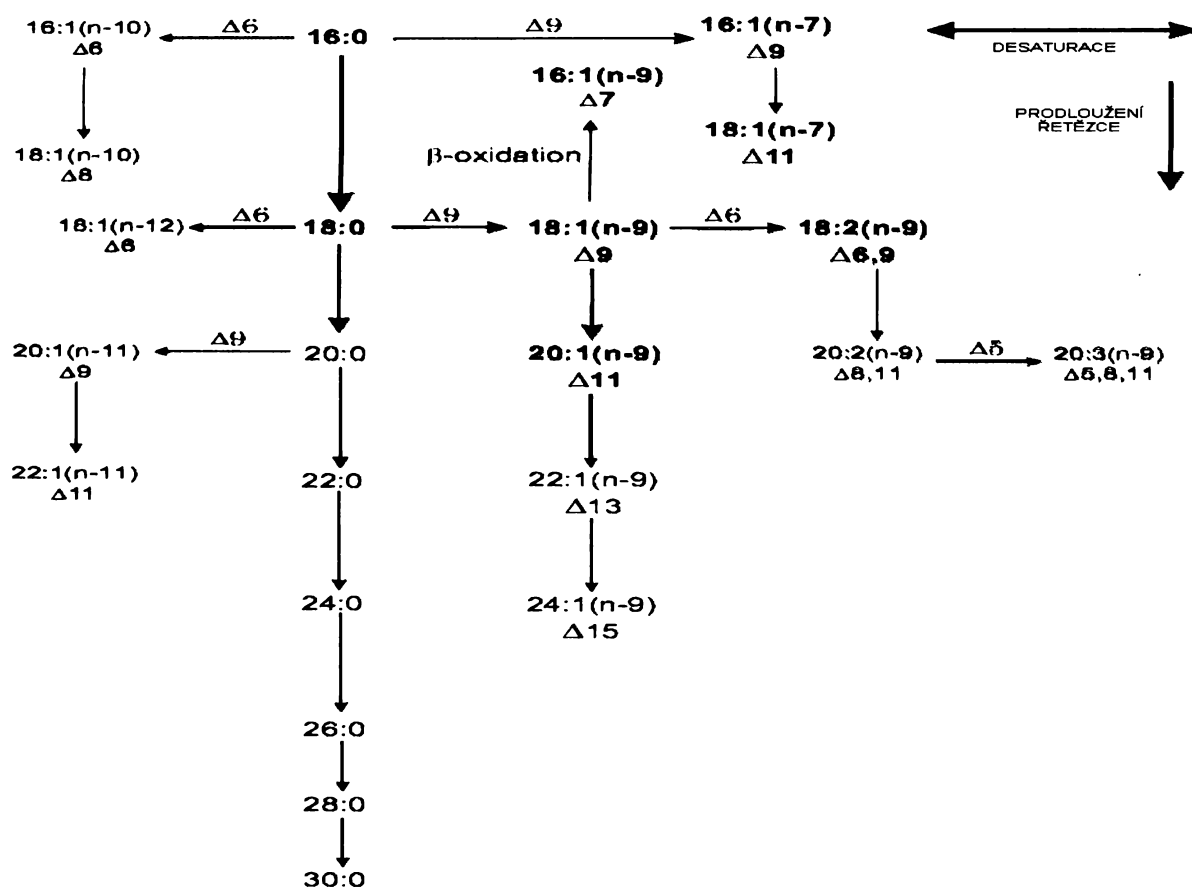
Značení	Systematický název (IUPAC)	Triviální název	Zkratka
12:0	dodekanová	laurová	
14:0	tetradekanová	myristová	MA
14:1n-5	<i>cis</i> -9-tetradecenová	myristolejová	MOA
16:0	hexadekanová	palmitová	PA
16:1n-9	<i>cis</i> -7-hexadecenová		
16:1n-7	<i>cis</i> -9-hexadecenová	palmitolejová	POA
18:0	octadekanová	stearová	SA
18:1n-9	<i>cis</i> -9-octadecenová	olejová	OA
18:1n-7	<i>cis</i> -11-octadecenová	vakcenová	VA
18:2n-6	<i>cis, cis</i> -9,12-octadekadienová	linolová	LA
18:3n-6	<i>cis, cis, cis</i> -6,9,12-oktadekatrienová	γ -linolenová	GLA
18:3n-3	<i>cis, cis, cis</i> -9,12,15-oktadekatrienová	α -linolenová	ALA
18:4n-3	<i>cis, cis, cis, cis</i> -6,9,12,15-oktadekatetraenová	stearidonová	
20:0	eikosanová	arachová	
20:1n-11	<i>cis</i> -9-eikosenová	gondolová	
20:1n-9	<i>cis</i> -11-eikosenová	gondoová	
20:2n-6	<i>cis, cis</i> -11,14-eikosadienová		
20:3n-9	<i>cis, cis, cis</i> -5,8,11-eikosatrienová	Meadova	
20:3n-6	<i>cis, cis, cis</i> -8,11,14-eikosatrienová	dihomo- γ -linolenová	DHGLA
20:4n-6	<i>cis, cis, cis, cis</i> -5,8,11,14-eikosatetraenová	arachidonová	AA
20:5n-3	<i>cis, cis, cis, cis, cis</i> -5,8,11,14,17-eikosapentaenová	timnodonová	EPA
22:0	dokosanová	behenová	
22:1n-11	<i>cis</i> -11-dokosenová	cetolová	
22:1n-9	<i>cis</i> -13-dokosenová	eruková	
22:4n-6	<i>cis, cis, cis, cis</i> -7,10,13,16-dokosatetraenová	adrenová	DTA
22:5n-3	<i>cis, cis, cis, cis, cis</i> -7,10,13,16,19-dokosapentaenová		DPA-3
22:5n-6	<i>cis, cis, cis, cis, cis</i> -4,7,10,13,16-dokosapentaenová		DPA-6
22:6n-3	<i>cis, cis, cis, cis, cis, cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	klupadonová	DHA
24:0	tetrakosanová	lignocerová	
24:1n-9	<i>cis</i> -15-tetrakosenová	nervonová	NA
26:0	hexakosanová	cerotová	
28:0	oktakosanová	montanová	
30:0	triakontanová	melissová	

2.1.1 Biosynthesa

Mastné kyseliny jsou syntetisovány z dvouuhlíkatých nebo tříuhlíkatých prekursorů za účasti přenašeče acylových skupin, NADPH a acetyl-CoA-karboxylasy. Odbourávání FA β -oxidací v mitochondriích je doprovázeno uvolněním energie. V lidské krevní plasmě a tkáních bylo identifikováno asi 60 FA, z biologického hlediska jsou relevantní pouze některé z nich. Složení FA je charakteristické jak pro jednotlivé živočišné druhy, tak i pro jednotlivé tkáně.

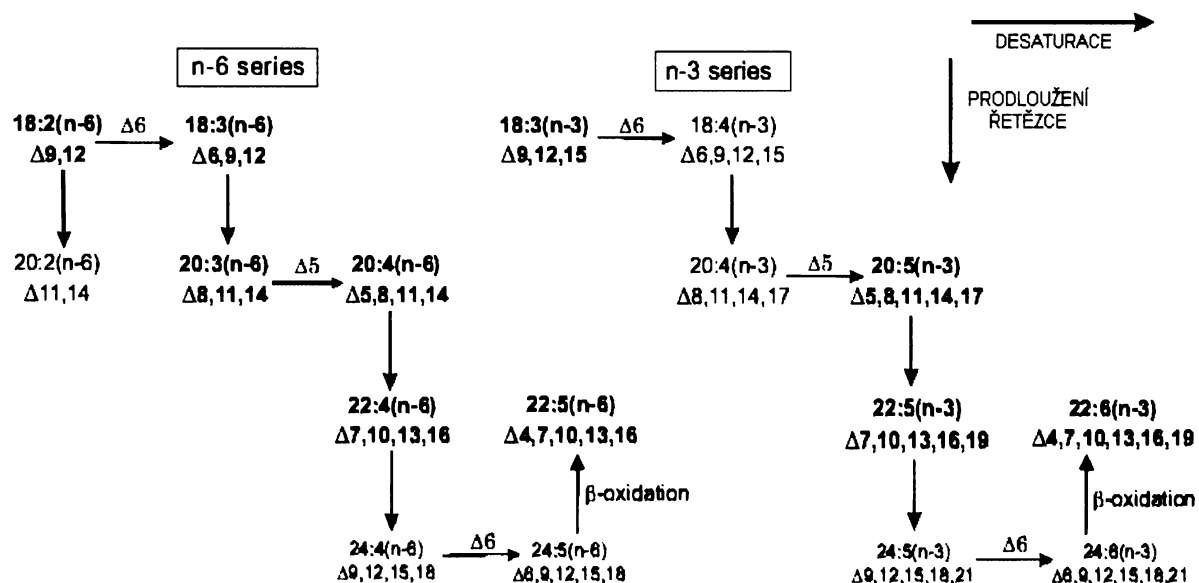
Lidské (obecně savčí) tkáně jsou schopny syntetisovat nasycené FA (SFA) převážně s rovným řetězcem a sudým počtem atomů uhlíku. Mononenasycené FA (MFA) vznikají zavedením dvojné vazby do polohy $\Delta 9$ od uhlíkového atomu karboxylové skupiny. Reakce je katalysována enzymem $\Delta 9$ desaturasou. Z kyseliny stearové (18:0) tak vzniká kyselina olejová (18:1 n-9), u kyseliny palmitové (16:0) kyselina palmitolejová (16:1 n-7). Další desaturací ($\Delta 6$, $\Delta 5$) a elongací kyseliny olejové vzniká Meadova kyselina (20:3 n-9), kterou lidský organismus produkuje pouze při nedostatku esenciálních FA (EFA). Elongace a desaturace endogenních FA je uvedena na Obr.2 (3).

Obr. 2:



Vícenenasycené FA (PUFA) obsahují 2-6 dvojných vazeb v pentadienovém uspořádání. Esenciální FA mají první dvojnou vazbu na třetím (řada n-3) nebo šestém (řada n-6) uhlíkovém atomu od methylové skupiny. Tyto kyseliny není schopen organismus syntetisovat a je zcela závislý na dietním přísunu. Základními prekursory EFA jsou kyselina linolová (18:2 n-6) pro řadu n-6 a kyselina α -linolenová (18:3 n-3) pro řadu n-3. Metabolickou přeměnu EFA ukazuje přehledně Obr. 3 (3).

Obr. 3:



2.1.2 Klasifikace a biologické funkce

Mastné kyseliny rozdělujeme do několika skupin na základě jejich struktury, fyziologické úlohy a biologických účinků.

Nasycené mastné kyseliny dělíme do podskupin podle délky uhlíkového řetězce:

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids, SCFA) zahrnují kyselinu octovou (2:0), propionovou (3:0) a máselnou (4:0); tyto kyseliny vznikají během fermentace vlákniny v tlustém střevě. Kyselina máselná a částečně i propionová jsou využívány v metabolismu kolonocytů (množení a obnova buněk) (4).

Mastné kyseliny se středním řetězcem (medium chain fatty acids, MCFA) zahrnují kyselinu kapronovou (6:0), kaprylovou (8:0) a kaprinovou (10:0), které jsou přímo resorbovány a transportovány portální žílou. Tukové emulze obsahující triglyceridy s MCFA (medium chain triglycerides, MCT) jsou využívány jako nutriční podpora, vzhledem k jejich kratšímu biologickému poločasu a vyšší stabilitě vůči lipoperoxidaci (5).

Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain fatty acids, LCFA) zahrnují kyselinu laurovou (12:0), myristovou (14:0), palmitovou (16:0) a stearovou (18:0), které mají významný atherogenní a trombogenní potenciál. Tyto kyseliny představují 80-90% celkových SFA přijímaných potravou. Jejich rostlinným zdrojem je především kokosový olej, palmový olej a kakaové máslo. Potravním zdrojem LCFA z živočišné říše je máslo, vepřové sádlo a hovězí lůj. Pravidelná konzumace LCFA zvyšuje hladinu cholesterolu, především cholesterolu v lipoproteinu LDL, který souvisí se zvýšenou úmrtností na ischemickou chorobu srdeční (ICHS) (6).

Atherogenní a trombogenní potenciál lze vyjádřit jako atherogenní index (AI) a trombogenní index (TI) (7):

$$AI = [12:0 + 4 \times 14:0 + 16:0] \times [PUFAn-6 + PUFAn-3 + MFA]^{-1};$$

$$TI = [14:0 + 16:0 + 18:0] \times [0.5 \times MFA + 0.5 \times PUFA \text{ n-6} + 3 \times PUFAn-3 + PUFAn-3 / PUFAn-6]^{-1}$$

Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long chain fatty acids, VLCFA) zahrnují kyselinu arachovou (20:0), behenovou (22:0), lignocerovou (24:0), cerotovou (26:0), montanovou (28:0) a melissovou (30:0), které jsou obsaženy v měřitelných koncentracích v krevním séru osob s vrozenými metabolickými poruchami (8).

Mononenasyčené mastné kyseliny v cis konfiguraci: hlavními představiteli jsou kyselina olejová (18:1n-9), vakcenová (18:1n-7) a palmitolejová (16:1n-7). Endogenní původ mají dále kyseliny myristolejová (14:1n-5), gondoová (20:1n-9), eruková (22:1n-9) a nervonová (24:1n-9c), které jsou přítomny pouze v minoritním zastoupení. Exogenního původu jsou kyseliny gadolová (20:1n-11), eruková a cetolová (22:1n-11). Kyselina eruková, která je hojně zastoupena v oleji nekultivované řepky olejné, je považována za kardiotoxickou (9). Kyselina olejová v dietě má antiatherogenní i antitrombotické účinky (zvyšuje poměr HDL-C/LDL-C, snižuje agregabilitu destiček). Inkorporace kyseliny olejové do plasmatických lipidů (esterů cholesterolu, triglyceridů a fosfolipidů lipoproteinových částic) zvyšuje jejich odolnost vůči lipoperoxidaci. Kyselina olejová je hojně obsažena v olivovém, saflorovém a řepkovém oleji (6).

Mononenasyčené mastné kyseliny v trans konfiguraci (trans-FA): hlavními představiteli jsou kyselina elaidová (18:1n-9t) a trans-vakcenová (18:1n-7t). Pro lidský organismus jsou trans-FA exogenními kyselinami, jejichž atherogenní účinek je vyšší než u SFA. Hlavním zdrojem kyseliny elaidové v potravě jsou margaríny a ztužené pokrmové tuky, kyselina trans-vakcenová se nachází v másle a dalších mléčných výrobcích (vzniká působením

bakterií v zažívacím traktu přežvýkavců). Trans MFA jsou asi dvakrát účinnější pro vzrůst LDL-cholesterolu a snížení HDL-cholesterolu než SFA (10).

Vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA): obsahují dvě a více dvojných vazeb v molekule. Jsou výhradně exogenního původu a rozdělují se do dvou skupin: řady n-3 a řady n-6. Mají výrazný antiatherogenní i antitrombotický účinek. Přítomnost většího počtu dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny však zvyšuje možnost lipoperoxidace.

Vícenenasycené FA řady n-3: mateřskou kyselinou je kyselina α -linolenová (ALA, 18:3n-3); hlavními metabolickými produkty jsou kyseliny timnodonová (eikosapentaenová, EPA, 20:5n-3) a klupadonová (dokosahexaenová, DHA, 22:6n-3). Tyto kyseliny mají v organismu řadu příznivých účinků (snížení koncentrací krevních lipidů, zvýšení imunity). Zdrojem kyseliny α -linolenové jsou semena a listy některých rostlin (soja, len, černý rybíz, brutnák). Konverze ALA na její metabolity s 20-22 CN je podstatně efektivnější u mořských živočichů než u člověka, a proto jsou EPA a DHA v lidském organismu také převážně exogenního původu (6).

Vícenenasycené FA řady n-6: mateřskou kyselinou je kyselina linolová (LA, 18:2n-6), jejími hlavními metabolickými produkty jsou kyselina γ -linolenová (GLA, 18:3n-6), dihomog γ -linolenová (DHGLA, 20:3n-6) a arachidonová (AA, 20:4n-6). Suplementace PUFA n-6 vede k poklesu celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a ke zvýšené oxidabilitě částic LDL. PUFA n-6 zvyšují inzulínovou senzitivitu, mění distribuci tuku a velikost adipocytů. Kyselina arachidonová je hlavním prekursorem eikosanoidů. Vysoký obsah PUFA n-6 (>60%) má olej sojový, slunečnicový, pupalkový a saflorový. Nižší obsah (40-50%) má olej z pšeničných klíčků, kukuřice, vlašských ořechů a sezamu (6).

2.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti

Mastné kyseliny výrazně ovlivňují chemické a fyzikálně chemické vlastnosti lipidů, jejichž jsou součástí:

- nasycené mastné kyseliny vedou k vyšší chemické stabilitě a k vyššímu bodu tání lipidů
- nenasyčené mastné kyseliny snižují chemickou stabilitu a bod tání lipidů
- poloha dvojných vazeb: čím blíže ke karboxylové skupině, tím více snižuje chemickou stabilitu a bod tání

Nasycené mastné kyseliny s řetězcem C4 až C10 jsou kapalné a dobře stravitelné. Volné nepříjemně zapáchají.

Nasycené mastné kyseliny s řetězcem C12-C20 při pokojové teplotě tuhnou a jsou hůře stravitelné. Jsou stabilní a k autooxidaci dochází až při vyšších teplotách.

Dvojně vazby mají za fyziologických podmínek převážně *cis*-konfiguraci, která způsobuje ohyb uhlíkového řetězce pod úhlem 60° (2). Tato vlastnost určuje sterické uspořádání řetězce, snižuje van der Waalsovy interakce a tím i bod tání.

Rozpustnost FA ve vodě s rostoucí délkou řetězce klesá. Ve zředěných roztocích jsou FA přítomny jako monomery, ve vyšších koncentracích (nad hodnotou tzv. kritické micelární koncentrace) pak tvoří micely. V micelách jsou karboxylové skupiny orientovány směrem do vodné fáze, zatímco hydrofobní alifatická část je orientována dovnitř micely (11).

2.2 Analytický přístup

Zjištění složení FA je jednou z nejčastějších analyz při sledování lipidového metabolismu. Podle charakteru a potřeb studie se provádí buď v extraktu celkového lipidu, nebo v jednotlivých lipidových třídách separovaných tenkovrstevnou nebo kapalinovou chromatografií. Stanovovány jsou obvykle pouze ty FA, které v metabolismu mají významnou roli (v biochemických a biomedicinských studiích obvykle pouze sudé, s CN 12 – 22). Analyzovat lze v podstatě dvěma metodami - GLC nebo HPLC, pro každou z nich je nutná předchozí derivatisace. Pro GLC jsou FA převáděny nejčastěji na methylestery za alkalické či kyselé katalýzy (např. methoxid sodný, fluorid boritý, acetylchlorid, methyl chloroformát, kyselina sírová) (3); pro HPLC jsou derivatisovány chromofory pro detekci UV (např. fenacylbromid, 2-bromo-2'-acetonafon, 2-nitrofenylhydrazin, dibromoacetofenon, 1-naftylamin) nebo fluorescenční (např. panacylbromid, 9-anthryldiazomethan, 9-(2-hydroxyethyl)-karbazol, 9-bromomethylakridin, 4-methyl-7-methoxykumarin) (12). Nadále se budeme věnovat plynové chromatografii, kterou byla provedena tato studie.

2.2.1 Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií

Pro stanovení GLC se používají kolony střední či vysoké polarity (25-30, resp. 50-100 m). U středně polárních kolon je pořadí eluce určeno délkou řetězce a stoupajícím počtem dvojných vazeb, např. retenční čas (RT) kyseliny stearidonové je menší než RT kyseliny arachové. Jejich poměrně vysoký teplotní limit umožňuje i eluci sterolů při analýze sterolesterů, nelze však oddělit isomery v konfiguraci *trans*. Ty mohou být analyzovány na velmi polárních kolonách, které mají nižší teplotní limit, *trans*-isomery jsou eluovány před příslušnými *cis*-isomery, pro stejné CN roste RT s počtem dvojných vazeb, ale pořadí eluce je ovlivněné ještě dalšími faktory ($RT_{FA\ 20:0} < RT_{FA\ 18:3\ n-3}$) (3).

Závislost odezvy detektoru na analyzovaném množství je lineární v širokém rozmezí koncentrací; obsah složek bývá většinou stanovován jako relativní molární procento, méně často je určován absolutně metodou vnitřního standardu podle následujícího vztahu:

$$c_i = c_{is} \cdot A_i \cdot A_{is}^{-1} \cdot RRF_{\text{theor}}^{-1}$$

kde c_i koncentrace stanovované složky, c_{is} koncentrace vnitřního standardu, A_i je plocha píku stanovované složky, A_{is} plocha píku vnitřního standardu, RRF_{theor} je teoretický poměr ploch píků složky a vnitřního standardu vypočtený podle počtu aktivních methylenových skupin (3).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Methanol pro chromatografii (<i>Chromservis, ČR</i>)
Heptan pro HPLC (<i>Chromservis, ČR</i>)
Diethylether (<i>Chromservis, ČR</i>)
Kyselina octová (<i>Chromservis, ČR</i>)
Hexan pro HPLC (<i>Chromservis, ČR</i>)
Methoxid sodný (Sigma, SRN)
Fluorid boritý (Sigma, SRN)
Kyselin sírová (Lachema, ČR)
Hydroxid sodný (Lachema, ČR)
Uhličitan sodný (Lachema, ČR)
Voda (Millipore, ČR)
Silikagel 60PF ₂₅₄₊₃₆₆ (Merck, SRN)

3.2 Přístrojové vybavení

Plynový chromatograf GC-17A (Shimadzu, Japonsko)
Autosampler AOC-20i (Shimadzu, Japonsko)
Vakuová sušárna (Cole Parmer, USA)
Koncentrátor vzorků Termovap TV 10+ (Ecom, ČR)
Chlazená centrifuga K 23 D (Janetzki, SRN)
Vortex mixer „Lab dancer“ (IKA, USA)
Zahřívací lázeň Reacti-Therm (Pierce, USA)

3.3 Pracovní postupy

Jako zkušební vzorek pro otestování laboratorních postupů byl použit rybí olej z potravního doplňku Soma Omega 3 (Georg Geyer GmbH, SRN) rozpuštěný v heptanu o koncentraci 20 mg/ml. Rybí olej má vysoký obsah PUFA, které se za zvýšené teploty při reakci mohou rozkládat a tím zkreslit výsledky analys. Pro stanovení jsme odměřovali 100 nebo 200 µl základ-

ního roztoku (2 nebo 4 mg oleje) podle charakteru analyzy a pracovali v seriích s 6 nebo 8 vzorky.

3.3.1 Příprava methylesterů mastných kyselin transmethylací MeONa

3.3.1.1 Vliv doby a teploty -3 serie po 8 vzorcích (2 mg)

Ke každému vzorku přidáme 1 ml 1 M methoxidu sodného v methanolu, vyubláme dusíkem k odstranění rozpuštěného kyslíku, a inkubujeme v temnu za těchto podmínek:

1. 60 min při lab. teplotě
2. 5 min při 60°C
3. 30 min při 60°C

Přidáme postupně 2 ml hexanu a 2 ml 1 M kyseliny octové, promixujeme, vrchní organickou frakci přeneseme do zkumavky a vysušíme ve vakuu. Dále rozpustíme v 100 µl heptanu, přeneseme do chromatografických nádobek pro autosampler a analyzujeme. Po analýze GLC nanese na tenkou vrstvu a vyvineme v systému heptan-diethylether-kyselina octová 80:20:2 (v/v/v) pro kontrolu úplnosti transmethylace, visualisujeme jodem.

3.3.1.2 Vliv přidání kyseliny sírové - 2 serie po 8 vzorcích (2 mg)

Vzorky inkubujeme 20 min při 80°C v 1 ml 1 M methoxidu sodného, jak je běžné pro estery cholesterolu, kdy může docházet k hydrolyse na volné kyseliny vlivem stop vlhkosti v činidle. Přidání H₂SO₄ katalyzuje methylaci volných kyselin. K 1. serii přidáme 0,1 ml a k 2. serii 0,2 ml koncentrované H₂SO₄, vyubláme dusíkem a inkubujeme 60 min při laboratorní teplotě v temnu. Přidáme 2 ml hexanu a promyjeme 3x vodou. Organickou vrstvu pak přeneseme do zkumavky a vysušíme ve vakuu. Dále rozpustíme v 100 µl heptanu, přeneseme do chromatografických nádobek pro autosampler a analyzujeme GC.

3.3.1.3 Vliv separace triglyceridů na tenké vrstvě - 2 serie po 8 vzorcích (2 mg)

Vzorky nanese na tenkou vrstvu a vyvineme v systému heptan-diethylether-kyselina octová 80:20:2 (v/v/v). Pod UV světlem indikujeme pruh triglyceridů, který v 1. serii seškrábáme do zkumavky a transmethylujeme i s materiálem vrstvy 60 min při laboratorní teplotě. Vzorky z 2. serie přeneseme na kolonku a vzorky eluujeme dichlormethanem do zkumavky. Další postup je stejný jako ad 3.3.1.1.

3.3.1.4 Vliv separace methylesterů a kyselin na tenké vrstvě - 2 serie po 8 vzorcích (2 mg)

Vzorky 1. serie zpracujeme jako v bodě 3.3.1.1, po analýze GLC nanese na tenkou vrstvu a vyvineme v systému heptan-diethylether-kyselina octová 80:20:2 (v/v/v). Pod UV světlem indikujeme pruh methylesterů, které přeneseme na kolonku a eluujeme směsí hexan-diethylether 1:1 (v/v) do zkumavky. Vysušíme ve vakuu, přeneseme do chromatografických nádobek a znovu analyzujeme GLC. Vzorky 2. serie hydrolyzujeme 1 ml 5M KOH v methanolu při 40°C přes noc, pak přidáme 1 ml 2,5 M H₂SO₄ a uvolněné kyseliny extrahujeme do hexanu jako ad. 3.1.1.3. Neesterifikované mastné kyseliny vyvineme na tenké vrstvě a izolujeme stejně jako methylestery 1. serie. Methylováme 60 min při laboratorní teplotě ve směsi 1 ml methanolu a 0,1 ml konc. H₂SO₄. Vzniklé methylestery extrahujeme do hexanu a analyzujeme GLC.

3.3.2 Příprava methylesterů mastných kyselin za kyselých katalysů

3.3.2.1 Vliv doby methylace volných kyselin s BF₃ – 2 serie po 6 vzorcích (2 mg)

Mastné kyseliny uvolníme z oleje stejně jako ad 3.3.1.4. Vzorky 1. serie inkubujeme s 1 ml BF₃ (ze zatavené ampule o objemu 25 ml) při 95°C po dobu 3 min, vzorky 2. serie po dobu 10 min. Vzorky ochladíme, neutralisujeme 2 ml 15,5% Na₂CO₃, extrahujeme do hexanu a analyzujeme GLC jako v předchozích postupech.

3.3.2.2 Vliv doby methylace triglyceridů za katalysů BF₃ – 2 serie po 6 vzorcích (2 mg)

Vzorky 1. serie inkubujeme s 1 ml BF₃ (ze zatavené ampule o objemu 25 ml) při 95°C po dobu 60 min, vzorky 2. serie po dobu 120 min. Vzorky ochladíme, neutralisujeme 2 ml 15,5% Na₂CO₃, extrahujeme do hexanu a zkontrolujeme složení pomocí TLC.

3.3.2.3 Vliv doby methylace triglyceridů za katalysů H₂SO₄ – 2 serie po 6 vzorcích (2 mg)

Vzorky 1. serie inkubujeme s 1 ml methanolu a 0,1 ml H₂SO₄ při 95°C po dobu 12 hod, vzorky 2. serie po dobu 24 hod. Vzorky ochladíme, přidáme 2 ml vody, extrahujeme do hexanu a zkontrolujeme složení pomocí TLC.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Jednotlivé postupy přípravy methylesterů FA prověřovaly běžně používané laboratorní postupy. Cílem všech postupů je kvantitativní převedení jednotlivých lipidových tříd na methylestery FA při zachování jejich profilu, zvláště minimalisace ztrát nejméně stabilních složek (více nenasycených FA) (13,14,15). Nejšetrnějším postupem je transmethylace za laboratorní teploty v dusíkové atmosféře. Tento postup byl zvolen jako srovnávací pro všechny další modifikace.

4.1 Transmethylace methoxidem sodným – vliv doby a teploty reakce

Pro přípravu methylesterů z triglyceridů a glycerofosfolipidů lze reakci časově zkrátit zvýšením teploty na 60°C. Na kompletní transmethylaci pak pro glycerolipidy postačí 5 min, prověřili jsme i prodloužení času na 60 min. Výsledky ukazuje Tab. 3. Srovnání průměrů t-testem ukazuje u některých FA významné rozdíly, které však jsou důsledkem pouze vysoké přesnosti metody. Relativní směrodatná odchylka (RSD) pro jednotlivé FA se pohybuje mezi 0,3 a 5,4%. V porovnání s biologickou významností jsou tyto rozdíly zanedbatelné, RSD u biologických souborů dosahuje 6-50% (3), výjimečně i více (90%). Z výsledků v Tab. 3 vyplývá, že reakce může být zkrácena díky vyšší teplotě, aniž by došlo k významnému úbytku vysoce nenasycených FA. Porovnání obou postupů za zvýšené teploty ukázalo, že i prodloužení reakční doby na 1 hod nemá na výsledek reakce podstatný vliv.

V biologických vzorcích, především v krevní plasmě, je třeba také stanovovat složení FA v esterech cholesterolu. Ty jsou podstatně odolnější vůči chemickým reakcím a proto je třeba vyšší teploty, obvykle 80°C. I když reakce probíhá v inertním prostředí, nelze se někdy vyhnout stopám vzdušné vlhkosti, která může být přítomna v činidle. Následkem je částečná hydrolysa a přítomnost neesterifikovaných kyselin ve výsledném vzorku. Pokud by míra hydrolysy byla příliš velká, dojde k ochuzení vzorku o methylestery, což může při malém obsahu esterů cholesterolu zkreslit analýsu. Tento nežádoucí efekt je možné kompenzovat přidáním koncentrované kyseliny sírové, která za laboratorní teploty umožňuje přímou esterifikaci ne-reagovaných kyselin a současně váže vznikající vodu. Výsledky této modelové reakce ukazuje Tab. 4. I zde nacházíme u některých FA signifikantní rozdíly mezi jednotlivými postupy, avšak v porovnání s biologickou významností jsou zanedbatelné.

Tab. 3: Vliv doby a teploty transmethylace na složení mastných kyselin

FA	MeONa I ^a	MeONa I - 5 min ^b	MeONa I - 60 min ^c	t-test ^d
12:0	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,02428
14:0	6,46 ± 0,03	6,35 ± 0,05*	6,42 ± 0,05	0,14240
14:1n-5	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,84457
16:0	17,26 ± 0,16	17,16 ± 0,28	17,35 ± 0,13	0,02514
16:1n-7	8,00 ± 0,09	7,93 ± 0,05*	7,98 ± 0,07	0,18838
18:0	2,99 ± 0,08	3,08 ± 0,02***	3,04 ± 0,04	0,04008
18:1n-9	16,55 ± 0,14	16,51 ± 0,35	16,88 ± 0,11***	0,00154
18:1n-7	2,99 ± 0,09	3,04 ± 0,06	3,04 ± 0,03	0,75674
18:2n-6	3,60 ± 0,01	3,83 ± 0,22*	3,87 ± 0,25*	0,68764
18:3n-6	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,02*	0,23 ± 0,01	0,00388
18:3n-3	1,66 ± 0,01	1,69 ± 0,08	1,67 ± 0,01	0,44771
18:4n-3	2,58 ± 0,02	2,60 ± 0,12	2,57 ± 0,04	0,38309
20:0	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,06231
20:1n-9	3,80 ± 0,03	3,84 ± 0,07	3,85 ± 0,05	0,76913
20:2n-6	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,01*	0,92781
20:3n-6	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,90121
20:4n-6	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,67 ± 0,05*	0,25974
20:3n-3	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,00**	0,08749
20:4n-3	1,15 ± 0,00	1,16 ± 0,06	1,15 ± 0,03*	0,70867
20:5n-3	14,87 ± 0,13	14,66 ± 0,01*	14,63 ± 0,11***	0,68701
22:5n-3	2,40 ± 0,06	2,46 ± 0,20	2,45 ± 0,05	0,71327
22:6n-3	13,96 ± 0,10	13,87 ± 0,04	13,33 ± 0,27***	0,00097
ΣSFA	27,00 ± 0,09	26,88 ± 0,22	27,09 ± 0,14	0,02437
ΣMFA	31,38 ± 0,17	31,36 ± 0,17	31,77 ± 0,07***	0,00004
ΣPUFA w6	4,88 ± 0,03	5,17 ± 0,16**	5,17 ± 0,28*	0,96114
ΣPUFA w3	36,75 ± 0,11	36,58 ± 0,55	35,96 ± 0,36***	0,00296

^a transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min

^b transmethylace při 60°C, 5 min

^c transmethylace při 60°C, 60 min

^d srovnání výsledků „c“ vs „b“

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Tab. 4: Vliv teploty a koncentrace kyseliny sírové na složení mastných kyselin

FA	MeONa I ^a	0,2 ml H ₂ SO ₄ ^b	0,1 ml H ₂ SO ₄ ^c	t-test ^d
12:0	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,01***	0,07 ± 0,01	0,0035
14:0	6,46 ± 0,03	6,24 ± 0,15**	6,43 ± 0,12	0,0123
14:1n-5	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,1391
16:0	17,26 ± 0,16	16,99 ± 0,14***	17,01 ± 0,16	0,8133
16:1n-7	8,00 ± 0,09	7,90 ± 0,06**	7,89 ± 0,05*	0,6863
18:0	2,99 ± 0,08	3,01 ± 0,02	3,05 ± 0,04*	0,0554
18:1n-9	16,55 ± 0,14	16,59 ± 0,05	16,66 ± 0,22	0,3705
18:1n-7	2,99 ± 0,09	3,04 ± 0,02	3,10 ± 0,08**	0,0670
18:2n-6	3,60 ± 0,01	3,63 ± 0,02**	3,64 ± 0,04	0,6261
18:3n-6	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,7053
18:3n-3	1,66 ± 0,01	1,67 ± 0,02	1,66 ± 0,02	0,4737
18:4n-3	2,58 ± 0,02	2,59 ± 0,02	2,56 ± 0,05	0,1809
20:0	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,8055
20:1n-9	3,80 ± 0,03	3,83 ± 0,05	3,95 ± 0,27	0,2464
20:2n-6	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,7780
20:3n-6	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,7786
20:4n-6	0,65 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,6389
20:3n-3	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,00*	0,16 ± 0,00***	0,6572
20:4n-3	1,15 ± 0,00	1,17 ± 0,01**	1,16 ± 0,01	0,3258
20:5n-3	14,87 ± 0,13	14,78 ± 0,12	14,55 ± 0,11*	0,0015
22:5n-3	2,40 ± 0,06	2,53 ± 0,01**	2,53 ± 0,04*	0,9449
22:6n-3	13,96 ± 0,10	14,25 ± 0,12**	14,02 ± 0,20	0,0164
ΣSFA	27,00 ± 0,09	26,52 ± 0,24***	26,77 ± 0,28	0,0704
ΣMFA	31,38 ± 0,17	31,39 ± 0,08	31,64 ± 0,19	0,0070
ΣPUFA n-6	4,88 ± 0,03	4,93 ± 0,04**	4,93 ± 0,09	0,9979
ΣPUFA n-3	36,75 ± 0,11	37,16 ± 0,25**	36,66 ± 0,22	0,0006

^a transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min

^b transmethylace při 80°C, 20 min, po přidání 0,2 ml H₂SO₄ 60 min při laboratorní teplotě

^c transmethylace při 80°C, 20 min, po přidání 0,1 ml H₂SO₄ 60 min při laboratorní teplotě

^d srovnání výsledků „c“ vs „b“

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

4.2 Vliv separace tenkovrstevnou chromatografií a přítomnosti materiálu tenké vrstvy na výsledek transmethylace

Pro analýsu jednotlivých lipidových tříd je třeba jejich předběžná separace tenkovrstevnou chromatografií. Zde by mohlo docházet ke ztrátám těkavějších složek, protože je velmi malé množství vzorku rozprostřeno na velkém povrchu tenké vrstvy. Jednotlivé třídy můžeme po separaci buď izolovat z materiálu vrstvy (vzorek nasypeme do krátké kolony a prolijeme směsí rozpouštědel podle charakteru lipidové třídy) a izolované vzorky derivatisovat, nebo je přenést do zkumavek i s materiálem vrstvy a společně derivatisovat (16,17). Druhý způsob je manuálně i co do spotřeby organických rozpouštědel méně náročný, ovšem pouze v případě, že materiál vrstvy neovlivní výsledky. Někteří autoři zaznamenali ztráty vzorku působením materiálu vrstvy (18), proto jsme tomuto srovnání věnovali pozornost. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

Porovnáním výsledků vzorku separovaného tenkovrstevnou chromatografií se základním vzorkem jsme zjistili malý úbytek PUFA n-3. K tomuto úbytku může dojít vzhledem k nižší stabilitě těchto složek a tudíž ztrátám během separace. Dalším důvodem by mohla být separace čistého triglyceridu rybího oleje od malého množství fosfolipidů z buněčných membrán, které mohly ve výrobku zůstat po přečistění. Fosfolipidy mají PUFA zastoupeny ve větší míře než triglyceridy.

V dalším pokuse jsme testovali způsob separace FA a cholesterolu, který v praxi přichází při analýse esterů cholesterolu z plasmy nebo např. celkového lipidu z buněčných membrán. Zásadně jsou možné 2 způsoby:

1. Separace methylesterů FA nebo volných FA (po zmýdelnění vzorku) tenkovrstevnou chromatografií.
2. Transmethylace vzorku a následná analýsa plynovou chromatografií s elucí volného cholesterolu po každé analýze.

Druhý způsob, šetrnější ke vzorku, v praxi znamená prodloužit závěrečný stupeň teplotního programu na cca 30 min při teplotě blížící se teplotnímu limitu kolony. To je dobře proveditelné u středně polárních kolon, avšak donedávna vyráběné vysoce polární kolony eluci cholesterolu neumožňovaly právě vzhledem k nižšímu teplotnímu limitu než je teplota potřebná k eluci cholesterolu. Bylo proto běžné oddělovat buď methylestery nebo volné FA tenkovrstevnou chromatografií. V současné době již mají vysoce polární kolony dosti vysoký teplotní limit, vzhledem k délce (50-100 m) ale může být eluce cholesterolu po každé analýze příliš zdlouhavá. V případě TLC separace volných FA mohou být tyto přímo methylovány za kyselých katalysů (H_2SO_4 nebo BF_3). V našem případě jsme methylovali za katalysu H_2SO_4 . Vý-

sledky srovnání jsou uvedeny v Tab. 6. Ukazují, že separace na tenké vrstvě vede ke ztrátám nejméně stabilních složek, tj. PUFA n-3.

Tab. 5: Vliv materiálu vrstvy na složení mastných kyselin

FA	MeONa I ^a	TLC-bez materiálu ^b	TLC-s materiálem ^c	t-test ^d
12:0	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00***	0,08 ± 0,01	0,00001
14:0	6,46 ± 0,03	6,07 ± 0,09***	6,60 ± 0,05***	0,00000
14:1n-5	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00***	0,03 ± 0,00*	0,00484
16:0	17,26 ± 0,16	17,56 ± 0,24**	17,50 ± 0,16**	0,55870
16:1n-7	8,00 ± 0,09	7,97 ± 0,10	8,23 ± 0,04***	0,00009
18:0	2,99 ± 0,08	3,17 ± 0,09***	3,05 ± 0,05*	0,00593
18:1n-9	16,55 ± 0,14	17,63 ± 0,49***	17,00 ± 0,32**	0,00963
18:1n-7	2,99 ± 0,09	3,18 ± 0,07***	3,18 ± 0,03***	0,75610
18:2n-6	3,60 ± 0,01	3,97 ± 0,48	3,86 ± 0,07***	0,53378
18:3n-6	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,02***	0,20 ± 0,01***	0,19100
18:3n-3	1,66 ± 0,01	1,66 ± 0,05	1,69 ± 0,04	0,10931
18:4n-3	2,58 ± 0,02	2,22 ± 0,13***	2,34 ± 0,15**	0,11437
20:0	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,01*	0,20 ± 0,01	0,00016
20:1n-9	3,80 ± 0,03	3,99 ± 0,21*	3,79 ± 0,11	0,03843
20:2n-6	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,04064
20:3n-6	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,12 ± 0,01	0,01657
20:4n-6	0,65 ± 0,02	0,61 ± 0,02**	0,65 ± 0,01	0,00281
20:3n-3	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,49696
20:4n-3	1,15 ± 0,00	1,11 ± 0,03**	1,15 ± 0,01	0,00889
20:5n-3	14,87 ± 0,13	13,53 ± 0,57***	13,84 ± 0,45***	0,26094
22:5n-3	2,40 ± 0,06	2,42 ± 0,04	2,44 ± 0,04	0,38913
22:6n-3	13,96 ± 0,10	13,88 ± 0,18	13,63 ± 0,12**	0,00569
ΣSFA	27,00 ± 0,09	27,09 ± 0,29	27,44 ± 0,22***	0,01665
ΣMFA	31,38 ± 0,17	32,79 ± 0,68***	32,23 ± 0,43***	0,07227
ΣPUFA n-6	4,88 ± 0,03	5,15 ± 0,49	5,11 ± 0,07***	0,82628
ΣPUFA n-3	36,75 ± 0,11	34,97 ± 0,91***	35,22 ± 0,66***	0,52862

^a transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min

^b transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min, po separaci TLC a izolaci z materiálu vrstvy

^c transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min, po separaci TLC bez izolace z materiálu vrstvy

^d srovnání výsledků „c“ vs „b“

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Tab. 6: Vliv separace methylesterů a volných kyselin

FA	MeONa I ^a	TLC-FA ^b	TLC-FAME ^c	t-test ^d
12:0	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,02***	0,01 ± 0,01***	0,001
14:0	6,46 ± 0,03	7,64 ± 0,79**	5,13 ± 0,69*	0,001
14:1n-5	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,01***	0,012
16:0	17,26 ± 0,16	22,13 ± 0,39**	21,92 ± 0,41***	0,802
16:1n-7	8,00 ± 0,09	9,55 ± 0,20**	8,91 ± 0,55**	0,114
18:0	2,99 ± 0,08	3,67 ± 0,28	4,02 ± 0,16***	0,272
18:1n-9	16,55 ± 0,14	19,91 ± 0,87**	21,51 ± 1,18***	0,095
18:1n-7	2,99 ± 0,09	3,67 ± 0,27***	3,94 ± 0,06***	0,097
18:2n-6	3,60 ± 0,01	4,10 ± 0,13*	4,53 ± 0,21***	0,023
18:3n-6	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,04**	0,18 ± 0,01***	0,075
18:3n-3	1,66 ± 0,01	1,48 ± 0,01	1,75 ± 0,11**	0,014
18:4n-3	2,58 ± 0,02	1,29 ± 0,28***	1,95 ± 0,04***	0,011
20:0	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,25 ± 0,00*	0,017
20:1n-9	3,80 ± 0,03	4,28 ± 0,48	5,08 ± 0,39***	0,047
20:2n-6	0,27 ± 0,03	0,32 ± 0,03***	0,42 ± 0,15**	0,011
20:3n-6	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,073
20:4n-6	0,65 ± 0,02	0,58 ± 0,02*	0,55 ± 0,06***	0,477
20:3n-3	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,00**	0,099
20:4n-3	1,15 ± 0,00	0,95 ± 0,05**	1,07 ± 0,05*	0,039
20:5n-3	14,87 ± 0,13	8,93 ± 0,94***	9,99 ± 0,84***	0,254
22:5n-3	2,40 ± 0,06	1,85 ± 0,06*	2,03 ± 0,17***	0,282
22:6n-3	13,96 ± 0,10	9,05 ± 0,09**	6,45 ± 1,02***	0,019
ΣSFA	27,00 ± 0,09	33,65 ± 0,12**	31,32 ± 0,13***	0,081
ΣMFA	31,38 ± 0,17	37,43 ± 1,42**	39,46 ± 2,17***	0,164
ΣPUFA n-6	4,88 ± 0,03	5,22 ± 0,08	5,80 ± 0,02***	0,029
ΣPUFA n-3	36,75 ± 0,11	23,67 ± 1,29**	23,42 ± 2,02***	0,905

^a transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min

^b methylace za katalysy H₂SO₄ při laboratorní teplotě, 60 min, po separaci FA na TLC

^c methylestery FA po separaci TLC

^d srovnání výsledků „c“ vs „b“

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

4.3 Přímá methylace volných kyselin fluoridem boritým

Esterifikace FA probíhá výhradně za kyselé katalysy. Jako katalysátor může sloužit fluorid boritý, kyselina sírová, acetylchlorid, methylchloroformát. Fluorid boritý je jedním z nejdéle využívaných katalysátorů. Reakce probíhá za vysoké teploty (95-100°C) ve velmi krátkém čase (cca 3 min). Při prodloužení doby reakce může docházet ke ztrátám vysocenenasyčených složek (19,20,21). V našem testu jsme porovnali dobu reakce 3 a 10 min za teploty 95°C; výsledky jsou shrnuty v Tab. 7. Po tříminutové reakci se složení FA významně neliší od srovnávacích vzorků transmetylovaných MeONa za laboratorní teploty. Statisticky významné rozdíly u některých minoritních složek se v biologickém souboru neuplatní. Při prodloužení doby reakce na 10 min dochází u nenasycených složek k výrazným ztrátám PUFA n-3, které jsou kompenzovány zvýšením obsahu SFA a MFA. Pokles PUFA n-3 oproti srovnávacímu vzorku představuje cca 8%; tento pokles je již dost velký na to, aby zkreslil výsledek biologické studie. Proto je dodržení reakční doby velmi důležité.

4.4 Transmethylace triglyceridu za kyselé katalysy

Transmethylace lipidů za kyselé a alkalické katalysy se zásadně liší nejen podmínkami reakce (kratší čas a nižší teplota při alkalické katalyze), ale i výsledným složením vzorku. Za kyselé katalysy lze stanovit i plasmalogeny, které při alkalické katalyze přecházejí do vodné fáze. Jejich stanovení může být důležité při sledování FA např. v membránách krevních buněk. V transportních lipidech krevní plasmy je jejich obsah zanedbatelný. Transmethylace lipidů probíhá rovněž za vysoké teploty (95-100°C), potřebná doba reakce je cca 90 min. Podmínkami reakce se zabývalo několik autorů již v šedesátých letech minulého století (22-24). V naší studii jsme testovali výtěžnost reakce probíhající při 95°C po dobu 60 a 120 min sledováním výchozí sloučeniny – triglyceridu, a produktu reakce – methylesterů FA tenkovrstevnou chromatografií. Výsledky ukazuje obr. 4, ze kterého je patrné, že ani po 120 min neproběhla reakce kvantitativně. Při případné analýze GLC by se do kolony dostal intaktní triglycerid, který by snižoval její životnost. Literatura také uvádí tvorbu artefaktů při reakci BF₃ s lipidy (25,26), i vliv skladování činidel na výtěžnost nasycených a nenasycených FA (27). V literatuře je rovněž popisována příprava FAME za katalysy kyselinou sírovou, která probíhá buď po předchozí alkalické hydrolyse (28), nebo přímou transmethylací (29). První způsob byl již ověřen při simulaci zpracování esterů cholesterolu, druhý způsob jsme se pokusili zreprodukovat. Pracovali jsme při 80°C a reakce probíhala po dobu 12 a 24 hod. Z výsledků znázorněných na obr. 5 je zřejmé, že reakce proběhla jen částečně. Ze stejného důvodu jako u katalysy BF₃ jsme vzorky neanalysovali GC.

Tab. 7: Vliv doby methylace mastných kyselin fluoridem boritým

FA	MeONa I ^a	BF3-N-FA-3MIN ^b	BF3-N-FA-10MIN ^c	t-test ^d
12:0	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01**	0,23
14:0	6,46 ± 0,03	6,88 ± 0,08*	6,83 ± 0,08**	0,69
14:1n-5	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00***	0,00 ± 0,00***	0,26
16:0	17,26 ± 0,16	16,71 ± 0,55	18,37 ± 0,29***	0,11
16:1n-7	8,00 ± 0,09	8,62 ± 0,03*	8,52 ± 0,21***	0,52
18:0	2,99 ± 0,08	2,56 ± 0,23	3,16 ± 0,05**	0,18
18:1n-9	16,55 ± 0,14	15,69 ± 0,24	17,19 ± 0,06***	0,16
18:1n-7	2,99 ± 0,09	2,84 ± 0,06	3,15 ± 0,05***	0,14
18:2n-6	3,60 ± 0,01	3,67 ± 0,01	3,68 ± 0,03**	0,73
18:3n-6	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,00***	0,15 ± 0,02***	0,08
18:3n-3	1,66 ± 0,01	1,78 ± 0,04	1,66 ± 0,01	0,27
18:4n-3	2,58 ± 0,02	3,06 ± 0,06	2,63 ± 0,03*	0,18
20:0	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,01***	0,16
20:1n-9	3,80 ± 0,03	3,21 ± 0,23	3,86 ± 0,00	0,23
20:2n-6	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,33
20:3n-6	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,00*	0,14 ± 0,01***	0,91
20:4n-6	0,65 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,60 ± 0,02***	0,16
20:3n-3	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,98
20:4n-3	1,15 ± 0,00	1,18 ± 0,02	1,07 ± 0,03***	0,12
20:5n-3	14,87 ± 0,13	16,02 ± 0,43	13,74 ± 0,24***	0,14
22:5n-3	2,40 ± 0,06	2,61 ± 0,45	2,64 ± 0,03	0,94
22:6n-3	13,96 ± 0,10	13,58 ± 0,46	11,91 ± 0,18***	0,08
ΣSFA	27,00 ± 0,09	26,30 ± 0,89	28,56 ± 0,14***	0,12
ΣMFA	31,38 ± 0,17	30,45 ± 0,56	32,81 ± 0,32***	0,16
ΣPUFA n-6	4,88 ± 0,03	4,89 ± 0,01	4,85 ± 0,00	0,32
ΣPUFA n-3	36,75 ± 0,11	38,36 ± 1,46	33,79 ± 0,45***	0,14

^a transmethylace při laboratorní teplotě, 60 min

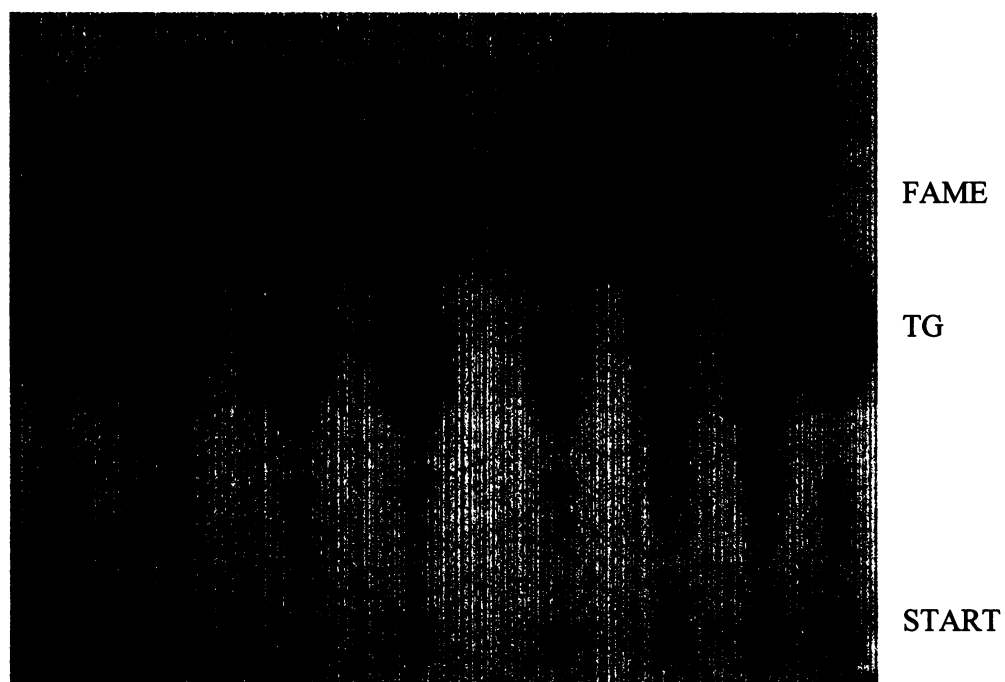
^b methylace volných kyselin BF3, 3 min za teploty 95°C, N atmosféra

^c methylace volných kyselin BF3, 10 min za teploty 95°C, N atmosféra

^d srovnání výsledků „c“ vs „b“

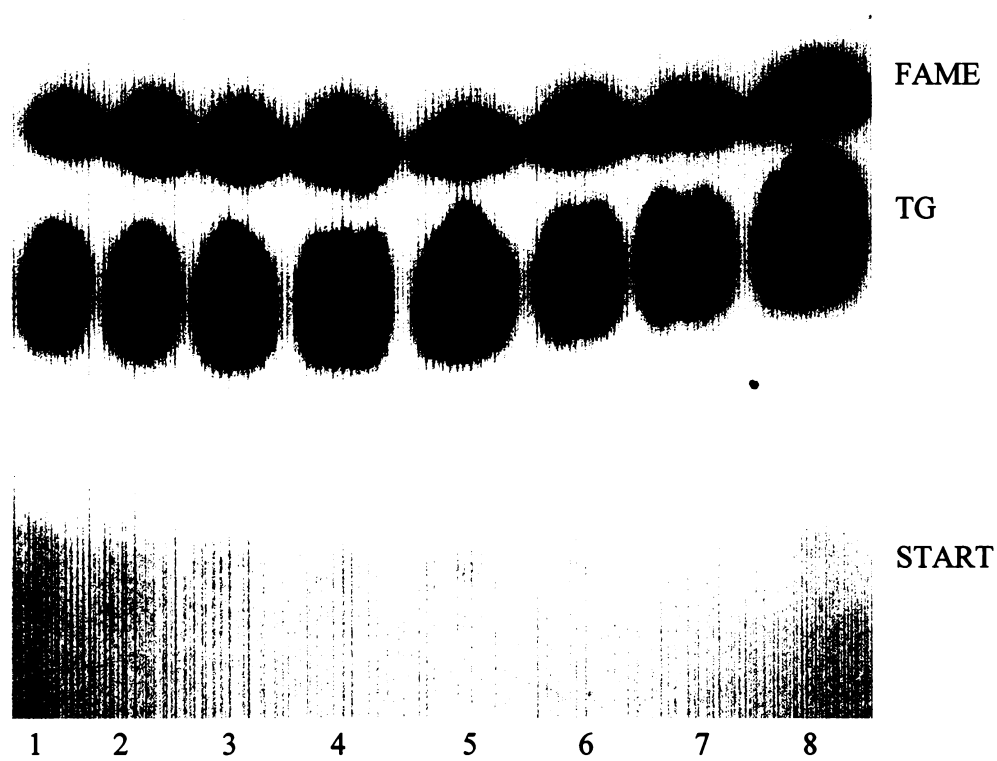
* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Obr. 4: Transmethylace za katalysy BF_3



Vzorky č. 1 a 8 – původní vzorek, č. 2-4 – doba reakce 1 hod, č. 5-7 – doba reakce 2 hod

Obr. 5: Transmethylace za katalysy H_2SO_4 , 24 hodin při 95°C



5 ZÁVĚR

1. Příprava methylesterů FA transmethyloací MeONa za laboratorní teploty probíhá kvantitativně a není destruktivní vůči nestabilním složkám vzorku.
2. Použitý materiál tenké vrstvy přítomný při reakci neovlivňuje výsledné složení FA.
3. Transmethyloace za kyselých katalysů neprobíhá kvantitativně. Lepších výsledků lze dosáhnout u BF_3 , ale bude třeba ještě dalšího studia.

Literatura

1. J. Hladík, v knize *Biochemie – základní kurz*, kap. 8 Lipidy, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2005
2. D. Voet, J.G. Voet: *Biochemie*, kap. 11 Lipidy a membrány, Victoria Publishing, Praha 1995
3. E. Tvrzická, M. Vecka, B. Staňková, A. Žák: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection. Quantitative aspects. *Anal. Chim. Acta* 465, 337 (2002).
4. Compher C., Setto R.W., Lew J.I., Rombeau J.L. v knize *Clinical Nutrition: Enteral and tube feeding*, s. 81-95. Rombeau J.L. a Rolandelli R.H. ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia 1997
5. Hainer V., Kunešová M., Štich V., Žák A., Pařízková J.: *Čas. Lék. Čes.* 133, 373 (1994).
6. Larsson K., Quinn P.J., v knize: *The Lipid Handbook*, kap. 3. Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. Chapman and Hall, London 1994.
7. Ulbright T.L.V., Southgate D.A.T.: *Lancet* 338, 985 (1991).
8. Gotto A.M. v knize: *Contemporary diagnosis and management of lipid disorders.* Handbooks in Health Care Co., Newtown, Pa. 2004.
9. Beare-Rogers J.L., Nera E.A.: *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 793 (1972).
10. Osso F.S., Moreira A.S., Teixeira M.T., Pereira R.O., Tavares do Carno M.G., Moura A.S.: *Nutrition* 24, 727 (2008).
11. Gunstone F.D. v knize: *The Lipid Handbook*, kap. 1. Fatty Acid Structure. Chapman and Hall, London 1994.
12. Christie W.W., v knize: *High-Performance Liquid Chromatography and Lipids*, kap. 7. The Analysis of Fatty acids. Pergamon Press, Oxford 1987.
13. R. Garcés, M. Mancha: *Anal. Biochem.* 211, 139 (1993).
14. I. Medina, S. Aubourg, J.M. Gallardo, R. Perez-Mart: *Int. J. Food Sci. Technol.* 21, 597 (1992).
15. Y. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, J.S. Sim: *Poultry Sci.* 79, 1168 (2000).
16. A. Ohta, M.C. Mayo, N. Kramer, W.E.M. Lands: *Lipids* 25, 742 (1990).
17. W. Sattler, H. Reicher, P. Ramos, U. Panzenboeck, M. Hayn, H. Esterbauer, E. Malle, G.M. Kostner, *Lipids* 31, 9 (1996).
18. J. M. Sowa, P.V. Subbaiah: *J. Chromatogr. B*, 813, 159 (2004).
19. C.D. Bannon, J.D. Craske, N.T. Hai, N.L. Harper, K.L. O'Rourke: *J. Chromatogr.* 247, 63 (1982)
20. N. Shirai, H. Suzuki, S. Wada: *Anal. Biochem.* 343, 48 (2005)
21. L. T. Miller: *J. Clin. Microbiol.* 16, 584 (1982).
22. O.S. Duron, A. Nowotny: *Anal. Chem.* 35, 370 (1963).
23. W. R. Morrison, L.M. Smith: *J. Lipid Res.* 5, 600 (1964).
24. S.A. Hyun, G.V. Vahouny, C.R. Treadwell: *Anal. Biochem.* 10, 193 (1965).
25. A.K. Lough: *Biochem. J.* 90, 4 (1964),
26. W.K. Fulk, M.S. Shorb: *J. Lipid Res.* 11, 276 (1970),
27. W.E. Klopfenstein: *J. Lipid Res.* 12, 773 (1971).
28. J.V. O'Fallon, J.R. Busboom, M.L. Nelson, C.T. Gaskins: *J Anim Sci.* 85, 1511 (2007)..
29. D.S. Fudge, E.D. Stevens, J.S. Ballantyne: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, 818 (1998).