

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Tereza Bosáková

### **Analýza obranných látek potápníků (Dytiscidae) metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí**

Analysis of defensive substances of Diving beetles (Dytiscidae) by ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2015

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. 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, 18. května 2015

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D., své konzultantce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. a Mgr. Jiřímu Hájkovi, Ph.D. za pomoc při řešení mé bakalářské práce.

## Abstrakt

Obranný sekret potápníků (Dytiscidae) produkovaný jejich prothorakálními žlázami obsahuje řadu steroidních látek. Pro analýzu obranného sekretu potápníka druhu *Ilybius fenestratus* byla využita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s detekcí diodovým polem a hmotnostní detekcí. Analýza methanolického extraktu sekretu probíhala na koloně Acquity BEH C<sub>18</sub> za podmínek gradientové eluce s dvousložkovou mobilní fází tvořenou methanolem s 0,1% obsahem amoniaku a 0,1% vodným roztokem amoniaku. V sekretu byla zjištěna přítomnost dvou steroidních hormonů, a to boldenonu a testosteronu a jejich identifikace byla potvrzena na základě shody jejich retenčních časů i hmotnostních spekter s příslušnými standardy.

klíčová slova: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní detekce, potápníci, *Ilybius fenestratus*, steroidní látky

# Obsah

1. Seznam zkratk a symbolů .....	6
2. Úvod .....	8
3. Teoretická část .....	9
3.1 Potápníci .....	9
3.2 Metody použité pro analýzu obranných sekretů potápníků .....	13
3.3 HPLC .....	14
3.3.1 Způsoby detekce v kapalinové chromatografii .....	16
4. Experimentální část .....	19
4.1 Chemikálie .....	19
4.2 Instrumentace .....	19
4.3 Příprava vzorků .....	20
4.4 Podmínky hmotnostní detekce a DAD detekce .....	20
4.5 UHPLC podmínky .....	21
5. Výsledky a diskuze .....	22
5.1 Optimalizace separačních podmínek .....	22
5.2 Analýza vzorků .....	23
6. Závěr .....	30
7. Použitá literatura .....	31

## 1. Seznam zkratek a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (z anglického Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (z anglického Atmospheric Pressure Photoionization)
a.u.	relativní jednotka (z anglického arbitrary unit)
DAD	detektor diodového pole (z anglického Diode Array Detector)
EI	elektronová ionizace (z anglického Electron Ionization)
ELISA	z anglického Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	ionizace elektrosprejem (z anglického Electrospray Ionization)
GC	plynová chromatografie (z anglického Gas Chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z anglického High Performance Liquid Chromatography)
IT	iontová past (z anglického Ion Trap)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického Mass Spectrometry)
$m/z$	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
NP	normální fáze (z anglického Normal-Phase)
Q	kvadrupól (z anglického Quadrupole)
QQQ	trojitý kvadrupól
RP	reversní fáze (z anglického Reverse-Phase)
$t_r$	retenční čas

TIC	celkový iontový proud (z anglického Total Ion Current)
TOF	průletový analyzátor (z anglického Time-of-flight)
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (z anglického Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialová oblast
VIS	oblast viditelného světla
v/v	objem/objem
$\lambda$	vlnová délka

## 2. Úvod

Chemická ekologie se zabývá studiem chemických signálů, kterými se dorozumívají jednotlivé živé organismy. Studium těchto signálů zahrnuje jak sledování syntetické cesty v produkci těchto látek, tak i jejich identifikaci. Výsledky mohou být důležité u ochrany rostlin nebo u kontroly škůdců apod. Zatímco suchozemské prostředí bylo z hlediska chemické ekologie intenzivně studováno již v 70. letech minulého století, se studiem akvatického prostředí se v této době teprve začínalo.

Během několika posledních desetiletí bylo zjištěno, že některé druhy hmyzu produkují steroidy, které jsou pro ně nepostradatelné. V případě čeledi potápníkovití bylo zjištěno, že tito brouci ve svých žlázách produkují velkou škálu steroidních hormonů, vyskytujících se také u obratlovců. Tyto hormony vykazují u brouků nehormonální aktivitu. Navíc u potápníků existuje řada steroidů, jejichž hormonální nebo jiné aktivity jsou u obratlovců i bezobratlých neznámé. Zájem o výzkum zaměřující se na identifikaci a zjištění jejich přesných biologických účinků je spojen s možností využít tyto látky v budoucnu jako potenciální hormonální preparáty.

Cílem předkládané práce bylo využít ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s detekcí diodového pole a hmotnostní detekcí pro analýzu obranného sekretu potápníka druhu *Ilybius fenestratus*. Řada látek v sekretu již byla identifikována, nejčastěji metodou plynové chromatografie. Metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí pro tento účel doposud vyzkoušena nebyla. Na rozdíl od plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, která vyžaduje derivatizaci vzorku, je předúprava vzorku pro tuto metodu minimální.



### 3. Teoretická část

#### 3.1 Potápníci

Čeď potápníkovití, latinsky Dytiscidae (z řeckého *dytikos* – umění potápět se) patří do skupiny dravých, vodních brouků. Do této čeledi patří okolo 4200 druhů a tím se stává jednou z nejpočetnějších skupin vodního hmyzu. Potápníci se vyskytují prakticky po celém světě [1].

Draví potápníci patří mezi predátory žijící ve sladkovodním prostředí. Obvykle vyhledávají stojaté vody, jako například jezera, rybníky a přehrady, nebo se zdržují u břehu s vodní vegetací. Někteří dospělci dobře létají, hlavně v noci a dokáží tak osídlit nové vodní plochy. Z území České republiky je v současnosti doložen výskyt 120 druhů čeledi Dytiscidae, konkrétně např. Potápník vroubený, Potápník široký nebo Potápník bahenní [2].

Potápníci vykazují životní cyklus, který začíná vajíčkem, ze kterého se vylíhne larva, ta se následně zakuklí a z kukly se nakonec vyvine dospělý jedinec. Jde o tzv. proměnu dokonalou, která je patrná u různých druhů hmyzu jako např. u blanokřídlých, kdy larva je nepodobná dospělým jedincům.

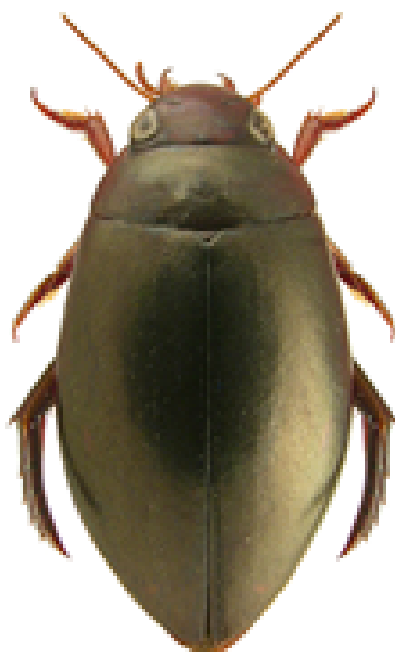
Larva i dospělec jsou predátoři menších, vodních organismů, disponující různými způsoby loveckého chování a využívající širokou škálu chemikálií pro svou obranu a komunikaci. Jediným rozdílem je, že larvy se živí pouze živými vodními organismy, kdežto dospělci i mrtvým vodním organismem. K dýchání kyslíku potápníci využívají vzduch, jež nabírají při vynoření zadečku nad hladinu a dospělci ho mohou hromadit v prostoru pod krovkami [3].

Celkový tvar a velikost dospělců i larev potápníků jsou velmi variabilní a pro jejich vzájemné odlišení je důležité posouzení jak jejich vnějších znaků (tvar, struktura, barva aj.), tak i struktury vnitřních částí, tedy jejich anatomie [4].

Mezi potápníky existují velké mezidruhové rozdíly. Velikost dospělců se pohybuje v rozmezí 1 – 45 mm, tvar jejich těla je oválný, hydrodynamický a spolu se setami (brvami) na zadních nohách je tělo velmi dobře adaptováno na vodní prostředí [5]. Zbarvení potápníků slouží hlavně k obraně proti predátorům. Dospělci jsou většinou tmaví (hnědí až černí), někdy se žlutými okraji nebo tečkami, u některých druhů lze pozorovat i barvy odlišné, jako je krémová, olivově zelená nebo červená až červeno-

hnědá [6]. Pro ilustraci je na obr. 1 zobrazen dospělec potápníka druhu *Ilybius fenestratus* [4].

Podobně jako u dospělců i velikost larev je značně rozdílná a obvykle se pohybuje v rozmezí 1 – 70 mm. Larvy mají výrazně trojúhelníkovitou hlavu, dlouhá šavlovitá kusadla a nohy jsou opatřeny brvami napomáhajícími pohybu. Jejich zbarvení se pohybuje od žluté, přes šedozelenou po tmavě hnědou až černou s barevnými pruhy.



Obr. 1: Dospělec potápníka druhu *Ilybius fenestratus* [4].

Během evoluce si živočichové vyvinuli řadu způsobů, jak se navzájem detekovat nebo se bránit, obecně komunikovat a interagovat jeden s druhým. Vedle vizuální komunikace, která je ve vodném prostředí značně snížena špatnou viditelností, využívají potápníci i způsoby chemické interakce pomocí tzv. semiochemikálií [7]. Semiochemikálie jsou látky využívané pro přenos informací mezi organismy pomocí chemických signálů (tzv. chemická řeč) a rozdělují se na feromony, přenášející informace mezi jedinci stejného druhu a allelochemikálie, zprostředkovávající informace mezi jedinci různého druhu. Mezi allelochemikálie patří tzv. allomony, což

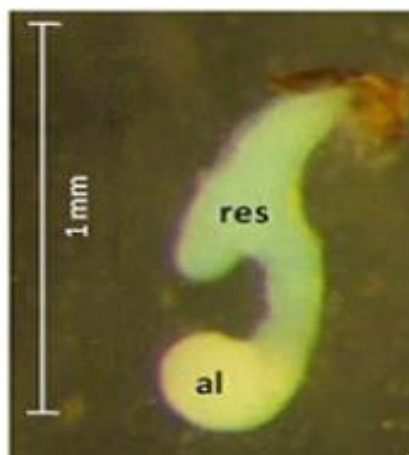
jsou chemické signály výhodné pro producenta zprávy a velmi často fungují jako chemická ochrana před predátory. Naopak tzv. kairomony jsou výhodné pro příjemce chemického signálu. Allomony tedy reprezentují látky produkované a uvolňované jednotlivci daného druhu a ovlivňují chování jednotlivců jiného druhu [8, 9].

Mezi allomony patří i obranné sekrety, které jsou produkovány v komplexních pygidiálních a prothorakálních párových žlázách potápníka a obsahují převážně steroidy a aromáty. Jejich důležitou funkcí je ochrana potápníků proti rybím a savčím predátorům [10].

Mimo tyto dva druhy žláz disponují dospělci i larvy tzv. rektální ampulí, ze které je jedinec, v případě obrany, schopen velmi rychle uvolňovat páchnoucí plyny jako je  $H_2S$  nebo  $NH_3$ . Tato rektální ampule představuje první obranný systém, který předchází zapojení zejména prothorakálních žláz [9].

Přibližné složení sekretu produkovaného pygidiálními párovými žlázami bylo poprvé popsáno Ghidinim a kol. v roce 1957. Sekret obsahuje řadu aromatických i alifatických sloučenin a metabolity tryptofanu. Některé molekuly identifikovaných látek mají jak lipofilní, tak hydrofilní část, což jim propůjčuje amfifilní charakter. Sekrece pygidiálních žláz má multifunkční biologický význam. Látky, obsažené v sekretu, mají fungicidní a baktericidní vlastnosti a také inhibují rostlinný růst. Těla potápníků jsou pokryta tímto sekretem, který funguje jako jejich ochrana před bakteriemi, proti napadení řasami a plísněmi, a protože se vesměs jedná o vodu odpuzující látky, brání i promočení jejich těla a také snižuje odpor vody při plavání [11].

Prothorakální párové žlázy (viz obr. 2) uvolňují při podráždění mléčně zbarvený sekret. Bylo zjištěno, že sekret obsahuje velkou škálu steroidních hormonů, které se vyskytují u obratlovců, např. estratrieny, androstadieny, pregnany, pregneny, pregnadieny aj a také řadu nových, často specifických steroidů, které nejsou u obratlovců známy. Předpokládá se, že některé z těchto molekul jsou syntetizovány z cholesterolu, který potápník získává ze své kořisti [12].



Obr. 2: Vypreparovaná prothorakální žláza druhu *Ilybius fenestratus*; *res* – reservoár prothorakální obranné žlázy, *al* – apikální (vrcholové) zakončení reservoáru [9].

Jak již bylo uvedeno výše, čeleď potápníků je velmi rozsáhlá a zahrnuje okolo 4200 druhů, z nichž pouze velmi malá část byla po chemické stránce prozkoumána a testována na produkci obranných látek hormonálního původu [9].

Do čeledi potápníkovití patří mimo jiné i rod *Ilybius*, který čítá okolo 70 druhů a jedním z nich je i druh *Ilybius fenestratus*. Druh *Ilybius fenestratus* je jedním z těch, u kterého byla objevena produkce velkého množství hormonů typu estratrienů ( $C_{18}$ ), androstadienů ( $C_{19}$ ), pregn-4-enů ( $C_{21}$ ), pregna-4,6-dienů ( $C_{21}$ ) a velké množství seskviterpenů, konkrétně 3-hydroxyestra-1,3,6(10)-trien-17-on (estron), 3,17 $\beta$ -dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien (17 $\beta$ -estradiol), 17 $\beta$ -hydroxyandrost-4-en-3-on (testosteron), 17 $\beta$ -hydroandrost-1,4-dien-3-on (boldenon), 2 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-on (2 $\alpha$ -hydroxytestosteron), 2 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-on (2 $\beta$ -hydroxytestosteron), 17 $\beta$ ,19-dihydroxyandrost-4-en-3-on (19-hydroxytestosteron), 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-5-en, 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-5-en, 20 $\alpha$ -hydroxypregn-4-en-3-on, 20 $\beta$ ,21-dihydroxypregn-4-en-3-on, 15 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-on, 3 $\beta$ ,20 $\alpha$ ,21-trihydroxypregn-5-en, 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,21-trihydroxypregn-5-en-20-on, (16 $\alpha$ ,21-dihydroxypregnenolon),  $\alpha$ -kopaen,  $\alpha$ -muurolen,  $\gamma$ -muurolen,  $\epsilon$ -muurolen,  $\gamma$ -kandien,  $\delta$ -kandien,  $\alpha$ -kubeben,  $\beta$ -kubeben, torreyol, trans- $\beta$ -fanesen,  $\gamma$ -gurjunen a 7 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,10 $\alpha$ -endesin-4(14)-en-12,6 $\alpha$ -diol (platambin). V sekretu *Ilybius fenestratus* byly dále identifikovány methylisobutanoát, methylestery leucinu a isoleucinu a dokonce i alkaloid methyl-8-hydroxy-chinolinkarboxylát, díky jehož žluté barvě vykazuje sekret nažloutlé zbarvení [9, 13, 14].

### 3.2 Metody použité pro analýzu obranných sekretů potápníků

Pro analýzu steroidů se nejčastěji používají metody plynové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Většina prací je soustředěna na analýzu steroidních hormonů ve vzorcích životního prostředí a v potravinách [15]. V minulosti se pro screening steroidních látek používaly zejména imunologické techniky jako radioimunoanalýza nebo ELISA (z anglického Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [15].

Identifikací látek steroidní povahy v obranných sekretech se zabývá pouze velmi omezený počet prací. V minulosti byly organické extrakty obranných sekretů různých druhů potápníka analyzovány např. metodou tenkovrstvé chromatografie nebo pomocí infračervené spektroskopie [9, 13, 14]. V současné době převládá metoda plynové chromatografie spojená s hmotnostní detekcí (GC-MS). Touto metodou byl analyzován obranný sekret produkovaný prothorakální žlázou potápníků druhů *Graphoderus cinereus* a *Laccophilus minutus*. Vlastní GC-MS analýze předcházela derivatizace vzorku trimethylsilylací. Bylo zjištěno, že majoritní složkou v *Graphoderus cinereus* je 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on a v *Laccophilus minutus* to je 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on [16]. Jedenáct steroidních látek bylo identifikováno metodou GC-MS v obranných prothorakálních žlázách potápníka druhu *Agabus guttatus* [17]. Metoda HPLC pro analýzu obranných sekretů byla použita jen výjimečně. Sekrety získané z pygidiální a prothorakální žlázy tří druhů potápníků, a to *Acilius semiculcatur*, *Acilius sylvanus* a *Acilius mediatius*, byly analyzovány metodou HPLC s UV detekcí. Pro analýzu byl použit jak normální, tak reverzní separační mód. Normální mód byl realizován za použití  $\mu$ Porasil kolony (300 x 4 mm) s mobilní fází o složení dioxan/hexan 15/85 (v/v) a průtokové rychlosti 1 ml/min. Reverzní mód byl složen z  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> kolony a mobilní fáze tvořené acetonitrilem a vodou za podmínek gradientové eluce, kdy lineární gradient začínal na 30 % acetonitrilu a 70 % vody a končil na 60 % acetonitrilu během 10 min. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,5 ml/min. Obranný extrakt z potápníka byl získán vydrážděním potápníka elektrickým proudem, poté byl sekret okyselen na pH = 1 a obranné složky sekretu byly extrahovány z vody chloroformem, který byl poté odpařen pod proudem dusíku. Takto upravený vzorek byl následně analyzován metodou HPLC. V obranném sekretu byly nalezeny následující látky: benzoová kyselina, p-hydroxybenzaldehyd, methyl-p-hydroxybenzoát,

testosteron a 11-deoxykortikosteron. První tři látky byly pravděpodobně produkovány pygidiální žlázou, zatímco poslední dvě jmenované látky patří do produkce prothorakální žlázy. Obsah látek se pohyboval v jednotkách až desítkách mikrogramů na brouka a bylo zjištěno, že je sezónně závislý [18]. Nalezení testosteronu a 11-deoxykortikosteronu bylo ve shodě s prací Millera a Mummy z roku 1976, popisující výskyt steroidů typu 4-pregnen-3-on a jejich derivátů v obranném sekretu prothorakální žlázy [19].

Podobný separační systém skládající se z kolony  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> a mobilní fáze methanol/voda 50/50 (v/v) a průtoková rychlost mobilní fáze 2 ml/min byly použity pro separaci vybraných složek v obranném sekretu potápníka druhu *Acilius sulcatus*. V sekretu byly zjištěny deriváty pregnanu jako kortexon, 20 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-3-on spolu s některými dieny: 6,7-dehydroxykortexon, 20 $\alpha$ -hydroxy-4,6-pregnadien-3-on a 4,6-pregnadien-3,20-dion [20].

### 3.3 HPLC

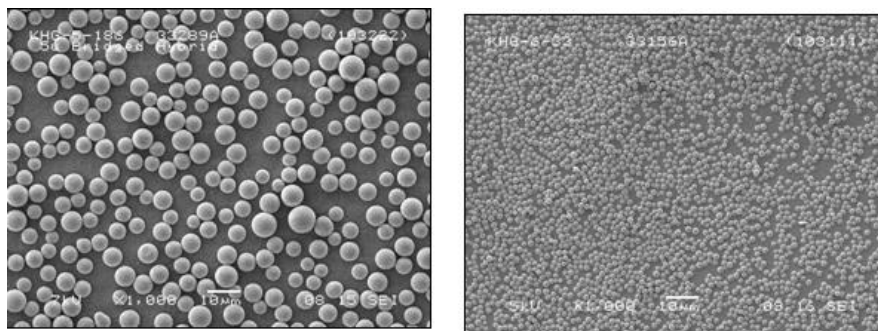
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z anglického High-Performance Liquid Chromatography) je chromatografická technika, která slouží k separaci, purifikaci nebo izolaci složek vzorku. Historie HPLC sahá až do počátku 20. století, kdy ruský botanik M.S. Cvět jako první rozdělil na sloupci sorbentu uhličitanu vápenatém listová barviva (chlorofyly a karotenoidy). Pojem chromatografie vznikl z řeckých slov *chroma* = barva a *graph* = psátí, tedy popis barevného experimentu. V dnešní době je kapalinová chromatografie jednou z nejpoužívanějších technik v analytické chemii.

Princip kapalinové chromatografie spočívá v distribuci separovaných látek mezi dvě fáze, a to fázi stacionární a mobilní. Na rozdíl od plynové chromatografie, kde mobilní fáze analyt pouze unáší kolonou, se v kapalinové chromatografii obě tyto fáze na separaci aktivně podílí. Separace probíhá v chromatografické koloně na základě rozdílné afinity analytů ke stacionární a mobilní fázi. Čím větší má analyt afinitu ke stacionární, nepohyblivé fázi, tím je silněji zadržován a jeho retenční čas (čas strávený v koloně) je delší. Zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou rozšiřují a jednotlivé zóny se v záznamu (chromatogramu) objeví jako píky neboli eluční křivky, které charakterizují koncentrační profily analytů v zónách [21].

Nejčastěji používaným typem kapalinové chromatografie je dnes rozdělovací chromatografie. V rozdělovací chromatografii se složky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze. U rozdělovací chromatografie rozlišujeme následující základní uspořádání: chromatografii s normálními fázemi (NP – z anglického Normal-Phase) a chromatografii s obrácenými fázemi (RP – z anglického Reverse-Phase). V chromatografii s normálními fázemi je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. Uspořádání RP-HPLC je opačné, tedy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární a nejčastěji se používá k separaci nepolárních látek. V RP chromatografii se stacionární fáze obvykle skládá ze dvou složek, a to nosiče a na něm navázaného ligandu. Jako nosič se nejvíce využívá silikagel ( $\text{SiO}_2$ ), který se vyrábí z křemičitanu sodného. Na povrchu silikagelu jsou silanolové ( $-\text{SiOH}$ ) a siloxanové ( $-\text{Si-O-Si-}$ ) skupiny. Přítomnost silanolových skupin propůjčuje silikagelu kyselý charakter a tyto skupiny jsou vhodné pro chemickou reakci, zavádějící na nosič požadovanou skupinu (ligand). Tím je nejčastěji nepolární oktadecylový ( $-\text{C}_{18}$ ) nebo polárnější oktylový ( $-\text{C}_8$ ) uhlíkatý řetězec, nebo fenylová či fenyl-hexylová skupina aj. Jednotlivé ligandy se od sebe navzájem mohou lišit nejen polaritou, ale i typem interakcí, které jsou schopny poskytovat (např. fenylová skupina disponuje i  $\pi$ - $\pi$  interakcemi) [22].

Současná vyspělá technologie výroby náplňových kolon pro HPLC poskytuje stacionární fáze o široké škále velikosti částic v běžném rozsahu od 2,4 po 10  $\mu\text{m}$ . Jako mobilní fáze v reverzním módu se používají nejčastěji směsi vody či pufru s polárními organickými rozpouštědly (zejména acetonitrilem či methanolem). Přes všechny uvedené výhody však v řadě případů poskytuje metoda HPLC a zejména RP-HPLC pouze omezenou separační účinnost nebo separace vyžadují delší čas. Jedním z možných řešení je modifikace HPLC v tzv. ultra-vysokoučinnou kapalinovou chromatografii - UHPLC (z anglického Ultra-High Performance Liquid Chromatography), poprvé představenou v roce 2004. Princip UHPLC spočívá v použití kolon naplněných částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Použití takto malých částic generuje v chromatografickém systému podstatně vyšší zpětný tlak až do cca 1000 barů (oproti HPLC s maximálním zpětným tlakem do cca 350 barů). Kvůli vysokému zpětnému tlaku je nutné používat speciální instrumentaci, která těmto tlakům odolá. Na druhé straně však přináší podstatně vyšší separační účinnost, lepší citlivost, kratší dobu analýzy a menší spotřebu HPLC rozpouštědel [23].

V klasické HPLC se používají v podstatě dva typy nosičů. Jak již bylo uvedeno výše, jsou to jednak nosiče založené na silikagelu, které jsou mechanicky odolné. Nevýhodou je zejména limitovaný rozsah pH použité mobilní fáze (2,5 – 8). Druhou možností je použití nosičů, které jsou založeny na bázi různých polymerů. Ty se vyznačují širokým rozsahem použitelného pH mobilní fáze, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Spojení výhodných vlastností obou typů nosičů využívá patentovaná technologie "bridged hybrid particle" nebo "hybrid (silicon-carbon) particle", kde jsou k zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení mechanické odolnosti použity tzv. ethylenové můstky. Tyto nosiče, modifikované příslušnými ligandy, jsou používány jako stacionární fáze v UHPLC. Velikost částic se pohybuje okolo 1,7  $\mu\text{m}$ . Porovnání velikosti částic využívaných v HPLC a UHPLC je znázorněno na obr. 3 [24].



Obr. 3: Částice o velikosti zrnění 5  $\mu\text{m}$ , určené pro HPLC (vlevo) a o velikosti zrnění 1,7  $\mu\text{m}$ , používané v UHPLC (vpravo) [24].

### 3.3.1 Způsoby detekce v kapalinové chromatografii

Zatímco výběr kolony je klíčový pro dosažení požadované separace, na výběru vhodného způsobu detekce je závislá možnost separované látky detekovat, popřípadě kvantifikovat v požadované citlivosti. V kapalinové chromatografii dnes může být použito mnoho způsobů detekce, k nejdůležitějším a nejfrekventovanějším detektorům patří absorpční fotometrické detektory, fluorescenční detektory a hmotnostní spektrometry.

Velmi běžným je absorpční fotometrický detektor (neboli UV/VIS spektrofotometr), který měří absorbanci eluované látky ve viditelné nebo ultrafialové



oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Tento typ detekce se používá pro látky, které ve své struktuře obsahují tzv. chromofory, které jsou schopné v této vlnové oblasti absorbovat záření (barevné látky nebo látky s vícenásobnými vazbami, s aromatickými jádry aj.). Tento typ detektoru je tzv. nedestruktivní, to znamená, že v něm nedochází k chemické přeměně detekovaného analytu, a proto za něho lze zařadit další detektor [25].

Detektor diodového pole (DAD, z anglického Diode Array Detector) snímá, na rozdíl od klasického spektrofotometru, celé spektrum vlnových délek nebo jeho vybraný výsek v reálném čase, a to bez přerušení chromatografické separace. Hlavní předností tohoto typu spektrometru je možnost detekovat látky při jakékoliv zvolené vlnové délce a také možnost porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter [26].

V poslední době je stále častěji používaná detekce založená na hmotnostní spektrometrii (MS, z anglického Mass Spectrometry). Hmotnostní spektrometr je zařízení, které měří  $m/z$  hodnoty, kde  $m$  je relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu a  $z$  je nábojové číslo (počet elementárních nábojů bez ohledu na polaritu) a zaznamenává jejich intenzitu. Ionty se dělí podle poměru  $m/z$ .

V současné době existuje několik různých typů provedení hmotnostního spektrometru, ale všechny typy se skládají ze tří základních částí, a to z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na nabitě částice (kladné nebo záporné ionty) [27].

Ionizační techniky můžeme v zásadě rozdělit do dvou skupin, a to na měkké a tvrdé. Mezi tvrdé ionizační techniky patří zejména elektronová ionizace (EI, z anglického Electron Ionization), probíhající za sníženého tlaku, která je založena na principu předávání energie letících elektronů molekulám analytu. Ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty).

Měkké ionizační techniky jsou šetrnější a ionizovaná molekula získá oproti EI mnohem menší množství energie, a proto lze ve spektrech pozorovat zejména protonované a deprotonované molekuly a minimum fragmentových iontů.

Ve spojení s kapalinovou chromatografií je často využívanou ionizační technikou elektrosprej (ESI, z anglického Electrospray Ionization), který lze použít pro široké spektrum analytů. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku aplikací silného elektrického pole (napětí) vloženého na elektrodu, na jejímž hrotu se vytváří drobné

nabité kapičky, tzv. aerosol. Rozpouštědlo je z nabitých kapiček postupně odpařováno proudem plynu o vysoké teplotě (okolo 300 °C) a postupně se zmenšující kapičky aerosolu uvolňují ze svého povrchu ionty do plynné fáze. Tento typ iontového zdroje je jednoduchý, vyznačuje se vysokou robustností a lze jej použít i při vyšších průtocích mobilní fáze nad 1 ml/min [28].

Další používanou ionizační technikou je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, z anglického Atmospheric Pressure Chemical Ionization). V tomto případě je mobilní fáze s analytem rozprašována do vyhřívané komůrky. Koronový výboj je zdrojem elektronů, které ionizují plyny v komůrce a vzniklé ionty kolidují s molekulami rozpouštědla za vzniku sekundárních reakčních iontů, které následně ionizují molekuly analytu. Výhodou APCI je uplatnění pro méně polární látky, nevýhodou je nevhodnost použití pro termálně labilní látky.

Další velmi používanou ionizační technikou je fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, z anglického Atmospheric Pressure Photoionization). APPI využívá UV záření a fotony jsou následně absorbovány molekulami analytu za vzniku iontů. Technika APPI je vhodná pro látky, které se špatně ionizují v ESI i v APCI [27].

Další součástí hmotnostního spektrometru je hmotností analyzátor, ve kterém dochází k separaci iontů na základě poměru  $m/z$ . Pro tento účel se využívá magnetický hmotností analyzátor, kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor (TOF, z anglického Time-of-flight) a iontová past (IT, z anglického Ion Trap). Jedním z typů hmotnostních analyzátorů je kvadrupólový analyzátor, který je tvořen čtyřmi kruhovými tyčemi připojenými ke stejnosměrnému a střídavému napětí. Ionty o určitém poměru  $m/z$  se pohybují až do detektoru, zatímco ostatní jsou vychýleny a do detektoru nedopadnou.

V posledních letech byla snaha o spojení výhod jednotlivých analyzátorů, a tedy o vytvoření tzv. hybridních analyzátorů, neboli sériového zapojení dvou a více různých analyzátorů, např. trojitý kvadrupól (QQQ) [28].

## 4. Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

- boldenon (čistota  $\geq 99,0$  %, Sigma – Aldrich, Německo)
- testosteron (čistota  $\geq 99,0$  %, Sigma – Aldrich, Německo)
- acetonitril (čistota  $\geq 99,9$  %, Sigma – Aldrich, Německo)
- methanol (čistota  $\geq 99,9$  %, Sigma – Aldrich, Německo)
- mravenčí kyselina (čistota 98 – 100 %, Merck, Německo)
- amoniak (čistota p.a., Lachner – Neratovice, Česká Republika)
- deionizovaná voda (vodivost 1,85  $\mu\text{S}$ , Milli Q purifikační systém Millipore, Bedford, USA)

### 4.2 Instrumentace

- UHPLC – Agilent Technologies 1290 Infinity (Waldbronn, Německo), sestávající se z odplyňovače mobilní fáze, kvartérní pumpy, automatického dávkovače, kolonového termostatu a detektorů:
- DAD Agilent Technologies 1290 Infinity detektor diodového pole (Waldbronn, Německo)
- MS/MS Triple Quad LC-MS Agilent Technologies 6460 tandemový hmotnostní spektrometr (Waldbronn, Německo)
- sběr dat byl proveden v programu Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition verze B.06.00 (Agilent Technologies, USA)
- zpracování dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.06.00 (Agilent Technologies, USA)
- uvedené obrázky 4 – 13 byly extrahovány z programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.06.00 (Agilent Technologies, USA) a číselné hodnoty na ose y jsou uvedeny v relativních jednotkách (tzv. arbitrary units, a.u.)
- kolona – Acquity BEH C<sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), (Waters, Irsko)
- analytické váhy – APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk – Ultrasonic LC 30H (Německo)

### 4.3 Příprava vzorků

Odběr potápníků druhu *Ilybius fenestratus* byl uskutečněn 5.10.2014 v Modřanech v Praze, konkrétně v Modřanské laguně. Bylo odebráno 8 exemplářů *Ilybius fenestratus*. Potápníci byli umístěni do plastového boxu s vodou z místa odběru, která byla poté zaměněna za odstátou kohoutkovou vodu, a byli krmeni zmraženými nítěnkami. Vzorek pro analýzu byl z jednoho potápníka odebrán 10.10.2014.

K získání sekretu produkovaného prothorakální žlázou potápníka byl potápník zmáčknut a uvolněný bílý sekret byl poté odebrán vatovou tyčinkou Bel family (Hartmann-Rico, Heidenheim, Německo) do vialky s 1 ml 100% methanolu. Vzorek byl umístěn na 15 min do ultrazvuku a byl extrahován. Poté byl methanolický roztok uchovávan v mrazáku a před samotnou analýzou byl přefiltrován přes 0,2  $\mu\text{m}$  nylonový filtr Spartan 13/0,2 RC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Jednotlivé zásobní roztoky standardů boldenonu a testosteronu byly připraveny následujícím způsobem: 8 mg boldenonu bylo rozpuštěno ve 100 ml methanolu a 1 mg testosteronu byl rozpuštěn v témže objemu methanolu. Odměrné baňky s methanolickými roztoky pak byly na 5 min umístěny do ultrazvukové lázně pro usnadnění rozpouštění. Poté byly standardní roztoky uchovávány v chladničce při 5 °C.

### 4.4 Podmínky DAD detekce a hmotnostní detekce

Pomocná DAD detekce předcházela hmotnostní detekci. Methanolické vzorky byly proměřovány v rozsahu od 190 – 400 nm, jednotlivý měřicí krok byl 2 nm.

Nastavení hmotnostního spektrometru bylo:

- teplota sušícího plynu ( $\text{N}_2$ ): 330 °C
- průtok sušícího plynu: 8 l/min
- tlak nebulizeru: 35 psi
- napětí fragmentoru: 135 V
- napětí sprejovací kapiláry: 4000 V

Snímaná spektra: mód MS sken, spektra snímána v rozmezí  $m/z$  100 – 2500 jak v pozitivním, tak v negativním ionizačním módu.

#### **4.5 UHPLC podmínky**

Pro analýzu sekretu byl vzhledem ke struktuře steroidních látek zvolen RP-UHPLC separační mód. Byly testovány mobilní fáze obsahující acetonitril nebo methanol jako organický modifikátor v různém poměru s vodnou složkou. Vodná složka byla zastoupena 0,1% vodným roztokem mravenčí kyseliny nebo 0,1% vodným roztokem amoniaku. Všechny analýzy probíhaly při průtoku mobilní fáze 0,35 ml/min za podmínek gradientové eluce. Kolona byla temperována na 30 °C a objem nástřiku vzorku byl 1 nebo 2  $\mu$ l.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Optimalizace separačních podmínek

Vzhledem k tomu, že byla prováděna analýza komplexního vzorku o neznámém složení, byl nejprve jako organický modifikátor mobilní fáze zvolen acetonitril, který má v RP separačním módu vyšší eluční sílu než methanol. Lze předpokládat, že vzorek bude obsahovat řadu látek, které se mohou značně lišit ve své polaritě, a proto byla pro separaci zvolena gradientová eluce, která se k tomuto účelu hodí lépe než eluce izokratická. Složku A gradientu tvořil acetonitril, obsahující 0,1% mravenčí kyselinu (HCOOH) a složkou B byl 0,1% vodný roztok mravenčí kyseliny, použitý gradient je popsán v tabulce 1. Mravenčí kyselina byla přidávána do mobilní fáze pro lepší ionizaci analytu. Dávkovaný objem vzorku byl 1  $\mu$ l.

Tab. 1: Gradient použitý pro počáteční analýzy. Složka A je acetonitril s 0,1% obsahem HCOOH, složka B je 0,1% vodný roztok HCOOH.

čas (min)	A (obj %)	B (obj %)
0	15	85
1	15	85
10	90	10
13	90	10
14,5	15	85
16,5	15	85

Při těchto separačních podmínkách byl změřen methanolicý extrakt sekretu potápníka pomocí skenu celkového iontového proudu (z anglického Total Ion Current). Získaný chromatogram obsahoval řadu píků, z nichž velká část nebyla dostatečně oddělena. Z těchto důvodů byl acetonitril poté vyměněn za methanol ve snaze dosáhnout lepšího rozlišení píků. Profil gradientu byl až na tuto změnu analogický, pouze byla vzhledem k nižší eluční síle methanolu prodloužena délka trvání gradientu, jak dokládá tabulka 2. Nejprve byla vyzkoušena mobilní fáze s přítomností mravenčí

kyseliny, jako druhá byla vyzkoušena mobilní fáze s amoniakem. Z porovnání spekter methanolického extraktu sekretu, změřených v mobilní fázi s mravenčí kyselinou a v mobilní fázi s amoniakem bylo zjištěno, že v přítomnosti amoniaku dochází k lepší ionizaci látek, obsažených v sekretu. Pro získání vyšších odezev byl dávkovaný objem zvýšen z 1 na 2  $\mu$ l.

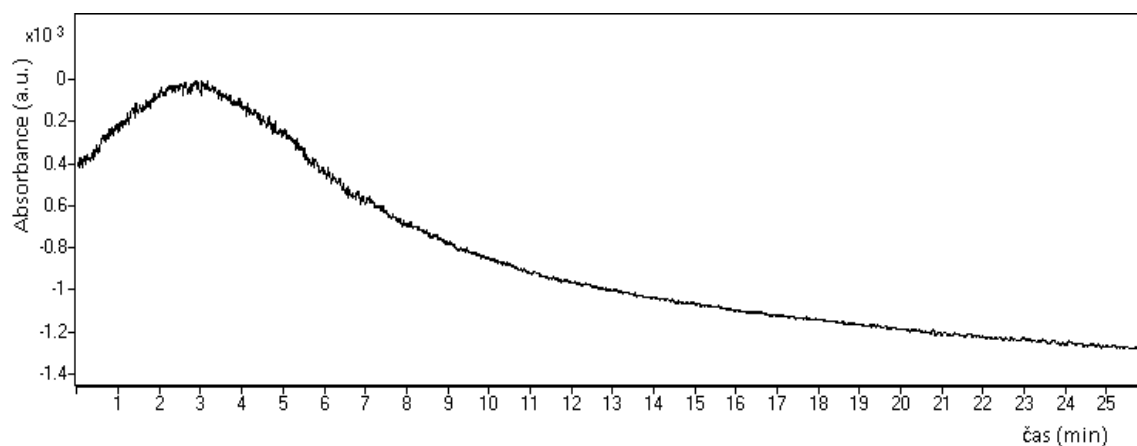
Tab. 2: Gradientový profil s methanolem jako organickým modifikátorem. Složka A je methanol s 0,1% obsahem HCOOH nebo 0,1% amoniakem, složka B je 0,1% vodný roztok HCOOH nebo 0,1% vodný roztok amoniaku.

čas (min)	A (obj %)	B (obj. %)
0	15	85
1	15	85
10	90	10
21	90	10
22	15	85
26	15	85

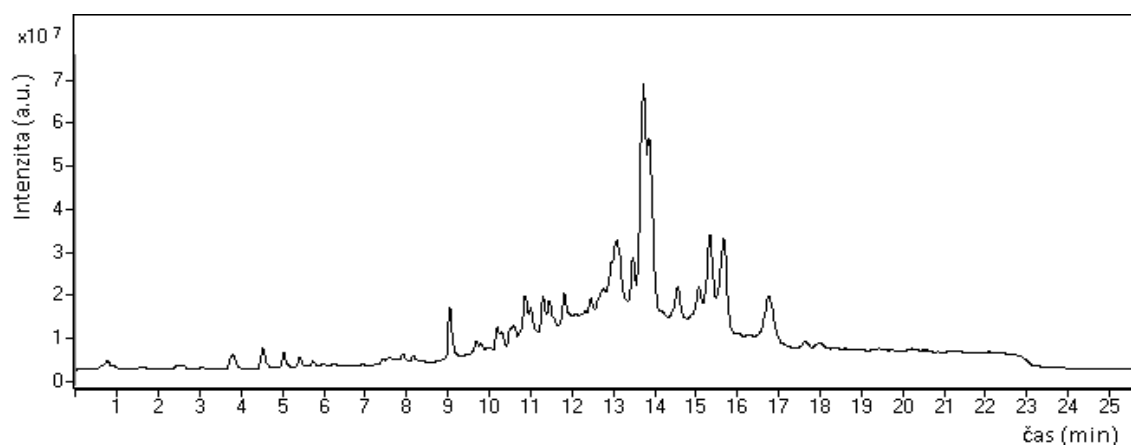
## 5.2 Analýza vzorků

V optimalizovaném separačním systému (mobilní fáze methanol s 0,1% amoniakem/0,1% vodný roztok amoniaku, gradientová eluce viz tab. 2) bylo proměřeno DAD spektrum v rozmezí 190 – 400 nm a MS spektrum ve sken módu v rozmezí  $m/z$  od 100 do 2500 v pozitivním i negativním ionizačním módu jak blanku, tak vlastního vzorku.

Nejprve byl proměřen blank, což byl methanolický roztok, získaný namočením samotné vaty (použité pro odběr sekretu) do methanolu, jenž pak prošel stejnou procedurou, jako vzorek se sekretem (viz kapitola 4.3). Záznam takto získaného chromatogramu s DAD detekcí je uveden na obr. 4 a na obr. 5 je uveden záznam blanku, pořízený v MS skenu. Blank neobsahoval žádné látky, které by v měřeném rozsahu vlnových délek absorbovaly, a na obr. 4 je uveden záznam při vybrané vlnové délce 250 nm.



Obr. 4: Chromatografický záznam analýzy blanku změřený pomocí DAD detekce při  $\lambda = 250$  nm za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



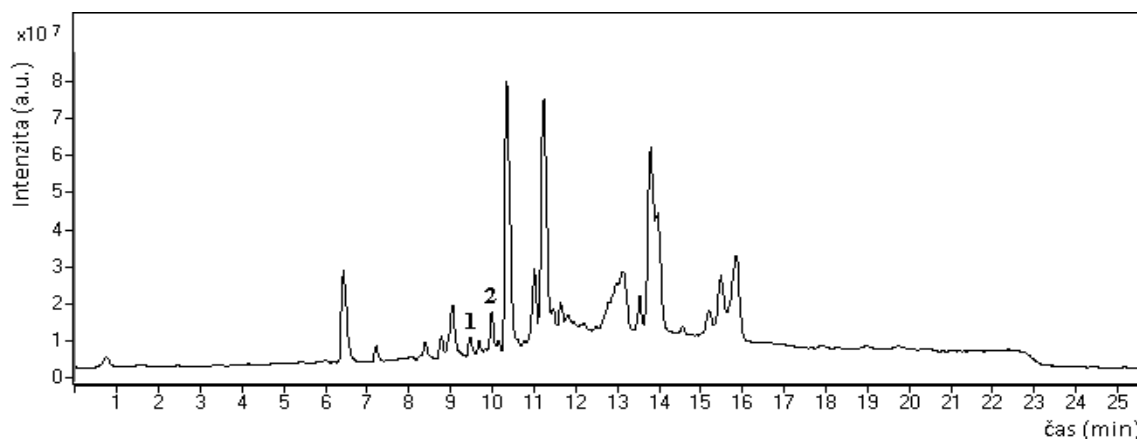
Obr. 5: Chromatografický záznam TIC skenu blanku změřený v režimu MS skenu za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.

Poté byl stejným způsobem změřen vzorek sekretu, získaného z potápníka. Získané chromatogramy jsou uvedeny na obr. 6 a 7. Nejprve bylo porovnáno TIC spektrum získané z blanku (obr. 5) s TIC spektrem sekretu (obr. 6). Tím bylo zjištěno, které píky se vyskytují pouze v měřeném vzorku sekretu a které pocházejí z blanku. Porovnáním chromatogramů získaných s DAD detekcí pro blank (obr. 4) a pro sekret (obr. 7) je dobře vidět, které píky ze směsi absorbují při  $\lambda = 250$  nm. Zatímco v sekretu

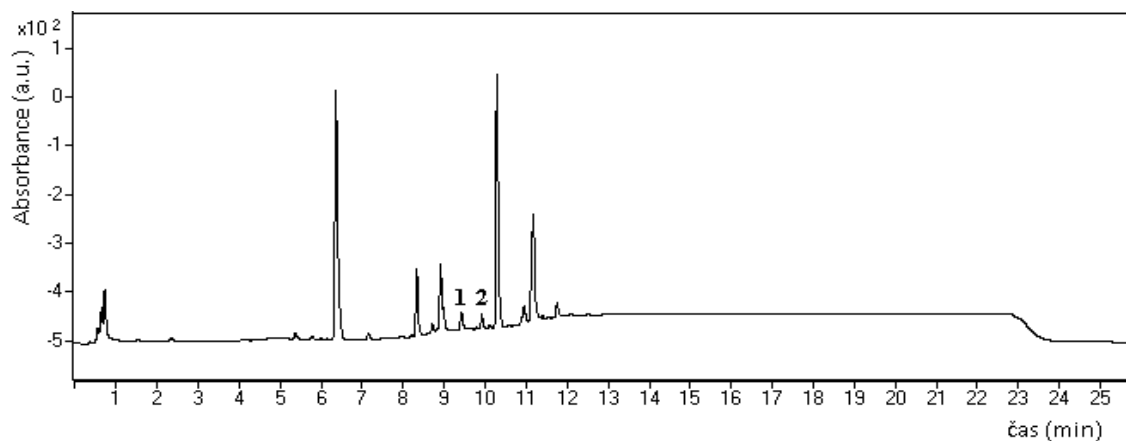


potápníka (obr. 7) lze vidět několik dobře viditelných píků, blank žádný pík neobsahuje (obr. 4).

Jak již bylo uvedeno výše (kapitola 3.1), druh *Ilybius fenestratus* produkuje velké množství obranných látek steroidní povahy [9, 13, 14]. Pro látky, které již byly v minulosti v sekretu identifikovány a popsány, byly vypočítány jejich relativní molekulové hmotnosti. Jelikož náš vzorek sekretu byl měřen v módu MS sken jak v pozitivním, tak i v negativním ionizačním módu, byla k jednotlivým vypočítaným hmotnostem přičtena hodnota +1 a -1. Získané hmotnosti, respektive  $m/z$ , kde  $z$  je položeno rovno jedné, byly hledány ve spektrech, změřených v pozitivním, respektive negativním ionizačním módu. Ze všech naměřených píků odpovídaly pouze dva z nich hledaným relativním molekulovým hmotnostem. Pík, elující v čase 9,49 min by mohl odpovídat boldenonu (1) a pík, elující v čase 10,00 min by mohl odpovídat testosteronu (2).

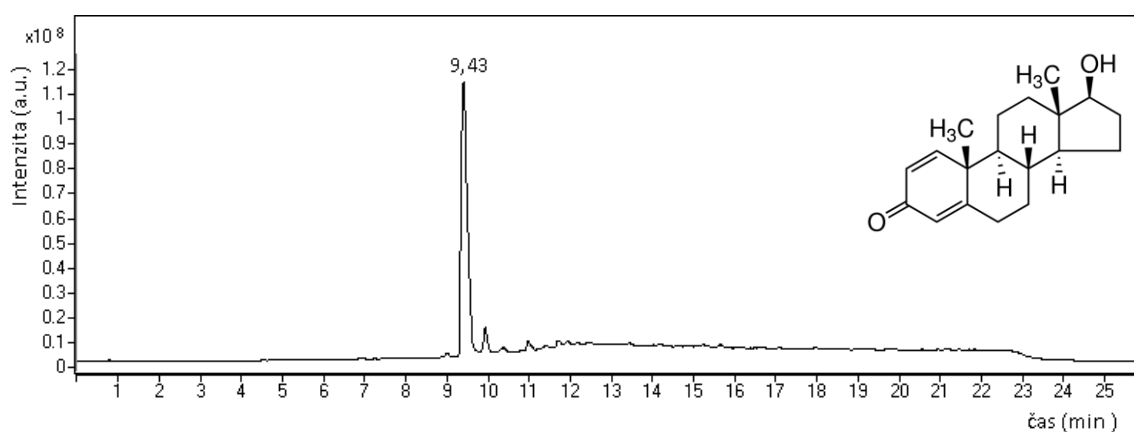


Obr. 6: Chromatografický záznam TIC skenu methanolického extraktu obranného sekretu potápníka změřený za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1. Pík označený č. 1, by mohl odpovídat boldenonu a pík č. 2 testosteronu.

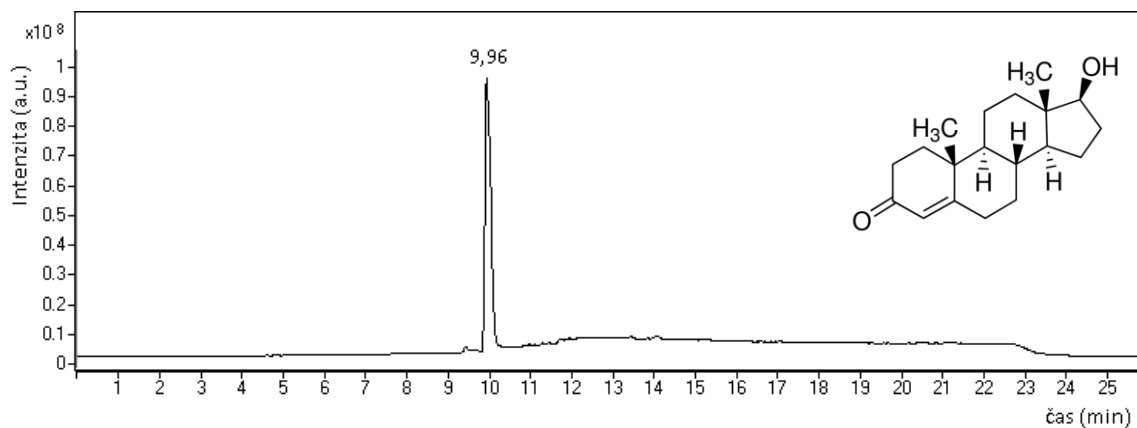


Obr. 7: Chromatografický záznam methanolického extraktu obranného sekretu potápníka změřený pomocí DAD detekce při  $\lambda = 250$  nm za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1. Pík označený č. 1, by mohl odpovídat boldenonu a pík č. 2 testosteronu.

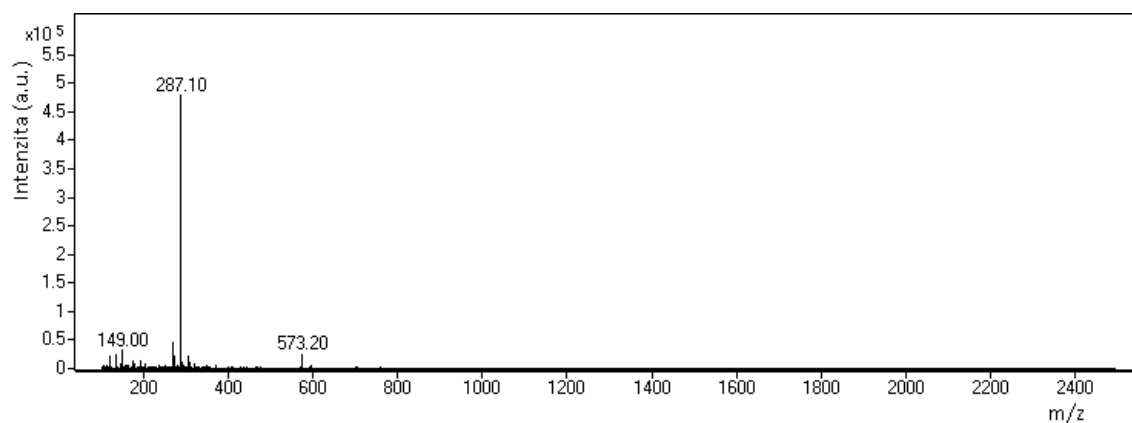
Pro potvrzení identifikace byly zakoupeny standardy těchto dvou steroidních látek a jejich vzorky byly změřeny za stejných podmínek jako vzorek sekretu na UHPLC za použití DAD i hmotnostního detektoru (viz kapitola 4.4 a 5.1). Chromatogramy standardů boldenonu a testosteronu, které dokazují, že se jejich retenční časy shodují s retenčními časy píků ze sekretu potápníka (obr. 6) jsou uvedeny na obrázcích 8, respektive 9. Standardy a látky identifikované v sekretu potápníka se také shodují v příslušných MS spektrech, která jsou uvedena na obrázcích 10 – 13.



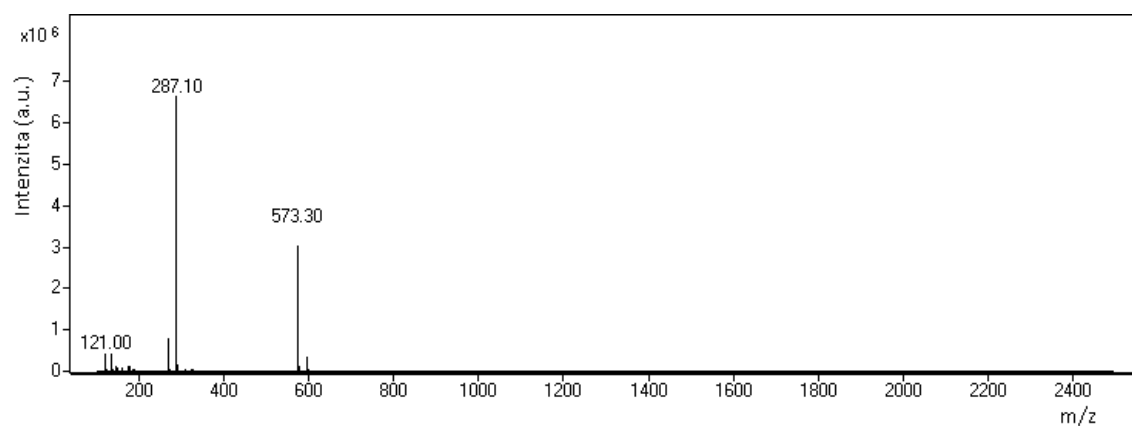
Obr. 8: Chromatografický záznam TIC skenu standardu boldenonu změřený za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



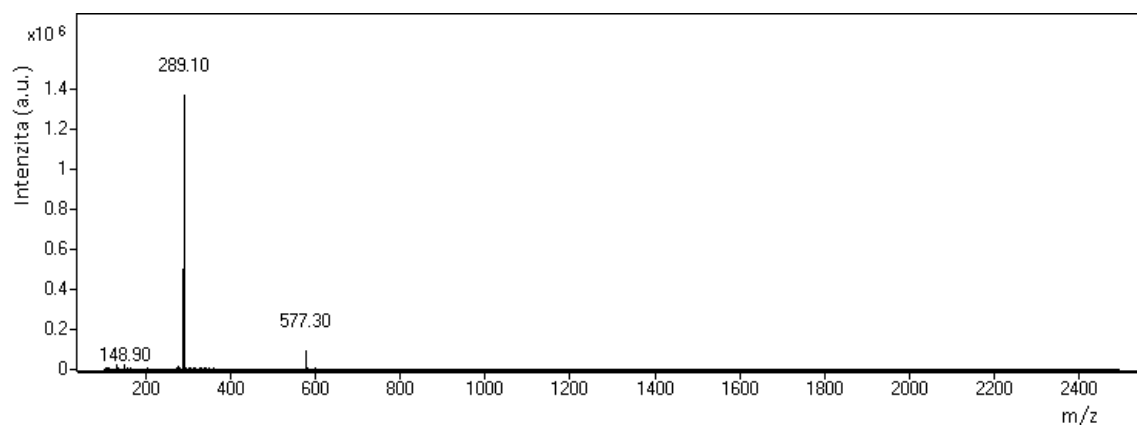
Obr. 9: Chromatografický záznam TIC skenu standardu testosteronu změřený za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



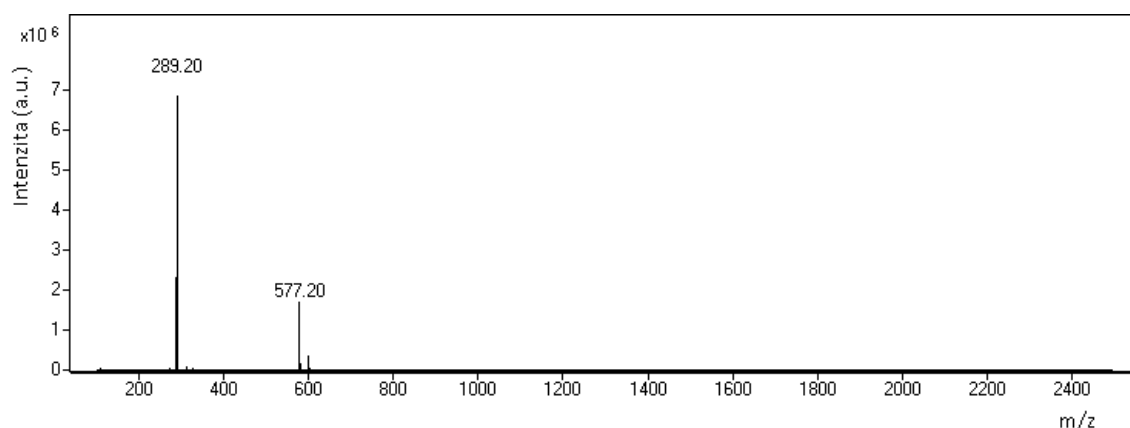
Obr. 10: MS spektrum píku nalezeného v sekretu s retencí 9,93 min, změřeno v pozitivním ionizačním módu za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



Obr. 11: MS spektrum standardu boldenonu, změřeno v pozitivním ionizačním módu za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



Obr. 12: MS spektrum píku nalezeného v sekretu s retencí 10,00 min, změřeno v pozitivním ionizačním módu za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.



Obr. 13: MS spektrum standardu testosteronu, změřeno v pozitivním ionizačním módu za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.4 a 5.1.

Data, získaná pro identifikaci píku 1 (odpovídající boldenonu) a píku 2 (odpovídající testosteronu) v sekretu potápníka hmotnostní detekcí, jsou shrnuta v tabulce č. 3.

Tab. 3: Retenční časy a nejintenzivnější hodnoty  $m/z$  pro píky 1 a 2 a standardy boldenonu a testosteronu.

	$t_r$ (min)	$m/z$
<b>pík 1</b>	9,49	287,10; 573,20
<b>standard boldenonu</b>	9,43	287,10; 573,30
<b>pík 2</b>	10,00	289,10; 577,30
<b>standard testosteronu</b>	9,96	289,20; 577,20

Řádové odhadnutí koncentrace boldenonu a testosteronu v sekretu bylo založeno na porovnání ploch získaných pro koncentraci standardu boldenonu (0,08 mg/ml), respektive testosteronu (0,01 mg/ml) s plochami píků, odpovídajícími boldenonu a testosteronu v sekretu. Bylo zjištěno, že boldenon by se mohl ve vzorku pohybovat v řádu  $10^{-3}$  mg/ml a testosteron v řádu  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mg/ml. Přesné stanovení koncentrace pomocí metody standardního přídatku bude předmětem budoucí práce na toto téma.

## 6. Závěr

V rámci této bakalářské práce byla vypracována nová, moderní analytická metoda určená pro analýzu obranného sekretu, produkovaného prothorakálními žlázami potápníka druhu *Ilybius fenestratus*. Metoda je založená na spojení vysoce účinné separační techniky – ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie – s univerzální DAD detekcí a s vysoce citlivou a selektivní hmotnostní detekcí.

Ve dvousložkové mobilní fázi, tvořené methanolem s 0,1% obsahem amoniaku a 0,1% vodným roztokem amoniaku za podmínek gradientové eluce, byl na koloně Acquity BEH C<sub>18</sub> analyzován methanolický extrakt obranného sekretu potápníka *Ilybius fenestratus*. V sekretu byly identifikovány dva steroidní hormony, a to boldenon a testosteron, jejichž přítomnost byla potvrzena pomocí standardů obou steroidů.

## 7. Použitá literatura

1. *Handbook of Zoology, A Natural History of Phyla of the Animal Kingdom*, Vol. IV Arthropoda: Insecta, Part 38, Volume 1: Coleoptera, Beetles, Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim) Beutel R.G., Leschen R.A.B. (eds.), Berlin, Walter de Gruyter, 2005.
2. Hájek J., Šťastný J., Dytiscidae (potápníkovití), In: *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*, Farkač J., Král D., Škorpík M. (eds.), Praha, Agentura Ochrany Přírody a Krajiny ČR, 2005, p. 414 – 416.
3. Miller K., The Phylogeny of Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae) and the Evolution of Sexual Conflict, *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 79, (3), 359 – 388, 2003.
4. Kehl S., Morphology, Anatomy, and Physiological Aspects of Dytiscids, In: *Ecology, Systematics, and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae)*, Yee D. (ed.), Dordrecht, Springer, 2014, p. 173 – 198.
5. Ribera I., Nilsson A.N., Morphometric Patterns among Diving Beetles (Coleoptera: Noteridae, Hygrobiidae, and Dytiscidae), *Canadian Journal of Zoology*, vol. 73, (12), 2343 – 2360, 1995.
6. Larson D.J., Alarie Y., Roughley R.E., *Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae) of the Nearctic Region, with Emphasis on the Fauna of Canada and Alaska*, Ottawa, National Research Council of Canada Research Press, 2000.
7. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*, Wyatt T.D. (ed.), UK Cambridge University Press, 2003, p. 1 – 36.
8. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals*, Schulz S. (ed.), 2. vydání, Berlin, Springer, 2005, p. 85 – 166.

9. Dettner K., Chemical Ecology and Biochemistry of Dytiscidae, In: *Ecology, Systematics, and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae)*, Yee D. (ed.), Dordrecht, Springer, 2014, p. 235 – 306.
10. Morgan E.D., *Biosynthesis in Insects*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2010, p. 255 – 293.
11. Ghidini G., Ghiandole pigidiali aromatiche in Coleotteri Dytiscidae, *Bolletino della Societa Entomologica Italiana*, vol. 87, 67 – 69, 1957.
12. Eisner T., Eisner M., Siegler M., *Secret Weapons*, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 2005.
13. Schildknecht H., Birringer H., Maschwitz U., Testosteron als Abwehrstoff des Schlammschwimmers *Ilybius*, *Angewandte Chemie*, Germany Edition, vol. 79, 579 – 580, 1967a.
14. Schildknecht H., Krebs G., Birringer H., Tryptophan als Precursor des Insekten Alkaloids 8-Hydroxychinolin-carbonsäure-2-methylester aus *Ilybius fenestratus*, *Chemiker Zeitung*, vol. 95, 332 – 333, 1971.
15. Noppe H., Le Bizec B., Verheyden K., De Brabander H.F., Novel Analytical Methods for the Determination of Steroid Hormones in Edible Matrices, *Analytica Chimica Acta*, vol. 611, (1), 1 – 16, 2008.
16. Schaaf O., Baumgarten J., Dettner K., Identification and Function of Prothoracic Exocrine Gland Steroids of the Dytiscid Beetles *Graphoderus cinereus* and *Laccophilus minutus*, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 26, (10), 2291 – 2305, 2000.
17. Jungnickel H., Dettner K., Identification of Steroids from the Defensive Glands of *Agabus Guttatus* (Payk) (Coleoptera: Dytiscidae) with Respect to a Possible Involvement of Microorganisms in the Steroid Biosynthesis, *Mitteilungen der*



*Deutschen Gesellschaft fuer Allgemeine und Angewandte Entomologie* , vol. 11, (1 – 6), 895 – 898, 1997.

18. Newhart A. T., Mumma R. O., Defensive Secretions of Three Species of *Acilius* (Coleoptera: Dytiscidae) and Their Seasonal Variations as Determined by High-pressure Liquid Chromatography, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 5, (5), 643 – 652, 1979.

19. Miller J., Mumma R., Physiological Activity of Water Beetle Defensive Agents. I., Toxicity and Anaesthetic Activity of Steroids and Norsesquierpenes Administered in Solution to the Minnow *Pimephales promelas*, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 2, 115 – 130, 1976a.

20. Chapman J.C., Lockley W.J.S., Rees H.H., Goodwin T.W., Stereochemistry of Olefinic Bond Formation in Defensive Steroids of *Acilius sulcatus* (Dytiscidae), *European Journal of Biochemistry*, vol. 81, 293 – 298, 1977.

21. Poole C., Poole S.K., *Chromatography today*, Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 312 – 600.

22. Unger K.K., Adsorbents in Column Liquid Chromatography, In: *Packing and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, Unger K.K. (ed.), New York, Marcel Dekker, 1990.

23. Dong M.W., Zhang K., Ultra-high-pressure Liquid Chromatography (UHPLC) in Method Development, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 63, 21 – 30, 2014.

24. Nováková L., Douša M., kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Klatovy, Michal Douša, 2013.

25. Kellner R., Mermet J.M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H.M., Organic Mass Spectrometry, In: *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, 2. vydání, Weinheim, Wiley, 2004, p. 823 – 895.

26. Scott R.P.W., *Liquid Chromatography Detectors*, Amsterdam, Elsevier, 1986, p. 103 – 105.
27. Holcapek M., Jirasko R., Lisa M., Recent Developments in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Related Techniques, *Journal of Chromatography A*, vol. 1259, 3 – 15, 2012.
28. Friedecký D., Lemr K., Úvod do hmotnostní spektrometrie, 1. Díl, *Klinická biochemie a metabolismus*, vol. 20, (41), 152 – 157, 2012.