

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Vývoj metody pro stanovení hmyzího juvenilního
hormonu GC/MS technikou**

**Development of a method for determination of insect
juvenile hormone using GC/MS**

Jana Krasulová

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Doc. RNDr. Ireny Valterové, CSc. (garantka Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.) a že jsem všechny prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v Praze je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 7. 5. 2008

Krasulova'

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
ÚVOD.....	5
CÍLE PRÁCE.....	5
TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1 Literární přehled.....	7
1.1 Juvenilní hormony (JH).....	7
1.2 Termiti (<i>Isoptera</i>).....	10
1.3 Čmeláci (<i>Hymenoptera: Apidae: Bombini</i>).....	13
1.4 Stanovení JH.....	15
1.5 GC/MS.....	17
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
2 Materiál a metody.....	19
2.1 Chemikálie.....	19
2.2 Biologický materiál.....	20
2.2.1 Termiti.....	20
2.2.2 Čmeláci.....	20
2.3 Přístroje.....	21
2.4 Metody.....	22
VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
3.1 Mez detekce pro JH III.....	25
3.2 Kalibrační křivka.....	29
3.3 Optimalizace podmínek.....	31
3.4 Stanovení titru JH III čmeláků.....	33
3.5 Stanovení titru JH III termitů.....	35
ZÁVĚR.....	39
POUŽITÁ LITERATURA.....	40

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	plocha
CA	<i>corpora allata</i>
Da	Dalton
DB1	100% dimethylpolysiloxan
DB5	(5% fenyl)-methylpolysiloxan
d ₄ -methanol	perdeuterovaný methanol
full scan	skenování rozsahu hmot
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
JH	juvenilní hormon
JHA	analog juvenilního hormonu
JH III	juvenilní hormon III = methylester kyseliny (<i>E,E</i>)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienové
JHBP	vazebný protein pro JH (juvenile hormone binding protein)
JHCP	transportní protein pro JH (juvenile hormone carrier protein)
LC	kapalinová chromatografie
methoxyhydrin	11-methoxy-d ₃ -10-hydroxyderivát JH III
NFH-OH	<i>n-1H,1H,2H,2H</i> -perfluorohexanol
RF	radiofrekvence
RIA	radioimunoassay
SIM	sledování vybraného iontu (select ion monitoring)
TC199	inkubační medium
TFA	kyselina trifluoroctová
TIC	celkový iontový proud (total ion current)
TLC	tenkovrstvá chromatografie

ÚVOD

Juvenilní hormon je klíčovou látkou hmyzí fyziologie, jelikož ovlivňuje téměř všechny aspekty hmyzího života. Hlavním motivem pokusů s juvenilním hormonem a jeho analogy je pochopení jejich působení a využití těchto znalostí pro regulaci ekonomicky významných druhů hmyzu. Jako příklad je možno uvést použití juvenoidů pro místní vyhubení mravence faraóna *Monomorium pharaonis*¹. Stanovení titru juvenilního hormonu má také důležitou roli při základním výzkumu fyziologie hmyzu.

Problémem při stanovení juvenilního hormonu analytickými metodami jsou v první řadě jeho velmi nízké koncentrace v tělech hmyzu, které se obvykle pohybují v řádech pikogramů až nanogramů. V současnosti jsou nejvíce používané dva metodické přístupy. Prvním je využití metody RIA při *in vitro* měření rychlosti biosyntézy juvenilního hormonu žlázou *corpora allata*, druhým je derivatizace juvenilního hormonu a následné stanovení metodou plynové chromatografie s hmotností detekcí. Druhá zmíněná metoda se ukázala jako dostatečně citlivá, avšak dosud používaný způsob přípravy vzorku zahrnoval dvě sloupcové chromatografie a několik odpařování, což vedlo k řádovým rozdílům v naměřených koncentracích u stejného modelového organismu různými výzkumnými týmy.

CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je vypracování a optimalizace metody stanovení juvenilního hormonu v hemolymfě hmyzu. Metoda by měla zahrnovat co nejméně purifikačních kroků, aby se minimalizovaly ztráty, měla by vyžadovat co nejmenší spotřebu hmyzího materiálu a měla by být jednoduchá a rychlá, aby ji bylo možné rutinně využít při studiu hmyzí fyziologie.

Dalším cílem je ověření vyvinuté metody stanovením hladin juvenilního hormonu v reálných vzorcích hmyzího materiálu. Hlavním modelovým organismem je termití druh *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae), u kterého dosud nebyly studovány rozdíly v titru juvenilního hormonu u různých kast a vývojových stadií.

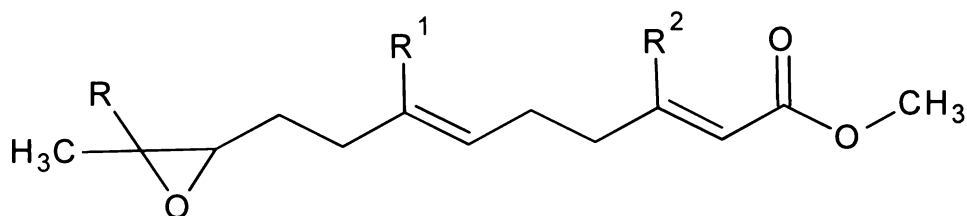
TEORETICKÁ ČÁST

1 Literární přehled

1.1 Juvenilní hormony (JH)

Juvenilní hormon (JH) byl identifikován v roce 1934 u plošnice *Rhodnius prolixus*, kdy se o něm začalo uvažovat jako o možném faktoru, jenž zabraňuje metamorfóze nymfy v dospělce. V roce 1956 byl poprvé izolován z abdomenu můry *Hyalophora cecropia*.² Dnes je již juvenilní hormon díky svým rozmanitým funkcím považován za klíčový hormon hmyzí fyziologie. V první řadě je JH univerzálním regulačním činitelem řídícím metamorfózu, jehož zvýšená koncentrace udržuje jedince v larválním (juvenilním) stádiu a zamezuje metamorfóze v dospělce. Teprve při poklesu jeho koncentrace se vyvíjí kukla a až při úplném vymizení vzniká dospělý jedinec. Odtud také název hormonu, tj. „juvenilní“ či „status quo“ hormon³. U dospělců se pak JH zásadně podílí na řízení a načasování rozmnožování, spouští reprodukční chování, reguluje vitellogenezi u samic, stimuluje činnosti přídatných pohlavních žláz samců. Mezi další funkce JH patří řízení diapauzy, metabolismu, pigmentace.^{3,4,5} JH také ovlivňuje polyfenismus samotářského hmyzu, např. fázový a barevný polymorfismus sarančat a mšic, a přebírá mnoho funkcí u hmyzu společenského. Zde hraje hlavní úlohu při diferenciaci kast, neboť jeho přítomnost či absence během určitých kritických období rozhoduje o vývojové cestě nediferencovaných stadií. JH se dále účastní dělby práce a stimulace vývoje dominantních jedinců⁶.

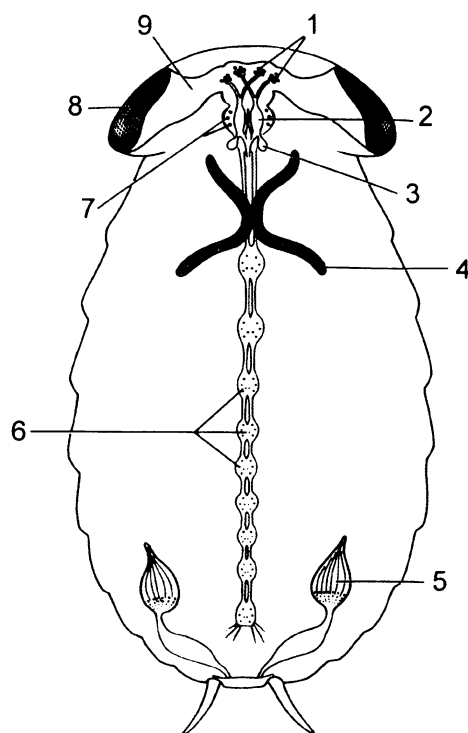
Z chemického hlediska patří juvenilní hormony mezi sesquiterpeny. Jejich struktura je odvozena od farnesolu a je pro ně charakteristická epoxidová skupina na jednom konci a methylesterová skupina na konci druhém. Jsou známy čtyři přírodní analogy, které se liší substitucí řetězce (obr. 1.)



Obr. 1. JH 0....R=R¹=R²=C₂H₅ JH IR=R¹= C₂H₅; R²= CH₃
JH II....R= C₂H₅; R¹=R²= CH₃ JH III...R=R¹=R²= CH₃

Zatímco JH 0 byl nalezen pouze u vajíček lišaje tabákového (*Manduca sexta*) a JH I a JH II se vyskytují jen u motýlů, JH III byl identifikován napříč mnohými ostatními řády hmyzu³.

Hmyz má mezi bezobratlými nejdokonaleji vyvinutý endokrinní systém (obr. 2). Syntéza juvenilních hormonů probíhá sérií enzymatických reakcí mevalonátové cesty v *corpora allata*⁷, což je párová žláza s vnitřní sekrecí v zadní části hlavy v blízkosti hltanu. Její původ je ektodermální, má oválný nebo vejčitý tvar, velikostí je srovnatelná s průměrem aorty, ale mění se v závislosti na věku, pohlaví, polymorfismu a aktivitě tohoto orgánu⁵.



Obr. 2. Endokrinní systém hmyzu⁸:

1. mozkové neurosekretorické buňky
2. *corpora cardiaca*
3. *corpora allata*
4. prothorakální žláza
5. ovarium
6. neurosekretorické buňky nervové pásy
7. neurosekretorické buňky suboesophageálního ganglia
8. složené oko
9. mozek

Nově syntetizovaný juvenilní hormon je přímo uvolňován do hemolymfy, kde je transportován speciálním bílkovinným nosičem, tzv. *juvenile hormone binding proteinem* (JHBP), který také bývá označován jako *juvenile hormone carrier protein* (JHCP). Navázání juvenilního hormonu na přenašeč zajišťuje jeho ochranu před esterázami hemolymfy⁵.

Syntéza juvenilních hormonů je regulována mozkovými neurohormony allatotropinem a allatostatinem⁷, dále zpětnovazebným mechanismem, kdy snížení koncentrace JH v hemolymfě podporuje jeho syntézu a naopak, přítomností gonád, které syntézu stimulují, a inervací *corpora allata*⁵. Koncovým článkem v regulačním cyklu JH je jeho enzymatická degradace. Juvenilní hormon bývá nejčastěji degradován přímo v hemolymfě, kdy se hydrolyzuje jeho esterová vazba účinkem esterázy JH. Aktivita tohoto enzymu je ovlivněna mnoha faktory, jako je fotoperioda, výživa, stres a další. JH může být také odbouráván epoxidovou hydratací, oxidací a konjugací molekul⁵.

1.2 Termiti (*Isoptera*)

Termiti jsou nejstarší eusociální skupinou hmyzu⁹. Vyznačují se vysoce rozvinutým kastovním systémem, kdy se příslušníci jednotlivých kast dělí o úlohy reprodukční, obranné, pečovatelské a stavební¹⁰. Dělíme je na nižší termity, kam řadíme čeledi Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, a na vyšší termity s jedinou početnou čelí Termitidae. Termiti náležejí k primitivnímu hmyzu, nejbližšími příbuznými jsou švábi¹¹. Jejich vývoj je hemimetabolní, jsou tedy zástupci hmyzu s nedokonalou proměnou, kdy se jedinec vyvíjí sledem svlékání doprovázených postupným vývojem znaků dospělce, kterými jsou křídla, složené oči, gonády. Schází stadium kukly, a tedy i metamorfóza¹². Jedinec tak narozdíl například od blanokřídlého společenského hmyzu nenáleží celoživotně k jedné kastě, může naopak proměňovat směr svého vývoje, a tedy i svou kastovní příslušnost na základě stimulů z okolí. Tyto vnější sociální a environmentální vlivy určují hladinu JH v hemolymfě, která rozhoduje o spuštění genové exprese směrem k vývoji určité kasty. Kastovní příslušnost tedy není určena geneticky^{6,10,12}.

Zakladatelem kolonie termitů je pár primárních pohlavních jedinců - král a královna¹³ (obr. 3). Nejpočetnější kastou v kolonii jsou dělníci (obr. 4), kteří se vyznačují schopností složité kooperace při plnění různých úkolů. Další kategorií, přítomnou s výjimkou několika málo druhů u všech termitů, je kasta vojáka (obr. 5), extrémně specializovaná svou stavbou těla a chováním k plnění obranných úloh. Díky své specializaci jsou ale vojáci zcela závislí na dělnících, neboť nejsou schopni samostatné výživy. Termití vojáci jsou vybaveni pro mechanickou obranu, tvarem hlavy a zejména kusadel, nebo pro obranu chemickou, zde se jedná o exokrinní žlázy určené k syntéze jedů, iritantů, repelentů a lepkavých látek^{14,15}.



Obr. 3. Král a královna



Obr. 4. Dělník



Obr. 5. Voják

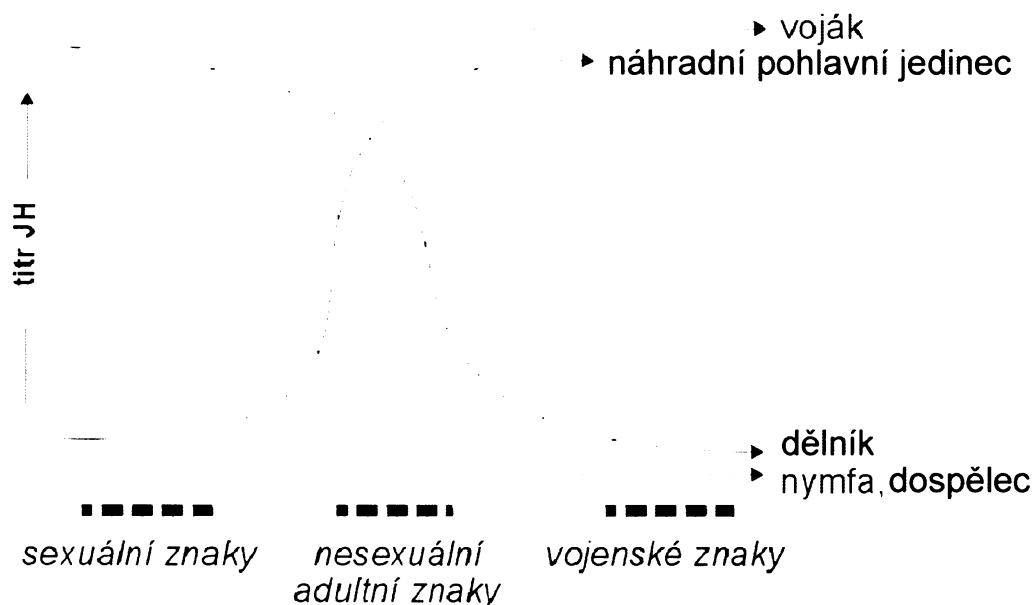


Obr. 6. Bílý voják

Počet vojáků v termitích koloniích je druhově specifický a záleží na obranné a hnízdní strategii. V přírodě se tak můžeme setkat s druhy s méně než 1 % vojáků stejně jako s druhy s více než 25 % vojáků¹⁶. Při nízkém stavu je regulačním mechanismem stimulována tvorba vojáků, zatímco nadbyteční vojáci jsou odstraňováni kanibalistickými útoky ze strany dělníků nebo hynou vyhladověním^{17,18}.

Experimentálně bylo opakovaně ověřeno, že izolace dělníků vede k biochemickým a fyziologickým změnám, jejichž výsledkem je nastartování vývoje ve vojáka¹⁹. Předpokladem takové sociální regulace je existence inhibičního feromonu, který je syntetizován vojáky a zamezuje tvorbě dalších vojáků. Přestože zdroj a chemická podstata tohoto feromonu jsou stále neznámé, jeho fungování je popsáno již několik desetiletí. Vývoj dělníka ve vojáka vede vždy přes přechodné stadium bílého vojáka a je předcházen zvýšením titru JH^{20,21}. Bílý voják (obr. 6) má již některé morfologické znaky vojáka, ale chybí mu pigmentace (odtud označení „bílý“ voják), je málo aktivní a neúčastní se obranných aktivit. Po 8-20 dnech se svléká ve vojáka.

V průběhu stadia bílého vojáka je titer JH nejvyšší, mírně naopak klesá u definitivních vojáků^{20,21,22}. Změny koncentrace JH v hemolymfě nediferencovaného jedince jsou popsány v modelu uvedeném na obr. 7.

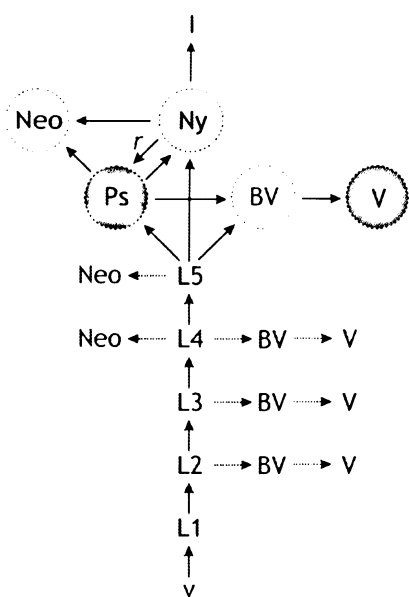


Obr. 7. Průběh titru JH v hemolymfě nediferencovaného jedince (dělňíka) v období mezi dvěma svlékáními a výsledný směr dalšího vývoje. Dole čárkovaně periody citlivosti k expresi různých sad znaků, šipky naznačují charakter následujícího svlékání. Podle literatury²³.

U termitů v přírodě dochází k sezónním změnám v titru juvenilního hormonu. Tato variabilita a s ní spojené kolísání v počtu vojáků v kolonii byly studovány u druhu *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae)²⁴. Titr JH vojáků byl obecně vyšší než dělníků, ale sezónní variace měla stejný trend u obou kast. V květnu docházelo ke zvýšení titru, v červnu a červenci bylo dosaženo nejvyšších hodnot a již od září nastal pokles, který přetrval během podzimu a zimy. Tato variabilita má své logické vysvětlení, protože právě v letním období dochází ke zvýšené tvorbě vojáků potřebných pro období rojení. Z toho plyne i změna titru JH a také změna výsledného počtu vojáků v kolonii při přesunu do laboratorních podmínek²⁵.

Více než 40 let jsou prováděny pokusy s použitím juvenilního hormonu a jeho analogů u termitů s cílem případné regulace jejich populací. Po prvních experimentech, kdy byla transplantována funkční žláza *corpora allata*, následovalo testování mnoha umělých analogů na početných skupinách nebo celých koloniích.

Hlavním modelovým druhem v této práci je *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) původem z Karibské oblasti (Kuba), pro nějž je typický vysoký počet vojáků a jeho chov v laboratoři je poměrně snadný (obr. 8). Titr JH jednotlivých kast tohoto druhu dosud nebyl stanovován. Dalším je původem asijský druh *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae), který byl zavlečen do USA a páchá zde obrovské škody na majetku. Titr JH u jednotlivých kast byl u *C. formosanus* opakovaně studován, avšak výsledky různých výzkumných týmů se liší až o dva řády. Posledním druhem užívaným v této práci je *Kaloterme flavicollis* (Kalotermitidae) z Chorvatska, jehož vojáci váží až 9 mg a titr JH u něj dosud studován nebyl.



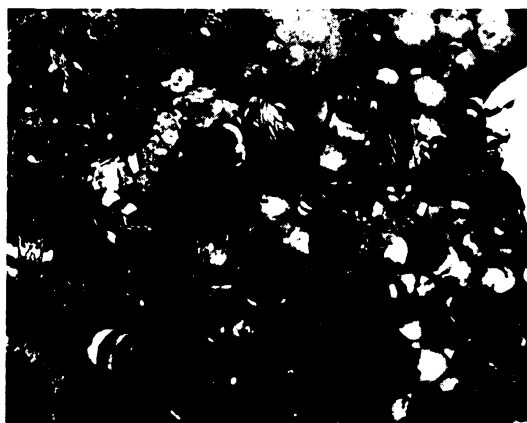
Obr. 8. Vývojové schéma rodu *Prorhinotermes* podle Roisina²⁶. Vysvětlivky: v - vajíčko; L1-L5 - larvální instary; L6-L9 - pokročilé larvy (pseudergati); BV - bílý voják; V - voják; Ny - nymfa; I - imago; r - regresivní svlékání. Tečkované ohraničení označuje skupiny jedinců různých stadií, kteří se vzájemně liší jen v morfologických detailech. Tečkované šipky označují vývojové linie, které jsou platné jen pro incipientní kolonie.

1.3 Čmeláci (*Hymenoptera: Apidae: Bombini*)

Čmeláci patří mezi blanokřídlý společenský hmyz. Jejich původ se datuje do třetihor, kdy se začali vyvíjet souběžně s krytosemennými rostlinami. Centrem vývoje byla střední Asie, nyní jsou však rozšířeni v celém mírném pásu severní polokoule, na severu Afriky, jihu Ameriky a jihovýchodě Asie²⁷.

Čmeláci slouží jako modelové organismy při studiu vztahů v ekosystémech a mechanismů vzniku a vývoje sociální hierarchie. Jsou také citlivým indikátorem změn v krajině. Ve většině evropských zemí včetně České republiky patří mezi chráněné nebo ohrožené druhy zvířat. Charakteristickým znakem je hustá srst na povrchu těla, jež zajišťuje tepelnou izolaci. Před predátory jsou chráněni jednak výstražným zbarvením, jednak žihadlem. Potravou je převážně nektar květů, který pro čmeláka představuje zdroj energie, tepla a umožňuje mu létat, a pyl jako zdroj bílkovin.

Čmeláci společenstvo (obr. 9) je tvořeno matkou a podřízenými dělnicemi. Kolonii zakládá sama matka, která se probouzí ze zimního spánku v období března a dubna v závislosti na teplotě, délce prohřátí půdy a také na velikosti a konkrétním druhu čmeláka. Jakmile matce dozrají vajíčka ve vaječnicích, začíná hledat vhodné místo pro založení hnízda²⁸. Do voskové buňky naklade vajíčka, ze kterých se po 4-6 dnech vylíhnou larvy. Ty po přibližně dvaceti dnech vytvoří kokony. Z povrchu kokonů matka seškrábe kusadly vosk a asi po dvou týdnech se ze zámotků líhnou dělnice. Tyto dělnice jsou malého vzrůstu, nejdříve pomáhají matce s péčí o další generace larev, poté hledají a přinášejí potravu. Během léta se při dostatečné velikosti hnízda narodí samci a nové matky, jež se spáří a jako jediné přečkají zimu. Jedná se tedy o kolonii jednoletou. Samci se líhnou z neoplozených vajíček, které matka klade po tzv. bodu zvratu²⁷.



Obr. 9. Čmeláci společenstvo

Důležitou roli v životě čmeláků hrají feromony²⁹. Pomocí feromonu, který brání vývoji vaječnicků, udržuje matka dělnice v podřízeném stavu. Jakmile matka toto dominantní postavení ztratí, dojde k vývoji vaječnicků dělnic a stoupne jejich agresivita. Dalšími feromony matka označuje plod, aby ho dělnice v temném hnízdě našly a zahřívaly. K orientaci uvnitř hnízda slouží tzv. stopovací feromony vznikající v Dufourově žláze na zadečku dělnic. Bohatý zdroj potravy označují pomocí těkavých složek sekretu tarsálních žláz umístěných na chodidlech. Do určité koncentrace jsou dělnice lákány těmito pachovými stopami, při vysokých hodnotách jsou naopak odpuzovány. Feromony mají zásadní význam při rozmnožování. Samečci opakovaně létají po určité dráze a značují objekty druhově specifickým feromonem, který přitahuje neoplozené samičky. Tento typ chování samců se nazývá patrolování³⁰.

Klíčovou úlohu zastává také juvenilní hormon, který reguluje sociální hierarchii a tedy celý roční cyklus kolonie. Jeho titer koreluje s výše popsaným dominantním chováním královen. V prvních dnech mají ovšem královny nízkou hladinu JH, při jeho experimentální aplikaci mladým královnám se zastavuje vývoj tukového tělesa, hemolymfa pak obsahuje stejný podíl lipidů jako hemolymfa dělnic. Tyto královny neopouštějí hnízdo a účastní se prací jako dělnice. JH však zároveň ovlivňuje vývoj vaječnicků. U dělnic žijících bez královny byl zjištěn rychlejší vývoj vaječnicků, rychlejší *in vitro* biosyntéza JH a vyšší titer JH v hemolymfě ve srovnání s podobně starými dělnicemi žijícími s královnou^{31,32,33}.

Modelovým druhem v této práci je *Bombus terrestris* (čmelák zemní), který je v Evropě jedním z nejpočetnějších a snadno se chová v laboratoři. Velikost královny je 2 - 2,7 cm a dělnice 1,5 - 2 cm (obr. 10).



Obr. 10. Dělnice čmeláka zemního

1.4 Stanovení JH

V současné době jsou pro stanovení juvenilního hormonu používány převážně dva metodické přístupy. Prvním z nich je měření rychlosti syntézy JH párovou žlázou *corpora allata in vitro* metodou radioimunoassay (RIA)^{34,35,36}, což bylo použito např. k měření titru JH u dělníků druhu *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae). Žláza CA byla rozřezána v solném roztoku, bylo přidáno modifikované medium TC199 a L-(¹⁴C-methyl)methionin. Po 5 hodinách bylo provedeno radiochemické měření. U dělníků nasměrovaných k vývoji ve vojáky byly takto naměřeny 2,5x vyšší hodnoty než u dělníků, kteří směřovali ke svlékání ve vyšší stadium dělníka³⁴.

Druhým přístupem je derivatizace JH a stanovení titru užitím plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). Bylo vyzkoušeno mnoho typů derivatizace. Jedním z nich je použití n-1H,1H,2H,2H-perfluorohexanolu (NFH-OH) k získání stabilních 10-hydroxy-11-NFH derivátů, které poskytují velmi výrazný a specifický pík při *m/z* 305 pro JH III a ethylester JH III a při *m/z* 319 pro JH I a JH II. Touto metodou byla stanovována koncentrace JH III např. u různých vývojových stádií včelích dělnic a královen, která se pohybovala v hodnotách mezi 0,7-20 ng/g³⁷.

V roce 1981 vyšla práce Bergota a kol.³⁸, kdy je JH určován z hemolymfy lišaje tabákového (*Manduca sexta*, Lepidoptera). Vzorek o objemu 3-6 ml byl rozpuštěn ve směsi pentan, acetonitril a 4% vodný roztok chloridu sodného a následně extrahován acetonitrilem. Čištění bylo provedeno přes skleněnou kolonku naplněnou neutrálním oxidem hlinitým. Derivatizací s 0,08M TFA v deuterovaném methanolu byly získány d₃-methoxyhydrinderiváty JH, jež ve spektru poskytují unikátní fragmenty *m/z* 76 a 225. Následovalo čištění kapalinovou chromatografií (LC) a detekce pomocí GC/MS v SIM modu. Jako vnitřní standard byl použit tritiem značený analog JH. Tento způsob derivatizace vynikal svou selektivitou, specificitou a narozdíl od některých dřívějších pokusů i poměrně malou spotřebou biologického materiálu. Proto byl s určitými úpravami využit ve většině dalších prací zabývajících se stanovením koncentrace JH.

V roce 1997 Shu a kol.³⁹ modifikovali výše popsaný postup při stanovení titru JH u různě starých samiček škůdce *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera) a ke zjištění role JH při vývoji vajíčka. Hemolymfa (1μl) byla rozpuštěna v acetonitrilu a 2% roztoku soli, následovala extrakce hexanem a přečištění přes kolonu naplněnou neutrálním oxidem hlinitým. Frakce obsahující JH a vnitřní standard, kterým byl v tomto případě ethylester

juvenilního hormonu III, byla derivatizována přidavkem deuterovaného methanolu v kyselém prostředí 5% TFA v deuterovaném methanolu. Druhé čištění pomocí LC nahradili opět sloupcovou chromatografií.

Uvedená modifikovaná metoda byla využita dvěma výzkumnými týmy ke stanovení titru JH jednotlivých kast termitů *Coptotermes formosanus*. Narozdíl od předchozí práce se vzhledem k velikosti používala celá zvířata. Zatímco jeden tým stanovil koncentraci JH u dělníků na 13 pg/mg, vojáků na 25 pg/mg a u bílých vojáků až 596 pg/mg²⁰, druhý tým určil titer dělníků na 3,5 pg/jedinec a vojáků 7 pg/jedinec²⁴. Vezmeme-li v úvahu průměrnou hmotnost termita *Coptotermes formosanus*, která je 3 mg, jedná se o řádové rozdíly v naměřených titrech.

V práci od Teala a kol.⁴⁰ byla na vzorcích lišaje tabákového zkoušena další GC/MS metoda, ale bez derivatizace, užitím iontové pasti s chemickou ionizací a jako reakční plyn byl použit isobutan. Vnitřním standardem byl farnesyl-acetát. Tuto metodu poté použili ke stanovení JH III u vrtule *Anastrepha suspensa* (Diptera), 21 pg/μl hemolymfy.

V jedné z novějších prací bylo provedeno srovnání metody RIA a LC-MS/MS pro stanovení juvenilního hormonu z hemolymfy sarančete *Melanoplus sanquinipes* (Orthoptera) a z celých těl mšice *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera), kdy se ukázala kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí jako citlivější, neboť bylo dosaženo meze detekce pro JH III $8,25 \pm 1,44$ pg, zatímco metodou RIA $13,75 \pm 2,39$ pg⁴¹. Jako vnitřní standardy byly použity methopren a prekocen.

V práci od Cornetta a kol.⁴² byly koncentrace JH v hemolymfě japonského druhu termitů *Hodotermopsis sjostedti* pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí stanoveny v rozmezí 20 – 720 pg/μl. Hemolymfa byla rozpuštěna v 50% roztoku isooktanu v methanolu, vnitřním standardem byl fenoxycarb.

1.5 GC/MS

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) je jednou z nejefektivnějších technik pro analýzu složitých směsí organických látek. Plynová chromatografie je analytická separační metoda založená na distribuci látek mezi nemísitelnými fázemi. Probíhá v kapilární koloně, která obsahuje stacionární fázi, a mobilní fází je nosný plyn. Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určující hmotnost atomů, molekul nebo molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty⁴³.

V rámci této práce byly využity dva typy ionizace. Elektronová, kdy dochází k ionizaci svazkem elektronů emitovaných z wolframového nebo rheniového vlákna, chemická, kdy je vzorek ionizován ionty reakčního plynu.

Měření bylo prováděno na přístrojích s různými typy hmotnostních analyzátorů, což jsou zařízení separující ionty v plynné fázi podle poměru hmotnost/náboj pomocí elektromagnetických polí.

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem, na které je vkládáno napětí. Vstupující ionty začnou oscilovat a pouze ionty s určitým poměrem hmotnost/náboj kvadrupólem projdou, ostatní jsou zachyceny na tyčích. Všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra jsou postupně propouštěny skenováním.

Iontová past je tvořena prstencovou a dvěma koncovými elektrodami. Uvnitř pasti je helium, které slouží ke snížení kinetické energie iontů, čímž zvyšuje rozlišovací schopnost a citlivost a pomocí trojrozměrného RF pole je možné ionty selektivně vypuzovat a uchovávat uvnitř pasti.

Průletový analyzátor (TOF) měří dobu, za kterou ionty překonají určitou dráhu. Vysokonapěťovým pulzem jsou ionty urychleny a vstupují do letové trubice, kde není elektrický proud a na jejímž konci je detektor. Ionty s různým m/z získají stejnou energii, ale různou rychlost, těžší ionty proto potřebují delší čas na překonání letové dráhy.

Byla také vyzkoušena tandemová hmotnostní spektrometrie pomocí iontové pasti. Daný ion je nejprve izolován a poté podroben fragmentaci (kolizně indukovaná disociace). Vzniklé fragmenty jsou postupně detekovány pomocí elektronového násobiče. Tímto způsobem dosáhneme vyšší selektivity a lepšího poměru signálu k šumu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

acetonitril	Sigma Aldrich
bromundekan	Fluka
d ₄ - methanol	Acros
ether	Penta
ethylacetát	Penta
hexan	Merck
hexadekanol	z laboratorních zásob Dr. Stránského
chloroform	Penta
JH III	Fluka
kyselina sírová	z laboratorních zásob
methanol	Lach-Ner s.r.o.
methopren	z laboratorních zásob Doc. Hrdého
NaCl	Lach-Ner, s.r.o.
oxid hlinitý	M. Woelm
TFA	Riedel de Haën

Rozpouštědla používaná pro chromatografie byla předem destilována.

2.2 Biologický materiál

2.2.1 Termiti

Termiti druhu *Prorhinotermes simplex* původem z Piñar del Rio, Kuba, jsou chováni v laboratorních podmínkách od roku 1964. Termiti druhu *Coptotermes formosanus* pocházejí z Hsui hui, provincie Kanton, a jsou chováni v laboratorních podmínkách od roku 1963. Termiti druhu *Kalotermea flavicollis* byli nasbíráni v červenci 2006 v Chorvatsku na ostrově Mali Lošinj.

Termití kolonie jsou umístěny ve skleněném akváriu. Potravou a hnízdním materiálem jsou pláty smrkového dřeva. Většina kolonie se zdržuje ve svazcích těchto plátů, ostatní je možno nalézt v přirozeném substrátu, který je tvořen směsí hlíny, výkalů a úlomků dřeva. Kolonie je umístěna ve tmě v chovné místnosti s topným tělesem a termostatem kontrolujícím teplotu 27,5 °C. Vlhkost v místnosti kolísá mezi 50-70 %.

2.2.2 Čmeláci

Čmeláci druhu *Bombus terrestris* byli získáni z laboratorního chovu Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Kolonie jsou zde založeny kaskádovou metodou dvou královen ke stimulaci kladení vajíček v laboratorních podmínkách. Všechny královny matky byly sbírány na přírodních stanovištích během období výzkumu, aby byly minimalizovány vlivy umělých podmínek.

2.3 Přístroje

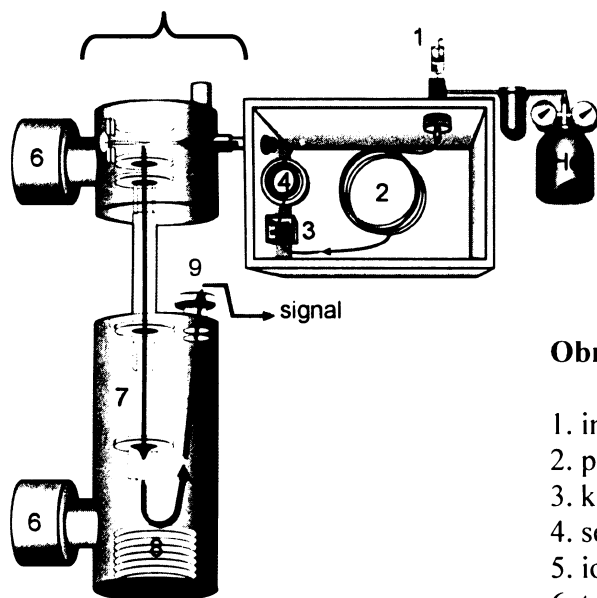
V rámci této práce bylo vyzkoušeno 5 GC/MS přístrojů:

- Thermo Finigan Focus GC, Fisons Instruments MD 800 s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem
- Agilent Technologies 6890N, Agilent 5975B inert XL MSD s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem
- Focus GC, Thermo Scientific DSQ II s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem
- Varian, Saturn 2000 – hmotnostním analyzátozem je iontová past
- Leco PEGASUS 4D, Agilent Technologies 6890N GC, Leco Corporation USA s průletovým analyzátozem (obr. 11), dvourozměrné chromatografie je docíleno využitím kombinace dvou kolon rozdílné polarity:

a) DB5 - 25 m x 0,25 mm, nepolární fáze

b) DB50 - 1,9 m x 0,1 mm, středně polární fáze

hmotnostní spektrometr



Obr. 11: Leco PEGASUS (podle manuálu Leco)

1. injektor
2. primární kolona
3. kryomodulátor
4. sekundární kolona
5. ionizační komora
6. turbomolekulární pumpa
7. průletový analyzátozem
8. reflektor iontů
9. detektor

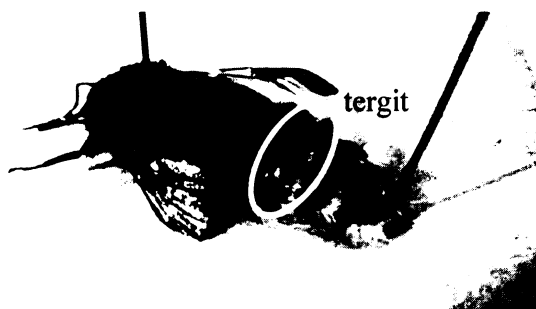
Přístroj Thermo Scientific DSQ II:

- kolona DB5, 30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm
- hmotnostní analyzátor – kvadrupól
- ionizace – EI, pozitivní ionty
- metoda: Full scan i SIM (m/z 135)
počet skenů 2/min
rozsah hmot 29-500 Da
teplota iontového zdroje 200°C
teplota nástřikové komory 200 °C
průtok nosného plynu 1 ml/min
teplotní program GC: počáteční teplota 70 °C po dobu 1 min
následně 10 °C/min do 300 °C (5min)

2.4 Metody

Odběr a zpracování hemolymfy čmeláků

Čmeláci byli narkotizováni oxidem uhličitým. Jemným entomologickým špendlíkem byla porušena intersegmentální membrána mezi 4. a 5. tergitem (obr.12) a za jemného tlaku na záda byla pomocí kapiláry odebírána hemolymfa (asi 10x z jednoho hmyzího těla). Z kapiláry byla vytlačena injekční stříkačkou do mikrozskumavky. Po odběru byl pitvou zkoumán stav ovarii. Na jeden vzorek byla spojena hemolymfa 3-5 čmeláků, celkově byl získán objem asi 100 μl . K takto připravenému vzorku bylo přidáno 0,5 ml acetonitrilu a 0,5 ml 2% roztoku NaCl v destilované vodě. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 4600 otáčkách a následně 3x extrahován hexanem. Hexanová fáze byla dávkována na kolonu.



Obr. 12. Tergit čmeláka

Příprava vzorku z termitů

Počet termitů potřebných na jeden vzorek se lišil dle druhu a kasty v závislosti na očekávaném množství juvenilního hormonu. V případě druhu *Prorhinotermes simplex* byli na jeden vzorek použiti 3 bílí vojáci, 5 vojáků nebo 10 dělníků, u druhu *Coptotermes formosanus* 10 vojáků nebo 30 dělníků a u druhu *Kalotermes flavicollis* tvořilo jeden vzorek 11 vojáků z incipientních (začínajících) kolonií nebo 22 vojáků z dospělých kolonií. Termiti byli po odebrání z kolonie ponecháni minimálně půl hodiny v mrazáku při teplotě -20 °C a následně rozdrceni ve 100 µl hexanu ve speciálním skleněném homogenizátoru. Extrakt byl buď nadávkován Pasteurovou pipetou na kolonku nebo pomocí skleněné kapiláry nanesen na TLC desku se silikagelem. Poté byly provedeny ještě 2 oplachy homogenizátoru 100 µl hexanu.

Vyvolání svlékání dělníků v bílé vojáky

U druhu *Prorhinotermes simplex* bylo využito faktu, že se důsledkem odstranění vojáků ze skupiny nastartuje vývoj vojáků z přítomných dělníků. Po několika týdnech pak lze v takové skupině pozorovat přítomnost bílých vojáků, kteří se za normálních podmínek vyskytují vzácně. Ze středně velké kolonie (800 jedinců) byli odebráni všichni vojáci a po třech týdnech bylo v kolonii nalezeno téměř tolik bílých vojáků, kolik bylo původně odebráno vojáků. Odebrání bílí vojáci byli na základě vnější anatomie rozděleni do dvou skupin, tj. jedinci "mladí" (krátce po svlékání v bílého vojáka) a "staří" (krátce před svlékáním ve vojáka).

Příprava neutrálního oxidu hlinitého

Oxid hlinitý byl 5 hodin promýván v Soxhletově extraktoru methanolem, poté žhán v peci při teplotě 300 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení bylo přidáno 6 % destilované vody a k důkladnému promísání 30 minut třepáno.

Separace sloupcovou chromatografií

Kolonka, vytvořená zkrácením Pasteurovy pipety, byla naplněna 1 g neutrálního oxidu hlinitého. Na kolonku byl nanesen vzorek a 10 µl standardního roztoku methoprenu

o koncentraci 500 pg/ μ l. Kolonka byla promyta nejprve 2 ml hexanu, poté 2 ml 10% etheru v hexanu a následně 3 ml 30% etheru v hexanu. Poslední frakce obsahující JH III a methopren byla zakoncentrována na rotační vakuové odparce, převedena do insertu, odpařena do sucha a k odparku bylo přidáno 10 μ l standardního roztoku 1-bromundekanu o koncentraci 500 pg/ μ l.

Derivatizace JH III

Poslední frakce získaná sloupcovou chromatografií byla zakoncentrována na rotační vakuové odparce na objem asi 200 μ l, bylo přidáno 75 μ l d_4 -methanolu a 75 μ l 5% TFA v d_4 -methanolu. Takto připravený vzorek byl 20 minut zahříván v lázni při teplotě 60 °C, poté byla derivatizační reakce zastavena přidávkem 500 μ l hexanu. Roztok byl následně odpařen do sucha, znovu rozpuštěn ve 200 μ l hexanu a nadávkován na kolonku s 1g neutrálního oxidu hlinitého. Kolonka byla promyta 2 ml hexanu, 2 ml 30% etheru v hexanu a 3 ml 50% ethylacetátu v hexanu. Poslední frakce obsahující derivát JH byla odpařena na vakuové rotační odparce a bylo přidáno 5 μ l standardu 1-bromundekanu o koncentraci 500 pg/ μ l.

Separace pomocí TLC

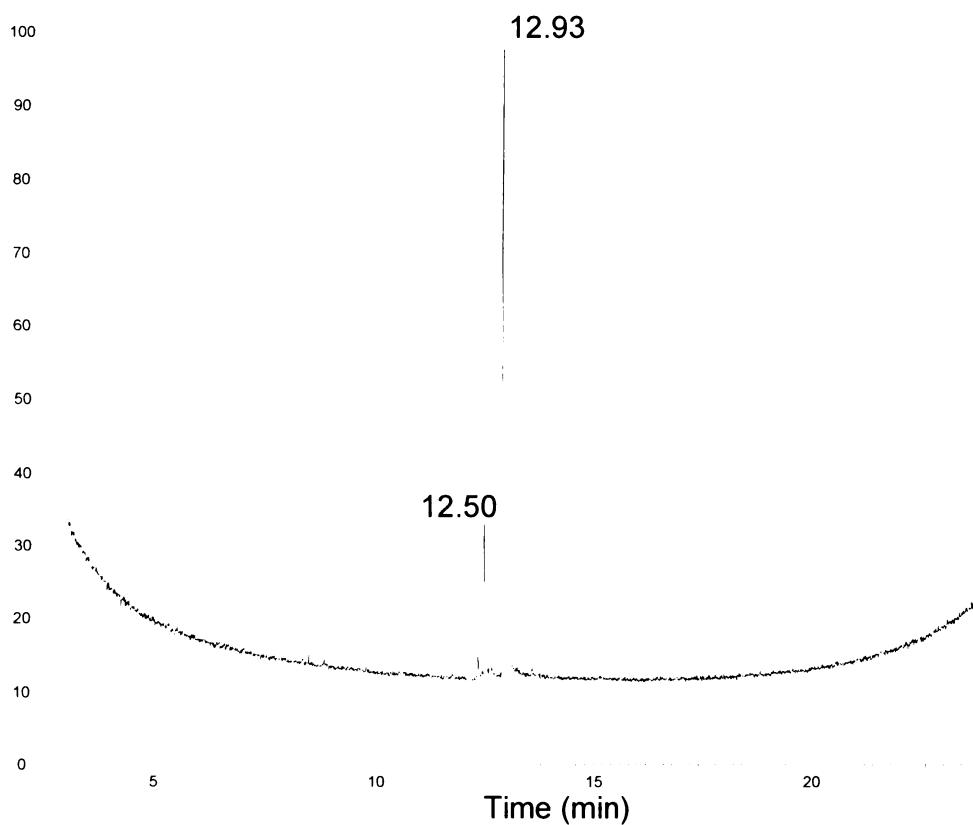
Skleněné destičky pokryté vrstvou silikagelu byly nejprve předmyty ve fázi 30% etheru v hexanu. Hmyzí těla (5-30 dle typu vzorku) byla rozdrčena ve 100 μ l hexanu ve speciálním skleněném homogenizátoru a nanášena na destičku. Byly provedeny ještě 2 oplachy 100 μ l hexanu, které byly také nanášeny na vrstvu silikagelu. Destička se vzorkem byla vyvíjena ve stejnou chvíli ve stejné vyvíjecí komůrce jako analytická destička, na kterou byl nadávkován roztok standardu JH III o koncentraci 1 mg/ml. Jako mobilní fáze byla použita 30% směs etheru v hexanu. Analytická destička byla poté mineralizována kyselinou sírovou a vysušena horkovzdušnou pistolí k detekci JH III. Podle retenčního faktoru byl na destičce se vzorkem určen pás, který byl seškrábán a následně promyt 2 ml etheru. Ether byl odpařen na rotační vakuové odparce a bylo přidáno 5 μ l standardního roztoku 1-bromundekanu o koncentraci 500 pg/ μ l.

VÝSLEDKY A DISKUZE

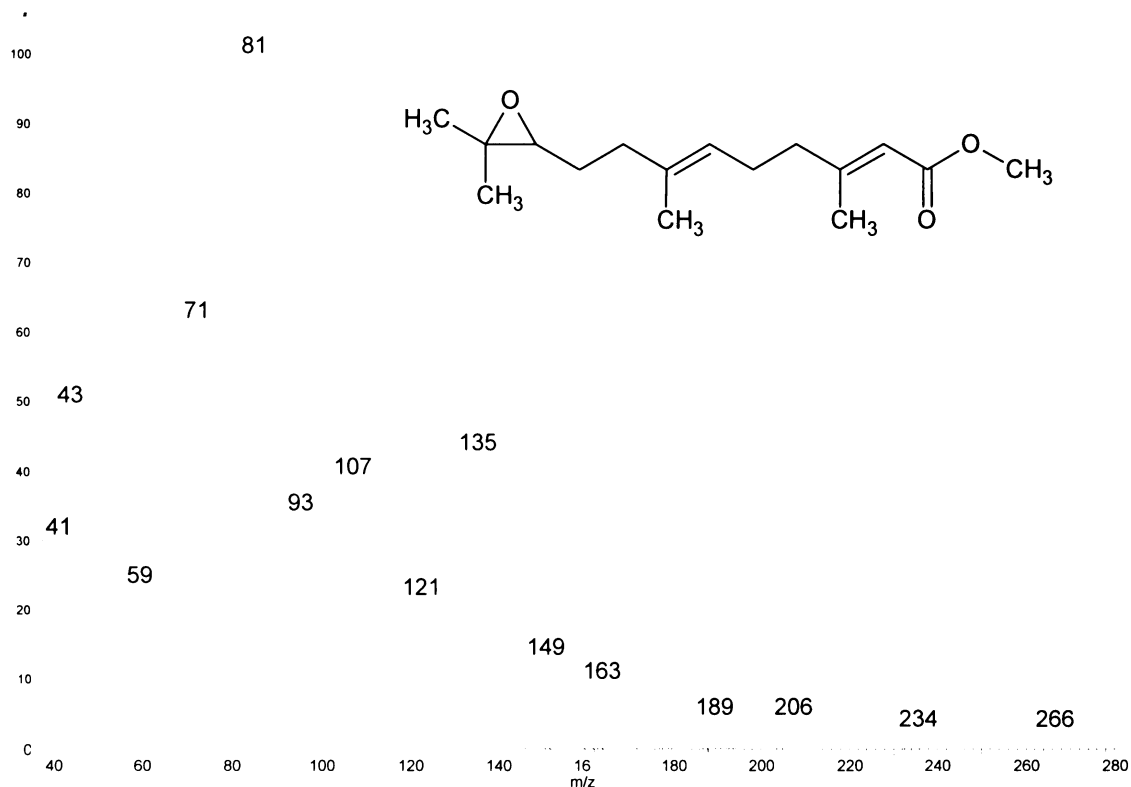
3.1 Mez detekce pro JH III

Prvním úkolem mé práce bylo vybrat z dostupných GC/MS přístrojů ten s nejnižší mezí detekce pro JH III. K dispozici byly 3 přístroje s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem, jeden s iontovou pastí a jeden s průletovým analyzátozem (TOF).

V komerčně dostupném standardu tvoří JH III 80 % celkového obsahu. Na chromatogramu je možno vidět kromě píku pro JH III v $t_r = 12,93$ min také další dva píky (obr. 13). Podle MS spekter se zřejmě jedná se o juvenoidní struktury, pravděpodobně izomery JH, které vznikají již při syntéze.



Obr. 13: Chromatogram JH III (množství 1,25 ng)



Obr. 14. Hmotnostní spektrum JH III

Molekulová hmotnost JH III je 266 (obr. 14). Vznik typických fragmentů m/z 81 a 135 je popsán na schématech 1, 2.

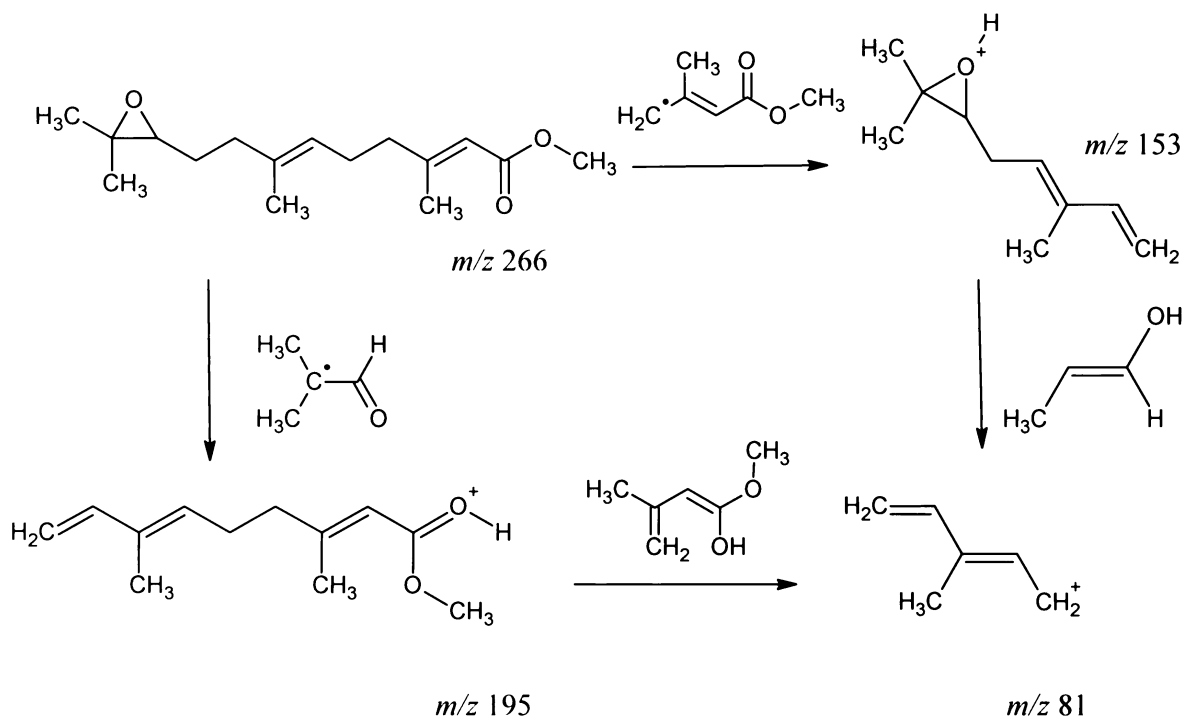


Schéma 1. Vznik fragmentu⁴⁴ m/z 81

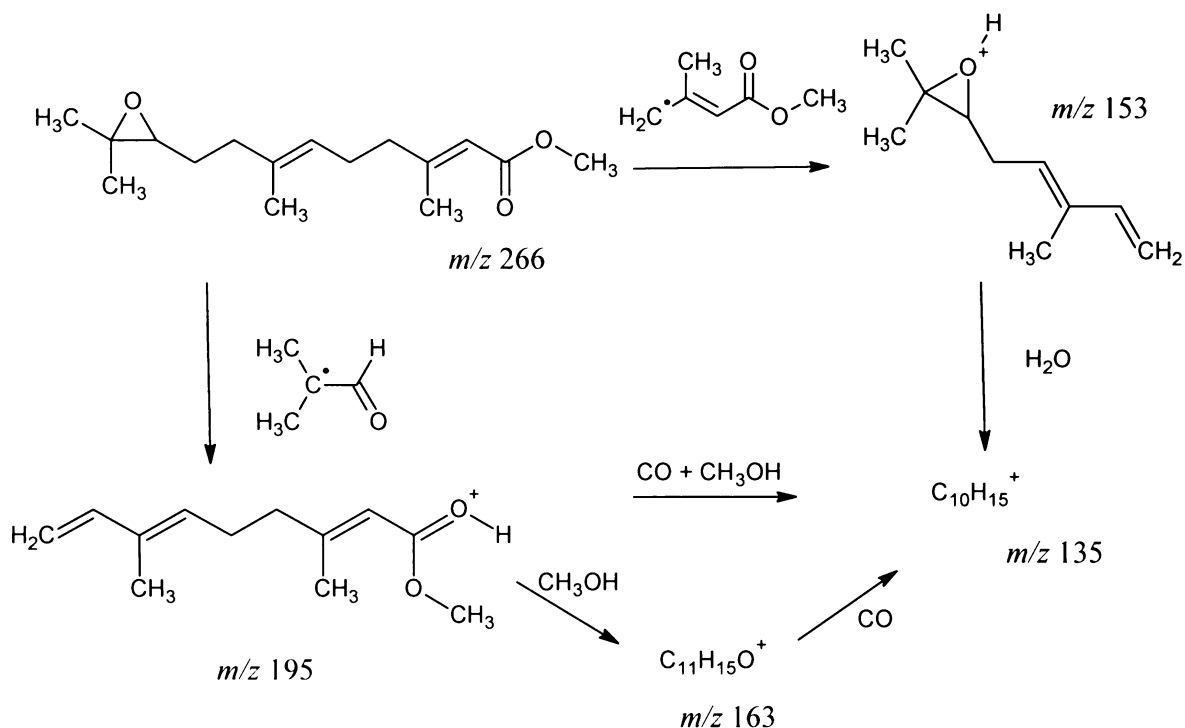


Schéma 2. Vznik fragmentu⁴⁴ m/z 135

K určení nejvhodnějšího přístroje (nejcitlivějšího) bylo měření prováděno v SIM modu pro nejintenzivnější fragment ve spektru m/z 81. Na kvadrupólu Fisons již koncentrace JH III 0,01 mg/ml zanikala v šumu. Na iontové pasti byla vyzkoušena tandemová hmotnostní spektrometrie a chemická ionizace vzorku (jako reakční plyn byl použit acetonitril). Přesto nebylo dosaženo potřebné citlivosti.

Původní ideou bylo využití přístroje Leco PEGASUS, neboť díky dvourozměrné plynové chromatografii lze lépe oddělit analyt od matrice, jak je možné vidět na obr. 15. Tento přístroj se ale ukázal jako málo citlivý, jelikož koncentrace JH III termitů se pohybují v řádech desítek pikogramů.



Obr. 15. Dvourozměrný chromatogram JH III (3D-zobrazení)

Vzhledem k dosažené citlivosti byl pro další měření vybrán přístroj Termo Scientific DSQ II. Jeho velkou výhodou je možnost současného zaznamenávání celkového proudu iontů (TIC) a vybraného iontu (SIM). Meze detekce pro JH III jsou uvedeny v tab. 1.

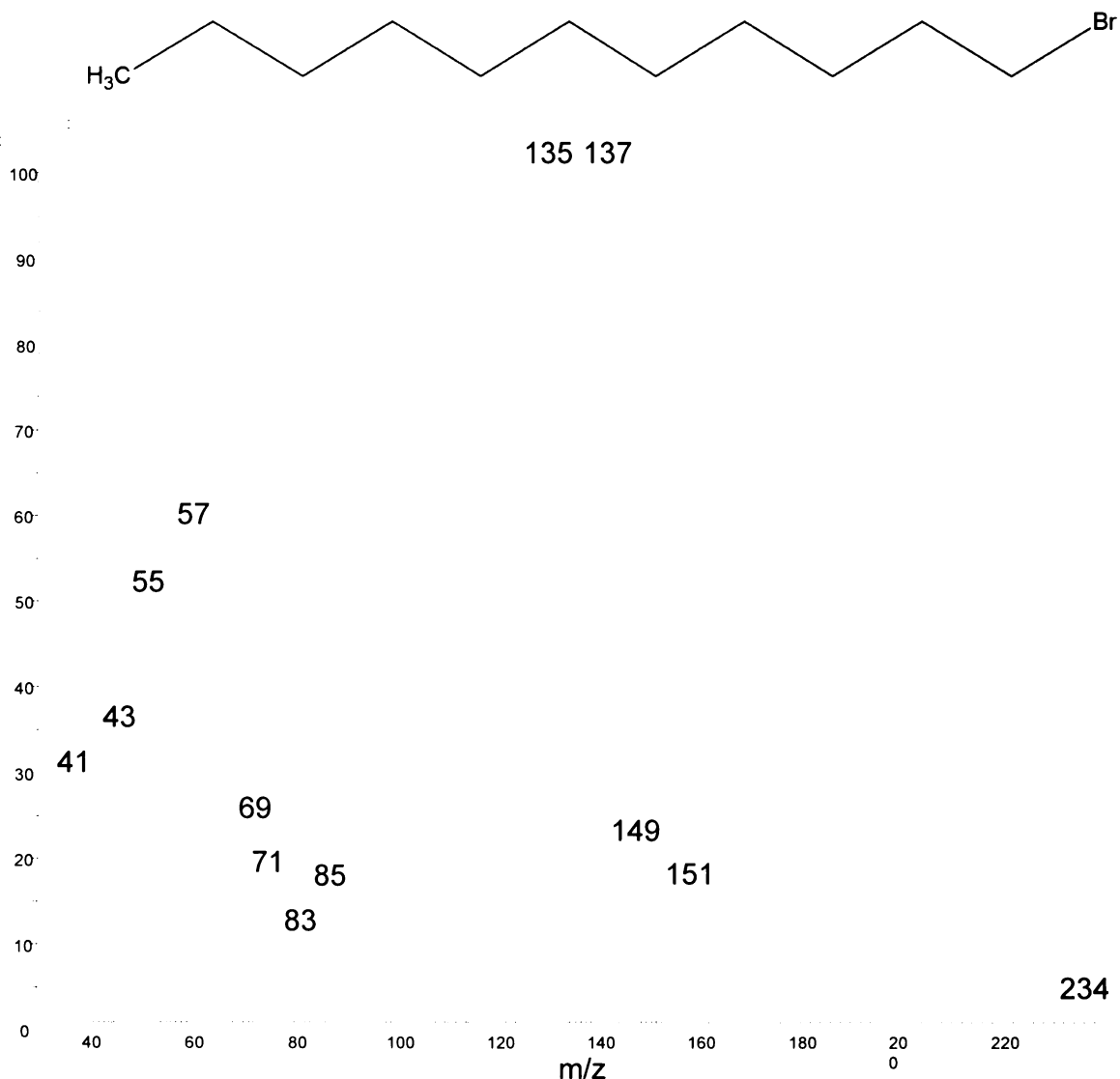
Název	Metoda	Typ ionizace	Hmotnostní analyzátor	Mez detekce pro JH III (pg)
Fisons Instruments				
MD 800, Termo Finigan Focus GC	GC/MS	EI	kvadrupól	10000
Agilent Technologies				
6890N, 5975B inert XL MSD	GC/MS	EI	kvadrupól	200
Termo Scientific DSQ II, Focus GC				
Varian, Saturn 2000	GC/MS/MS	CI	iontová past	800
Leco PEGASUS III, Agilent Technologies 6890N				
Leco PEGASUS III, Agilent Technologies 6890N	GCxGC/MS	EI	TOF	200

Tab. 1. Mez detekce pro JH III (nástrík vzorku vždy 1 µl)

Při pozdějším měření reálných vzorků nebylo možné pro SIM mód použít ion m/z 81, protože se v matrici vyskytoval téměř v celém chromatogramu. Proto byla vybrána kvůli vyšší unikátnosti hodnota pro SIM m/z 135. V důsledku toho ale došlo k poklesu meze detekce o cca 1 řád.

3.2 Kalibrační křivka

V dalším kroku byla připravena sada roztoků JH III v koncentračním rozmezí 0,16-2,5 ng/μl . Ke každému roztoku bylo přidáno stejné množství standardního roztoku bromundekanu o koncentraci 500 pg/μl. Bromundekan byl vybrán jako vnitřní standard vzhledem k délce řetězce a snadné identifikaci v chromatogramu (obr. 16).



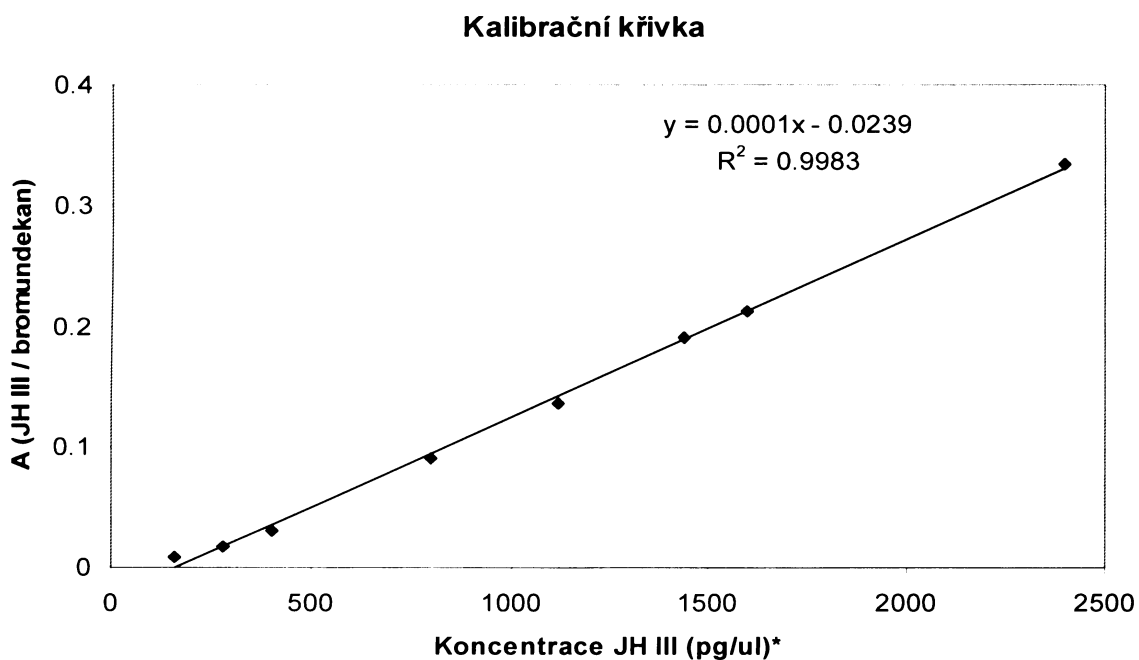
Obr. 16. Spektrum bromundekanu

Z poměrů ploch píků juvenilního hormonu a bromundekanu v závislosti na koncentraci JH III byla sestrojena kalibrační křivka (tab. 2). Integrovány byly plochy v SIM modu pro fragment m/z 135, který je vhodný jak pro JH III, tak pro bromundekan.

Měření bylo provedeno ve třech sériích v různém čase. Srovnatelné výsledky vypovídají o dobré opakovatelnosti. K sestavení kalibrační křivky byl použit medián naměřených hodnot.

Titr JH III (pg/μl)	$A_{\text{JH III}} / A_{\text{Bromundekan}}$			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Medián
160	0,009	0,014	0,006	0,009
280	0,017	0,027	0,016	0,017
400	0,028	0,045	0,031	0,031
800	0,082	0,091	0,094	0,091
1120	0,136	0,148	0,136	0,136
1440	0,19	0,216	0,171	0,19
1600	0,209	0,223	0,212	0,212
2400	0,334	0,305	0,338	0,334

Tab. 2. Kalibrační křivka poměru ploch (A) JH III ku bromundekanu v závislosti na koncentraci JH III.



* Koncentrace připravených roztoků je přepočtena na absolutní množství JH III ve standardu (obsah JH III 80%).

3.3 Optimalizace podmínek

Těkavost a stabilita JH III byla vyzkoušena porovnáním plochy píku při nástřiku roztoku JH III o určité koncentraci do GC/MS a plochy píku roztoku o stejné koncentraci odpařeného na vakuové odparce a opětovně rozpuštěném v původním objemu hexanu. Tento pokus byl 3x zopakován a vzhledem ke srovnatelným plochám všech tří opakování v porovnání s pokusem bez odpaření byla rotační vakuová odparka používána na veškerá odpařování.

Pro experimenty s biologickým materiálem byla hledána nejvhodnější kolona. Původní 15 m dlouhá kolona DB5 byla nahrazena méně polární DB1, účinnost separace se nijak nezlepšila, proto byla znovu vyměněna za kolonu DB5, tentokrát 30 m dlouhou.

Dále byla se standardním roztokem JH III vyzkoušena dosud nejčastěji používaná metoda stanovení juvenilního hormonu v tělech hmyzu, tedy separace sloupcovou chromatografií a následná derivatizace deuterovaným methanolem, kdy dojde k rozevření epoxidového kruhu a vytvoření methoxyhydrinderivátu (schéma 3).

Po derivatizaci je ovšem nutné provést další purifikaci přes kolonku s aktivním oxidem hlinitým a tím dochází k navýšení ztrát. Derivatizace navíc nijak neulehčovala identifikaci JH v chromatogramu, proto bylo snahou detekovat JH III bez derivatizace.

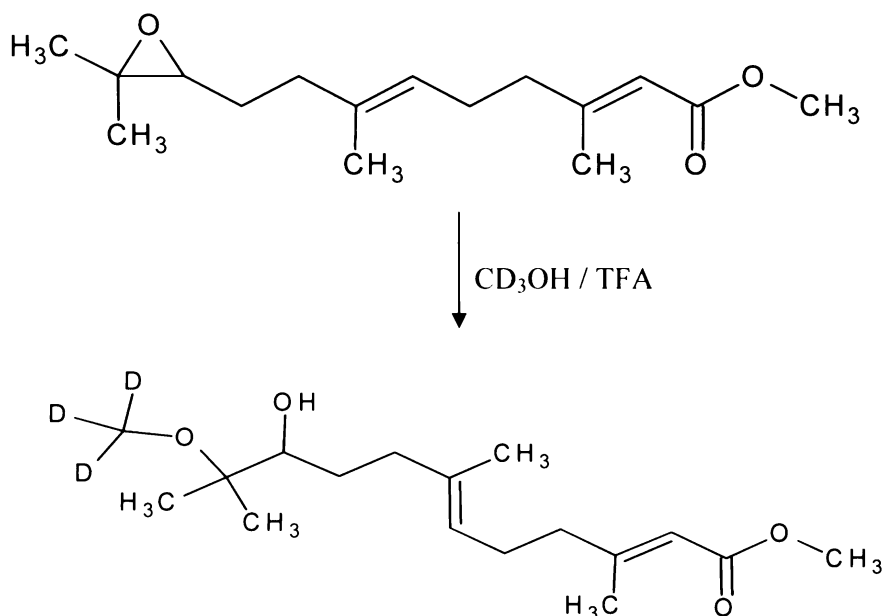
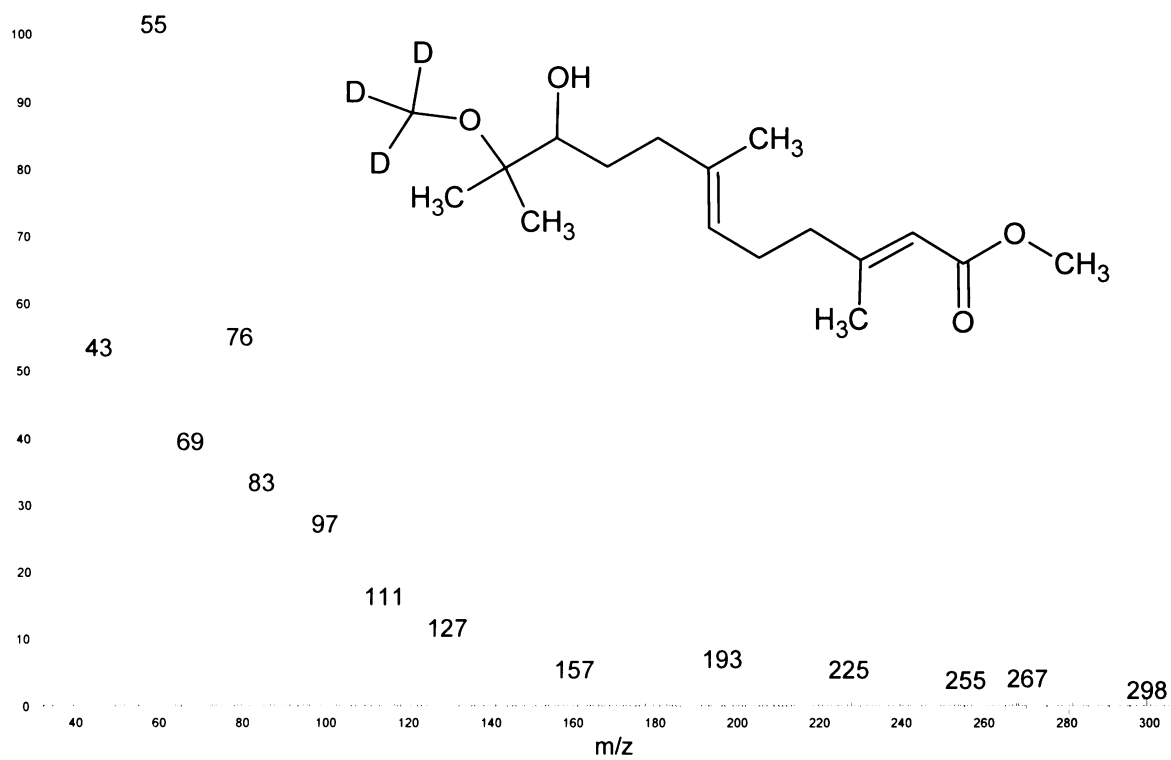


Schéma 3. Derivatizace JH III d₄-methanolem v kyselém prostředí.

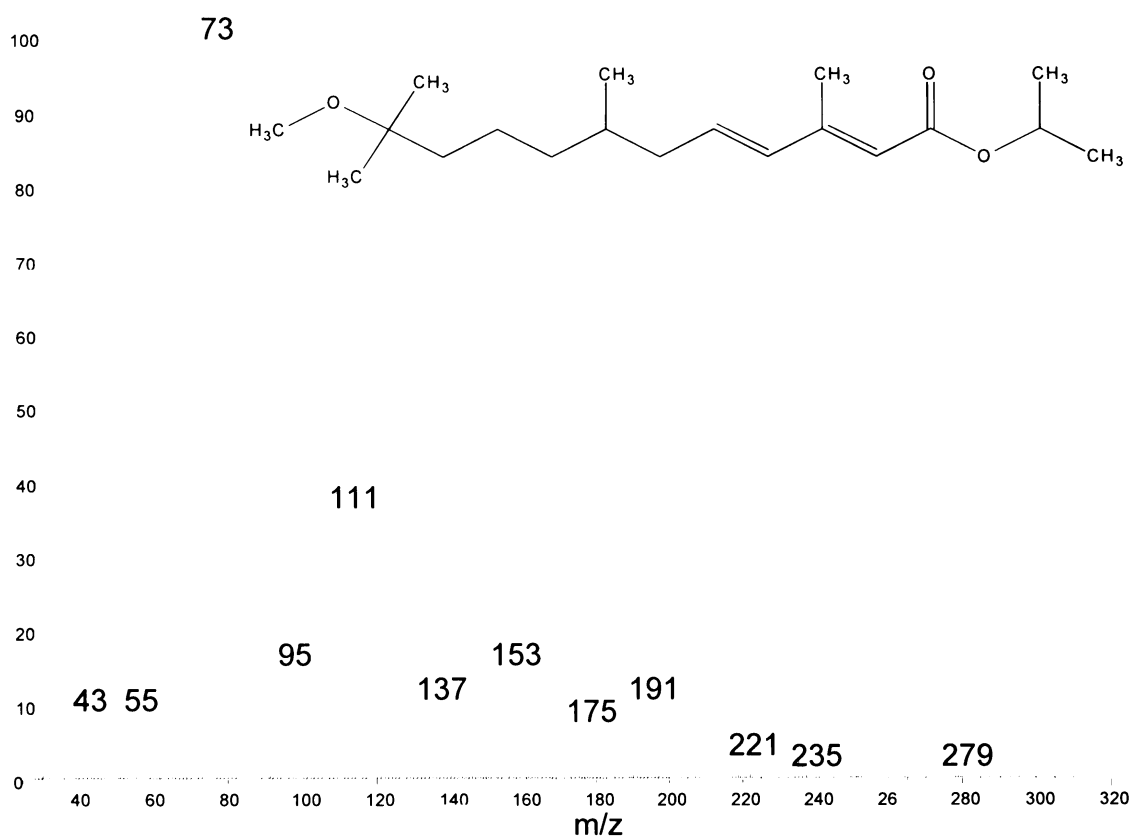
Derivát byl identifikován v SIM modu podle typických fragmentů m/z 76, 225 (obr.17).



Obr. 17. Spektrum derivátu JH III

3.4 Stanovení titru JH III čmeláků

Původní metoda, ovšem bez koncové derivatizace, byla vyzkoušena na vzorcích čmeláčích královen. Tentokrát byly použity dva vnitřní standardy. Kromě bromundekanu, který byl opět přidáván po závěrečném odpaření, byl vnitřním standardem methopren (obr. 18), jenž byl společně s juvenilním hormonem dávkován na kolonu, aby dle jeho úbytku bylo možno stanovit účinnost separace. Methopren byl vybrán, jelikož je analogem juvenilního hormonu a má nejen podobnou strukturu, ale i stejné retenční chování při sloupcové chromatografii, tudíž jde při čištění ve stejné frakci. Retenční čas methoprenu při GC/MS byl 21,43 min. Pro jeho snadnější identifikaci byla metoda upravena a měření SIM modu pro m/z 135 od 13. minuty nahradil SIM m/z 191, který je jeho typickým fragmentem (obr. 18.)



Obr. 18. Spektrum methoprenu

Bylo provedeno stanovení JH III v hemolymfě čmeláčích královen v různých obdobích jejich života (tab. 3). Vzhledem k předpokládaným nízkým hodnotám byly spojeny hemolymfy vždy všech královen jednoho typu a byl připraven jeden vzorek. Juvenilní hormon byl nalezen jen u čerstvě oplozených královen, u nichž se jeho přítomnost předpokládá. Dle dostupných informací by jej měly mít i královny plodující. Po odebrání hemolymfy však nebyla provedena jejich pitva, proto neznáme skutečný stav jejich ovarii a tedy není jisté, že byly plodující. V budoucnu bude nutné měření zopakovat, což nebylo v diplomové práci možné kvůli nedostatku materiálu.

Vzorek	Počet jedinců na vzorek	Titř JH III ng/jedinec
královny před hibernací	3	/
královny čerstvě oplozené	3	2,53
královny panenské	4	/
královny plodující	3	/

Tab. 3. Stanovení JH III v hemolymfě čmeláků.

Stejnou metodou byly připraveny i vzorky hlav čmeláčích královen (opět spojeny královny stejného typu na jeden vzorek). Juvenilní hormon nebyl nalezen v žádném, čímž byl potvrzen předpoklad, že je ze žlázy *corpora allata* ihned uvolňován do hemolymfy a neukládá se.

Dále byla zjišťována koncentrace JH III u kladoucích a nekladoucích čmeláčích dělnic. Tentokrát byla po odebrání hemolymfy provedena pitva a podle stavu ovarii byly na jeden vzorek spojeny hemolymfy 4 nebo 5 dělnic stejného typu. V několika opakováních bylo ověřen relativně vysoký titř JH III u dělnic kladoucích, 1,49 ng/jedinec s intervalem spolehlivosti $\pm 0,35$. Ze statistického zpracování výsledků byla vyloučena jedna naměřená hodnota, přesto se nemusí jednat o chybu stanovení, jelikož pracujeme s variabilním biologickým materiálem. U nekladoucích dělnic byl v jednom případě titř JH III na hranici meze detekce, tudíž ho nebylo možno kvantifikovat, v dalším vzorku byl stanoven na 0,5 ng/jedince. V posledním vzorku dosáhl hodnoty 1,8 pg/jedinec jako u dělnic kladoucích. Tento překvapivý výsledek lze vysvětlit, neboť tyto dělnice mohly být ve fázi těsně předcházející kladení, titř JH tedy již mohl být zvýšený, ovšem změny na ovarii ještě nemusely být patrné, a proto byly tyto dělnice po pitvě zařazeny mezi nekladoucí (tab. 4).

Dělnice	Titr JH III (ng/jedinec)				
	1	2	3	4	5
kladoucí	1,85	4,26	1,38	1,6	1,36
nekladoucí	1,8	*	0,5	/	/

Tab. 4. Koncentrace JH III čmeláčích dělnic

* JH III detekovatelný, ne však kvantifikovatelný, hodnota kurzivou vysvětlena na předchozí straně

Podle úbytku množství methoprenu byl vypočten výtěžek separace na koloně, v rozmezí 20 % - 60 %. Široký rozptyl výsledků může být v některých případech způsoben interferencí píku methoprenu s píkem methylesteru.

3.5 Stanovení titru JH III termitů

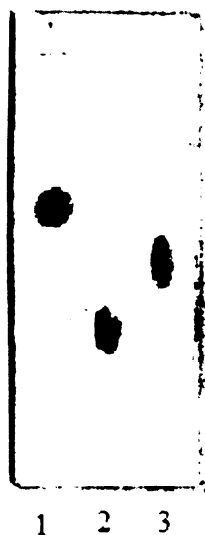
Při přípravě vzorků z termitů byla používána vzhledem k jejich velikosti celá těla, čímž se samozřejmě navýšil počet interferujících látek jdoucích při purifikaci ve stejné frakci jako JH III. Bylo provedeno srovnávací měření vzorku získaného homogenizací termitích těl ve směsi acetonitrilu, hexanu a 2% NaCl v destilované vodě a následné extrakci hexanem se vzorkem získaným homogenizací pouze v hexanu. Vzhledem ke srovnatelným výsledkům byl při dalších měřeních používán pouze hexan.

Stejná metoda jako u čmeláků byla použita pro stanovení JH III u termitů druhu *Kalotermea flavicollis*. U vojáků z incipientních (začínajících) kolonií, jejichž průměrná hmotnost je 4 mg, byl titr JH stanoven na 560 pg/jedinec a vojáků z dospělých kolonií, jejichž průměrná hmotnost je 9 mg, byl titr JH III 400 pg/jedinec.

U druhu *Prorethitermes simplex*, jehož biologie je na našem pracovišti dobře prostudována, bylo možno sledovat změnu koncentrace JH III při přeměně dělníka ve vojáka přes stadium bílého vojáka, kterého lze u tohoto druhu relativně snadno dosáhnout izolací dělníků. Při prvních experimentech s vojáky však bylo detekováno mnoho nitropentadecenu, jenž je jejich obrannou látkou a dosahuje množství až stovek µg, a hexadekanolu v tak vysoké koncentraci, že zastiňovaly JH III.

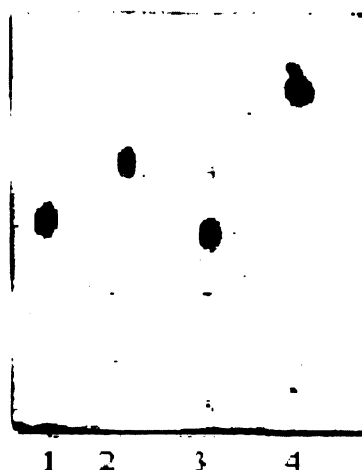
Proto byl proveden pokus s upravením GC metody, ale ani při použití velmi pomalého teplotního programu nebylo docíleno separace. JH III byl překrýván hexadekanolem, což bylo potvrzeno nástřikem standardu tohoto alkoholu. I v retenčním čase pro derivát JH III byly nalezeny interferující látky, proto byla zavržena i derivatizace. K odstranění hexadekanolu ze vzorku byla vyzkoušena chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Nejprve byla použita fáze hexan:ether 5:5, lepší separace však bylo dosaženo ve fázi hexan:ether 7:3.

Na obr. 19 je možno vidět separaci standardů methoprenu, hexadekanolu a JH III, na obr. 20 separaci hexadekanolu, JH III, připraveného derivátu JH III a vzorku extraktu termity v hexanu. Použitím TLC tedy bylo dosaženo požadované separace, proto byla purifikace sloupcovou chromatografií nahrazena chromatografií na tenké vrstvě.



Obr. 19. TLC hexan:ether 7:3

1. methopren
2. hexadekanol
3. JH III



Obr. 20. TLC hexan:ether 5:5

1. hexadekanol
2. JH III
3. derivát JH III
4. termití extrakt

Při UV detekci na chromoforových destičkách bylo možno nalézt vyšší koncentrace JH III, avšak při nanesení vzorku z termity byl detekovatelný pouze nitropentadecen. Při detekci rhodaminem se JH III také neukázal, proto byla vždy zároveň s destičkou se vzorkem vyvíjena analytická destička se standardem JH III.

Methopren, přestože se při TLC dobře dělil, nebyl po kvantitativním převedení z destičky a promytí etherem v chromatogramu detekován. Účinnost separace pomocí TLC byla tedy zjištěna sadou roztoků o určitých koncentracích JH III, které prošly stejnou procedurou jako vlastní vzorky. Účinnost byla ve dvou opakováních pro každý roztok JH III stanovena na 30 %. Přestože dochází k poměrně velkým ztrátám, byl tímto typem purifikace stanoven JH III ve vzorcích, ve kterých byl dříve po sloupcové chromatografii nedetekovatelný.

Titř JH III byl měřen v několika opakováních u jednotlivých kast druhu *Prorhinotermes simplex*, jejichž průměrná hmotnost je 3 mg. Nejvyšších hodnot dosahoval u bílých vojáků, kdy dosahoval průměrné hodnoty 590 pg/mg (tab. 5), resp. 1970 pg/mg při uvažování ztrát během přípravy vzorku. Na jeden vzorek byli použiti 3 bílí vojáci. Níže uvedené výsledky naznačují možný věkový trend v titru JH u bílých vojáků: jedinci krátce po svlékání v bílého vojáka vykazují vyšší hodnoty než jedinci v pozdních fázích před svlékáním ve vojáka. Tato časová dynamika v titru JH uvnitř přechodného stadia bílého vojáka odpovídá závěrům publikovaných studií u ostatních druhů i teoretickému modelu změny titru JH během vývoje vojáka^{6,10,12,19,20,22,23,24,25}.

Vzorek	Stáří	Hmotnost vzorku (mg)	$A_{\text{JH III}} / A_{\text{Brom.}}$	Titř JH III (pg/mg)
1	mladí	9,24	0,180	1100
2	mladí	10,09	0,096	594
3	staří	10,23	0,040	312
4	staří	7,77	0,030	347

Tab. 5. Titř JH III bílých vojáků druhu *Prorhinotermes simplex* bez přepočtu na teoretické množství při 30% výtěžnosti přípravy vzorku.

Na jeden vzorek vojáků bylo použito 5 jedinců a titř JH III se pohyboval okolo 100 pg/mg. U dělníků, kterých bylo na přípravu jednoho vzorku spotřebováno 10, byl JH III stanoven v rozmezí 40-60 pg/mg. Zatímco v některých vzorcích těchto dvou kast byl JH III bez problémů detekovatelný a kvantifikovatelný, při některých měřeních byl získán směsný pík s hexadekanolem, jenž byl pravděpodobně obsažen v tak vysoké koncentraci, že se jej nepodařilo na TLC dostatečně separovat.

Trend rozdílu titru JH III jednotlivých kast je uveden v tab. 6. Naměřené rozdíly se shodují se zjištěními v literatuře o ostatních druzích i s teoretickými modely variace titru JH během vývoje termitího vojáka, tj. výrazný vzestup titru u bílých vojáků a následný mírný pokles během stadia vojáka^{6,10,12,19,20,22,23,24,25}. Absolutní hodnoty JH vztažené k hmotnosti se při použité metodice jeví vyšší než u ostatních studovaných druhů termitů^{20,24,42}.

Kasta	Titř JH III (pg/mg)	Teoretický titř JH III (pg/mg)
dělník	50	170
bílý voják	590	1970
voják	100	330

Tab. 6. Porovnání obsahu JH III jednotlivých kast *Prorhinotermes simplex*

Posledním modelovým druhem termitů byl *Coptotermes formosanus*. Průměrná hmotnost jedinců tohoto druhu je také 3 mg. Bylo připraveno několik vzorků dělníků a vojáků. JH III se podařilo detekovat, avšak i při navýšení jedinců na vzorek (10 vojáků, 30 dělníků) se nepodařilo jeho obsah kvantifikovat. Příčinou může být stáří kolonie, kdy se titř může pohybovat ve velmi nízkých hodnotách.

ZÁVĚR

Byla vypracována metoda stanovení juvenilního hormonu bez derivatizačního kroku, tedy umožňující měření technikou GC/MS ihned po separaci vzorku buď sloupcovou, nebo tenkovrstvou chromatografií. Jako vnitřní standard byl zvolen bromundekan, který je díky délce řetězce a typickým fragmentům snadno identifikovatelný v chromatogramu. Jeho vhodnost se ukázala také při měření v SIM modu, kdy obsahoval fragment m/z 135 stejně jako JH III.

Vyvinutá metoda byla použita ke stanovení titru JH III čerstvě oplozených čmeláčích královen, 2,53 ng/jedinec, a kladoucích čmeláčích dělnic, $1,49 \pm 0,35$ ng/jedinec. U dělnic nekladoucích bylo prokázáno snížení titru JH III. Při pokusu s hlavami čmeláčích královen bylo ověřeno tvrzení, že se JH III ihned po syntéze uvolňuje do hemolymfy a neukládá se ve žláze *corpora allata*.

U termita *Kaloterme flavicollis* byl JH III stanoven u vojáků z incipientních kolonií na 560 pg/jedinec, u vojáků z dospělých kolonií na 400 pg/jedinec. U dělníků a vojáků druhu *Coptotermes formosanus* se JH III pohyboval na hranici meze detekce, tudíž jej nebylo možné kvantifikovat. Dále byly zjišťovány změny titru JH při přeměně dělníka ve vojáka přes přechodné stadium bílého vojáka u druhu *Prorhinotermes simplex*. Hodnoty JH III (bez uvažování ztrát během přípravy vzorku) se pohybovaly u dělníků v řádech desítek pg/mg, vojáků kolem 100 pg/mg. U kasty bílého vojáka byl titr JH III výrazně vyšší, průměrně 590 pg/mg.

Naměřené rozdíly v titru jednotlivých kast odpovídají trendům popisovaným v literatuře, tj. výrazný vzestup titru u bílých vojáků a následný mírný pokles během stadia vojáka. Časová dynamika v titru JH byla pozorována také uvnitř stadia bílého vojáka, kde jsou vysoké počáteční hodnoty následovány poklesem, zcela v souladu s pozorováními u ostatních druhů. Odhadované reálné hodnoty JH vztažené k jednotce hmotnosti se při použité metodice jeví vyšší než u ostatních studovaných druhů termitů. Časová proměnlivost titru JH III a její souvislost s ontogenezí bude předmětem další studie a případné publikace.

POUŽITÁ LITERATURA:

1. Hrdý I.; Křeček J.; Rupeš V.; Žárek J.; Chmela J.; Ledvinka J.: Control of the Pharaoh's Ant (*Monomorium pharaonis*) with juvenoids in baits. Pp. 83-84. *Proc. 8th Intern. Congr. IUSSI Wageningen* (1977).
2. Riddiford L.M.: Juvenile hormone action: A 2007 perspective, *Journal of Insect Physiology* **54**, 895-901 (2008).
3. Hartfelder K.: Insect juvenile hormone: from „status quo“ to high society, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**, 157-177 (2000).
4. Wheeler D.E.; Nijhout H.F.: A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system, *Bioassays* **25**, 994-1001 (2003).
5. Kodrík D.: *Fyziologie hmyzu, učení texty*. Entomologický ústav AV ČR a Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích (2004).
6. Nijhout H.F.; Wheeler D.E.: Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms, *The Quarterly Review of Biology* **57**, 109-133 (1982).
7. Gilbert L.I.; Granger N.A.; Roe R.M.: The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research direction, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 617-644 (2000).
8. Gullan P.J.; Cranston P.S.: *The insect an outline of entomology, 3. edition*. Blackwell, USA (2005).
9. Grimaldi D.A.; Engel M.S.: *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge (2005).
10. Miura T.: Proximate mechanisms and evolution of caste polyphenism in social insects: From sociality to genes, *Ecological Research* **19**, 141-148 (2004).
11. Inward D.J.G.; Beccaloni G.; Eggleton P.: Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches, *Biology Letters* **3**, 331-335 (2007).
12. Miura T.: Developmental regulation of caste-specific character in social-insect polyphenism, *Evolution & Development* **7**, 122-129 (2005).

13. Hanus R.; Šobotník J.: Ontogeneze termitů (Isoptera) v kontextu ekologických strategií; *Biologické Listy* **69**, 29-57 (2004).
14. Deligne J.; Quennedey A.; Blum M.S.: The enemies and defense mechanisms of termites. In H.R. Hermann (ed.), *Social insects 2*. Pp. 1-76..Academic Press, New York (1981).
15. Prestwich G.D.: Defense mechanisms of termites, *Annual Review of Entomology* **29**, 201-232 (1984).
16. Haverty M.I.: The proportion of soldiers in termite colonies: a list and a bibliography (Isoptera), *Sociobiology* **2**, 199-216 (1977).
17. Su N.Y.; La Fage J.P.: Effects of starvation on survival and maintenance of soldier proportion in laboratory groups of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae), *Annals of the Entomological Society of America* **79**, 312-316 (1986).
18. Lenz M.: The dependence of hormone effects in termite caste determination on external factors. In M. Lüscher (ed.), *Phase and caste development in social insects (Endocrine aspects)*. Pp. 73-89. Pergamon Press, Oxford (1976).
19. Okot-Kotber B.M.; Prestwich G.D.; Strambi A.; Strambi C.: Changes in morphogenetic hormone titers in isolated workers of the termite *Reticulitermes flavipes*, *General and Comparative Endocrinology* **90**, 290-295 (1993).
20. Park Y.I.; Raina A.K.: Juvenile hormone regulation of soldier caste in *Coptotermes formosanus*, *Journal of Insect Psychology* **50**, 561-566 (2004).
21. Park Y.I.; Raina A.K.: Regulation of juvenile hormone titers by soldiers in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*, *Journal of Insect Physiology* **51**, 385-391 (2005).
22. Lebrun D.: The role of hormones in social polymorphism and reproduction in *Kalotermes flavicollis* Fabr., *Current Themes in Tropical Science* **3**, 227-238 (1985).
23. Yin C.M.; Gillot C.: Endocrine control of caste differentiation in *Zootermopsis angusticollis* Hagen (Isoptera), *Canadian Journal of Zoology* **53**, 1701-1708 (1975).

24. Liu Y.; Henderson G.; Mao L.; Laine R.A.: Seasonal variation of juvenile hormone titers of the Formosan Subterranean Termite, *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae), *Environmental Entomology* **34**, 557-562 (2005).
25. Mao L.; Henderson G.; Liu Y.; Laine R.A.: Formosan subterranean termite soldiers regulate juvenile hormone levels and caste differentiation in workers, *Physiology, Biochemistry and Toxicology* **98**, 340-345 (2005).
26. Roisin Y.: Morphology, development and evolutionary significance of the working stages in the caste system of *Prorhinotermes* (Insecta, Isoptera), *Zoomorphology* **107**, 339-347 (1988).
27. Pavelka M., Smetana V.: Čmeláci; *Metodika ČSOP* **28** (2003).
28. Röseler P.F.: Juvenile hormone and queen rearing in bumblebees. In M. Lüscher (ed.), *Phase and caste determination in insect (Endocrine aspects)*. Pp. 55-61. Pergamon Press, Oxford (1976).
29. Valterová I.; Urbanová K.: Chemické signály čmeláků, *Chemické Listy* **91**, 846-857 (1997).
30. Kindl J.; Valterová I.; Hovorka O.: Námluvy čmeláků a pačmeláků, *Živa* **4**, 169-172 (1998).
31. Larrere M.; Couillaud F.: Role of juvenile hormone biosynthesis in dominance status and reproduction of the bumblebee, *Bombus terrestris*, *Behavioral Ecology and Sociobiology* **33**, 335-338 (1993).
32. Bloch G.; Borst D.W.; Huang Z.; Robinson G.E.; Cnaani J.; Hefetz A.: Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*, *Journal of Insect Physiology* **46**, 47-57 (2000).
33. Röseler P.F.: Juvenile hormone control of oögenesis in bumblebee workers, *Bombus terrestris*, *Journal of Insect Physiology* **23**, 985-992 (1977).
34. Elliott K.L.; Stay B.: Changes in juvenile hormone synthesis in the termite *Reticulitermes flavipes* during development of soldiers and neotenic reproductives from group of isolated workers, *Journal of Insect Physiology* **54**, 492-500 (2008).

35. Elliott K.L.; Stay B.: Juvenile hormone synthesis as related to egg development in neotenic reproductives of the termite *Reticulitermes flavipes*, with observation on urates in the fat body, *General and Comparative Endocrinology* **152**, 102-110 (2007).
36. Yagi K.J.; Tobe S.S.: The radiochemical assay for juvenile hormone biosynthesis in insects: problems and solutions, *Journal of Insect Physiology* **47**, 1227-1234 (2001).
37. Rembold H.; Hagenguth H.; Rascher J.: A sensitive method for detection and estimation of juvenile hormones from biological samples by glass capillary combined gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry, *Analytical Biochemistry* **101**, 356-363 (1980).
38. Bergot B.J.; Ratcliff M.; Schooley D.A.: Method for quantitative determination of the four known juvenile hormones in insect tissues using gas chromatography-mass spectroscopy, *Chromatography* **13**, 231-244 (1981).
39. Shu S.; Park Y.I.; Ramaswamy B.; Srinivasan A.: Hemolymph juvenile hormone titers in pupal and adult stages of southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella* (Pyralidae)) and relationship with egg development, *Journal of Insect Physiology* **43**, 719-726 (1997).
40. Teal P.E.A.; Proveaux A.T.; Heath R.R.: Analysis and quantification of insect juvenile hormones using chemical ionization ion-trap mass spectrometry, *Analytical Biochemistry* **277**, 206-213 (2000).
41. Chen Z.; Linse K.D.; Taub-Montemayor T.E.; Rankin M.A.: Comparison of radioimmunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of juvenile hormone titers, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 799-807 (2007).
42. Cornette R.; Gotoh H.; Koshikawa S.; Miura T.: Juvenile hormone titers and caste differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti*, *Journal of Insect Physiology* **54**, 922-930 (2008).
43. Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spectrometry: Principles and Applications*, 2. edition. Wiley & sons, LTD, New York (2001).
44. Liedtke R.J.; Djerassi C.: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. The electron impact induced behavior of terpenoid esters of the juvenile hormone class, *Journal of Organic Chemistry* **37**, 2111-2118 (1972).

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Doc. RNDr. Ireně Valterové, CSc. za bezmeznou trpělivost, odborné vedení a laskavý přístup při mých nelehkých začátcích i během celého vypracování této diplomové práce.

Dále děkuji Mgr. Pavlu Jirošovi za ochotu, mnoho cenných rad a jeho nehynoucí optimismus, Mgr. Robertu Hanusovi, Ph.D. za dodání vzorků termitů a zasvěcení do pozoruhodného termitího světa a Mgr. Jiřímu Kindlovi, Ph.D. za přípravu vzorků čmeláků.

Velký dík patří také všem kolegům z laboratoře za jejich rady a vytvoření výborného pracovního prostředí.

Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za veškerou podporu během mých studií.