

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

---

**VLIV POŽITÍ ETHANOLU NA TVORBU ETHYL ESTERŮ  
MASTNÝCH KYSELIN PRO ÚČELY PRŮKAZNOSTI  
ZBYTKOVÉHO ALKOHOLU V KRVI**

**THE EFFECT OF CONSUMPTION OF ETHANOL ON  
FORMATION OF FATTY ACID ETHYL ESTERS FOR THE  
PURPOSES OF DETECTION OF RESIDUAL ALCOHOL IN  
BLOOD**

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Jana Strachoňová

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

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a školitelů-specialistů Ing. Hany Střítecké a PharmDr. Viktora Voříška a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 20. srpna 2009.

Mé poděkování patří doc. RNDr.Petru Rychlovskému, CSc., že mi umožnil tuto práci vypracovat, PharmDr. Viktoru Voříškovi a Ing.Haně Střítecké, PhD za pomoc, rady, zázemí, spolupráci a realizaci tohoto experimentu.

# OBSAH

Seznam zkratk.....	6
1 Úvod.....	7
1.1 Cíl práce.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Metabolismus ethanolu.....	9
2.1.1 Mechanismus účinku.....	9
2.1.2 Resorpce ethanolu.....	10
2.1.3 Eliminace ethanolu.....	10
2.1.4 Buněčný metabolismus.....	11
2.1.5 Ethyl estery mastných kyselin jako produkty neoxidativního metabolismu ethanolu.....	12
2.2 Metody používané ke zjištění hladiny ethanolu v organismu.....	13
2.2.1 Orientační metody.....	13
2.2.2 Stanovení ethanolu v organismu.....	14
2.3 Metabolismus ethyl esterů mastných kyselin.....	15
2.3.1 Metabolismus mastných kyselin.....	15
2.3.2 Ethyl estery mastných kyselin.....	16
2.4 Stanovení ethyl esterů mastných kyselin.....	18
2.4.1 Metody izolace ethyl esterů mastných kyselin.....	18
2.4.2 Aplikace stanovení ethyl esterů mastných kyselin v biologických materiálech..	18
3 Experimentální část.....	19
3.1 Popis experimentu.....	19
3.2 Specifikace souboru.....	19
3.3 Použité metodiky.....	20
3.3.1 Metodologie stanovení alkoholu.....	21
3.3.1.1 Orientační zkouška.....	21
3.3.1.2 Stanovení v krvi.....	21
3.3.1.3 Specifikace přístrojů.....	22
3.3.2 Stanovení ethyl esterů mastných kyselin.....	23
3.3.2.1 Příprava vzorku.....	23
3.3.2.2 Analýza GC-MS.....	24
3.4 Výsledky.....	25

3.4.1 Výsledky ethanolu.....	25
3.4.2 Výsledky ethyl esterů mastných kyselin.....	33
4 Diskuse.....	76
5 Závěr.....	78
Seznam literatury.....	79
Příloha.....	82

## **Seznam zkratek**

**ADH** – alkoholdehydrogenasa

**ADP** - adenosindifosfát

**ATP** - adenosintrifosfát

**FAEE** – ethyl ester mastné kyseliny (z anglického textu)

**FID** – plamenově- ionizační detektor

**GC** – plynová chromatografie

**GC-MS** – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

**HPLC** – Vysokoučinná kapalinová chromatografie

**HPLC-MS** – Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

**IS** – interní standard

**LF UKHK** – Lékařská fakulta University Karlovy Hradec Králové

**MS** – hmotnostní detekce

**NAD<sup>+</sup>** - nikotinamidadeninukleotid

**NADH** - nikotinamidadeninukleotid-redukovaná forma

**PČR** – Policie České republiky

**TAG** - triacylglycerol

**TLC** – tenkovrstvá kapalinová chromatografie

**ÚKBD FNHK** – Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové

# 1. Úvod

Při stanovení alkoholu pro forensní účely je u nás běžné, že se odběry krve provádějí na jiném místě, než kde dochází k vlastní analýze. I když jsou předepsané přesné postupy pro transport a skladování těchto vzorků, je celá tato problematika zatížena možnými chybami.

Tyto chyby mohou být způsobeny špatnými podmínkami při skladování vzorků, chybou lidského faktoru anebo záměrným zdržováním inkriminované osoby, aby k vlastnímu odběru krve došlo, co možná nejpozději. Mnohdy jsou důsledky těchto zatížení velmi výrazné právě proto, že se jedná o stanovení ethanolu, který je poměrně nestabilní a ke stanovení množství alkoholu v krvi se většinou používají metody přímého stanovení ethanolu.

V odborné literatuře se uvádí, že existuje jistá spojitost mezi metabolismem ethanolu a hladinou ethyl esterů mastných kyselin. Ve většině dostupných, publikovaných studiích s touto tematikou se autoři pokouší aplikovat spojitost mezi ethyl estery a užitím ethanolu především u případů spojených s chronickým alkoholismem či nejasným úmrtím. Ethyl estery mastných kyselin jsou produkty neoxidativního metabolismu ethanolu v organismu, jsou to látky velmi stabilní, proto by se o nich dalo uvažovat jako o markeru užití alkoholu alespoň v rámci stanovení zbytkového alkoholu neboli hladiny alkoholu v eliminační fázi, která se doposud řeší zpětným dopočítáváním. Avšak i toto dopočítávání může být zatíženo chybou, jelikož se vychází opět ze stanovené hladiny ethanolu běžnou metodou. Kdyby se pro tyto účely daly použít ethyl estery mastných kyselin, nebyla by tak důležitá časová ztráta od odběru po analýzu, protože u nich nedochází, na rozdíl od ethanolu, k vymrazování a vypařování analyzované látky. Každý vzorek po analýze pro forensní účely musí být také ještě uchován po dobu dvou měsíců. Během skladování opět dochází k falešnému snížení koncentrace ethanolu vymražením nebo odpařením ze vzorku, to pak může způsobit problém při opakování analýzy pro soudní účely. Při užití esterů k ničemu podobnému díky jejich stabilitě nedochází a stanovení množství užitého alkoholu přes tyto metabolity by mohlo být daleko spolehlivější a průkaznější například při prokazování viny před soudem.

## **1.1 Cíl práce**

Cílem mé práce bylo porovnat koncentraci ethanolu v plasmě s koncentrací experimentálně zjištěných a vybraných ethyl esterů mastných kyselin s použitím plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Bylo snahou prokázat předpokládané přímé korelace mezi hodnotami ethanolu a konkrétními estery s ohledem na omezené možnosti rozsahu této práce.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Metabolismus ethanolu

Ethanol na základě svých fyzikálně-chemických vlastností lehce prostupuje lipidovými bariérami, a tak se rychle dostává do centrálního nervového systému člověka. V malých dávkách vyvolává u osob jenž alkohol užily subjektivně příjemný účinek, který se popisuje jako uvolnění, relaxace, zlepšení nálady a snažší komunikace s ostatními lidmi. Stoupající dávky ethanolu postupně vyvolávají poruchy mozkové činnosti a nakonec vedou až k bezvědomí. [1]

Hladina alkoholu v krvi od 0,5 do 0,99 g/kg je uváděna jako podnapilost, 1,00-1,49 g/kg lehká opilost, 1,50-1,99 g/kg střední opilost, 2,00-2,99 g/kg těžká opilost. Ovlivnění alkoholem je však velmi individuální a chování opilého člověka nelze určit jen podle hladiny alkoholu v krvi. Při hladinách 0,5-1,5 g/kg se objevuje veselost, sdílnost, hovornost, u některých naopak smutek a pláč. Dochází ke snížení schopnosti koncentrace, pozornosti, přizpůsobení, lehkým poruchám rovnováhy, lehkým poruchám vidění, zpomalení reakce zornic, prodloužení reakční doby a k prodloužení postrotačního nystagmu. Při hladině 1,5-2,5 g/kg převažují poruchy koordinace, objevují se poruchy řeči, chůze, vnímání a výrazná excitace. Při hladinách 2,5-3,0 g/kg jde o těžkou opilost s výraznými poruchami chůze, řeči, orientace, paměti a přibývá psychická zmatenost. Může dojít k hrubosti až brutálnosti a ke spáchání trestného činu. Objevuje se nevolnost a zvracení, které bývá vystřídáno hlubokým spánkem až bezvědomím. Nad 3,5 g/kg je bezprostředně ohrožen život. Při zvracení v prenakotickém stadiu může dojít k aspiraci žaludečního obsahu, která je nejčastější příčinou smrti při akutní otravě alkoholem. Rovněž může dojít k udušení z ucpání nosu a úst po pádu obličejem na zem nebo nějakou jinou podložku, k utopení a podchlazení organismu. Ke smrti z podchlazení může dojít i při teplotách nad 0 °C. Časté jsou úrazy doprovázené závažnými zraněními.

Riziko „negativních“ projevů užití alkoholu můžou zvyšovat některé látky a léčiva požitá současně s alkoholem i při relativně nízkých hladinách alkoholu v krvi. Jedná se například o antihistaminika, sedativa, hypnotika, derivátů morfia, neuroleptik a další. [2]

#### 2.1.1. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku ethanolu nelze vysvětlit přesnou speciální interakcí s určitým biochemickým procesem. Důležitou úlohu pravděpodobně hraje fyzikálně-chemicky podmíněné zabudování ethanolu do integrálních membránových proteinů. Každá jiná složka

jeví rozdílné ovlivnění; zvláště citlivé jsou určité iontové kanály, které jsou řízeny kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou a kyselinou glutamovou jakožto transmitery. [1]

### **2.1.2. Resorpce ethanolu**

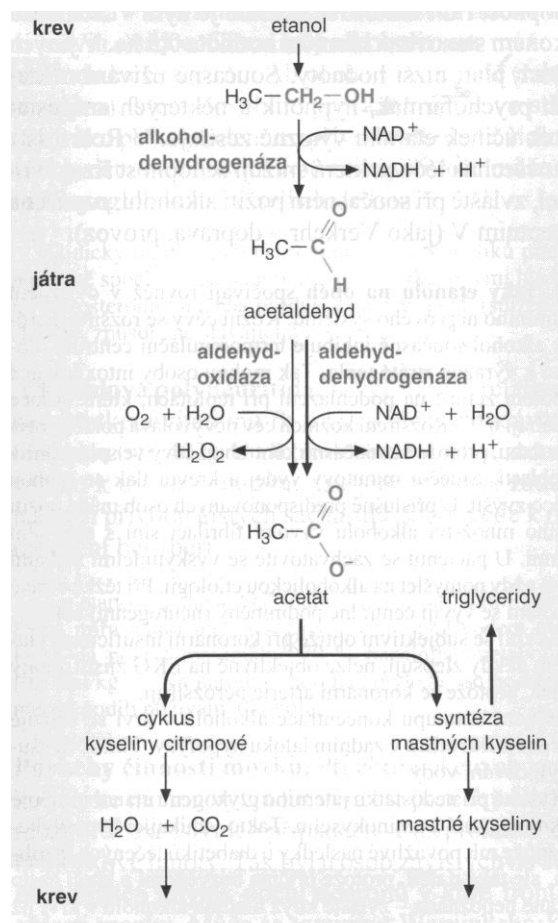
Ethanol se resorbuje přibližně z 20 % již v žaludku a zbytek ethanolu se vstřebává dvanáctníku a horní části tenkého střeva. Po resorpci se ethanol rozděluje rovnoměrně do všech typů tělesné tekutiny. Některé látky však vstřebávání alkoholu urychlují. Například oxid uhličitý v šumivých nápojích způsobuje prokrvení žaludeční sliznice, a tím zároveň urychlí vstřebání alkoholu žaludkem. Stejně působí i aromatické látky a hořčiny. Naopak cukry a tuky vstřebávání alkoholu zpomalují. Vliv na vstřebávání má i teplota, teplejší nápoje jsou vstřebávány rychleji než nápoje studené. Samozřejmě, že vstřebání ovlivňuje i momentální psychický stav jedince, přičemž únava a nervové vypětí vstřebávání zpomalují. Nema­lý vliv má obsah žaludku. Je-li žaludek prázdný, vstřebávání probíhá snadno, jinak dojde k okamžitému zředění alkoholu a zpomalení jeho vstřebávání, obzvláště když je v žaludku přítomna potrava bohatá na bílkoviny a tuky. [1,3]

### **2.1.3. Eliminace ethanolu**

Eliminace ethanolu začíná ihned po jeho požití. Ledvinami, plicemi a kůží se v nezměněné formě vylučuje jen několik procent, zbytek se metabolizuje. Rychlost biotransformace není úměrná jeho koncentraci v krvi, nýbrž za časovou jednotku se odbourává stále stejné množství ethanolu specifické pro každého jedince s kolísáním  $\pm 30$  %. Určité citace uvádí přibližný vzorec odbourávání ethanolu pro ženy 0,085 g/kg/h a pro muže 0,1 g/kg/h. Pro stejnou osobu zůstávají tyto hodnoty téměř konstantní. Po ukončení resorpce ethanolu se tedy musí počítat s pravidelným poklesem koncentrace alkoholu v krvi. Hodnoty klesají v rozmezí 0,1 – 0,2 ‰ za hodinu. U alkoholiků ve srovnání s abstinenty je odbourávání ethanolu zvýšeno jen málo nebo vůbec. [1,3]

### 2.1.4. Buněčný metabolismus

Po vstřebání je ethanol oxidován v cytoplasmě hepatocytů a to ve dvou stupních. Enzym alkoholdehydrogenasa jej převede na acetaldehyd, který je dále oxidován na acetát. Alternativním způsobem oxidace je působení enzymu katalasy ve spolupráci s peroxidem vodíku. Část požitého ethanolu je přeměněna mikrosomální monoxygenasou. Při této reakci vzniká acetaldehyd a vytváří se peroxid vodíku. Oxidace alkoholdehydrogenasou je však nejdůležitější. Při oxidaci alkoholu tímto způsobem vzniká nadměrné množství NADH, které buňka nestačí zpracovat. Proto dochází ke zvýšené redukci pyruvátu na laktát. Druhý stupeň biotransformace probíhá rychleji než ten první, zůstává aktuální koncentrace acetaldehydu na velmi nízké hladině. Acetát se také spotřebovává na syntézu mastných kyselin a podmiňuje alkoholické ztučnění jater. Část ethanolu se v jaterních buňkách oxiduje působením endoplazmatického cytochromu P450. [1]



**Obrázek č.1...Metabolismus ethanolu [1]**

*Schéma reakcí metabolismu ethanolu s umístěním v konkrétních orgánech*

### 2.1.5. Ethyl estery mastných kyselin jako produkty neoxidativního metabolismu ethanolu

V minulosti se odborná veřejnost zabývala převážně jen oxidativní částí metabolismu alkoholu. V posledních letech se dopředí zájmu dostala i druhá metabolická cesta odbourávání alkoholu v lidském těle, a to cesta neoxidativního metabolismu. V jedné z možných cest neoxidativního metabolismu alkoholu dochází k esterifikaci volných mastných kyselin za tvorby, již v úvodu zmíněných, ethyl esterů mastných kyselin nebo v jiné z cest neoxidativního metabolismu dochází ke vzniku fosfatidylethanolu z fosfatidylcholinu za katalýzy fosfolipázy D. [4]

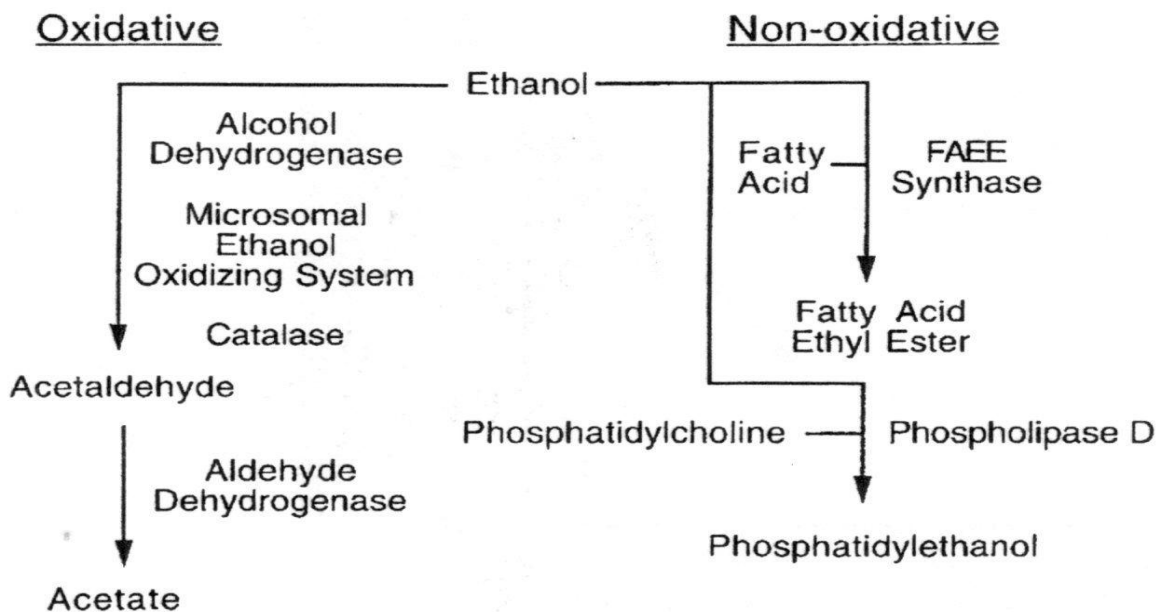


Fig. 1. Oxidative and nonoxidative pathways of ethanol metabolism.

### Obrázek. č.2 *Metabolismus ethanolu.* [4]

*Schéma oxidativní a neoxidativní cesty odbourávání ethanolu v organismu*

## 2.2 Metody používané ke zjištění hladiny ethanolu v organismu

Nejpoužívanějším biologickým materiálem pro stanovení ethanolu je krevní sérum. Analýza krevního séra poskytuje objektivní a dále reprodukovatelné výsledky. Méně užívaným biologickým materiálem je moč. Analýza moči je sice dosti přesná a spolehlivá, ale reprodukovatelnost výsledku je velmi obtížná. Pro soudně-patologické analýzy se dále využívá pro stanovení post mortem synoviální tekutina (tekutina obklopující klouby), jelikož krev se sice u mrtvého používat může, ale pokud je tento materiál odebírán v blízkosti žaludku, močového měchýře nebo přímo ze srdce, bude vykazovat falešně pozitivní výsledky způsobené hnilobnými posmrtnými procesy. Z výše uvedených důvodů není tato lokalizace pro odběr krve post mortem dovolena. Metod pro stanovení alkoholu se používá více s ohledem na důvod, proč je alkohol zjišťován. Pro zjištění alkoholu na pracovišti a k vyloučení či prokázání alkoholu ve forenzní oblasti se používají metody orientační a metody přesného stanovení. Pro přesné stanovení ve forenzní oblasti se používá stanovení plynovou chromatografií s následnou kontrolou stanovení metodou založenou na jiném principu – Widmarkovou metodou a z biologických metod se používá například metoda ADH (alkoholdehydrogenasa) - enzymatické stanovení alkoholu v krvi. [5,6,]

### 2.2.1 Orientační metody

Orientační metody jsou založené na zjišťování alkoholu v dechu pomocí detekčních trubiček nebo dechových analyzátorů, a to buď komerčně dostupných, nebo v rámci PČR (Policie České republiky) jsou to přesně kalibrované a seřízené analyzátory od firmy Dräger. Tyto analyzátory se používají většinou ruční, které můžeme vidět u standardní silniční kontroly, nebo staniční, které umožňují stanovení hladiny alkoholu v krvi analýzou alveolárního vzduchu (vzduchu v plicních sklípkách) na bázi spektrofotometrické detekce. Nejedná se však o specifické stanovení a výsledek nemůže být brán jako důkazní prostředek. [5,6]

Zvláštní kapitolou jsou komerčně dostupné alkohol testery, u kterých se naměřená hladina nemůže brát jako směrodatná, ale pouze jako informace na úrovni výstupu negativní versus pozitivní výsledek. Přesvědčila jsem se o tom při našem experimentu, kdy si účastníci mohli donést své vlastní komerčně dostupné a pro své účely používané alkohol testery.

### 2.2.2 Stanovení ethanolu v organismu

V oboru forenzní analytiky je nejvíce rozšířený způsob stanovení alkoholu v krvi pomocí chemických a fyzikálně-chemických metod. Za objektivní se považuje stanovení plynovou chromatografií v uspořádání Head Space pro těkavé látky a následně kontrolováno metodou, která je založená na jiném principu než uvedená plynová chromatografie, Widmarkova metoda. Plynová chromatografie je používána právě pro kvalitativně specifické a kvantitativně přesné stanovení koncentrace ethanolu v krvi. Dochází k jednoznačnému odlišení od těkavých látek obsažených v krvi. Při vlastním stanovení hladiny alkoholu v krvi se používá metoda vnitřního standardu. Přidává se přesně definované množství látky například terc-butanolu pro přesné určení koncentrace ethanolu. [5]

Widmarkova metoda je dosti přesná a spolehlivá, vykazuje vysokou citlivost, jednoduchost a je zařazená mezi rutinní laboratorní metody. Tato metoda, ale postrádá specifickou, jelikož nerozeznává pouze ethanol, ale i jiné redukující těkavé látky chovající se stejně jako ethanol. Patří mezi ně například aceton, ether. [5, 6]

Další metodou, kterou lze použít pro stanovení alkoholu v biologickém materiálu je například metoda ADH. Tato metoda je založena na principu enzymatického určení. Jedná se o katalytickou oxidaci ethanolu na acetaldehyd za katalýzy ADH. Tato metoda je využívána převážně v laboratořích klinické biochemie. [5]

Stanovení alkoholu v krvi nebo v jiném biologickém materiálu, se musí řídit stanoviskem schváleným výborem České společnosti soudního lékařství a soudní toxikologie. Podle toho to ustanovení se řídí celá ethanolová analýza v biologickém materiálu, jsou určeny standardizované metody a přesné postupy interpretace výsledku. Standardizovanou metodou je plynová chromatografie v uspořádání Head Space a k ní vždy jiná alternativní metoda. Je zde také ustanoveno, že ethanol musí mít jiný eluční čas než ostatní látky, které se mohou v biologickém materiálu objevit důsledkem onemocnění, otravy či hnilobných procesů. Ke kalibraci se používají vodné roztoky ethanolu. Pro vlastní vypočítání hladiny alkoholu v krvi či jiném biologickém materiálu jsou stanovené korekční faktory, pro plynovou chromatografií v uspořádání Head Space se používají faktory dle Machaty (1/F; F= krev 1,08; sérum 1,26; sérum s krvinkami 1,15; moč 1,00). Obecně platné stanovisko týkající se celého stanovení ethanolu zahrnuje přesné postupy doručování vzorků, skladování vzorků, přesné postupy analýz u všech používaných metod, přesné požadavky při výpočtech a interpretacích výsledků analýzy. [5]

I přes tato obecná ustanovení je možné, že některé výsledky nejsou zcela přesné. Ke zkreslení může dojít ještě před odběrem, kdy může dotyčná osoba různými způsoby zdržovat a tím

oddalovat dobu odběru. Pokud pozdním odběrem klesne hladina ethanolu v těle vyšetřovaného na hodnotu 0,2-0,3 g/kg, je tento výsledek brán jako negativní. Dále, pokud selže lidský faktor a není se vzorkem nakládáno dle nařízení – zapomenutí vzorku delší dobu v pokojové či laboratorní teplotě, extrémně dlouhé skladování vzorku před samotnou analýzou či špatnými podmínkami při převozu z místa odběru na místo stanovení (ethanol se odpařuje). I povinné skladování vzorku krve po stanovení pro případnou potřebu opakování celé analýzy je několik týdnů. Během této doby, ať je vzorek uskladněn v lednici či mrazáku, dojde při opakované analýze k vykazování falešně nízké až negativní koncentraci ethanolu v krvi, právě z důvodu již dříve zmiňované těkavosti ethanolu. [5]

## **2.3 Metabolismus ethyl esterů mastných kyselin**

Pro nastínění vzniku ethylesterů mastných kyselin a jeho osudu v organismu, je třeba zmínit několik důležitých informací týkajících se mastných kyselin .

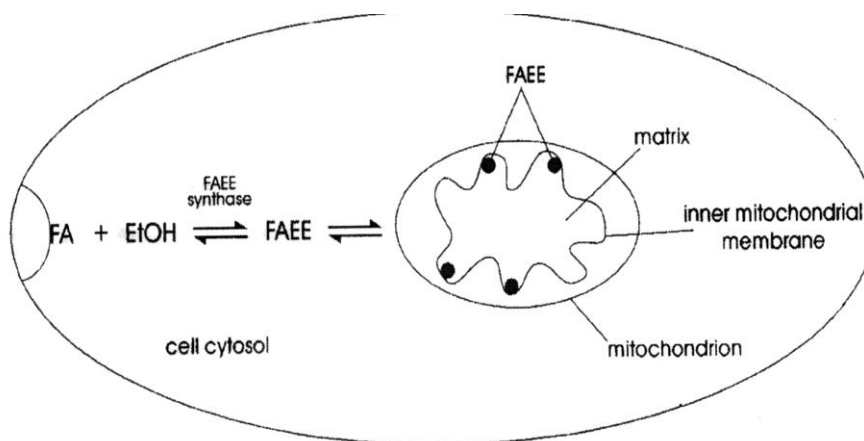
### **2.3.1. Metabolismus mastných kyselin**

Karboxylové kyseliny s vyšším počtem uhlíku jsou díky jejich nerozpustnosti ve vodném prostředí označovány jako mastné kyseliny. Podle délky alifatického řetězce je možné je dělit do tří skupin: kyseliny s krátkým, středně dlouhým a dlouhým řetězcem. Biologicky významné mastné kyseliny obsahují ve své molekule obvykle sudý počet uhlíku. Jelikož mastné kyseliny jsou z hlediska svých funkcí pro organismus nepostradatelné, je živočišná buňka vybavena enzymatickým aparátem umožňujícím syntesu, skladování a uvolňování v případě potřeby. Mastné kyseliny se tak stávají nejdůležitějším substrátem co do kvantity uvolněné energie v procesu biologické oxidace a saturace energetických potřeb organismu. Buňka je schopna mastné kyseliny syntetizovat de novo i metabolizovat kyseliny přijaté potravou. [7,8]

Hlavním exogenním zdrojem mastných kyselin jsou jejich estery s glycerolem (triacylglyceroly - TAG) přijímané v potravě ve formě tuku. Uvolnění mastných kyselin je spojeno s hydrolýzou triacylglycerolů ve střešní stěně a následnou reesterifikací v enterocyту (střešní buňka). Následná formace chylomikronových částic je důležitá pro transport nepolárních esterifikovaných mastných kyselin v polárním prostředí krve. V závislosti na

energetickém stavu organismu jsou TAG buňkami vycytávané, nebo putují k dalšímu zpracování do jater.

Endogenní syntéza mastných kyselin je lokalizována v cytosolu a řídí se dostupností energetických substrátů pro normální metabolickou aktivitu buněk. Biosyntéza je aktivována přebytkem živin a to hlavně glukosy a aminokyselin. Naopak degradace je stimulována nedostatkem energie, obecně snížením poměru ATP/ADP (adenosintrifosfát/adenosindifosfát) resp. NADH/NAD<sup>+</sup> (nikotinamidadenin dinukleotid-redukovaná forma / nikotinamidadenin dinukleotid), což je allosterickým signálem pro zpuštění  $\beta$ -oxidace. Katabolický osud mastných kyselin je zpečetěn přeměnou na acyl-CoA (acyl-koenzym A), pro který je vnější mitochondriální membrána prostupná. Ke změně situace dochází na vnitřní mitochondriální membráně, kde je nutná přítomnost karnitinového přenašeče. Po vstupu do matrix mitochondrie začíná degradace řetězce mastných kyselin v procesu Lynenovy spirály. [7, 8, 10]



**Obr. č.3 Esterifikace mastných kyselin na buněčné úrovni [8]**

*Znárodnění uložení FAEE v mitochondriích*

### 2.3.2. Ethyl estery mastných kyselin

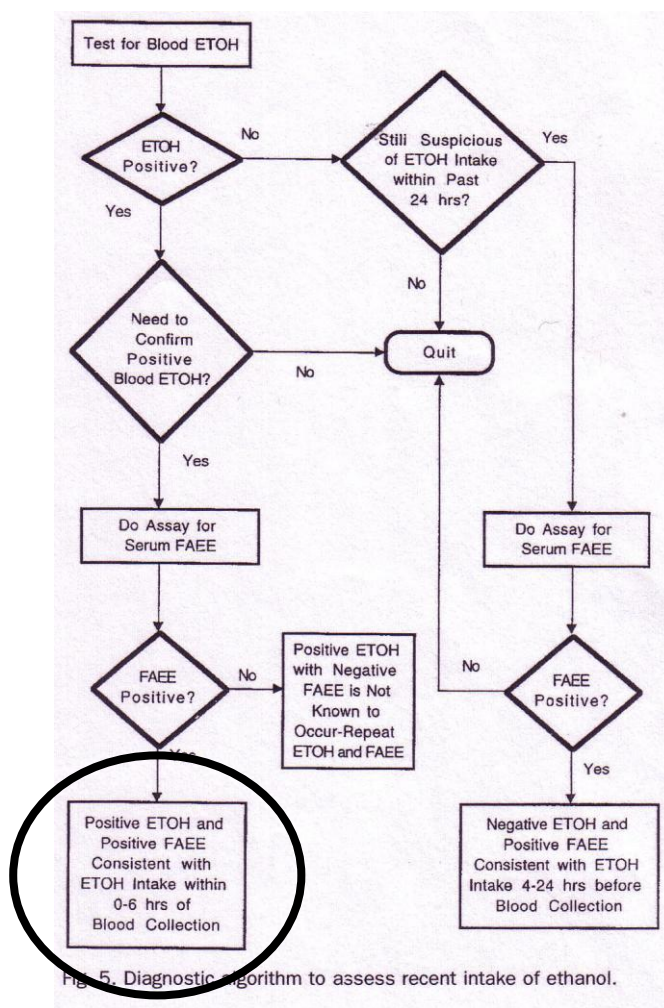
Ethanol jakožto malá polární molekula lehce prostupuje biologickými membránami. V cytosolu část podléhá oxidaci za vzniku acetaldehydu a kyseliny octové. Produktem je značné kvantum NADH, což vyvolává změnu redoxního stavu cytosolu s aktivací syntézy mastných



kyselin. Zvyšuje se obsah mastných kyselin a část etanolu je prostřednictvím FAEE synthasy (ethyl estery mastných kyselin synthasa) esterifikována na ethyl estery mastných kyselin.

Tyto estery jsou vysoce nepolární látky, které přestupují do mitochondrií. Mají výraznou afinitu k vnitřní mitochondriální membráně, na kterou se po hydrolyse váží. Zvýšený obsah mastných kyselin působí jako rozpojovač oxidativní fosforylace mechanismem reverzibilní inhibice cytochrom-c-oxidasy .

Esterifikace volných mastných probíhá za účasti enzymu FAEE syntasy. Tento enzym má čtyři isoformy a to I, II, III, syntasa/karboxyesterasa. [8,9]



**Obr.č.4 Diagnostický algoritmus ethanolu a FAEE [9]**

Zvýrazněná oblast obrázku představuje časový úsek algoritmu na který je zaměřena tato práce.

## **2.4 Stanovení ethyl esterů mastných kyselin**

### **2.4.1 Metody izolace ethyl esterů mastných kyselin**

Pro izolaci ethyl esterů mastných kyselin se zdají být nejvhodnější separační metody na bázi chromatografie. Nejpoužívanější jsou plynová a kapalinová. Dříve používanou tenkovrstvou chromatografií (TLC) nahradila chromatografie vysokoúčinná ve spojení s hmotnostním detektorem (HPLC-MS). Při použití plynové chromatografie je nejvhodnější spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) nebo plamenovou ionizací (GC-FID).

[11, 12, 13, 14]

### **2.4.2 Aplikace stanovení ethyl esterů mastných kyselin v biologických materiálech**

V rámci tohoto stanovení byl sledovaný obsah zjišťován v následujících vzorcích biologického původu: sérum, krevní elementy (erytrocyty, leukocyty a trombocyty), játerní, srdeční a mozková tkáň, mekonium a vlasy. V séru a krevních elementech byl studován vliv akutního požití ethanolu; v tkáni srdeční, játerní a mozkové toxicita ethyl esterů na metabolismus buněk; v mekoniu se prokazovala zvýšená hladina u novorozenců (živých i mrtvorozených) matek alkoholiček a ve vlasech vliv chronické expozice ethanolu. Experimenty se snažily prokázat příčinnou souvislost mezi požitím ethanolu (příležitostně i chronicky) a zvýšením hladiny esterů v daných vzorcích. Výsledky experimentů jsou stále předmětem diskusí a podnětem k dalším studiím. [10,15, 16, 17, 18, 19]

## **3. Experimentální část**

### **3.1 Popis experimentu**

Experimentální část se prováděla na skupině dobrovolníků o 13 členech a byla uskutečněna na Katedře vojenské hygieny Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Odběry byly prováděny odborným zdravotnickým personálem a po celou dobu experimentu byl přítomen lékař, který zároveň u každého zkoušeného provedl vstupní a výstupní zdravotní vyšetření.

Dobrovolníci byli z části příslušníci armády ČR a různorodá skupina běžných občanů. Všechny testované osoby abstinovaly minimálně 24 hodin před experimentem. Dobrovolníci se k experimentu dostavili ráno v 7.00 po standardní snídani jak byl každý zvyklý.

Experiment spočíval v podání dávky alkoholu v ranních hodinách. Každému jedinci odpovídající podle jeho váhy do maxima jednoho promile. Podávala se 37,5% vodka zapíjená vodou nebo různými druhy džusu. Každou hodinu byla provedena orientační dechová zkouška. Tato zkouška se prováděla opakovaně každou hodinu u každého jedince až do nadýchání opakované nuly. Každé dvě hodiny se odebírala venózní krev z žíly v předloktí, která byla použita ke krevní analýze hladiny alkoholu a pro stanovení ethyl esterů mastných kyselin. Dobrovolníci byli po celou dobu pod dozorem lékaře a ve společné místnosti, hráli společenské hry, bez velké fyzické námahy, strava jim byla podávána všestranně pestrá na živočišné bílkoviny, rostlinné, cukry a tuky, všem stejná dle individuálních potřeb. Kuřákům bylo dovoleno kouřit, aby se zachytil naprosto běžný a nijak neupravovaný denní režim. K pití během dne byla povolena voda a několik druhů džusů, káva a černý čaj podáván nebyl.

### **3.2 Specifikace souboru**

Skupina dobrovolníků byla vybírána s ohledem na zastoupení obou pohlaví, věku a zároveň tak, aby ve skupině obou pohlaví byli lidé, kteří nepijí běžně i ti, kteří alkohol požívají pravidelně. Soubor byl vybírán tak, aby byla pokryta škála produktivního věku. Tab.č.1

Tabulka .č.1.: specifikace jedinců testovaného souboru

	<b>Muž/žena</b>	<b>Věk</b>	<b>Váha kg</b>	<b>Objem EtOH ml</b>
<b>1</b>	Muž	44	89	209
<b>2.</b>	Muž	32	120	282
<b>3.</b>	Muž	33	95	223
<b>4.</b>	Muž	37	63	148
<b>5.</b>	Žena	22	68	137
<b>6.</b>	Muž	38	98	231
<b>7.</b>	Žena	39	70	141
<b>8.</b>	Žena	18	52	105
<b>9.</b>	Muž	29	85	200
<b>10.</b>	Muž	48	95	223
<b>11.</b>	Muž	24	73	172
<b>12.</b>	Žena	38	70	141
<b>13.</b>	Muž	24	60	141

Průměrný věk skupiny byl 32,77 let, přičemž nejnižší věk byl 18 let a nejvyšší 48 let. Průměrná váha souboru byla 79,84 kg, přičemž nejnižší byla 52 kg a nejvyšší 120 kg.

### **3.3 Použité metodiky**

V experimentu byly použity výsledky orientační dechové zkoušky prováděné na dechovém analyzátoru zapůjčeném od PČR (Policie České republiky) Alcotester Dräger 7410, pravidelně kalibrovaný a kontrolovaný metrologickým ústavem. Dále výsledky krevní analýzy na stanovení alkoholu, provedené v alkoholové laboratoři Soudního lékařství Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. A výsledky krevní analýzy pro ethyl estery mastných kyselin, která byla provedena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky. Příprava vzorků proběhla na již zmíněné katedře vojenské hygieny.

Pro snazší opakované odběry krve a snížení množství vpichů, byla aplikována každému dobrovolníkovi kanyla do žíly hned při prvním nulovém odběru. Při každém odběru se odebíralo 8 ml srážlivé krve a po centrifugování se sérum rozdělilo zhruba po 2 ml do dvou dobře uzavíratelných zkumavek a uskladněny v lednici při 5 °C. Jedna zkumavka byla použita na analýzu ethanolu, druhá na analýzu ethyl esterů mastných kyselin. U některých dobrovolníků nebylo možné provést všech šest odběrů, proto nemohly být zařazeni do statistického zpracování výsledků a analýzy na ethyl estery mastných kyselin.

### **3.3.1 Metodologie stanovení alkoholu**

#### **3.3.1.1 Orientační zkouška**

Orientační dechová zkouška se prováděla nejprve pro kontrolu, že každý ze zúčastněných nepřišel již pod vlivem alkoholu před podáním dávky alkoholu. Později se dechová zkouška prováděla opakovaně každou hodinu, ukončena byla po naměření opakované nulové hodnoty u každé z testovaných osob.

Výsledky orientační dechové zkoušky byly prováděné na dechovém analyzátoru zapůjčeném od PČR (Alcotester Dräger 7410), pravidelně kalibrovaný a kontrolovaný metrologickým ústavem. K dispozici byl analyzátor kalibrovaný 20. 11. 2008, námi prováděné dechové zkoušky byly první na něm prováděné, můžeme je tedy považovat za validní.

#### **3.3.1.2 Stanovení v krvi**

Připravené vzorky séra byly dopraveny do Alkoholové laboratoře soudního lékařství LF UK HK. Do jednotlivých vialek na plynovou chromatografii bylo odpipetováno 0,5 ml séra a ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit terc-butanol. Vzorky byly zpracovány a změřeny pomocí plynové chromatografie v uspořádání Head Space s plamenově ionizačním detektorem.

### 3.3.1.3 Specifikace přístrojů

Head Space uspořádání je komerční specifikace HP7694 Head Space UNIT. (Tab.č.2)

*Tabulka .č.2: Podmínky pro analýzu Head Space*

<b>Nastavené parametry</b>	
teplota pece	65 °C
teplota ve smyčce	80 °C
teplota v kapiláře	110 °C
Čas equilibrace	1,5 min
Čas tlakování	0,5 min
Čas naplnění smyčky	0,2 min.
Čas equilibrace smyčky	0.05 min.
Čas doba nástřiku	0,025 min

GC system Agilent Technologies 7890A

Kolona: Agilent 19091S – 510, HP – B- ALC

Délka: 7,5 m

I.D.: 0,320 mm

Film: 0,02 mm

*Tabulka č.3: Podmínky pro analýzu GC*

<b>Nastavené parametry</b>	
Průtok	4,000
Split dělení	10:1
Tlak nástřiku	17,008 psi
Průtok septa	3ml/min
Start	80 °C
Final	150 °C 2 min izokrat.
Pokles	80 °C
Celkový cyklus	6,95 min

Tabulka č.4: Podmínky pro analýzu FID

Nastavené parametry	
Teplota	235 °C
Průtok (H <sub>2</sub> )	30 ml/min
Průtok vzduchu	400 ml/min
Upravování (N <sub>2</sub> )	25 ml/min

### 3.3.2. Stanovení ethyl esterů mastných kyselin

#### 3.3.2.1. Příprava vzorku

Všechny vzorky pro analýzu ethyl esterů mastných kyselin v séru byly připraveny podle následujícího postupu.

Bylo odpipetováno 0,5 ml séra, k tomu bylo přidáno 0,5 ml H<sub>2</sub>O a 0,2 ml roztoku vnitřního standardu, který byl připraven z 0,01 g eikosanu a 100 ml hexanu. K takto upravenému séru bylo dále přidáno 7 ml směsi aceton/hexan v poměru 2:7. Tato připravená směs byla krátce protřepána na stolní třepačce (1 min) a dále se centrifugovala 10 min při 5000 otáčkách/min. Po centrifugaci se vzorky nechaly 2 minuty odstát a bylo odebráno 3,5 ml z horní hexanové fáze. Těchto 3,5 ml se dále vysušilo ve vakuové odparce při 40 °C (fa SUPELCO, UKBD FN HK). Po vysušení se odparek opět rozpustil v 0,3 ml hexanu.

Dále byla provedena Solid phase extrakce pomocí aminopropylových kolonek. Kolonky byly kondicionovány 4 ml hexanu. Na kolonku bylo nastříkováno 0,3 ml odparku rozpuštěného v hexanu. Pro další použití se jímala fáze z kolonky po propláchnutí 6 ml hexanu. Tato směs byla opět vysušena ve vakuové odparce při 40 °C (fa SUPELCO, UKBD FN HK). Takto připravený odparek byl uzavřen a uchován k následné analýze stanovení ethyl esterů. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml hexanu a připraven na analýzu GC/MS vždy těsně před nástřikem na kolonu.

### 3.2.2.2 Analýza GC-MS

Pro analýzu byl použit systém ITQ GC MS<sup>n</sup> firmy Thermo Scientific.

Tabulka.č.5: GC

<b>Nastavené parametry</b>	
Nástřik vzorku	1,5 µl
Kolona	Thermo TR – 5 ms SQC, průtok He konstantní 1 ml/min
SF	5% Fenyl - polysilfenylen – siloxan, TR 5MS SQC, 30m x 0,25mm x 0,25 um
Injektor	Režim splitless, 3 min
Průtok He	Konstantní, ve splitu 20 ml/min
Odfuk k výslednému průtoku nosného plynu	1 ml/min na koloně
Teplota	250 °C
Pec – počáteční teplota	90 °C , 2 min prodleva
Teplota 90 - 280 °C	20 °C/min , prodleva 15 min, celková doba 27 min

Tabulka č.6: MS

<b>Nastavené parametry</b>	
Kvadrupolová iontová past	Externí ionizace – režim EI(elektronové ionizace)
Detekce	Plný scan
Offset (kompenzační) napětí na dynodě	-100 V
Průtok He v pasti (moderující plyn v pasti)	0,3 ml/min
Chyba detekce	1,0 mmu/100 amu
Ionizační čas	25 ms
Rychlost scanu	3 µscan
Polarita dynody	+
Rozsah měřených hmot	45-700



## 3.4 Výsledky

### 3.4.1 Výsledky ethanolu

#### Testovaný č.1

Tabulka č.7 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00		0
10.00	0,32	0,37046
11.00	0,37	
12.00	0,23	0,3896
13.00	0,17	
14.00	0,11	0,0894
15.00	0	
16.00	0	0,0024
17.00	0	-

Testovaný č.1 pije velmi zřídka, zhruba 2x do měsíce vypije maximálně 5 desetistupňových piv za 3 hodiny. Skupina nepijan.

## Testovaný č.2

Tabulka č.8 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	6,60E-03
10.00	0,51	0,6518
11.00	0,57	
12.00	0,4	0,4819
13.00	0,31	
14.00	0,15	0,1439
15.00	0	
16.00	0	0,0144
17.00	0	2,20E-03

Tento testovaný požívá alkohol zhruba dvakrát za měsíc. Je zvyklý na desetistupňové pivo, jednorázová dávka je 5 piv během tří hodin. Skupina nepiján.

## Testovaný č.3

Tabulka č.9 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00		9,50E-05
10.00	0,59	0,7122
11.00	0,5	
12.00	0,45	0,4981
13.00	0,28	
14.00	0,19	0,2495
15.00	0,09	
16.00	0	2,80E-02
17.00	0	5,30E-03

Tento testovaný pije zhruba 2x do měsíce, pije víno, desetistupňové pivo, destilát. Tři piva jako jednorázové množství vypije asi za 90 minut. Skupina nepijan.

#### Testovaný č.4

Tabulka č.10 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza [
9.00	0	3,00E-03
10.00	0,51	0,5072072
11.00	0,47	
12.00	0,2	0,2827827
13.00	0	
14.00	0	0,0617617
15.00	0	
16.00	0	5,10E-03
17.00	0	1,20E-03

Testovaný pije asi zhruba 2x – 3x do měsíce. Preferuje víno, jako jednorázové množství uvedl 0,51 – 0,75l během 4 až 5 hodin. Skupina nepijan.

## Testovaný č.5

Tabulka č.11

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	9,00E-05
10.00	0,47	0,5672
11.00	0,29	
12.00	0,14	0,1752
13.00	0	
14.00	0	9,70E-03
15.00	0	
16.00	0	1,60E-04
17.00	0	0

Testovaný je vojenský medik ve velmi dobře fyzické kondici. Alkohol požívá v průměru 3x – 4x týdně, preferuje dvanáctistupňové pivo, víno, destiláty. Jednorázové množství alkoholu uvádí 5 piv a zhruba 3 0,4dl sklenky destilátu za 6-7 hodin.

## Testovaný č.6

Tabulka č.12 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	0
10.00	0,8	0,8574
11.00	0,76	
12.00	0,57	0,5784
13.00	0,33	
14.00	0,19	0,2054
15.00	0	
16.00	0	2,50E-02
17.00	0	1,30E-03

Testovaný s lehkou obezitou požívá alkohol zhruba 2x týdně, konzumuje většinou desetistupňové pivo, jednorázová dávka alkoholu je v průměru 10 piv během asi 9 hodin.

### Testovaný č.7

Tabulka č.13 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	1,00E-02
10.00	0,23	0,3543
11.00	0,45	
12.00	0,33	0,3627
13.00	0,17	
14.00	0	3,78E-02
15.00	0	
16.00	0	2,70E-03
17.00	0	7,70E-04

Testovaný konzumuje alkohol 2x týdně, desetistupňové pivo s jednorázovým množstvím maximálně 6 piv během 4 hodin.

## Testovaný č.8

Tabulka č.14 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	8,4e-5
10.00	0,77	0,5480
11.00	0,56	
12.00	0,33	0,3438
13.00	0,13	
14.00	0,0	0,0173
15.00	0	
16.00	0	-
17.00	0	-

Testovaný č.8 pije alkohol s pravidelností 1x týdně v množství 4 x 2 dcl vína. Toto množství vypije zhruba za tři hodiny.

## Testovaný č.9

Tabulka č.15 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	5,40E-04
10.00	0,78	0,7381
11.00	0,44	
12.00	0,35	0,4571
13.00	0,07	
14.00	0	0,1188
15.00	0	
16.00	0	3,80E-02
17.00	0	7,90E-03

Testovaný požívá alkohol pravidelně 3x týdně, preferuje desetistupňové pivo v nárazovém množství zhruba deset piv během 8 hodin.

### Testovaný č.10

Tabulka č.16 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00		3,40E-03
10.00	0,57	0,7097
11.00	0,45	
12.00	0,31	0,4039
13.00	0,16	
14.00	0	0,0673
15.00	0	
16.00	0	1,20E-02
17.00	0	3,60E-03

Testovaný konzumuje alkohol denně, ale v odlišném množství. Pravidelně sportuje. Konzumuje většinou pivo nebo víno občas přidá destiláty. Průměrně vypije asi 8 dvanáctistupňových piv za asi šest hodin.

## Testovaný č.11

Tabulka č. 17 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00		0
10.00	0,76	0,6576
11.00	0,47	
12.00	0,36	0,4087
13.00	0,23	
14.00	0,11	0,0984
15.00	0	
16.00	0	6,20E-03
17.00	0	1,30E-03

Testovaný konzumuje alkohol 3x týdně, nemá vyhraněný druh alkoholu. Jednorázovou dávku alkoholu představuje asi 10 piv v kombinaci s destiláty.

## Testovaný č.12

Tabulka č.18 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	-
10.00	0,88	0,7667
11.00	0,54	
12.00	0,32	0,2922
13.00	0,13	
14.00	0,0	0,0089
15.00	0	
16.00	0	2,8e-4
17.00	0	1,25E-04



Testovaný č.12 požívá alkohol v průměru 2x týdně. Preferuje pivo dvanáctistupňové a destiláty. Jednorázová dávka činí 5 piv a 5 x 4 cl destilátu. Toto množství vypije během 5 hodin.

### Testovaný č.13

Tabulka č.19 Výsledky ethanolu

Čas odběrů	Dechová zkouška[‰]	Krevní analýza[‰]
9.00	0	2,7E-3
10.00	0,48	0,4851
11.00	0,40	
12.00	0,26	0,2915
13.00	0,11	
14.00	0,0	0,0146
15.00	0	
16.00	0	1,62E-4
17.00	0	-

Testovaný č.13 pravidelně požívá alkohol 3x do týdne. Pije pivo, víno, destiláty. Množství udané jako jednorázové představuje 5 piv nebo 2 dcl vína a 2-3 destiláty. To vše vypije během 8 hodin.

### 3.4.2 Výsledky ethyl esterů mastných kyselin

Tabulka č.20

číslo odběru	plocha IS	hmotnost IS v mg
1	49582100	0,02
2	174591917	0,02
3	145811275	0,02
4	368782199	0,02

<b>5</b>	251529178	0,02
<b>6</b>	82037528	0,02
<b>1</b>	22532418	0,02
<b>2</b>	264178373	0,02
<b>3</b>	77790146	0,02
<b>4</b>	148743027	0,02
<b>5</b>	491023300	0,02
<b>6</b>	65212193	0,02
<b>1</b>	88559213	0,02
<b>2</b>	89785322	0,02
<b>3</b>	116194297	0,02
<b>4</b>	16010037	0,02
<b>5</b>	141682037	0,02
<b>6</b>	35851643	0,02
<b>1</b>	211788914	0,0108
<b>2</b>	59502663	0,0108
<b>3</b>	58466831	0,0108
<b>4</b>	45388396	0,0108
<b>5</b>	184273508	0,0108
<b>6</b>	115454785	0,0108
<b>1</b>	332759079	0,0108
<b>2</b>	89278533	0,0108
<b>3</b>	96284132	0,0108
<b>4</b>	21985324	0,0108
<b>5</b>	15712891	0,0108
<b>6</b>	72278968	0,0108
<b>1</b>	67141877	0,0108
<b>2</b>	40728669	0,0108

<b>3</b>	16135915	0,0108
<b>4</b>	29753092	0,0108
<b>5</b>	43773219	0,0108
<b>6</b>	176926929	0,0108
<b>1</b>	214468201	0,0108
<b>2</b>	76348548	0,0108
<b>3</b>	47876455	0,0108
<b>4</b>	32664931	0,0108
<b>5</b>	47795142	0,0108
<b>6</b>	104222486	0,0108
<b>1</b>	17372784	0,0248
<b>2</b>	25065430	0,0248
<b>3</b>	40492615	0,0248
<b>4</b>	28600012	0,0248
<b>5</b>	19930838	0,0248
<b>6</b>	58221786	0,0248
<b>1</b>	32070811	0,0248
<b>2</b>	31096872	0,0248
<b>3</b>	46809368	0,0248
<b>4</b>	115945710	0,0248
<b>5</b>	52665058	0,0248
<b>6</b>	124307686	0,0248

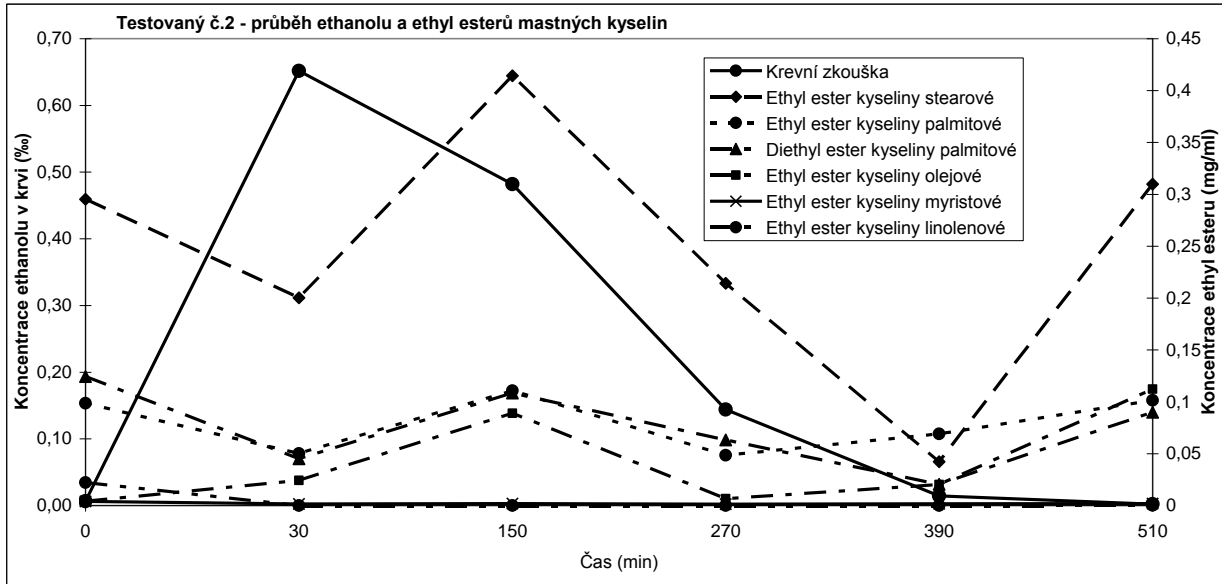
*Tabulka č.21*

testovaný	Čas (min)	krevní zk.(‰)	Diethyl ester kyseliny stearové (mg/ml)	Ethyl ester kyseliny palmitové (mg/ml)	Diethyl ester kyseliny palmitové (mg/ml)	Ethyl ester kyseliny olejové (mg/ml)	Ethyl ester kyseliny myristové (mg/ml)	Ethyl ester kyseliny linolenové (mg/ml)
2	0	0,01	0,295195421	0,098513	0,12435	0,00425	0,003917	0,022154
2	30	0,65	0,200270873	0,050215	0,045114	0,02428	0,001559	0
2	150	0,48	0,414322848	0,110757	0,108473	0,088862	0,001942	0
2	270	0,14	0,214173358	0,048425	0,063298	0,006711	0,001335	0
2	390	0,01	0,042283709	0,069066	0,020393	0,020182	0,00168	0
2	510	0,00	0,309825145	0,101485	0,08994	0,112198	0,001886	0,000248
3	0	9,50E-05	0	0,135094	0,425422	0,027198	0,00369	0,004704
3	30	0,7122	0,07095768	0,082122	0,057507	0,032065	0,002205	0
3	150	0,4981	0,077994151	0,059505	0,031921	0,019431	0,00224	0
3	270	0,2495	0,034675559	2,93066	0,024544	0,008514	0,003631	0
3	390	2,80E-02	0,215029228	0,050615	0,037589	0,033459	0,001005	0
3	510	5,30E-03	0,190471089	0,094755	0,046449	0,905796	0	0
							0	
4	0	3,00E-03	0,539414117	0,065119	0,136843	0,019669	0,001529	0,000196
4	30	0,5072	0,283035329	0,064497	0,07914	0,010513	0,002079	0
4	150	0,2827	0,063358614	0,082381	0,050987	0,015227	0,002598	0
4	270	0,0617	0,414175647	0,206458	0,104261	0,22549	0,004176	0
4	390	5,10E-03	0,148941556	0,087222	0,053174	0,057861	0,001953	0
4	510	1,20E-03	0,085073249	0,128129	0,038813	0,067633	0,005061	0,000793
5	0	9,00E-05	0,012709484	0,02047	0,009028	0,000744	0,000956	0,005478
5	30	0,5672	0,069300204	0,0574	0,042843	0,002105	0,001936	0,011337
5	150	0,1752	0,006731452	0,016773	0,00507	0	0,001014	0,003235
5	270	9,70E-03	0,013995796	0,019513	0,007421	0	0,00097	0,004497
5	390	1,60E-04	0,013755758	0,022465	0,00664	0,000709	0,00114	0,002609
5	510	0	0,011617667	0,019165	0,006312	0	0,000976	0,002627
6	0	0	0,015074937	0,022194	0,010223	0,000762	0,00078	0,005525
6	30	0,8574	0,017040472	0,021155	0,009753	0,000605	0,001067	0,005308
6	150	0,5784	0,225521397	0,029455	0,059384	0,001888	0,000714	0,055261

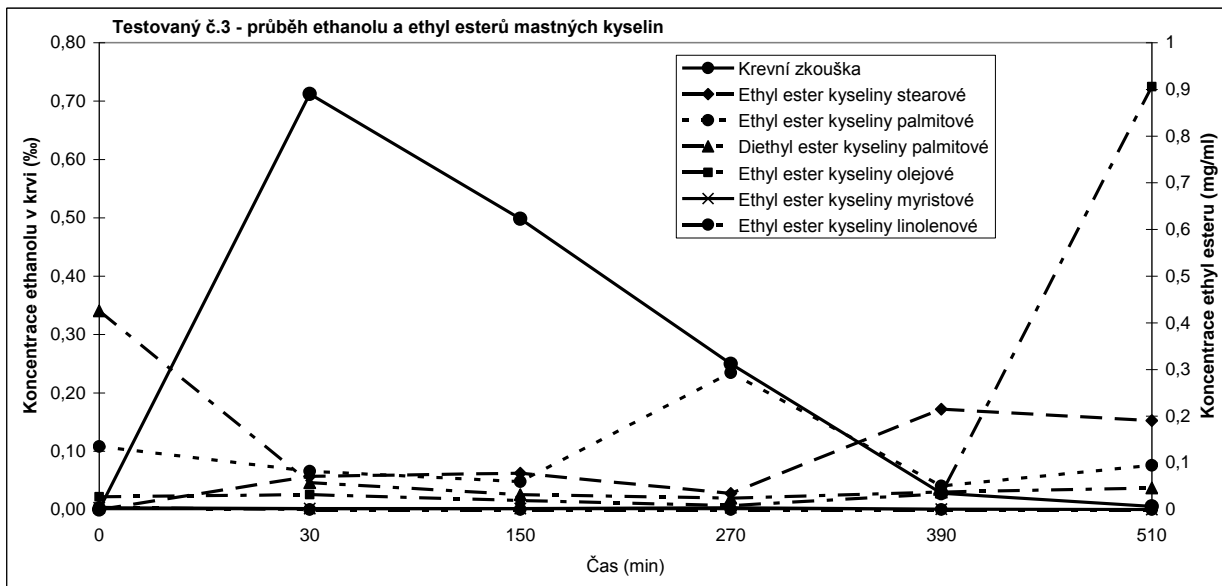
6	270	0,2054	0,023857146	0,022974	0,010687	0,000698	0,000895	0,005904
6	390	2,50E-02	0,150872945	0,0648	0,046112	0	0,003915	0,009378
6	510	1,30E-03	0,009238841	0,021427	0,005231	0,006555	0,00099	0,004285
7	0	1,00E-02	0,048720818	0,026837	0,027412	0,00102	0,000822	0,002864
7	30	0,3543	0	0,03989	0	0	0,001321	0,007542
7	150	0,3627	0,010209415	0,00056	0,032527	0,001138	0,016571	0,030237
7	270	3,78E-02	0,021573089	0,041115	0,015076	0	0,002105	0,007774
7	390	2,70E-03	0,196331857	0	0,041347	0,002219	0,002137	0,004319
7	510	7,70E-04	0,024008494	0,018161	0,009696	0,000455	0,001262	0,002319
9	0	5,40E-04	0,016647565	0,039635	0,016453	0,000472	0,002264	0,005797
9	30	0,7381	0,453564835	0,025803	0,101047	0,002643	0,000803	0,003161
9	150	0,4571	0,016934751	0,039872	0,012654	0,001258	0,001494	0,006475
9	270	0,1188	0,167481839	0,062975	0,0807	0,00214	0,001709	0,006443
9	390	3,80E-02	0,084832375	0,036285	0,025551	0,001859	0,004497	0,00347
9	510	7,90E-03	0,029770405	0,018766	0,010524	0,000588	0,001001	0,001523
10	0	3,40E-03	0,093598334	0,072008	0,035428	0	0,004226	0,013087
10	30	0,7097	0,04050748	0,082279	0,00247	0	0,006463	0,016378
10	150	0,4039	0,32151992	0,074749	0,083656	0	0,004422	0,014351
10	270	0,0673	0,002394082	0,078347	0,017501	0	0,004338	0,009275
10	390	1,20E-02	0,071885781	0,085205	0,041365	0	0,004986	0,008322
10	510	3,60E-03	0,025823588	0,084259	0,023044	0	0,002783	0,011329
11	0	0	0,082478028	0,092829	0,041033	0	0,00633	0,015351
11	30	0,6576	0,033451844	0,073559	0,021464	0	0,007926	0,008991
11	150	0,4087	0,127823768	0,085451	0,048464	0,001828	0,006611	0,011047
11	270	0,0984	0,019051512	0,06991	0,019953	0,002471	0,00286	0,021867
11	390	6,20E-03	0,039801299	0,07161	0,024592	0,002231	0,004049	0,021545
11	510	1,30E-03	0,110572785	0,084675	0,048875	0,003704	0,004406	0

**Grafické zpracování**

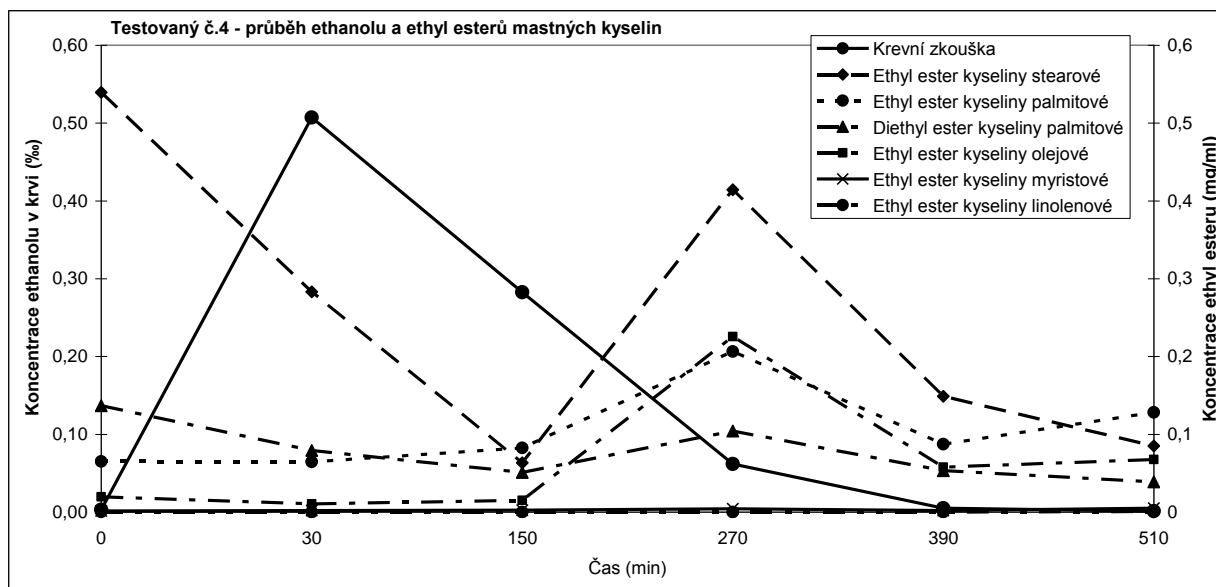
Graf č. 1



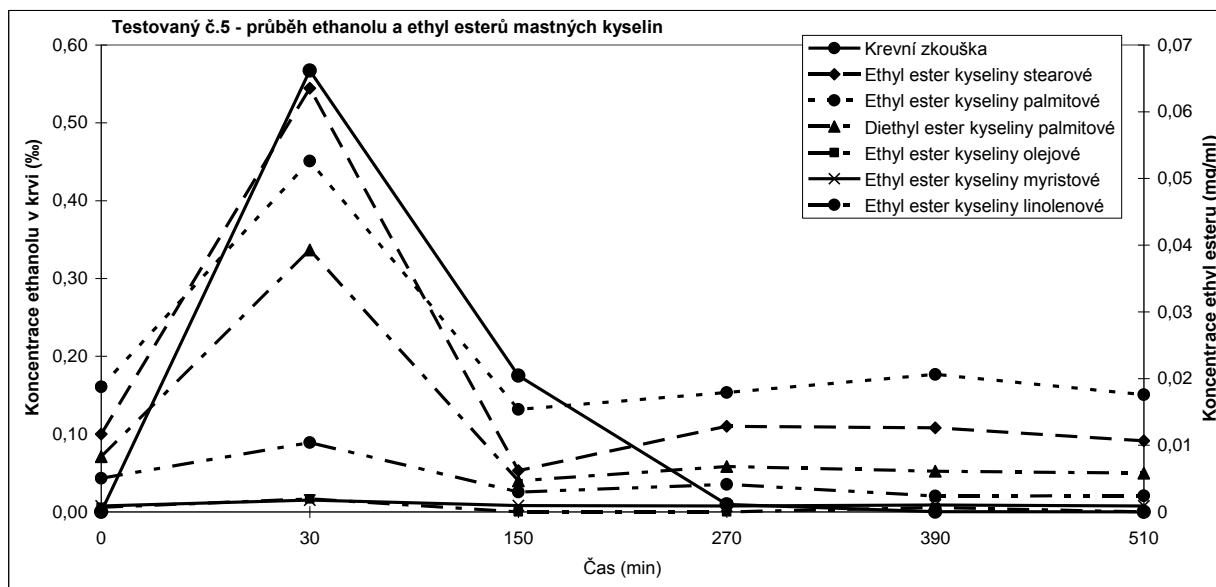
Graf č.2



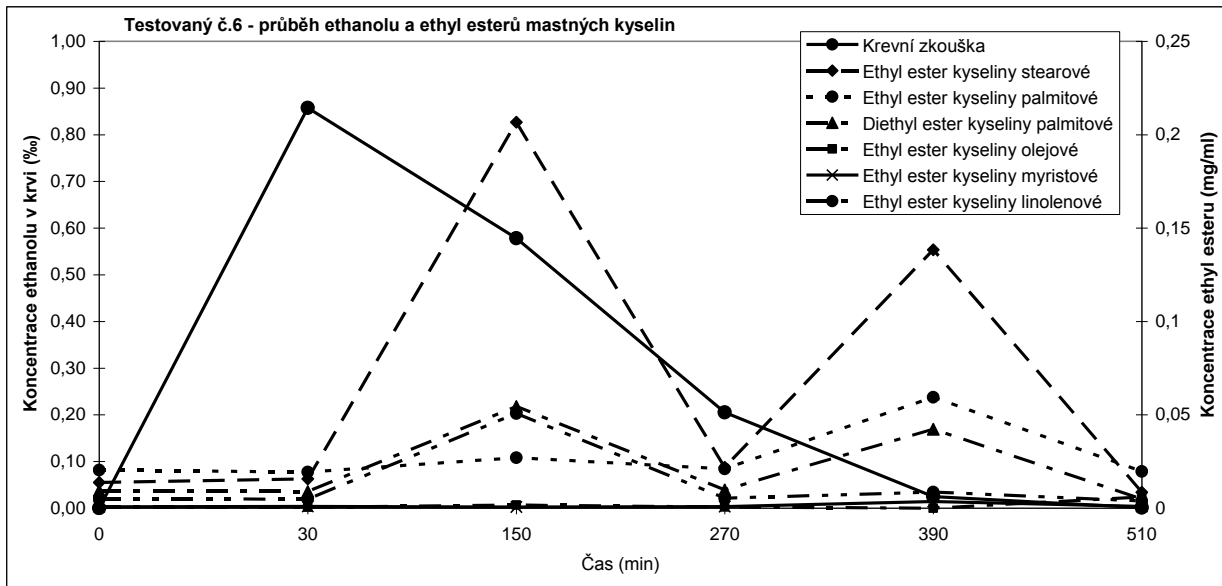
Graf č.3



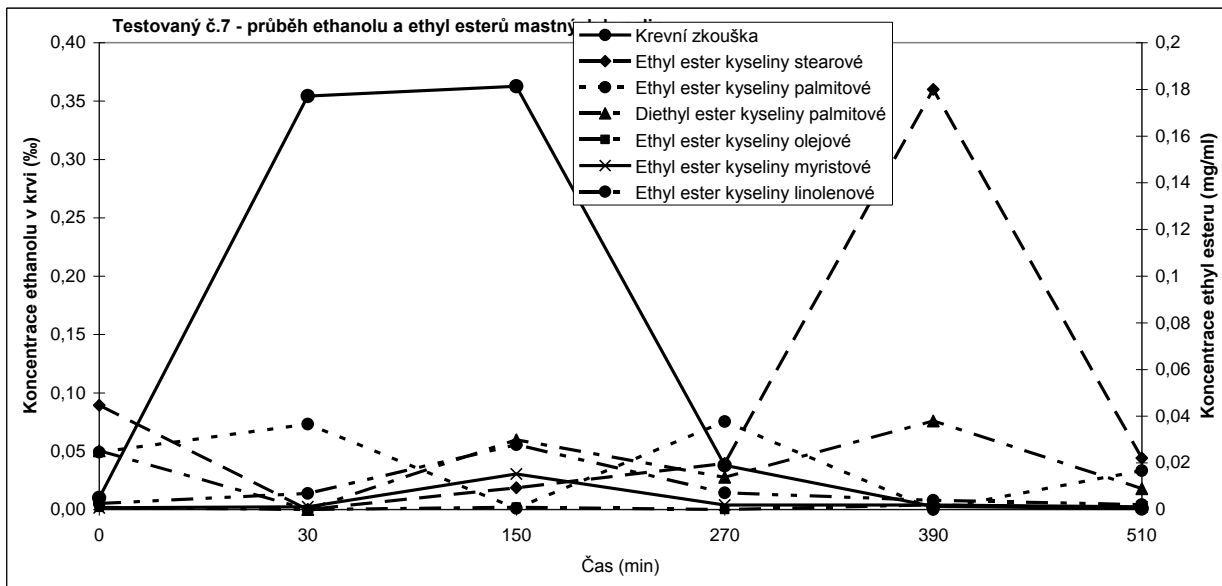
Graf č.4



Graf č.5

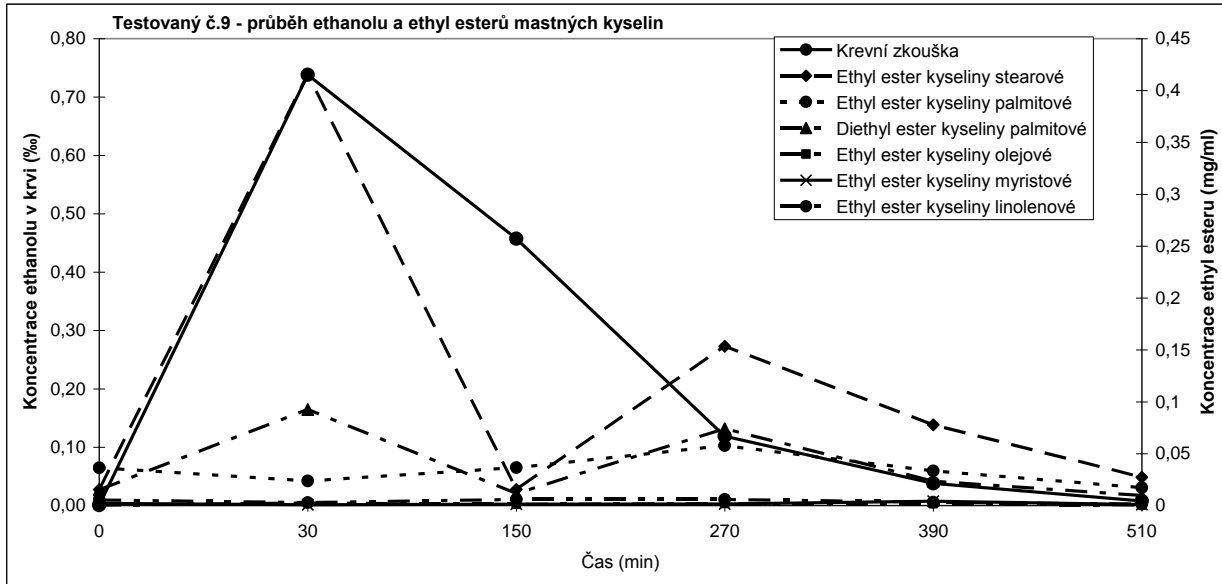


Graf č.6

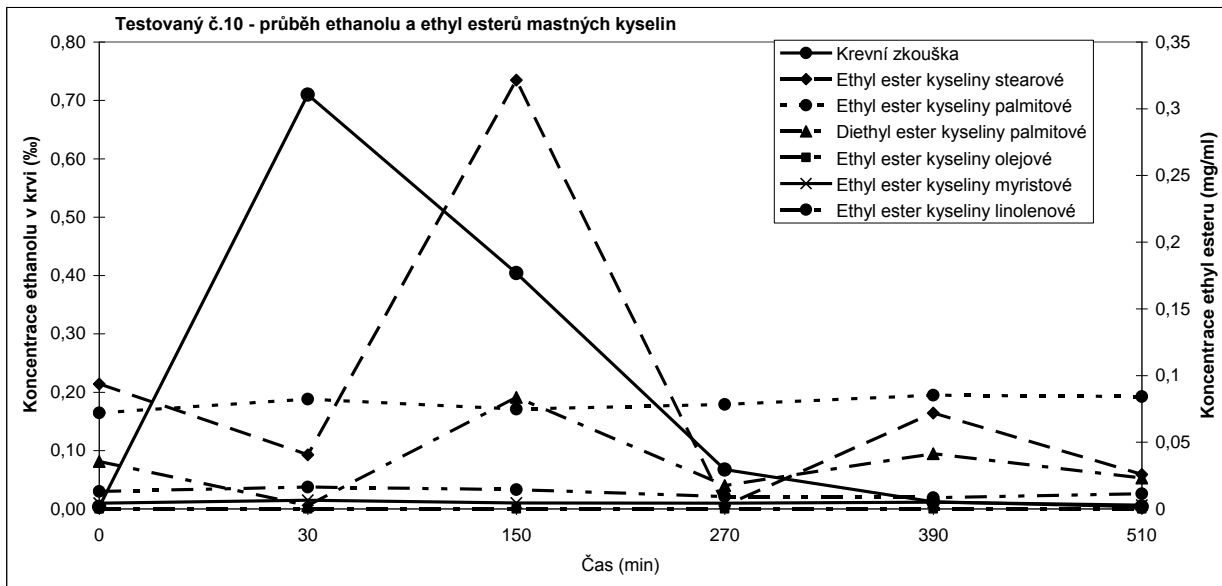




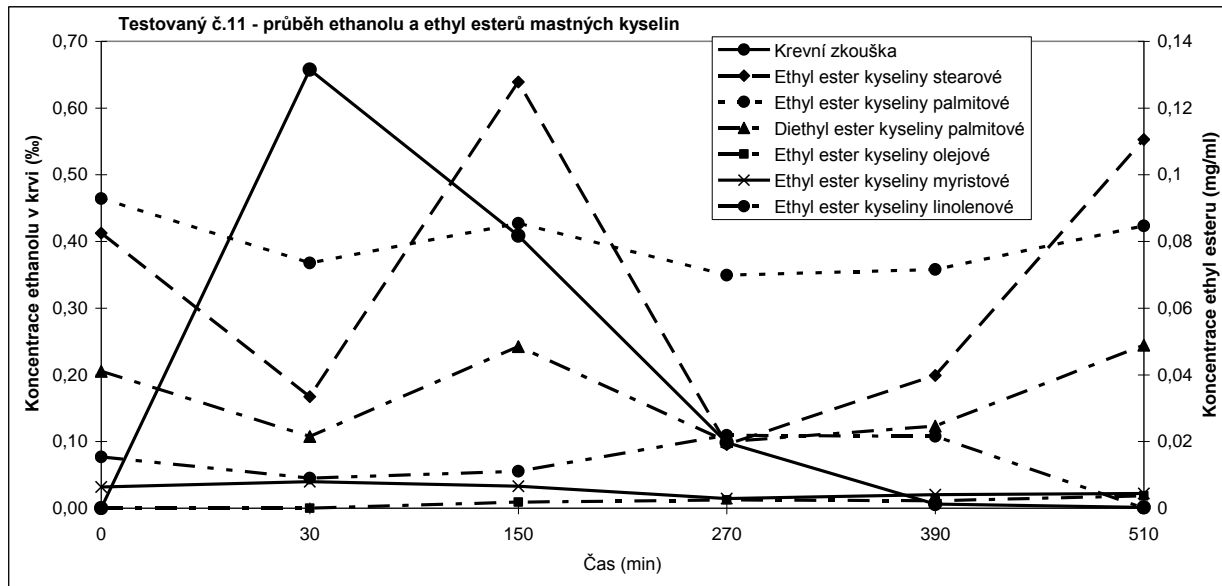
Graf č.7



Graf č.8



Graf č.9



Statistické zpracování

Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno dvouvýběrovým t-testem.

### T-testy pijaní versus nepijaní

Tabulka č.22

1. estery v čase 0						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
2	0	0,295195	0,000289		0,098513	1,12851E-06
3	0	0	0,077397		0,135094	0,001261577
4	0	0,539414	0,068231		0,065119	0,001187242
5	0	0,01165	0,001019		0,018764	0,000644248
6	0	0,013819	0,000886		0,020345	0,000566519
7	0	0,044661	1,17E-06		0,0246	0,000382046
9	0	0,01526	0,000802		0,036332	6,10595E-05
10	0	0,093598	0,002502		0,072008	0,000776249
11	0	0,082478	0,001513		0,092829	0,002369987

Tabulka č.23

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,12435	0,010925	0,00425	0,000164
0,425422	0,038632	0,027198	0,000103
0,136843	0,008469	0,019669	6,92E-06
0,008275	0,000199	0,000682	5,02E-08
0,009371	0,000169	0,000698	5,76E-08
0,025128	7,52E-06	0,000935	2,27E-07
0,015082	5,33E-05	0,000433	6,21E-10
0,035428	0,00017	0	2,1E-07
0,041033	0,000348	0	2,1E-07

Tabulka č.24

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,003917	7,6E-07	0,022154	0,000172552
0,00369	4,16E-07	0,004704	1,86095E-05
0,001529	2,3E-06	0,000196	7,78279E-05
0,000877	2,62E-06	0,005021	7,41273E-06
0,000715	3,17E-06	0,005065	7,17831E-06
0,000754	3,04E-06	0,002625	2,62005E-05
0,002076	1,77E-07	0,005314	5,90689E-06
0,004226	2,99E-06	0,013087	2,85523E-05
0,00633	1,47E-05	0,015351	5,78738E-05

Tabulka č.25

	<b>Abstinenti e.e.k.stearové</b>	<b>Pijani</b>				<b>Abstinenti e.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,278203	0,0435 78			<b>Průměr</b>	0,099575182	0,0441 46
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6			<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	0,021806				<b>Rozptyl</b>	0,001035722	
<b>Suma rozdílů</b>	0,145917	0,0067 23			<b>Suma rozdílů</b>	0,002449947	0,0048
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,147668				<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,032182638	
<b>t</b>	2,247008				<b>t</b>	2,435724432	
<b>T (5%)</b>	1,987608				<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527				<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>					<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>					<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>					<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.26

	<b>Abstinenti d.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.olejové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,228872	0,02238 6	<b>Průměr</b>	0,017039	0,00045 8
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	0,008425		<b>Rozptyl</b>	3,92E-05	
<b>Suma rozdílů</b>	0,058026	0,00094 7	<b>Suma rozdílů</b>	0,000274	7,55E- 07
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,091786		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,006261	
<b>t</b>	3,181458		<b>t</b>	3,745008	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.27

	<b>Abstinenti e.e.k.myristové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.linolenové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,003045	0,00249 6	<b>Průměr</b>	0,009018054	0,00774 4
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	4,31E-06		<b>Rozptyl</b>	5,74448E-05	
<b>Suma rozdílů</b>	3,48E-06	2,67E- 05	<b>Suma rozdílů</b>	0,000268989	0,00013 3
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,002076		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,007579236	
<b>t</b>	0,373963		<b>t</b>	0,237739419	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.28

2.estery - průměrná hodnota						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
2	Průměr	0,246012	0,00212 1		0,079743	0,000474373
3	Průměr	0,098188	0,01035 7		0,119193	0,000312205
4	Průměr	0,255666	0,00310 4		0,105634	1,68986E-05
5	Průměr	0,019572	0,00241		0,023801	0,000409426
6	Průměr	0,067468	1,44E- 06		0,027806	0,000263374
7	Průměr	0,045962	0,00051 6		0,019336	0,000610042
9	Průměr	0,117522	0,00238 7		0,034121	9,82942E-05
10	Průměr	0,092622	0,00057 4		0,079474	0,001255946
11	Průměr	0,068863	3,81E- 08		0,079672	0,001270005



Tabulka č.29

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,075261	0,000104	0,042747	0,002555
0,103905	0,00034	0,171077	0,00605
0,077203	6,81E-05	0,066066	0,000742
0,011812	0,000213	0,000544	2,02E-07
0,021601	2,3E-05	0,001605	3,74E-07
0,019259	5,09E-05	0,000738	6,53E-08
0,037725	0,000128	0,001369	1,41E-07
0,033911	5,65E-05	0	9,87E-07
0,034064	5,88E-05	0,001706	5,07E-07

Tabulka č.30

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,002053	9,45E-08	0,003734	4,72132E-06
0,002129	5,37E-08	0,000784	6,03473E-07
0,002899	2,91E-07	0,000165	1,94889E-06
0,001068	3,57E-06	0,00455	2,19479E-05
0,001277	2,82E-06	0,013087	1,48388E-05
0,0037	5,51E-07	0,008411	6,78996E-07
0,001798	1,34E-06	0,004105	2,63204E-05
0,004536	2,49E-06	0,012124	8,34397E-06
0,005364	5,79E-06	0,013134	1,51983E-05

Tabulka č.31

	<b>Abstinenti e.e.k.stearové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,199955	0,06866 8	<b>Průměr</b>	0,101523494	0,04403 5
<b>Počet typu poplatku</b>	3	<b>6</b>	<b>Počet typu poplatku</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>Rozptyl</b>	0,003067		<b>Rozptyl</b>	0,000672938	
<b>Suma rozdílů</b>	0,015582	0,00588 8	<b>Suma rozdílů</b>	0,000803477	0,00390 7
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,055381		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,025941042	
<b>t</b>	3,352565		<b>t</b>	3,134064204	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.32

	<b>Abstinenti d.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.olejové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,085457	0,02639 5	<b>Průměr</b>	0,093297	0,00099 4
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	0,000149		<b>Rozptyl</b>	0,001336	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000512	0,00053	<b>Suma rozdílů</b>	0,009347	2,28E- 06
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,012205		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,036545	
<b>t</b>	6,843752		<b>t</b>	3,571908	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.32

	<b>Abstinenti e.e.k.myristové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.linolenové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	0,00236	0,00295 7	<b>Průměr</b>	0,001560865	0,00923 5
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	2,43E-06		<b>Rozptyl</b>	1,35146E-05	
<b>Suma rozdílů</b>	4,39E-07	1,66E- 05	<b>Suma rozdílů</b>	7,27368E-06	8,73E- 05
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,001559		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,003676217	
<b>t</b>	0,541502		<b>t</b>	2,952190753	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.33

3.estery - rozdíl ve 150 a 0 minutě						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
2	Rozdíl	0,119127	0,04498 9		0,012244	0,000762017
3	Rozdíl	0,077994	0,02923 1		-0,07559	0,003627406
4	Rozdíl	-0,47606	0,14674 8		0,017263	0,001064279
5	Rozdíl	-0,00548	0,00584		-0,00339	6,6908E-07
6	Rozdíl	0,192909	0,01487 6		0,006656	0,000117989
7	Rozdíl	-0,0353	0,01128 8		-0,02409	0,000395223
9	Rozdíl	0,000263	0,00499 6		0,000217	1,95666E-05
10	Rozdíl	0,227922	0,02464 2		0,002741	4,82733E-05
11	Rozdíl	0,045346	0,00065 5		-0,00738	1,00573E-05

Tabulka č.34

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
-0,01588	0,022261	0,084612	0,003658
-0,3935	0,052177	-0,00777	0,001018
-0,08586	0,006276	-0,00444	0,000817
-0,00363	0,0004	-0,00068	1,4E-06
0,045064	0,000823	0,001033	2,82E-07
0,004689	0,000137	0,000108	1,54E-07
-0,00348	0,000395	0,00072	4,78E-08
0,048228	0,001014	0	2,51E-07
0,007431	8,02E-05	0,001828	1,76E-06

Tabulka č.35

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
-0,00198	1,42E-06	-0,02215	0,000172552
-0,00145	4,41E-07	-0,0047	1,86095E-05
0,00107	3,44E-06	-0,0002	7,78279E-05
5,24E-05	5,35E-06	-0,00206	0,000171371
-6,1E-05	5,89E-06	0,045591	0,001194152
0,014436	0,000146	0,025092	0,000197607
-0,00071	9,44E-06	0,000622	0,000108427
0,000196	4,71E-06	0,001263	9,5475E-05
0,000281	4,35E-06	-0,0043	0,000235283

Tabulka č.36

	<b>Abstinenti e.e.k.stearové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	-0,09298	0,07094 3	<b>Průměr</b>	-0,015360647	- 0,00421
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	0,040467		<b>Rozptyl</b>	0,00086364	
<b>Suma rozdílů</b>	0,220969	0,06229 7	<b>Suma rozdílů</b>	0,005453702	0,00059 2
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,201163		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,029387752	
<b>t</b>	1,152395		<b>t</b>	<b>0,536755499</b>	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	<b>1,987608241</b>	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	<b>2,633527223</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	



Tabulka č.37

	<b>Abstinenti d.e.k.palmitové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.olejové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	-0,16508	0,01638 4	<b>Průměr</b>	0,024134	0,00050 1
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	0,011938		<b>Rozptyl</b>	0,000785	
<b>Suma rozdílů</b>	0,080714	0,00284 9	<b>Suma rozdílů</b>	0,005492	3,9E-06
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,109259		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,02802	
<b>t</b>	2,348781		<b>t</b>	1,192794	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.38

	<b>Abstinenti e.e.k.myristové</b>	<b>Pijani</b>		<b>Abstinenti e.e.k.linolenové</b>	<b>Pijani</b>
<b>Průměr</b>	-0,00079	0,00236 6	<b>Průměr</b>	-0,009018054	0,01103 5
<b>Počet typu poplatku</b>	3	6	<b>Počet typu poplatku</b>	3	6
<b>Rozptyl</b>	2,58E-05		<b>Rozptyl</b>	0,000324472	
<b>Suma rozdílů</b>	5,3E-06	0,00017 5	<b>Suma rozdílů</b>	0,000268989	0,00200 2
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,005081		<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,018013107	
<b>t</b>	0,877134		<b>t</b>	1,574334916	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

## Výsledky ženy versus muži

Tabulka č.39

1. estery v čase 0						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
5	0	0,01165	0,000272		0,018764	8,51484E-06
7	0	0,044661	0,000272		0,0246	8,51484E-06
2	0	0,295195	0,021508		0,098513	0,000585299
3	0	0	0,022063		0,135094	0,003693473
4	0	0,539414	0,152784		0,065119	8,46605E-05
6	0	0,013819	0,018149		0,020345	0,002913313
9	0	0,01526	0,017763		0,036332	0,001443051
10	0	0,093598	0,003018		0,072008	5,34632E-06
11	0	0,082478	0,004364		0,092829	0,000342585

Tabulka č.40

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,008275	7,1E-05	0,000682	1,59841E-08
0,025128	7,1E-05	0,000935	1,59841E-08
0,12435	0,00014	0,00425	1,03312E-05
0,425422	0,097917	0,027198	0,000389423
0,136843	0,000592	0,019669	0,000148973
0,009371	0,010636	0,000698	4,57785E-05
0,015082	0,009491	0,000433	4,94346E-05
0,035428	0,005941	0	5,57118E-05
0,041033	0,005108	0	5,57118E-05

Tabulka č.41

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,000877	3,79424E-09	0,005021	1,43522E-06
0,000754	3,79424E-09	0,002625	1,43522E-06
0,003917	4,97459E-07	0,022154	0,000162404
0,00369	2,28688E-07	0,004704	2,21463E-05
0,001529	2,83315E-06	0,000196	8,49001E-05
0,000715	6,23317E-06	0,005065	1,88831E-05
0,002076	1,29114E-06	0,005314	1,67825E-05
0,004226	1,028E-06	0,013087	1,35218E-05
0,00633	9,72621E-06	0,015351	3,52984E-05

Tabulka č.42

	<b>ženy e.e.k.stearové</b>	<b>muži</b>				<b>ženy e.e.k.palmitové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	0,028156	0,1485 38			<b>Průměr</b>	0,021682453	0,0743 2
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7			<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,034314				<b>Rozptyl</b>	0,001297822	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000545	0,2396 51			<b>Suma rozdílů</b>	1,70297E-05	0,0090 68
<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,185239				<b>Směrodat ná odchylka</b>	0,036025303	
<b>t</b>	0,810535				<b>t</b>	1,822342943	
<b>T (5%)</b>	1,987608				<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527				<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>					<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>					<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>					<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.43

	ženy d.e.k.palmitové	muži		ženy e.e.k.olejové	muži
<b>Průměr</b>	0,016701	0,11250 4	<b>Průměr</b>	0,00080839	0,00746 4
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,018567		<b>Rozptyl</b>	0,000107914	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000142	0,12982 7	<b>Suma rozdílů</b>	3,19683E-08	0,00075 5
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,136261		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,010388148	
<b>t</b>	0,8769		<b>t</b>	0,799088188	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.44

	<b>ženy</b> <b>e.e.k.myristové</b>	<b>muži</b>		<b>ženy</b> <b>e.e.k.linolenové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	0,000815157	0,0032117 93	<b>Průměr</b>	0,003823293	0,00941
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	3,12077E-06		<b>Rozptyl</b>	5,09724E-05	
<b>Suma rozdílů</b>	7,58848E-09	2,18378E- 05	<b>Suma rozdílů</b>	2,87043E-06	0,00035 4
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,001766571		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,007139495	
<b>t</b>	1,692052372		<b>t</b>	0,975987122	
<b>T (5%)</b>	1,987608241		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527223		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.45

2.estery - průměrná hodnota						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
5	Průměr	0,019572	0,00017 4		0,023801	4,98349E-06
7	Průměr	0,045962	0,00017 4		0,019336	4,98349E-06
2	Průměr	0,246012	0,01228 1		0,079743	2,16352E-05
3	Průměr	0,098188	0,00136 9		0,119193	0,00194488
4	Průměr	0,255666	0,01451 4		0,105634	0,00093283
6	Průměr	0,067468	0,00458 7		0,027806	0,002235941
9	Průměr	0,117522	0,00031 2		0,034121	0,001678646
10	Průměr	0,092622	0,00181 2		0,079474	1,92053E-05
11	Průměr	0,068863	0,00439 9		0,079672	2,09782E-05



Tabulka č.46

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,011812	1,39E-05	0,000544	9,45615E-09
0,019259	1,39E-05	0,000738	9,45615E-09
0,075261	0,000418	0,042747	4,38621E-06
0,103905	0,00241	0,171077	0,017010524
0,077203	0,000501	0,066066	0,000645806
0,021601	0,001103	0,001605	0,001524713
0,037725	0,000292	0,001369	0,001543223
0,033911	0,000437	0	0,001652652
0,034064	0,00043	0,001706	0,001516882

Tabulka č.47

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
0,001068	1,73132E-06	0,00455	3,72652E-06
0,0037	1,73132E-06	0,008411	3,72652E-06
0,002053	6,59631E-07	0,003734	8,99611E-06
0,002129	5,42393E-07	0,000784	3,53912E-05
0,002899	1,16747E-09	0,000165	4,31417E-05
0,001277	2,52139E-06	0,013087	4,03741E-05
0,001798	1,1389E-06	0,004105	6,90848E-06
0,004536	2,79238E-06	0,012124	2,90579E-05
0,005364	6,24261E-06	0,013134	4,09656E-05

Tabulka č.48

	<b>ženy e.e.k.stearové</b>	<b>muži</b>		<b>ženy e.e.k.palmitové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	0,032767	0,13519 1	<b>Průměr</b>	0,021568428	0,07509 2
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,00566		<b>Rozptyl</b>	0,000980583	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000348	0,03927 5	<b>Suma rozdílů</b>	9,96698E-06	0,00685 4
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,075236		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,031314266	
<b>t</b>	1,697927		<b>t</b>	2,131796562	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.49

	ženy d.e.k.palmitové	muži		ženy e.e.k.olejové	muži
<b>Průměr</b>	0,015535	0,05481	<b>Průměr</b>	0,000640862	0,04065 3
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,000803		<b>Rozptyl</b>	0,003414029	
<b>Suma rozdílů</b>	2,77E-05	0,00559 2	<b>Suma rozdílů</b>	1,89123E-08	0,02389 8
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,028334		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,058429695	
<b>t</b>	1,728814		<b>t</b>	0,854080773	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.50

	<b>ženy</b> <b>e.e.k.myristové</b>	<b>muži</b>		<b>ženy</b> <b>e.e.k.linolenové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	0,00238402	0,0028651 66	<b>Průměr</b>	0,006480587	0,00673 3
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	2,48016E-06		<b>Rozptyl</b>	3,03269E-05	
<b>Suma rozdílů</b>	3,46263E-06	1,38985E-05	<b>Suma rozdílů</b>	7,45305E-06	0,00020 5
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,001574851		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,005506985	
<b>t</b>	0,38104835		<b>t</b>	0,057183814	
<b>T (5%)</b>	1,987608241		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527223		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.51

3.estery - rozdíl ve 150 a 0 minutě						
testovaný		Ethyl est.kyseliny stearové	Rozdíl od průměru na druhou		Ethyl est.kyseliny palmitové	Rozdíl od průměru na druhou
5	Rozdíl 1	-0,00548	0,00022 2		-0,00339	0,000107104
7	Rozdíl 1	-0,0353	0,00022 2		-0,02409	0,000107104
2	Rozdíl 1	0,119127	0,00852 7		0,012244	0,000342539
3	Rozdíl 1	0,077994	0,00262 2		-0,07559	0,004805928
4	Rozdíl 1	-0,47606	0,25285		0,017263	0,000553493
6	Rozdíl 1	0,192909	0,02759 7		0,006656	0,000166909
9	Rozdíl 1	0,000263	0,00070 3		0,000217	4,19968E-05
10	Rozdíl 1	0,227922	0,04045 5		0,002741	8,10896E-05
11	Rozdíl 1	0,045346	0,00034 4		-0,00738	1,24155E-06

Tabulka č.52

<b>Diethyl est. kyseliny palmitové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny olejové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
-0,00363	1,73E-05	-0,00068	1,56051E-07
0,004689	1,73E-05	0,000108	1,56051E-07
-0,01588	0,001679	0,084612	0,005440207
-0,3935	0,11333	-0,00777	0,000346771
-0,08586	0,000841	-0,00444	0,000234019
0,045064	0,010388	0,001033	9,64748E-05
-0,00348	0,002849	0,00072	0,000102716
0,048228	0,011043	0	0,000117825
0,007431	0,004133	0,001828	8,14779E-05

Tabulka č.53

<b>Ethyl est.kyseliny myristové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>	<b>Ethyl est. kyseliny linolenové</b>	<b>Rozdíl od průměru na druhou</b>
5,24E-05	5,1724E-05	-0,00206	0,000184255
0,014436	5,1724E-05	0,025092	0,000184255
-0,00198	2,55197E-06	-0,02215	0,000814106
-0,00145	1,14826E-06	-0,0047	0,000122828
0,00107	2,09564E-06	-0,0002	4,32258E-05
-6,1E-05	1,00532E-07	0,045591	0,001537617
-0,00071	1,07765E-07	0,000622	3,31418E-05
0,000196	3,29524E-07	0,001263	2,6165E-05
0,000281	4,33743E-07	-0,0043	0,000114126



Tabulka č.54

	<b>ženy e.e.k.stearové</b>	<b>muži</b>		<b>ženy e.e.k.palmitové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	-0,02039	0,02678 7	<b>Průměr</b>	-0,013737843	- 0,00626
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,047649		<b>Rozptyl</b>	0,000886772	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000445	0,33309 9	<b>Suma rozdílů</b>	0,000214208	0,00599 3
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,218287		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,029778719	
<b>t</b>	0,269557		<b>t</b>	0,313034815	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.55

	ženy d.e.k.palmitové	muži		ženy e.e.k.olejové	muži
<b>Průměr</b>	0,00053	- 0,05686	<b>Průměr</b>	-0,00028693	0,01085 5
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	0,020614		<b>Rozptyl</b>	0,000917115	
<b>Suma rozdílů</b>	3,46E-05	0,14426 2	<b>Suma rozdílů</b>	3,12101E-07	0,00641 9
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,143575		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,030283902	
<b>t</b>	0,49851		<b>t</b>	0,458859624	
<b>T (5%)</b>	1,987608		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

Tabulka č.56

	<b>ženy</b> <b>e.e.k.myristové</b>	<b>muži</b>		<b>ženy</b> <b>e.e.k.linolenové</b>	<b>muži</b>
<b>Průměr</b>	0,007244376	- 0,0003779 71	<b>Průměr</b>	0,011517761	0,00637 9
<b>Počet typu poplatku</b>	2	7	<b>Počet typu poplatku</b>	2	7
<b>Rozptyl</b>	1,57451E-05		<b>Rozptyl</b>	0,000320802	
<b>Suma rozdílů</b>	0,000103448	6,76744E- 06	<b>Suma rozdílů</b>	0,000368511	0,00187 7
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,003968007		<b>Směrodatná odchylka</b>	0,017910947	
<b>t</b>	2,395846799		<b>t</b>	0,357863178	
<b>T (5%)</b>	1,987608241		<b>T (5%)</b>	1,987608241	
<b>T (1%)</b>	2,633527223		<b>T (1%)</b>	2,633527223	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 5%</b>	
	<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>			<b>průměry se liší statisticky významně na 1%</b>	
	<b>průměry se neliší</b>			<b>průměry se neliší</b>	

## 4. Diskuse

Během experimentu jsme sledovali změny plazmatických koncentrací ethyl esterů mastných kyselin u vybraných jedinců v závislosti na přijaté množství ethanolu. Byly stanoveny ethyl estery kyseliny stearové, palmitové, myristové, olejové, linoleové a diethyl ester kyseliny palmitové, které jsou uváděny u Laposaty M.[4,9] Testovanou skupinu jsme rozdělili dvakrát a to do dvou skupin. První hodnocení bylo pro skupinu pijanů a nepijanů, druhé hodnocení pro muže a ženy. Do kategorie pijanů jsme zařadili jedince, kteří ethanol požívají pravidelně. U nepijanů předpokládáme minimální či příležitostné požívání ethanolu. Na základě výsledků statistického zpracování dat metodou t-testu jsme porovnávali průměrný nárůst plazmatické hladiny esterů v čase  $T_0$ , kdy byl proveden odběr před požitím dávky ethanolu, v čase  $T_{150}$  a průměrný nárůst v čase 0-150 minut. Tyto parametry vyplynuly z grafického zpracování dat. Podle průběhu křivek jednotlivých esterů s ohledem na průběh všech zpracovaných jedinců. Optimálně by se dalo očekávat, že koncentrace ethyl esterů mastných kyselin se bude u těchto dvou skupin lišit.

Vyhodnocením analyzovaných dat vyplývá pro čas  $T_0$ , se na hladině 5% liší koncentrace ethyl esteru kyseliny stearové a palmitové. Na hladině 1% se významně liší koncentrace diethyl esteru kyseliny palmitové a ethyl ester kyseliny olejové. U ethyl esteru kyseliny myristové a linoleové se koncentrace významně neliší. Je možné tedy říci, že v tomto čase je potvrzen rozdíl mezi skupinou pijanů a nepijanů.

Pro čas  $T_{150}$  je pozorováno že, se statisticky významně liší koncentrace na hladině 5% pouze u diethyl esteru kyseliny palmitové a u ostatních se koncentrace neliší a je možné tedy říci, že není rozdíl mezi skupinou pijanů a nepijanů.

Porovnáním průměrných hodnot koncentrací esterů za celý časový interval vyplývá, že na hladině 1% se liší koncentrace u ethyl esterů kyseliny palmitové, olejové, linolenové a u diethyl esteru kyseliny palmitové. Hladina u ethyl esteru kyseliny myristové se neliší. Vyplývá tedy, že hladina esterů se v tomto časovém rozmezí zvýšila.

Předpoklad, že se skupiny chovají rozdílně byl tedy splněn v čase  $T_0$  a průměrných koncentracích. Nebyl však splněn pro  $T_{150}$ . To mohlo být způsobeno podáním pro tyto účely nízké dávky ethanolu spolu s vybráním algoritmu 0-6 hodin po požití dle literatury. [9] Námi podávaná dávka však byla v experimentálních podmínkách limitována a nebylo možné podat dávky větší. Dále by bylo jistě vhodné prodloužit sledovaný interval krevních odběrů, aby bylo patrné jestli nedochází k dalším či pozdějším vzestupům hladin ethyl esterů. Mohlo by se také sledování hladin omezit čistě jen na diethyl estery mastných kyselin a porovnat rozdíly mezi

monoestery. Pro lepší zmapování této problematiky by bylo zajímavé tuto analýzu zopakovat spolu s paralelním stanovením množství ADH u každého jedince. Experimentem byl dokázán průkaz akutního zpětného abusu alkoholu, avšak ne tak statisticky významně jako při prokazování chronického abusu ve vlasech, kde se jedná o dlouhodobé markery. [7]

Při rozdělení skupiny podle pohlaví vznikla skupina žen, nepoužitelná pro validní statistické vyhodnocení, jelikož použitelný počet odběrů krve byl pouze u dvou.

## 5. Závěr

Pro alkoholovou analýzu bylo k dispozici 13 testovaných jedinců, kteří pro zjednodušení podmínek experimentu netrpěli obezitou. Pro stanovení ethyl esterů mastných kyselin se však dalo použít pouze 9 osob, jelikož při odběrech krve došlo ke komplikacím a čtyřem osobám již nebylo možné v posledních hodinách krev odebrat. Proto vyhodnocení analýzy muži versus ženy není použitelným výsledkem. Skupina byla tedy rozdělena na pijany a nepijany pro porovnání závislosti zvýšení hladiny plazmatických koncentrací ethyl esterů mastných kyselin.

Stanovení ethyl esterů mastných kyselin bylo provedeno metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. V chromatogramu byly analyzovány ethyl estery kyseliny stearové, palmitové, myristové, linoleové, olejové a diethyl ester kyseliny palmitové. Výsledky byly vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem, kterým se potvrdila závislost mezi zvýšením hladiny ethyl esterů mastných kyselin na přijatém množství ethanolu. Tímto byl splněn cíl práce a zároveň vyplynuly další aspekty, kterým by bylo dobré se v této problematice dále věnovat.

## Seznam literatury

- [1] Lüllmann H.; Mohr K.; Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vydání, Praha, Grada, 2004.
- [2] Štefan J.; Mach J.: *Soudně-lékařská a medicínsko-právní problematika v praxi*., Praha, Grada, 2005.
- [3] Zikmund J.: Osud alkoholu v organismu. Dostupné z URL: [www.zikmund.org](http://www.zikmund.org), [cit.13.1.2009]
- [4] Bigasa A.; Laposata M.; et.al.: Comparison of serum fatty acid ethyl esters and urinary 5-hydroxytryptophol as biochemical markers of recent ethanol consumption. *Alcohol and Alcoholism* **Vol.40**, 214-218, (2005)
- [5] Zikmund J.: Stanovení alkoholu v organismu. Dostupné z URL: [www.zikmund.org](http://www.zikmund.org) [cit.13.1.2009]
- [6] Balíková M.: *Forezní a klinická toxikologie*, Praha, Galén, 2004.
- [7] Pragst F.; Auwaerter V.; et al.: Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by head space solid-phase mikroextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Science International* **121**, 76-88, (2001).
- [8] Beckemeier M. E.; Bora P. S.: Fatty acid ethyl esters: Potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2487-2494, (1998).
- [9] Laposata M.: Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. *Clinical Chemistry* **43:8(B)**, 1527-1534, (1997).

- [10] Salem R. O.; Cluette-Brown J. E.; et al.: Fatty acid ethyl esters, nonoxidative ethanol metabolites, synthesis, uptake, and hydrolysis by human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* **1738**, 99-104, (2005).
- [11] Bearer C. F.; MD, PhD; Santiago L. M., MPH; et al.: Fatty acid ethyl esters: Quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. *The Journal of Pediatrics*, 824-830, (June 2005).
- [12] Refaai M. A.; Nguyen P. N.; et al.: Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake. *Clinical Chemistry* **48**:1, 77-83, (2002).
- [13] Bernhardt T. G.; Cannistraro P. A.; et al.: Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **675**, 189-196, (1996).
- [14] Haluzny M. A.; Duncan L. A.; et al.: Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, **Vol. 26**, 135-140, (1985).
- [15] Moore Ch.; Jones J.; et al.: Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimen. *Clinical Chemistry* **49**:1, 133-136, (2003).
- [16] Auwärter V.; Sporkert F.; et al.: Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental Hair as Markers of Alcoholics, Social Drinkers, and Teetotalers. *Clinical Chemistry* **47**:12, 2114-2123, (2001).
- [17] Saghir M.; Blodget E.; Laposata M.: The hydrolysis of fatty acid ethyl esters in low-density lipoproteins by red blood cells, white blood cells and platelets. *Alcohol*, **Vol. 19, No. 2**, 163-168, (1999).
- [18] Laposata E. A.; Scherrer D. E.; et al.: Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, **No 10**, 4653-4657, (1986).
- [19] Wurst F. M.; Elso E.; et al.: Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the audit - pilot study in a

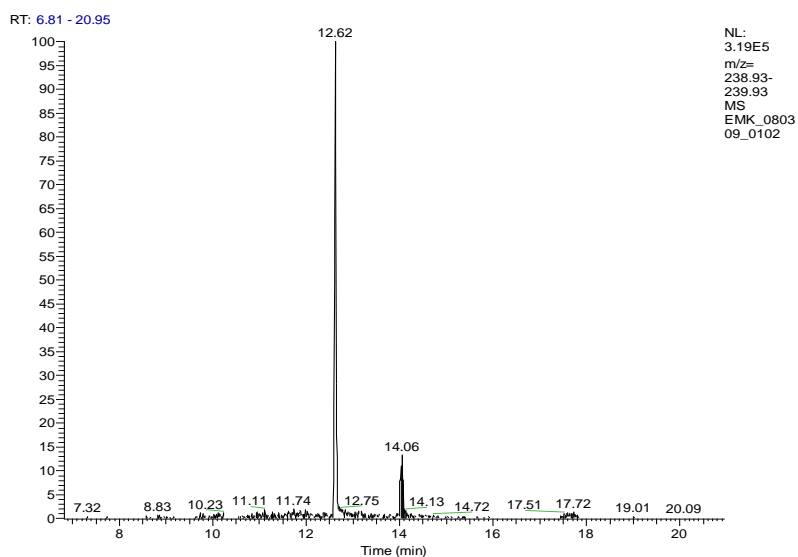


population – based sample of Swedish women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1.e1-1.e4, (2008).

## Příloha

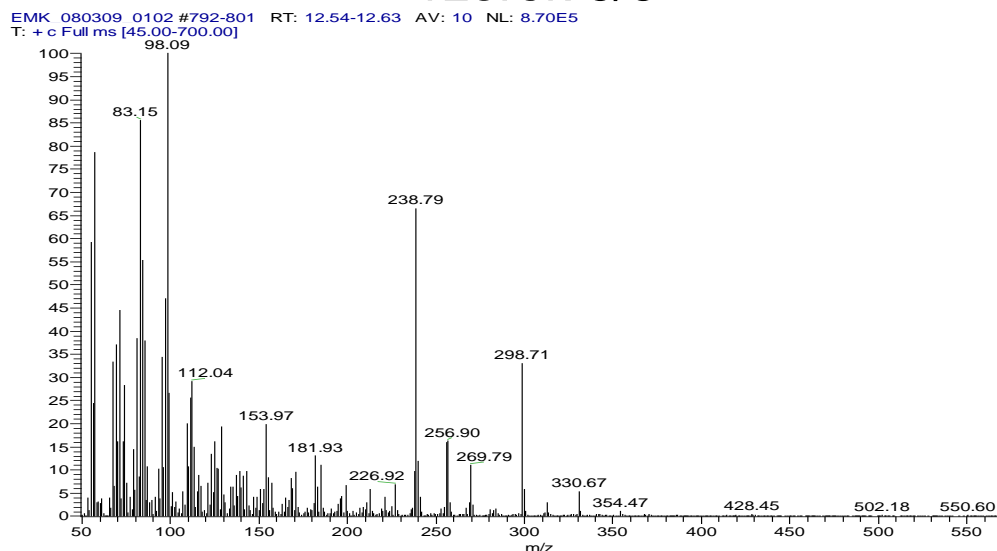
Příklady chromatogramů a hmotnostních spekter.

### CHROMATOGRAM Diethyl ester kyseliny palmitové vzorek 6/3

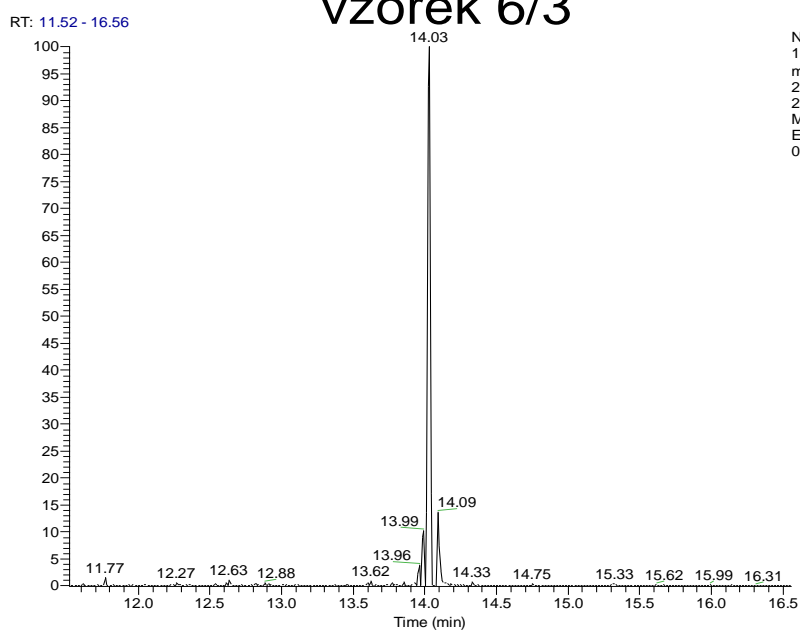


# MS

## Diethyl ester kyseliny palmitové vzorek 6/3



## CHROMATOGRAM Ester kyseliny stearové vzorek 6/3

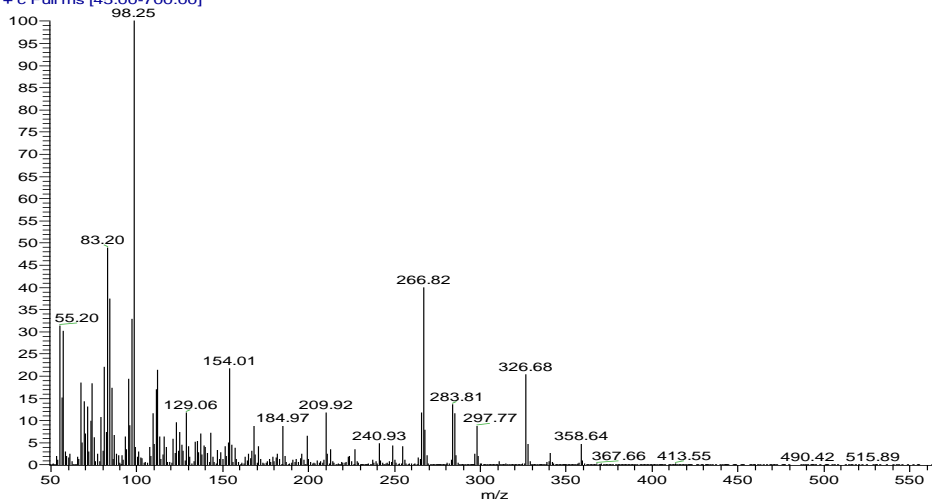


NL:  
1.92E6  
m/z=  
266.83-  
267.83  
MS  
EMK\_0803  
09\_0102

# MS

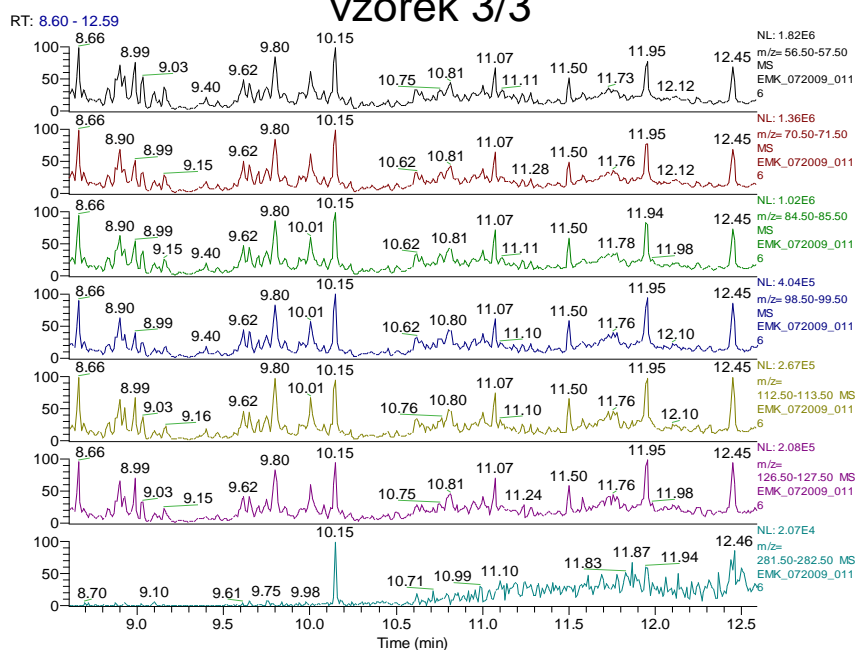
## Ester kyseliny stearové vzorek 6/3

EMK\_080309\_0102 #940-943 RT: 14.01-14.04 AV: 4 NL: 3.78E6  
T: + c Full ms [45.00-700.00]



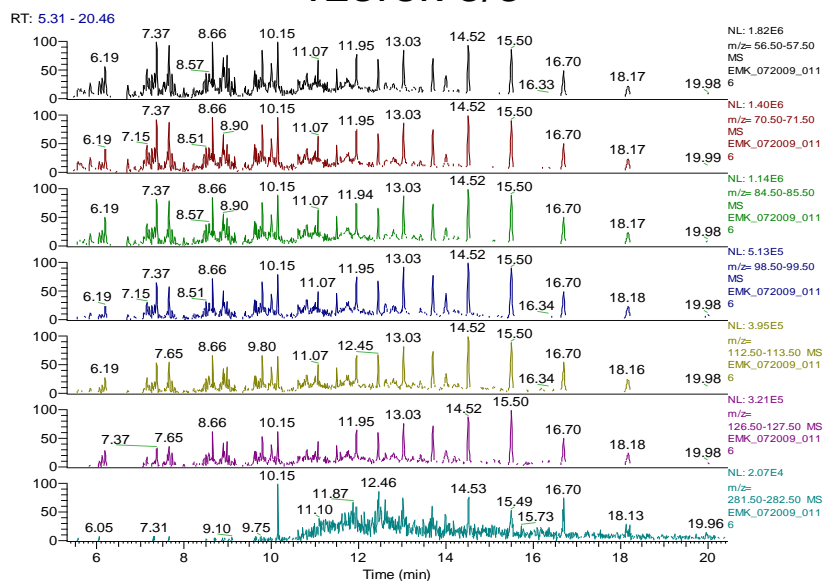
# MONITORING FAEE

## Vnitřní standard (eikosan), $R_t=10,15$ min vzorek 3/3



# MONITORING FAEF

## vzorek 3/3



## MS

### Eikosan

### vnitřní standard

EMK\_072009\_0116 #556 RT: 10.15 AV: 1 NL: 1.80E6  
T: + c Full ms [45.00-700.00]

