

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných aminokyselin a mastných kyselin v mateřském mléce

Bc. Petra Fukasová

Diplomová práce

2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Fukasová**
Osobní číslo: **C17436**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení vybraných aminokyselin a mastných kyselin
v mateřském mléce**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Tvorba a složení mateřského mléka.
Suchá kapka mléka.
Možnosti stanovení aminokyselin a mastných kyselin v biologických vzorcích.

Experimentální část:

Zpracování vzorků mateřského mléka a suché kapky mateřského mléka pro stanovení vybraných mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí a aminokyselin kapalinovou chromatografií s fluorescenční, případně hmotnostní detekcí.
Určení analytických parametrů metody.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25. 6. 2020

Bc. Petra Fukasová

Ráda bych na tomto místě poděkovala mému vedoucímu diplomové práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za věnovaný čas mé práci, cenné rady, odborné vedení a za pomoc při zpracování výsledků. Dále bych ráda poděkovala konzultantům Mgr. Radimu Janečkovi a Mgr. Michalu Kopčilovi za čas, trpělivost a rady, které mi poskytli během zpracovávání této práce.

Dále bych velice ráda poděkovala maminkám, které byly ochotné mi poskytnout vzorky a Nemocnici Pardubického kraje za ochotu při shánění vzorků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a svým blízkým, kteří mě po dobu studia, podporovali.

ANOTACE

Jelikož v posledních letech je snaha o minimalizaci nákladů na transport, manipulaci, ale hlavně analýzu vzorků, byla vyvinuta technika splňující tyto požadavky, kterou je technika suché kapky. Ta je známá především z novorozeneckého screeningu, nicméně ji lze aplikovat i na vzorky mateřského mléka. Tato práce se zabývá stanovením hladin mastných kyselin a aminokyselin ve vzorcích mateřského mléka a kolostra získaných technikou suché kapky. Hladiny byly porovnány s hladinami publikovanými v odborné literatuře. Mastné kyseliny byly převedeny na odpovídající methylestery a analyzovány metodou plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí. Aminokyseliny byly derivatizovány s naftalen-2,4-dikarboxaldehydem za vzniku odpovídajících 1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů, které byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mateřské mléko, mastné kyseliny, aminokyseliny, plynová a kapalinová chromatografie, suchá kapka

TITLE

Determination of selected fatty acids and amino acids in dried milk spot

ANOTACE

Since in recent years there has been an effort to minimize the costs of transport, handling, but mainly for the analysis of samples, a technique of dried spot has been developed. It meets these requirement. This method is known mainly for neonatal screening, however, it can also be applied to breast milk samples. This work deals with the determination of levels of fatty acids and amino acids in samples of breast milk and colostrum obtained by the technique of dried spot. The levels were compared with the levels published in the literature. The fatty acids were converted to the corresponding methyl esters and analysed by gas chromatography with flame ionization detection. Amino acids were derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde to give the corresponding 1-cyano-2-substituted-benz[f]isoindole derivatives, which were analysed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.

KEYWORDS

Human milk, fatty acids, amino acids, gas and liquid chromatography, dried spot

OBSAH

ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Mateřské mléko	15
1.2 Tvorba mateřského mléka	15
1.2.1 Vývoj mléčné žlázy a její anatomické uspořádání	15
1.2.2 Laktogeneze	16
1.3 Druhy mateřského mléka	17
1.3.1 Mlezivo – kolostrum	17
1.3.2 Přejídné mléko	18
1.3.3 Zralé mateřské mléko	18
1.4 Složení mateřského mléka	18
1.4.1 Bílkoviny	18
1.4.2 Lipidy	20
1.4.3 Ostatní složky v mateřském mléce	21
1.5 Mastné kyseliny	22
1.5.1 Biosyntéza mastných kyselin v mléčné žláze	24
1.5.2 Mastné kyseliny v mateřském mléce	26
1.6 Aminokyseliny	27
1.6.1 Aminokyseliny v mateřském mléce	28
1.7 Chromatografie	28
1.7.1 Plynová chromatografie	28
1.7.2 Kapalinová chromatografie	29
1.7.3 Metody stanovení mastných kyselin	29
1.7.4 Metody stanovení aminokyselin	30
1.8 Příprava vzorku před vlastní analýzou	31
1.8.1 Derivatizace mastných kyselin	31

1.8.2	Derivatizace aminokyselin	33
1.9	Suchá kapka	34
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1	Chemikálie	36
2.2	Pomůcky a přístroje	37
2.3	Pracovní roztoky	39
2.4	Vzorky mateřského mléka a kolostra	43
2.5	Pracovní postup stanovení mastných kyselin v suché kapce mléka	43
2.5.1	Příprava vzorku k analýze mastných kyselin plynovou chromatografií (vzorky suché kapky a plasmy)	43
2.5.2	Analytické parametry metod plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	44
2.5.3	Podmínky pro stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí	46
2.6	Postup stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce mléka	47
2.6.1	Příprava vzorků	47
2.6.2	Podmínky pro stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	48
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
3.1	Optimalizace metody stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií s plamenově ionizační detekcí	49
3.2	Optimalizace derivatizačního kroku mastných kyselin	51
3.2.1	Optimalizace teploty a doby derivatizačního kroku	51
3.2.2	Poměr a objem derivatizačního činidla	52
3.3	Testování extrakce mastných kyselin ze suché kapky mléka a methylesterů mastných kyselin z reakční směsi	54
3.4	Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v mateřském mléce	56
3.5	Analytické parametry metody plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí	60

3.6	Zastoupení aminokyselin v mateřském mléce.....	61
3.7	Analytické parametry metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	63
3.7.1	Optimalizace derivatizačního kroku.....	63
3.7.2	Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů.....	63
3.7.3	Analytické parametry metody stanovení aminokyselin v mateřském mléce	64
4	ZÁVĚR	67
5	SEZNAM LITERATURY	68
6	PŘÍLOHY	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-AB	2-aminomáselná kyselina
AA	arachidonová kyselina
ACP	protein přenášející zbytek karboxylové skupiny z angl. acyl carrier protein
AMK	aminokyselina
AQC	6-aminochinoly- <i>N</i> -hydroxysukcinimidylkarbamát
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BMI	body mass index
BSTFA	<i>bis</i> (trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CIT	citrulin
DBS	suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
DGLA	dihomo- γ -linolenová kyselina
DH	β -hydroxyacyldehydratáza
DHA	dokosahexaenová kyselina
DMS	suchá kapka mléka (z angl. dried milk spot)
DMTBS	dimethyl- <i>tert</i> -butylsilyl
DPA	dokosapentaenová kyselina
ER	enoylreduktasa
EPA	eikosapentaenová kyselina
FAA	volné aminokyseliny (z angl. free amino acids)
FAME	methylester mastné kyseliny (z angl. fatty acid methylester)
FID	plamenově-ionizační detektor (z angl. flame-ionization detector)
FMOC-Cl	9-fluorenylmethylchloroformát
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GLA	γ -linolenová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
IPA	isopropylalkohol
IQR	mezikvartilový rozdíl (z angl. interquartile range)
IRF	interní responsivní faktor (z angl. internal response factor)
KS	β -ketoacylsynthasa
MAT	malonyl-S-CoA-transferasa

MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectometry)
MTBSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(<i>terc</i> -butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (z angl.. monounsaturated fatty acids)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
NDA	naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
OPA	<i>ortho</i> -ftalaldehyd
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acids)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SF	stacionární fáze
SFA	nasyčené mastné kyseliny (z angl. saturated fatty acids)
Tau	taurin
TBME	<i>terc</i> -butylmethylether
TE	thioesterasa
TMS	trimethylsilyl

SEZNAM ILUSTRACÍ, ROVNIC A TABULEK

Obrázek 1 <i>Anatomické uspořádání mléčné žlázy</i>	16
Obrázek 2 <i>Mikrostruktury tukových globulů mateřského mléka zobrazeny kontrastním mikroskopem</i>	21
Obrázek 3 <i>Strukturní vzorec kyseliny arachidonové s vyznačením počítání uhlíků</i>	22
Obrázek 4 <i>Syntéza mastných kyselin v mléčné žláze</i>	25
Obrázek 5 <i>Struktura molekul kyseliny linolové a α-linolenové</i>	26
Rovnice 1 <i>Mechanismus tvorby radikálů mastných kyselin</i>	30
Rovnice 2 <i>Esterifikace v kyselém prostředí</i>	31
Rovnice 3 <i>Transesterifikace</i>	31
Rovnice 4 <i>Bazicky katalyzovaná transesterifikace</i>	32
Rovnice 5 <i>Reakce diazomethanu s mastnou kyselinou</i>	33
Rovnice 6 <i>Reakční schéma mechanismu tvorby trimethylsilylderivátu</i>	33
Rovnice 7 <i>Reakce OPA s primární aminokyselinou</i>	34
Rovnice 8 <i>Vzorec pro výpočet IRF</i>	56
Rovnice 9 <i>Vzorec pro výpočet koncentrace mastné kyseliny ve vzorku</i>	57
Tabulka 1 <i>Porovnání základních živin v g/100 ml</i>	18
Tabulka 2 <i>Mastné kyseliny - jejich značení, systematický a triviální název</i>	23
Tabulka 3 <i>Přehled proteinogenních aminokyselin, klasifikace na základě jejich postranního řetězce</i>	27
Tabulka 4 <i>Příprava zásobních roztoků aminokyselin</i>	41
Tabulka 5 <i>Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standardu S5</i>	42
Tabulka 6 <i>Příprava standardů pro sestavení kalibrační křivky</i>	42
Tabulka 7 <i>Mastné kyseliny, které se mateřském mléce vyskytují v nejvyšších koncentracích</i> ..	50
Tabulka 8 <i>Minoritně zastoupené mastné kyseliny</i>	50
Tabulka 9 <i>Porovnání hladin vybraných mastných kyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9)</i>	58
Tabulka 10 <i>Porovnání procentuálního zastoupení vybraných mastných kyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9)</i>	59

Tabulka 11 <i>Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných mastných kyselin v mateřském mléce a kolostru technikou suché kapky a metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí</i>	60
Tabulka 12 <i>Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9) dobrovolných dárců</i>	62
Tabulka 13 <i>Mez stanovitelnosti, mez detekce a průměrné parametry 5 kalibračních křivek metody vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí</i>	65
Tabulka 14 <i>Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce technikou suché kapky a metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí</i>	66

ÚVOD

Mateřské mléko je nejdůležitějším zdrojem látek potřebných pro vývoj a zdraví kojence. V případě, že matka nemůže kojit, je nutné mateřské mléko nahradit co nejvhodnější umělou výživou. Znalost jeho složení může pomoci k zlepšení kvality umělé výživy, ale hlavně pomáhá pochopit funkci jednotlivých složek ve vývoji novorozence a předejít různým onemocněním jako je třeba diabetes a alergie.

Tuk, jako nejvíce zastoupená složka mateřského mléka, je důležitým zdrojem energie, má také strukturální a další biologické funkce. Poskytuje přibližně 50-60 % energie. Obsahuje celou řadu nepostradatelných mastných kyselin, například kyselinu arachidonovou a eikosapentaenovou pro syntézu eikosanoidů, kyselinu dokosahexaenovou, která je součástí membrán kortikálních neuronů. Nejpoužívanější metodou pro stanovení mastných kyselin v biologických vzorcích je plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí. Mastné kyseliny jsou před vlastní analýzou převedeny na těkavé deriváty, nejčastěji methylestery.

Mateřské mléko obsahuje také aminokyseliny, potřebné pro syntézu proteinů a dalších důležitých látek. Aminokyseliny jsou v mateřském mléce nejvíce zastoupené v proteinech, ale vyskytují se i volně. Majoritními aminokyselinami jsou kyselina glutamová, která je významným neurotransmiterem, a společně s glutaminem jsou významným energetickým zdrojem pro střevní buňky. Jednou z možností stanovení hladin aminokyselin v mateřském mléce je kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci aminokyselin na fluoreskující deriváty.

Z důvodu snížení nákladů na přepravu a skladování vzorků mateřského mléka byla testována technika suché kapky. Odběr je zcela neinvazivní a postačuje pouze malé množství mateřského mléka, desítky mikrolitrů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je považováno za nejlepší zdroj výživy kojenců v prvních měsících života. Obsahuje látky, které mají příznivý vliv na gastrointestinální trakt, imunitní systém a vývoj mozku. Proto je mateřské mléko široce uznáváno jako biologická tekutina potřebná pro optimální růst a vývoj dítěte. Nejnovější studie ukazují, že mateřské mléko zmírňuje rozvoj metabolických chorob, zejména chrání před obezitou a diabetem 2. typu [1].

Jedná se o tekutinu, ve které jsou zastoupeny cukry, bílkoviny a tuky. Mimo jeho nutriční funkci, mléko obsahuje mnoho imunitních buněk, jako jsou makrofágy, dále kmenové buňky potřebné k regeneraci a stovky až tisíce druhů bioaktivních molekul. Tyto molekuly mohou chránit před infekcí a odvrátit zánět. Například oligosacharidy formují střevní mikroflóru kojenců. To značí, že kromě nutriční funkce má mateřské mléko i funkci ochrannou [2].

1.2 Tvorba mateřského mléka

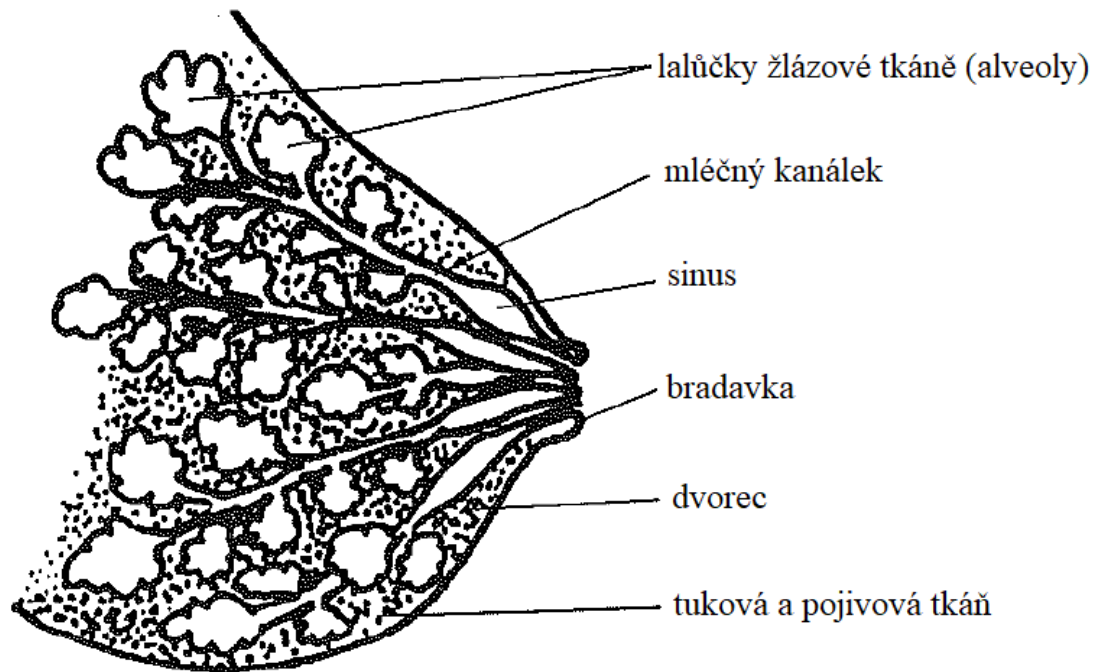
Tvorba a následná sekrece mateřského mléka je komplex fyziologických procesů. Tento proces je výsledkem předchozího vývoje mléčné žlázy a přísných regulací hormony. Všechny tyto aspekty přispívají ke koordinované sekreci buňkami mléčných žláz a k tomu, aby bylo novorozenci poskytnuto mléko přiměřeného složení a dostatečného množství [3].

Mateřské mléko se vytváří ve žlázových buňkách prsní žlázy, které jsou uspořádány do váčkovitých útvarů označovaných jako alveoly. V okolí každého alveolu je síťka buněk podobná myoepiteliálním buňkám. Tím, že se tyto buňky stahují, je vytvořené mléko posunováno z alveolů do vývodů. V oblasti dvorce prsu jsou umístěny tzv. sinusy, kde se mléko hromadí. Odtud je činností jazyka a ústními svaly novorozeněte vystřikováno [4].

1.2.1 Vývoj mléčné žlázy a její anatomické uspořádání

Vývoj mléčné žlázy začíná zhruba v 6. týdnu nitroděložního života, kdy se výběžky buněk zanořují do vaziva tam, kde se v budoucnu bude nacházet mléčná žláza. Dále se tvoří nervová a cévní zásobení žlázy a také pojivová tkáň. Když plod dosáhne 32. týdne nitroděložního vývoje, žláza začne být hmatatelná. Po porodu je mléčná žláza schopna produkce mléka, nicméně do puberty zůstává v neměnném stavu a další rozvoj nastává u dívek

okolo 12. roku. Vývoj žlázy se následně zdokonaluje vlivem cyklických hormonálních změn. Největší rozvoj poté nastává až v těhotenství. Anatomicky mléčná žláza, jak je vidět na obrázku 1, připomíná „strom s větvemi a listy“. Žlázu rozděluje 15-25 oddílů, které jsou odděleny vazivovými přepážkami. Každý tento oddíl je tvořen stovkou alveolů, kde se vytváří mateřské mléko. Z těchto alveolů vycházejí *ductus lactiferus* neboli vývodné kanálky. Postupně pak dochází ke spojování vývodů [4].



Obrázek 1 Anatomické uspořádání mléčné žlázy [4]

1.2.2 Laktogeneze

Laktogeneze je pojem označující počátek sekrece mléka a všechny změny v epitelu mléčných žláz, kdy tyto změny jsou nutné k přechodu od nediferencované mléčné žlázy v časném těhotenství k plnému kojení po porodu. Laktogeneze je rozdělena na dvě fáze: laktogeneze I a laktogeneze II. Fáze I nastává ve 20. týdnu těhotenství, kdy je žláza diferencovaná a schopna sekrece malého množství specifických složek mléka jako je kasein a laktosa. Tuto fázi lze určit změřením koncentrace laktosy a α -laktalbuminu v plasmě, kdy v tomto období jsou jejich hladiny zvýšené. Po této fázi je žláza dostatečně diferencovaná a schopna vylučovat mléko. Produkt sekrece se nazývá kolostrum neboli mlezivo,

viz Kapitola 1.3.1 [5]. Během této fáze jsou spoje mezi laktocyty, označované jako „těsné (tight junction)“, rozvolněné. To umožňuje složkám v mléce přecházet do krevního řečiště. Jakmile laktosa vstoupí do krve, nemůže být metabolizována a je vylučována močí. Díky tomu je možné v průběhu 24 hodin sledovat syntézu laktosy v mléčných žlázách a odhadnout tak rychlost syntézy mleziva během těhotenství, která je v této fázi nízká, asi 30 ml/24 hodin [6]. V první fázi syntézy tedy dochází k diferenciaci epitelálních buněk mléčné žlázy na laktocyty, které jsou schopny syntetizovat již zmiňované specifické složky. Druhou fází, laktogeneze II, je zahájení sekrece mateřského mléka. Proto byly termíny laktogeneze I a laktogeneze II nahrazeny termíny sekreční diferenciace a sekreční aktivace [7].

Laktogeneze II nastává zhruba 30-40 hodin po porodu. Když dojde k vyloučení placenty, významně se sníží hladina progesteronu. Pod řízením Inzulinu a kortisolu je aktivována sekreční fáze. V některých konkrétních případech může docházet ke zpoždění laktogeneze. Takovými případy jsou například porod císařským řezem, *diabetes mellitus* či stres během porodu. Je prokázáno, že obézní ženy mají větší riziko zpoždění laktogeneze II [3]. Během laktogeneze II dochází nejen ke zvýšení objemu vylučovaného mléka, ale i k dramatickým změnám v jeho složení. Zatímco kolostrum obsahuje vysoké hladiny proteinů (hlavně imunoglobulinů, lysozymu a laktoferinu), draselných a chloridových iontů, a nízké hladiny citrátu, tak během laktogeneze II dochází v mateřském mléce k zvýšení obsahu lipidů a naopak poklesu hladiny proteinů. Změny v hladinách laktosy, citrátu, bílkovin a sodných iontů v mateřském mléce, jsou používány jako ukazatele laktogeneze II [8].

1.3 Druhy mateřského mléka

1.3.1 Mlezivo – kolostrum

Kolostrum je speciální druh mléka, které je produkováno v prvních 2-3 dnech po narození dítěte, v množství zhruba 40-50 ml. Toto množství je ovšem adekvátní k potřebám novorozence. Mlezivo je bohaté na leukocyty a protilátky, zejména sekreční IgA. Dále také obsahuje větší množství bílkovin, minerálů a vitamínů rozpustných v tucích (A, E a K) než zralé mléko. Vitamín A hraje důležitou úlohu v ochraně očí novorozence a je příčinou nažloutlé barvy kolostra. Kolostrum poskytuje novorozenci imunitní ochranu při prvním kontaktu s mikroorganismy přítomných v okolním prostředí. Dále také připravuje výstelku střeva na příjem živin, které jsou obsaženy v mléce. Mléko jako takové se ve větším množství začíná

produkovat mezi 2. - 4. dnem po porodu. Od sedmého do čtrnáctého dne se mléko nazývá přechodné a po dvou týdnech se označuje jako mléko zralé [9].

1.3.2 Přechodné mléko

Tento druh mateřského mléka se nazývá přechodným, jelikož tvoří přechod mezi mlezivem a zralým mlékem. Přechodné mléko je svými vlastnostmi podobné mlezivu a podporuje veškerý vývoj rychle rostoucího dítěte. Během tohoto období se produkce mléka zvyšuje. Vyskytuje se zhruba od 5. dne do dvou týdnů po porodu. Po této době je mateřské mléko považováno za převážně zralé [10].

1.3.3 Zralé mateřské mléko

Plně zralé mateřské mléko se vyskytuje zhruba 6 týdnů po porodu. Složení mateřského mléka se během kojení mění. Existují dvě formy zralého mléka, tzv. přední a zadní. Přední mléko (na začátku kojení) je více vodnaté a slouží k uhašení žízně dítěte. Zadní mléko (na konci kojení) obsahuje více tuku a má za úkol dítě zasytit [10].

1.4 Složení mateřského mléka

V průběhu období kojení se složení mateřského mléka přizpůsobuje měnícím se požadavkům rostoucího kojence. V mateřském mléce je ideální poměr tuků, sacharidů a bílkovin. V tabulce 1 je uveden obsah (v g/100ml) těchto živin v porovnání s mlékem kravským [4].

Tabulka 1 Porovnání základních živin v g/100ml [4]

	Mlezivo	Zralé mléko	Kravské mléko
Bílkoviny	1,5 - 2,0	1,1 - 1,3	3,3
Tuky	2,0 - 2,2	4,0 - 4,5	3,8
Sacharidy	4,0 - 4,2	5,0 - 7,0	4,8

1.4.1 Bílkoviny

Přibližně 1 % mateřského mléka je tvořeno bílkovinami, z nichž zhruba 70 % tvoří tzv. syrovátkové bílkoviny (α -laktalbumin, laktoferin, sekreční IgA). Přítomnost proteinů v mateřském mléce přináší dítěti několik výhod. Bílkoviny pozitivně ovlivňují růst a vývoj

střevní mikroflóry, poskytují tělu aminokyseliny (AMK), dále také usnadňují trávení a příjem dalších živin v mléce, např. železa, vápníku a vitamínu B12. Mimo to také posilují imunitu tím, že poskytují obranu proti patogenním bakteriím, virům a kvasinkám. Více než 25 % obsahu bílkovin tvoří α -laktalbumin. Ten je nezbytný při biosyntéze laktosy. Předpokládá se, že α -laktalbumin usnadňuje vstřebávání dvojmocných kationtů [11]. Jedná se o důležitý zdroj bioaktivních peptidů a esenciálních AMK (viz Kapitola 1.6) jako jsou tryptofan, lysin, AMK s rozvětveným řetězcem a obsahující síru. Tento protein je komerčně dostupný a vzhledem k jeho fyzikálním vlastnostem (rozpuštěnost ve vodě, tepelná stabilita) se přidává do potravinářských produktů jako doplněk stravy. α -Laktalbumin se tvoří v epiteliálních buňkách mléčné žlázy a reguluje produkci laktosy v mateřském mléce. Je regulační podjednotkou laktosasyntetasy a katalytickou podjednotkou β -1,4-galaktosyltransferasy [12].

Další významnou bílkovinou obsaženou v mateřském mléce je laktoferin. Jedná se o glykoprotein s velikostí 80 kDa, který obsahuje přibližně 700 AMK. Má antioxidační, protinádorové a protizánětlivé účinky. Podporuje růst bakterií, jako jsou pro tělo prospěšné *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* [13]. Jedna molekula laktoferinu váže dva ionty železa, tím se železo stává nedostupným pro potenciálně patogenní mikroorganismy [11]. Rai a kol. stanovovali u 2724 žen hladinu laktoferinu v kolostru a zralém mléce. Hladina laktoferinu byla vyšší v kolostru a snížila se během prvních 5 dnů o asi 50 %. Po 30 dnech laktace je již hladina laktoferinu relativně konstantní [14]. Laktoferin je obtížně stravitelný, ve stolici čtyřměsíčních kojenců nacházíme určité množství nestráveného laktoferinu. [15].

Nedílnou součástí mateřského mléka jsou imunoglobuliny, které se v mléce vyskytují ve vysokých koncentracích, zejména na počátku kojení. Mezi dominantně zastoupené imunoglobuliny v mléce patří sekreční IgA, následovaný sekrečním IgG. Tyto imunoglobuliny poskytují dítěti imunologickou ochranu do té doby, než je zcela vyvinut jeho vlastní imunitní systém. Koncentrace sekrečního IgA v kolostru je přibližně 12 mg/ml, zatímco zralé mléko obsahuje zhruba 1 mg/ml. Tyto hodnoty potvrzují ochrannou funkci kolostra [16]. Sekreční IgA tvoří asi 90 % všech imunoglobulinů, které jsou v mléce obsaženy. Pokud je matka vystavena bakteriální nebo virové infekci, tak protilátky, které si proti patogenům vyvinula, jsou přeneseny na dítě. Na rozdíl od ostatních typů IgA, je sekreční IgA stabilní vůči proteolytickým enzymům ve střevě kojenců. Tento imunoglobulin se váže na bakteriální a virové antigeny a zabraňuje tak jejich adhezi k slizniční výstelce. V mateřském mléce se ovšem vyskytují i další

imunoglobuliny, jako jsou IgG a IgM, ale v nižších koncentracích a snadněji podléhají štěpení v tenkém střevě [15].

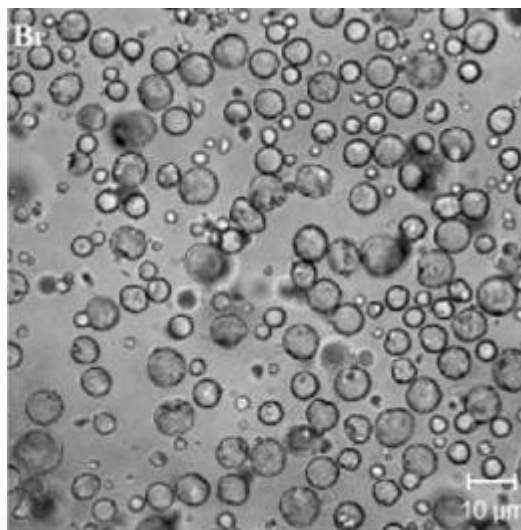
Mezi mléčné proteiny se řadí také kasein. Ten se v mateřském mléce vyskytuje ve formě micel, existují tři typy, α , β a κ -kasein [16]. Kaseiny tvoří přibližně 20-40 % bílkovin mateřského mléka, což je sice méně než v mléce kravském, ale to kaseinu neubírá na důležitosti při vývoji novorozence. Hlavním kaseinem je β -kasein, který obsahuje několik fosforylovaných AMK a po jeho štěpení vznikají kaseinové fosfopeptidy usnadňující absorpci vápenatých iontů. To může být jedním z důvodů, proč je mateřské mléko lepší, co se příjmu vápníku týká, než kojenecká výživa. Mimo to se vytvářejí také kaseinomorfiny, což jsou opioidní peptidy, které se podílejí na kvalitnějším spánku dítěte [15]. Dalším kaseinem je κ -kasein, který je vysoce glykosylovaným proteinem a poskytuje novorozenci imunologickou obranu proti infekci. Zabraňuje adhezi bakterie *Helicobacter pylori* k žaludeční sliznici a *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* k buňkám dýchacích cest [11].

Dalšími bílkovinami, které je nutno zmínit, jsou lysozym a haptokorin. Lysozym ve spolupráci s laktoferinem se podílejí na eliminaci patogenů tak, že laktoferin se naváže na buněčnou membránu a vytvoří póry, kterými lysozym vstoupí do buňky a účinně patogen zničí. Jelikož novorozenec prozatím nesyntetizuje vnitřní faktor, který je nezbytný pro vstřebávání vitamínu B12, nahrazuje jeho funkci haptokorin neboli vitamín B12-vázající protein, který jeho vstřebávání usnadňuje [15].

1.4.2 Lipidy

Tuky jsou definovány jako estery mastných kyselin (podrobněji v Kapitole 1.5) a glycerolu. V mateřském mléce je průměrná koncentrace tuku asi 3,8-3,9 g/100 ml. Tuk se vytváří v alveolárních buňkách a v mléce se vyskytuje ve formě tukových kapének (obrázek 2). Povrch těchto kapének je složen z amfipatických sloučenin jako jsou fosfolipidy, proteiny a cholesterol, které vytváří membránu mléčných kapének. Ve vodném prostředí je tento amfipatický povrch důležitý pro disperzi mléčných tuků a stabilitu olejové emulze. Průměr tukových kapének je v rozmezí od 1 do 10 μ m, ale většina měří 1 μ m. Jejich velká plocha (4,5 m²/dl) umožňuje vázat různé lipasy, což přispívá k účinnému trávení triglyceridů. V průběhu kojení se obsah tuku v mléce zvyšuje, kdy tvorba mléčného tuku alveolárními buňkami je podněcována vyprazdňováním prsu a také prolaktinem [17]. Mezi další faktory ovlivňující složení lipidů jsou věk matky, počet porodů matky, délka těhotenství a BMI (Body

Mass Index). Významnou úlohu hraje nejen strava matky a stádium laktace, ale i těhotenský diabetes [18].



Obrázek 2 Mikrostruktury tukových globulů mateřského mléka zobrazeny kontrastním mikroskopem [19]

1.4.3 Ostatní složky v mateřském mléce

V mateřském mléce je celá řada sacharidů, monosacharidy glukosa, a galaktosa, disacharid laktosa a oligosacharidy.

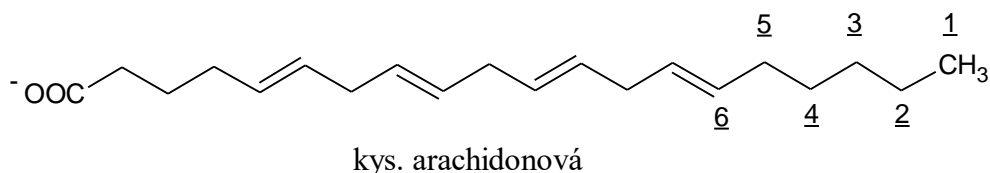
Sacharid, jehož hladina není závislá na stravě matky, je laktosa. Kojené dítě přijme přibližně 10-14 g laktosy denně na kilogram tělesné váhy a její obsah v mléce je poměrně stabilní (asi 7 %). Laktosa napomáhá vstřebávání minerálů, a to hlavně vápenatých iontů. Laktosa je hydrolyzována na monosacharidy glukosu a galaktosu, které se ve střevních buňkách oxidují v glykolýze na laktát, to vede k snížení pH a zvýšení rozpustnosti vápenatých solí [11].

Další důležitou součástí lidského mléka jsou oligosacharidy, jejichž hladina v mateřském mléce je asi 13 g/l a jejichž obsah se po porodu ještě zvyšuje. Monosacharidy, z nichž jsou oligosacharidy složeny, jsou L-fukosa, D-glukosa, D-galaktosa, N-acetylglukosamin a kyselina N-acetylneuraminová. Oligosacharidy mají probiotickou funkci, která spočívá v podpoře růstu bakterií jako je *Bifidobacterium infantis*. Tato bakterie se nachází v gastrointestinálním traktu dítěte a chrání dítě před kolonizací patogenními bakteriemi. To ukazuje na důležitou úlohu oligosacharidů v prevenci před novorozeneckými průjmy a infekcemi dýchacích cest [16].

1.5 Mastné kyseliny

Fyzikálně-chemické vlastnosti mastných kyselin (MK) jsou dány mimo jiné počtem atomů uhlíku v jejich molekule [20]. Na základě délky řetězce lze MK dělit na MK s krátkým řetězcem (3 až 7 atomů uhlíku), středním řetězcem (8 až 13 atomů uhlíku), dlouhým řetězcem (14 až 20 atomů uhlíku) a velmi dlouhým řetězcem (více než 21 atomů uhlíku) [21]. MK lze klasifikovat na základě počtu dvojných vazeb na nasycené (SFA, z angl. Saturated Fatty Acids), které dvojně vazby neobsahují, mononenasycené (MUFA, z angl. MonoUnsaturated Fatty Acids) obsahující jednu dvojnou vazbu a polynenasycené (PUFA, z angl. PolyUnsaturated Fatty Acids), v jejichž molekule lze nalézt dvě až šest dvojných vazeb [20].

MK lze označit jak systematickým, tak triviálním názvem (tabulka 2), často však bývají označovány schématickým vzorcem CN:p n-x, kde CN (z angl. Carbon Number) představuje celkový počet atomů uhlíků v molekule, p počet dvojných vazeb a x polohu první dvojně vazby od methylového konce kyseliny (n). Například zkrácený zápis pro kyselinu arachidonovou (obrázek 3) je C20:4n-6, protože obsahuje 20 atomů uhlíku, čtyři dvojně vazby, z nichž první se nachází na 6. uhlíku (počítáno od methylového konce). Tento „n-systém“ lze vyjádřit i systémem „omega“, např. ω^3 MK. Nicméně toto označení není doporučováno [21, 22].



Obrázek 3 Strukturní vzorec kyseliny arachidonové s vyznačením počítání uhlíků od n-konce [22]

Dalším způsobem, jak lze vyjádřit pozici první dvojně vazby v molekule, je označení symbolem Δ , kdy je vazba počítána od karboxylového konce [22].

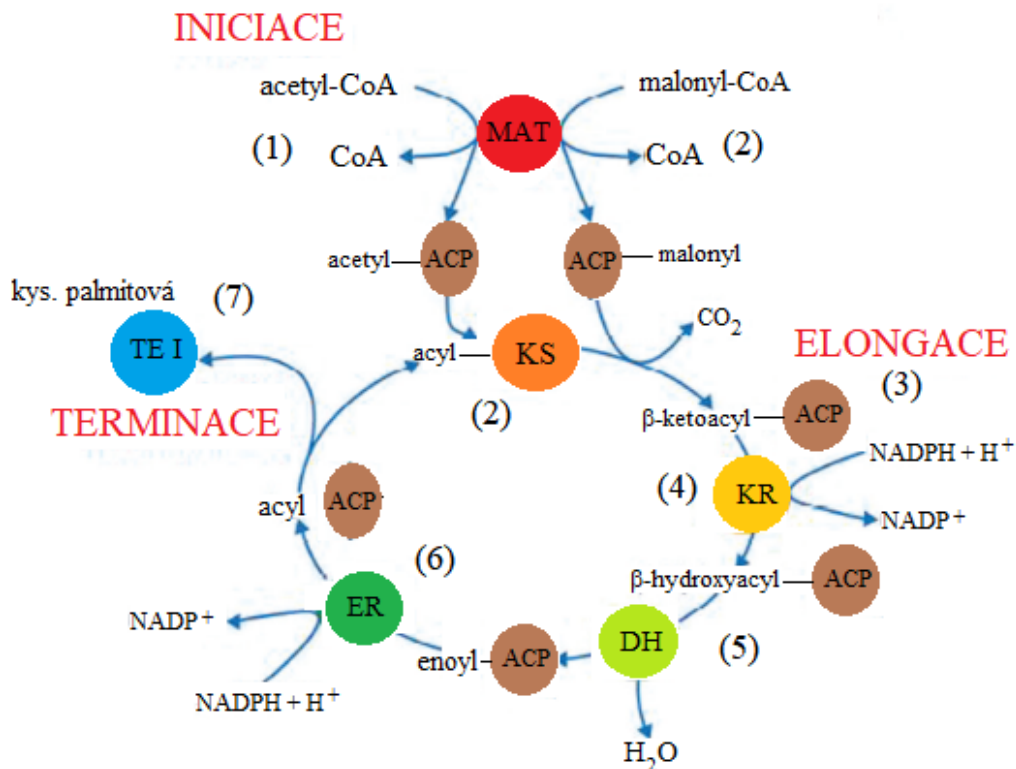
Tabulka 2 Mastné kyseliny - jejich značení, systematický a triviální název [20]

Zkrácený zápis	Systematický název	Triviální název
Nasyčené		
C4:0	Butanová	Máselná
C6:0	Hexanová	Kapronová
C8:0	Oktanová	Kaprylová
C10:0	Dekanová	Kaprinová
C12:0	Dodekanová	Laurová
C14:0	Tetradekanová	Myristová
C16:0	Hexadekanová	Palmitová
C18:0	Oktadekanová	Stearová
C20:0	Eikosanová	Arachová
C22:0	Dokosanová	Behenová
C24:0	Tetrakosanová	Lignocerová
Nenasycené (dle IUPAC)		
C16:1	(9Z)-hexadek-9-enová	Palmitoolejová
C18:1	(9Z)-oktadek-9-enová	Olejová
C18:1	(11E)-oktadek-11-enová	Vakcenová
C18:2	(9Z,12Z)-oktadeka-9,12-dienová	Linolová
C18:3	(9Z,12Z,15Z)-oktadeka-9,12,15-trienová	α -Linolenová
C20:4	(5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-eikosatetraenová	Arachidonová

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

1.5.1 Biosyntéza mastných kyselin v mléčné žláze

Biosyntéza MK v mléčné žláze (obrázek 4) je katalyzována multienzymovým komplexem syntasou MK a acetyl-CoA-karboxylasou. Synthasa MK je složena ze 7 domén, β -ketoacylsynthasy (KS), acetyl/malonyl-S-CoA-transferasy (MAT), β -hydroxyacyldehydratasy (DH), enoylreduktasy (ER), β -ketoacylreduktasy (KR), „acyl-carrier“ proteinu (ACP) a thioesterasy I (TE I). Biosyntéza probíhá v těchto krocích: (1) převedení acylové části acetyl-S-CoA (iniciační substrát) na ACP za katalýzy enzymem MAT, malonyl-S-CoA je elongačním substrátem; (2) dočasné převedení acylové skupiny na KS a zároveň transacylace malonyl-S-CoA (za katalýzy MAT) na ACP; (3) tvorba β -oxoacetylu navázaného na ACP dekarboxylační kondenzací katalyzovanou enzymem KS; (4) redukce na β -uhlíku za katalýzy KR a přítomnosti NADPH; (5) dehydratace vzniklého β -hydroxyacylu (navázaného na ACP) na enoyl; (6) NADPH-dependentní redukce enoylu na ACP (za katalýzy ER) za vzniku čtyřuhlíkatého produktu butyryl-S-CoA; (7) uvolnění MK o délce 16 atomů uhlíku (palmitoyl-S-CoA) z ACP za katalýzy TE I [23]. V případě syntézy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem v mléčné žláze je rozdíl v posledním kroku, kdy je zapotřebí thioesterasy II, která není součástí synthasy MK, ale je přítomna v cytosolu a svým působením vede k uvolnění MK s délkou řetězce C8-C12 [24].



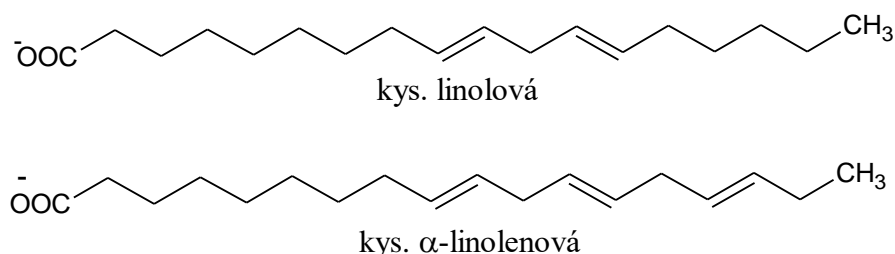
Obrázek 4 Syntéza mastných kyselin v mléčné žláze [23]

MK s delším uhlíkatým řetězcem a nenasycené MK jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu za katalýzy enzymy elongasami a desaturasami [23,24].

MK mohou být desaturovány až do polohy Δ^9 , což je číslo určující polohu dvojné vazby na 9. uhlíku od karboxylového konce v molekule. Na základě toho klasifikujeme desaturasy, které katalyzují vznik dvojné vazby na uhlících 4, 5, 6 a 9 MK (Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 , Δ^9). Živočichové, tedy i člověk, netvoří Δ^{12} - a Δ^{15} -desaturasu, proto nemohou syntetizovat kyselinu linolovou (C18:2 n-6) a α -linolenovou (C18:3 n-3), tím se pro člověka stávají esenciálními (obrázek 5). Další elongací a desaturací těchto MK se získají PUFA s dlouhým řetězcem. Vzhledem k tomu, že jejich tvorba závisí na esenciálních MK, lze je označit jako podmíněně esenciální [22].

Výchozí látkou pro syntézu PUFA řady n-6 je kyselina linolová, řady n-3 α -linolenová. PUFA obsahující 20 atomů uhlíku jsou prekurzory eikosanoidů, jako jsou prostaglandiny a leukotrieny, kdy AA jako prekurzor má, na rozdíl od kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dihomo- γ -linolenové (DGLA), prozánětlivé účinky [27].

V případě MUFA se zavádí dvojná vazba do jejich molekuly na pozici Δ^9 od karboxylového konce kyseliny za katalýzy enzymem Δ^9 -desaturasou. MUFA, obsahující n-9 s 20-24 atomy uhlíku, jsou získány elongací kyseliny olejové [22, 25]. Nejvíce zastoupená MUFA v mateřském mléce, kyselina olejová, vzniká desaturací kyseliny stearové v mléčné žláze a játrech [24].



Obrázek 5 Struktura molekul kyseliny linolové a α -linolenové

1.5.2 Mastné kyseliny v mateřském mléce

V mateřském mléce lze nalézt přes 200 MK, nicméně spousta z nich je přítomna ve velmi nízkých koncentracích, ovšem některé dominují [16]. Převažují ty s konfigurací *cis*, které mají příznivé účinky., MK s konfigurací *trans* mohou mít negativní účinky na růst a vývoj dítěte. Nejhojněji zastoupené SFA a MUFA v mateřském mléce jsou kyselina palmitová (C16:0) a olejová (*cis*-C18:1 n-9). Z PUFA to jsou esenciální kyselina linolová (all-*cis*-C18:2 n-6) a α -linolenová (all-*cis*-C18:3 n-3). V mateřském mléce jsou zastoupeny také kyselina eikosatrienová (all-*cis*-C20:3 n-6), AA (all- *cis*-C20:4 n-6) a DHA, které jsou důležité pro vývoj kognitivních a motorických funkcí. Kromě toho mají důležitou funkci v ochraně proti alergii, astmatu a obezitě [18, 28].

Z nižších MK lze v mateřském mléce nalézt například kyselinu máselnou, která reguluje genovou expresi a redukuje zánětlivé procesy ve střevech. Antimikrobiální aktivitu vykazují kyselina kapronová, kaprylová a laurová [28].

Miliku a kol. zjistili, že na obsah MK má vliv mnoho faktorů, jako je strava, genetika, sociodemografie a BMI. Ukázalo se, že matky, jejichž strava obsahovala v průběhu těhotenství a/nebo kojení více ryb a rybího tuku, měly vyšší hladiny n-3 PUFA. Byly pozorovány i rozdíly mezi hladinami MK napříč různými etniky. U matek asijské národnosti byla prokázána vyšší hladina kyseliny linolové a n-3 PUFA. Mateřské mléko obézních matek obsahovalo vyšší

hladiny SFA a nižší hladiny MUFA. Naopak nebyl pozorován vztah mezi obsahem MK a věkem matky, způsobem či počtem porodů, pohlavím dítěte [29].

1.6 Aminokyseliny

Existuje 20 aminokyselin (AMK), které se běžně vyskytují v proteinech, nazýváme je proteinogenní. Vzájemně se liší postranním řetězcem. Na základě tohoto postranního řetězce rozdělujeme AMK do čtyř skupin: nepolární, kyselé, bazické a neutrální (tabulka 3) [30].

Tabulka 3 Přehled proteinogenních aminokyselin, klasifikace na základě jejich postranního řetězce [30]

Název aminokyseliny	Zkrácený zápis	
Alanin	Ala	
Glycin	Gly	
Valin	Val	
Leucin	Leu	
Isoleucin	Ile	nepolární
Fenylalanin	Phe	
Prolin	Pro	
Methionin	Met	
Tryptofan	Trp	
Aspartát	Asp	kyselé
Glutamát	Glu	
Histidin	His	
Lysin	Lys	bazické
Arginin	Arg	
Serin	Ser	
Threonin	Thr	
Asparagin	Asn	neutrální
Glutamin	Gln	
Tyrosin	Tyr	
Cystein	Cys	

AMK, které si lidské tělo nedokáže vytvořit samo, a tudíž je závislé na jejich příjmu z potravy, jsou označovány jako esenciální a jsou to isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, tryptofan a valin [25, 30].

1.6.1 Aminokyseliny v mateřském mléce

Volné AMK (FAA) představují přibližně 8-22 % látek nebílkovinného dusíku. Taurin, glutamát a glutamin jsou nejvíce zastoupené AMK v mateřském mléce. Taurin je konjugačním činidlem žlučových kyselin ve střevě kojenců a podílí se na struktuře a funkci fotoreceptorů sítnice. Glutamát je zdrojem 2-oxoglutarátu, důležitým meziproduktem citrátového cyklu, navíc je významným neurotransmiterem a společně s glutaminem jsou významnými energetickými substráty pro střevní buňky [31,32].

Zhang a kol. zjistili, že složení AMK se v mateřském mléce během laktace mění. Největší pokles hladiny celkových AMK byl zaznamenán během prvních 4 měsíců laktace, poté byla hladina relativně konstantní. Hladiny některých FAA (alanin, glycin, serin, glutamin) se naopak s postupným kojením dítěte zvyšují. Dále byly pozorovány značné rozdíly v hladinách celkových AMK (tyrosin, prolin, histidin, methionin, tryptofan) a FAA (lysin, fenylalanin, isoleucin) napříč různými geografickými oblastmi [31]. Sadelhoff a kol. prokázali rozdíly v obsahu AMK mezi zadním a předním mlékem, v zadním mléce byl celkový obsah bílkovin vyšší, na druhou stranu v předním mléce byla vyšší hladina FAA. [33].

1.7 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k separaci složek mezi dvě fáze, které se vzájemně nemísí. Nepohyblivá fáze je označována jako stacionární (SF), pohyblivá jako mobilní fáze (MF). Složky vzorku unášeného MF se zachycují na SF, tím dochází k jejich separaci [34].

1.7.1 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie je vzorek nadávkován do vyhřátého dávkovače, kde dojde k jeho zplynění. Odtud je nosným plynem veden skrz kolonu se SF, kde je separován. Nakonec jsou separované složky vzorku nosným plynem dopraveny k detektoru, který je na základě fyzikálně-chemických vlastností deteguje. Volba nosného plynu závisí na typu detektoru, který je používán. Jako nosný plyn lze použít helium, dusík nebo argon [35].

Nejčastěji používaným detektorem v plynové chromatografii je plamenově-ionizační detektor (FID, z angl. Flame Ionization Detector). Vstoupí-li do detektoru látka, je v kyslíkovodíkovém plameni spálena za vzniku iontů a elektronů, které zvýší elektrickou vodivost plamene a zvýší se tak ionizační proud. Odezva detektoru je přímo úměrná koncentraci stanovované látky, závisí však na její struktuře. [35].

Populárním detektorem používaným ve spojení s plynovou chromatografií je v současné době hmotnostní spektrometr (MS, z angl. Mass Spectrometer). Po vstupu do detektoru je látka ionizována a fragmentována, fragmenty jsou následně separovány v hmotnostním analyzátoru na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Výstupem je hmotnostní spektrum [35].

GC-MS má mnoho využití, jedním z nich je metabolomika, což je obor zabývající se kvantifikací a identifikací metabolitů v biologickém systému (AMK, MK, báze nukleových kyselin, steroidy, deriváty purinů atd.). Analýza těchto metabolitů pomáhá mimo jiné objasnit mechanismus různých onemocnění [36].

1.7.2 Kapalinová chromatografie

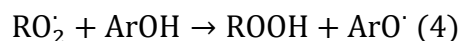
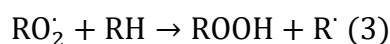
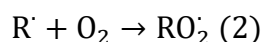
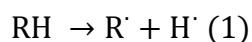
U této chromatografické metody je MF kapalina. To, jakým způsobem a s jakou účinností dojde k separaci složek, závisí jak na interakci se SF, tak i na použité MF [34]. Nejpoužívanější metodou kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. High Performance Liquid Chromatography). Jedná se o kolonovou chromatografii, kdy je rozpuštěný vzorek unášen MF skrz kolonu se stacionární fází. Analyt, který nejsilněji interaguje se SF, opouští kolonu jako poslední a jeho retenční čas je nejdelší. Separace může být provedena buď isokratickou elucí, kdy je složení MF konstantní, nebo gradientovou elucí, kde se složení MF mění v čase. Po opuštění kolony vstupuje mobilní fáze se separovanými látkami do detektoru, který generuje signál odpovídající množství analytu [37]. Nejpoužívanějšími detektory v HPLC jsou UV/Vis, fluorescenční, elektrochemický a MS [38].

1.7.3 Metody stanovení mastných kyselin

Aby byla analýza MK z hlediska kvality a kvantity spolehlivá, musí být biologický materiál po odběru upraven tak, aby se zabránilo oxidaci mastných kyselin, zejména PUFA, vlivem vzdušného kyslíku či působením UV záření. V případě séra či plasmy je vzorek

uchováván při -80 °C. Pokud se jedná o tkáň, vloží se po odběru do tekutého dusíku a poté se do doby analýzy uchovává při - 80 °C. Při přípravě vzorku před vlastní analýzou jsou lipidy separovány od ostatních složek, které jsou rozpustné ve vodě, extrakcí organickými rozpouštědly. Tkáň je prvně homogenizována a poté jsou lipidy extrahovány organickými rozpouštědly [39].

Tenkovrstvá chromatografie umožňuje separovat lipidy do příslušných tříd, cholesterolu, esterů cholesterolu, triacylglycerolů, diacylglycerolů, monoacylglycerolů, volných MK a fosfolipidů. K zabránění oxidace nenasycených MK se ke vzorku přidává butylovaný hydroxytoluen (BHT), fenolický antioxidant [39]. Pro vysvětlení principu antioxidantní funkce BHT, je nutné nastínit průběh oxidace MK (rovnice 1). Ve fázi iniciace vzniká volný radikál MK (1), který následně reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (2), ten odebírá atom vodíku ze sousední MK a vzniká lipoperoxid a radikál MK (3), který řetězovou reakcí reaguje dál. BHT brání oxidaci MK tím, že poskytne peroxylovému radikálu vodík a zabrání tak další propagaci, přičemž se sám stává radikálem, který ovšem už není tak reaktivní (4) [40].



Rovnice 1 Mechanismus tvorby radikálů mastných kyselin [40]

Ačkoliv je zapotřebí derivatizace MK (viz Kapitola 1.8.1), je plynová chromatografie zlatým standardem pro stanovení MK, a to nejčastěji ve spojení s FID. Jedná se o detektor, který i přes nízké pořizovací náklady je vysoce citlivý [41].

1.7.4 Metody stanovení aminokyselin

Hladiny AMK v různých biologických vzorcích lze stanovit různými analytickými metodami, především plynovou a kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní detekcí. MS zaujímá čelní místo v metabolomice [42].

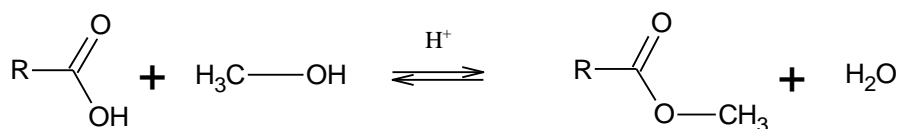
Stanovení hladin AMK v plazmě je důležité pro diagnostiku různých onemocnění. Používá se HPLC spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), lze však použít také finančně méně náročnou UV/Vis a fluorescenční detekci [43].

1.8 Příprava vzorku před vlastní analýzou

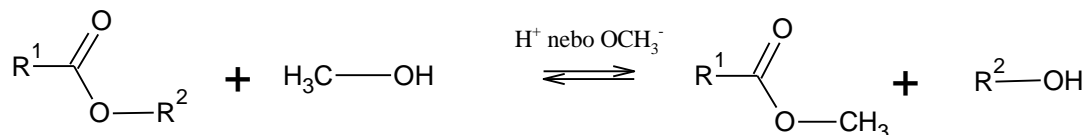
1.8.1 Derivatizace mastných kyselin

Jak již bylo řečeno, hladiny či procentuální zastoupení MK se stanovují převážně GC s použitím FID. MK je nutné převést na těkavější deriváty, nejčastěji methylestery MK (FAME, z angl. Fatty Acids Methyl Esters) [44].

MK mohou být převedeny na odpovídající estery v přítomnosti kyselého nebo zásaditého katalyzátoru. V případě kyselého katalyzátoru probíhá reakce podle rovnice 2. Pokud jsou MK součástí tuků, dochází k reakci, která se nazývá transesterifikace nebo transmethylace (také známé jako methanolýza) a probíhá podle rovnice 3 [45].



Rovnice 2 Esterifikace v kyselém prostředí [45]



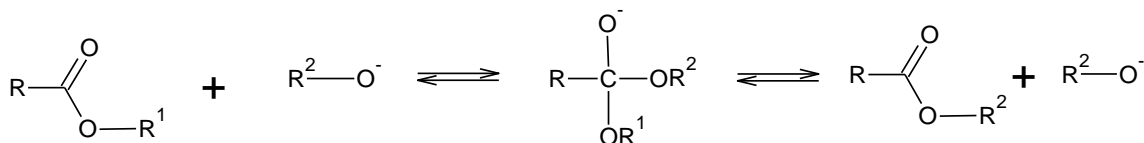
Rovnice 3 Transesterifikace [45]

Nejčastěji používanými katalyzátory jsou kyselina chlorovodíková, sírová a fluorid boritý. [44]. Bezvodou metanolicou kyselinu chlorovodíkovou lze připravit reakcí methanolu a acetylchloridu. Acetylchlorid je velmi těkavý (bod varu 52° C), vysoce dráždivý a s methanolem reaguje agresivně, proto je nutné s ním zacházet opatrně. Metanolicou kyselinu chlorovodíkovou lze získat komerčně, je však nestabilní, protože reaguje s methanolem za vzniku chlormethanu a vody, což způsobuje snížení koncentrace kyseliny chlorovodíkové během skladování [46].

Dalším účinným katalyzátorem je kyselina sírová, která je však silnou žíravinou a je proto nutné s ní zacházet opatrně. Nevýhodou jejího použití je také vznik artefaktů MK, které se vytvářejí, pokud se používá vysoká koncentrace kyseliny sírové, to platí i pro fluorid boritý [46]. Bylo také zjištěno, že při použití kyseliny sírové jako katalyzátoru, dochází k rozkladu PUFA [44].

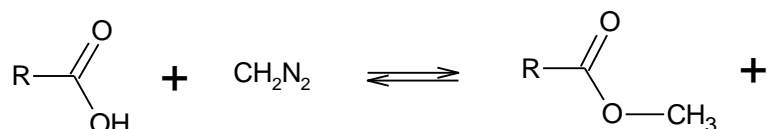
Fluorid boritý byl navržen společností American Oil Chemists' Society jako vhodný katalyzátor pro metodu stanovení MK v mořských olejích. Nicméně v několika případech byl potvrzen vznik nežádoucích artefaktů. Kromě toho fluorid boritý nenávratně poškozuje kolonu, jelikož stopy této sloučeniny se objevují po extrakci v organické fázi [44].

Při bazicky katalyzované metanolýze (rovnice 4) se nejčastěji používá hydroxid draselný nebo sodný. Na rozdíl od kysele katalyzované derivatizace, probíhá bazická derivatizace za mírnějších podmínek a rychleji. U acylglycerolů je metanolýza dokončena během 2 minut při laboratorní teplotě a pro estery sterolů je do 1 hodiny při 37 °C. Nevýhodou bazické katalýzy je, že báze nedokážou katalyzovat esterifikaci volných MK. Proto je častěji používaná derivatizace v kyselém prostředí [47, 48].



Rovnice 4 Bazicky katalyzovaná transesterifikace [45]

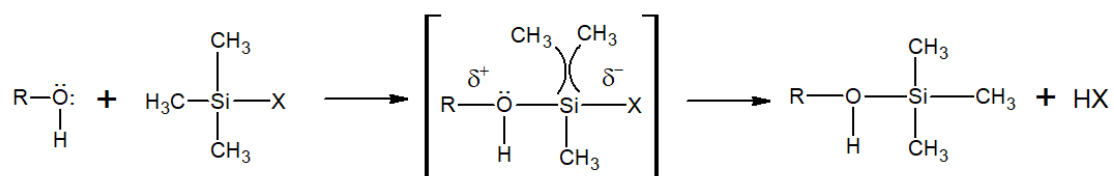
K derivatizaci MK lze použít také diazomethan (rovnice 5). Jedná se o činidlo, které s neesterifikovanými MK reaguje rychle, nicméně neovlivňuje transesterifikaci jiných lipidů. Roztok diazomethanu v etheru je stabilní jen krátce a je nutné ho skladovat ve tmě a při nízké teplotě. V případě, že je skladován delší dobu, vytvoří se vedlejší polymerní produkty, které následně mohou ovlivnit analýzu. Jedná se o potenciálně výbušnou a toxickou látku, kdy nitrosamidy, používané při jeho přípravě, jsou potenciální karcinogeny. Nicméně při manipulaci s malým množstvím je riziko nízké [47].



Rovnice 5 Reakce diazomethanu s mastnou kyselinou [47]

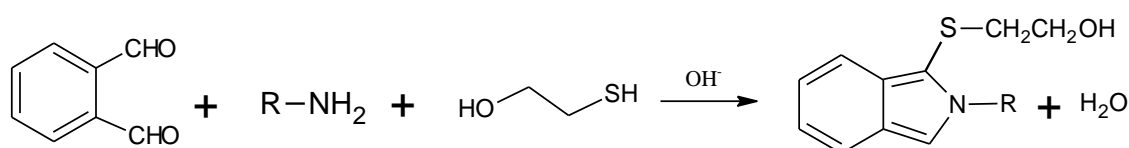
1.8.2 Derivatizace aminokyselin

Při stanovení AMK GC je zapotřebí AMK derivatizovat, nejlépe ve dvou krocích (esterifikace a acylace). Později byla vyvinuta jednokroková metoda derivatizace, silylace (rovnice 6). Jedná se o proces, kdy je aktivní vodík v –OH, –NH a –SH skupině nahrazen silylovou skupinou. Nejčastěji používanými silylačními činidly jsou *bis*(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) a *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSTFA). Deriváty dimethyl-*tert*-butylsilyl (DMTBS) jsou mnohem stabilnější vůči vlhkosti i oxidaci oproti trimethylsilyl (TMS) derivátům. Další výhodou je, že při použití MTBSTFA proběhne reakce rychle i při pokojové teplotě. Výjimkou jsou bazické AMK (lysin, arginin, histidin, glutamin a asparagin), proto se při derivatizaci používá směs MTBSTFA/acetonitril (1:1, v/v) [48].



Rovnice 6 Reakční schéma mechanismu tvorby trimethylsilylderivátu [49]

Při stanovení AMK metodou HPLC s fluorescenční detekcí se nejčastěji používá jako derivatizační činidlo *ortho*-ftalaldehyd (OPA). OPA reaguje pouze s primárními aminy (rovnice 7) za vzniku vysoce fluoreskujících derivátů. Reakce probíhá v silně alkalickém prostředí v přítomnosti silného redukčního činidla, jako je např. 2-merkaptoethanol. Reakce probíhá rychle, v průběhu 2 minut, vzniklé deriváty jsou však při pokojové teplotě nestabilní. Nevýhodou tohoto činidla je, že nereaguje s AMK se sekundární aminoskupinou (prolin), to lze řešit přidáním 9-fluorenylmethylchloroformátu (FMOC-Cl) po proběhlé derivatizaci s OPA [49]–[51].



Rovnice 7 Reakce OPA s primární aminokyselinou [50]

Derivatizačním činidlem podobným OPA je naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), který s primárními aminy, v přítomnosti kyanidů, vytváří vysoce fluoreskující isoindolové deriváty. NDA deriváty jsou stabilnější než OPA deriváty [51].

Dalšími derivatizačními činidly, které lze použít pro derivatizaci AMK za vzniku fluoreskujících derivátů jsou 6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC), 5-*N,N*-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid (dansylchlorid) a fluoreskamin [52].

1.9 Suchá kapka

Technika suché kapky se využívá při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických chorob. Krev je odebírána z patičky novorozence na speciální odběrovou kartu.

Pro většinu klinických testů je zapotřebí přibližně 5-10 ml krve, zatímco pro analýzu ze suché kapky pouze několik desítek mikrolitrů. Malé množství vzorku krve je největší výhodou této techniky. Další výhodou jsou nízké nároky na skladování a přepravu vzorků. Odběrovou kartu se suchou kapku krve lze přepravovat v klasické obálce, která je opatřena příslušným označením, zatímco prevoz krve nebo plasmy vyžaduje chlazení. U odběrových karet je výrazně sníženo riziko infekce [53].

K tomu, aby mohla být suchá kapka analyzována, je nutné vyseknout terčík, nejlépe ze středu skvrny a látky z něj extrahovat vhodným organickým rozpouštědlem či vodou. Objem krve v terčíku lze odhadnout na základě jeho průměru a je ovlivněn různými faktory, např. absorpcí filtračního papírku a v případě krve i hematokritem [53].

Na základě techniky suché kapky krve (DBS, z angl. Dried Blood Spot) byla vyvinuta i technika suché kapky mateřského mléka (DMS, z angl. Dried Milk Spot). Výhody této techniky jsou srovnatelné s technikou DBS. Převoz vzorku mateřského mléka získaného odsávačkou vyžaduje chlazení a před analýzou je zapotřebí ho skladovat při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Technikou DMS je odběr mléka jednodušší, filtrační papír lze předem ošetřit stabilizační látkou. Po usušení vzorku mléka při pokojové teplotě, stačí poslat kartičku s DMS do laboratoře poštou. Navíc je odběr mateřského mléka oproti DBS zcela neinvazivní[54, 55].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Acetylchlorid (C_2H_3OCl), Mr 78,50, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Butylovaný hydroxytoluen ($C_{15}H_{24}O$), Mr 220,40, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Deionizovaná voda (H_2O), Mr 18, $G = 0,055 \mu S$

Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát ($Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$), Mr 156,01, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Dichlormethan (CH_2Cl_2), Mr 84,93, (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA)

Ethanol (C_2H_6O), Mr 46,07, (Merck, Darmstadt, Německo)

Chloroform ($CHCl_3$), Mr 119,38, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Isopropylalkohol (C_3H_8O), Mr 60,1, (PENTA, Praha, ČR)

Kyanid draselný (KCN), Mr 65,12, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina boritá (H_3BO_3), Mr 61,83, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina heneikosanová ($C_{21}H_{42}O_2$), Mr 326,55, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina chlorovodíková (HCl), Mr 36,46, $w = 0,36$, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

L-Norleucin ($C_6H_{13}NO_2$), Mr 131,17, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Methanol (CH_4O), Mr 32,04, (Merck, Darmstadt, Německo)

Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd ($C_{12}H_8O_2$), Mr 184,19, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

n-Hexan (C_6H_{12}), Mr 86,18, (Merck, Darmstadt, Německo)

Supelco 37 Component FAME Mix, směs 37 FAME (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

tert-Butylmethylether (C₅H₁₂O), Mr 88,15, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Toluen (C₇H₈), Mr 92,14, (Lach-ner, Neratovice, ČR)

Uhličitan draselný (K₂CO₃), Mr 138,21, (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)

2.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy Adventurer™ Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Automatické pipety (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)

Odstředivka Sorvall TC6 (Sorvall® Instruments, Newtown, CT, USA)

Děrovací kleště, pinzeta

Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Kapalinový chromatograf Prominence (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

- čerpadla LC-20AD
- odplyňovač mobilní fáze DGU-20A
- autosampler SIL-20AC
- termostat kolon CTO-20A
- fluorescenční detektor RF-20A
- řídicí jednotka CBM-20A

Kolona Ascentis® Express C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm, opatřená ochrannou kolonou Ascentis®

Express C18, 5 µm, 5 x 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Software LCSolution, verze 1,25 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Laboratorní sklo (kádinky, zkumavky, odměrné baňky)

Magnetické míchadlo typ MR 3001 K8 (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)

Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Odběrová karta Whatman® Protein Saver Card (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Odpařovací zařízení Reacti-EVAP, model TS-18825 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

pH-metr inoLab, level 2, (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo)

Plynový chromatograf Shimadzu GC-2010 Plus s plamenově-ionizačním detektorem (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Kapilární kolona HP-88, J&W, 100 m x 250 µm x 0,25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Software GC-Solution, verze 2.42.00 SU2 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Polypropylenové zkumavky s víčkem typu Eppendorf, 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Předvážky Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Zkumavky z pyrexového skla a teflonovým těsněním, 10 ml (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Velká Británie)

Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné vialky s krimpovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Termoblok, model 18821 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt, Německo)

Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)

Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

2.3 Pracovní roztoky

Deionizovaná voda

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) byla vyrobena zařízením na úpravu vody Smart2pure. Voda byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě $0,2 \mu\text{m}$.

Pracovní roztok vnitřního standardu (kyselina heneikosanová) v methanolu (asi $10 \mu\text{g/ml}$)

Zásobní roztok heneikosanové kyseliny (asi $100 \mu\text{g/ml}$) byl připraven rozpuštěním navážky 10 mg v 100 ml methanolu. Následně byl připraven pracovní roztok zředěním $0,5 \text{ ml}$ zásobního roztoku v 50 ml methanolu. Roztok byl uchováván při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, maximálně po dobu 1 měsíce.

Roztok uhličitanu draselného (asi 6%)

Navážka 6 g K_2CO_3 byla rozpuštěna v 93 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při $4 \text{ }^\circ\text{C}$, maximálně po dobu 1 měsíce.

Směs hexanu a isopropylalkoholu v poměru 3:2 (v/v)

Směs byla připravena smícháním 3 ml hexanu a 2 ml IPA.

Směs *tert*-butylmethyletheru a methanolu v poměru 3:1 (v/v)

Směs byla připravena smícháním 3 ml TBME a 1 ml methanolu.

Směs toluenu a methanolu v poměru 3:1 (v/v)

Směs byla připravena smícháním 3 ml toluenu a 1 ml methanolu.

Příprava směsi dle Folcha

Směs byla připravena smícháním 4 ml CH_3Cl a 2 ml methanolu.

Směs methanolu a acetylchloridu (19:1, v/v)

Směs pro derivatizaci MK na odpovídající FAME byla připravena smícháním $9,5 \text{ ml}$ methanolu s $500 \mu\text{l}$ acetylchloridu.

Směs 10 mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného a acetonitrilu (95:5, v/v), pH 7,2; mobilní fáze A

V 950 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka $1,35 \text{ g}$ Na_2HPO_4 , poté přidáno 50 ml acetonitrilu a pH upraveno asi 6 mol/l HCl na hodnotu $7,2$.

Směs 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného a acetonitrilu (35:65, v/v), pH 7,2; mobilní fáze B

V 350 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 0,5 g Na₂HPO₄, poté přidáno 650 ml acetonitrilu a pH upraveno asi 6mol/l HCl na hodnotu 7,2.

Borátový pufr (asi 0,1mol/l)

Navážka 0,31 g kyseliny borité byla rozpuštěna v 50 ml deionizované vody a pH upraveno asi 6mol/l NaOH na hodnotu 9,3.

Roztok kyanidu draselného (asi 40mmol/l)

Navážka 0,0130 g KCN byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při 4 °C, maximálně po dobu 1 týdne.

Roztok naftalen-2,4-dikarboxaldehydu v ethanolu (asi 1 mg/ml)

Navážka 0,0050 g NDA byla rozpuštěna v 5 ml ethanolu. Roztok byl uchováván při -80 °C, maximálně po dobu 1 měsíce.

Zásobní roztok vnitřního standardu norleucinu (asi 22,5 mmol/l)

Navážka 0,0295 g norleucinu byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Zásobní roztok byl po 1 ml pipetován do 1,5 ml PP zkumavek a uchováván při -80 °C.

Pracovní roztok vnitřního standardu norleucinu (asi 10 μmol/l)

Objem 90 μl zásobního roztoku norleucinu byl naředěn ethanolem do objemu 10 ml. Tento roztok byl dále 20x naředěn ethanolem v množství potřebném pro přípravu vzorků v jednom dni.

Zásobní roztoky aminokyselin

Zásobní roztoky jednotlivých AMK byly připraveny rozpuštěním navážek v 10 ml deionizované vody, vyjma tyrosinu a kyseliny glutamové, ty byly rozpuštěny v 50 ml deionizované vody (tabulka 4). Zásobní roztoky byly po 1 ml pipetovány do 1,5 ml PP zkumavek a uchovávány při -80 °C.

Tabulka 4 Příprava zásobních roztoků aminokyselin

AMK	Navážka (g)	Koncentrace (mmol/l)	AMK	Navážka (g)	Koncentrace (mmol/l)
Ala	0,0907	101,8	Leu	0,1065	81,2
Arg	0,2101	99,7	Met	0,1440	96,5
Asn	0,1329	100,6	Phe	0,1328	80,4
Asp	0,0283	21,3	Ser	0,1077	102,5
Cit	0,1744	99,5	Tau	0,1271	101,6
Gln	0,1488	101,8	Thr	0,1189	99,8
Glu	0,2215	30,1	Trp	0,0620	30,4
Gly	0,0784	104,4	Tyr	0,0098	1,1
His	0,1568	101,1	Val	0,1141	97,4
Ile	0,1325	101,0			

Směsný pracovní roztok aminokyselin, standard aminokyselin S5

Směsný pracovní roztok AMK byl připraven pipetováním odpovídajícího množství zásobního roztoku jednotlivé AMK (tabulka 5) do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněním po rysku deionizovanou vodou.

Tabulka 5 Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standardu S5

AMK	Objem (μl)	Koncentrace (μmol/l)	AMK	Objem (μl)	Koncentrace (μmol/l)
Ala	370	1507	Leu	230	747
Arg	125	499	Met	25	97
Asn	60	241	Phe	155	498
Asp	590	502	Ser	490	2009
Cit	250	995	Tau	25	102
Gln	125	509	Thr	125	499
Glu	415	500	Trp	415	504
Gly	480	2005	Tyr	2300	100
His	375	1516	Val	195	760
Ile	125	505			

Standardy pro sestavení kalibrační křivky

Jednotlivé standardy pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny ředěním standardu S5 deioniovanou vodou (tabulka 6)

Tabulka 6 Příprava standardů pro sestavení kalibrační křivky

Standard	Standard S5 (μl)	Voda (μl)
S0	0	20
S1	20	380
S2	20	180
S3	20	80
S4	50	50

2.4 Vzorky mateřského mléka a kolostra

Bylo získáno celkem 8 vzorků mleziva od zdravých anonymních dobrovolných dárců z Nemocnice Pardubického kraje a.s., Oddělení šestinedělí. Dalších 9 vzorků zralého mateřského mléka poskytly matky, které kojí déle než měsíc. Matky byly předem poučeny o odběru vzorku a následném uchování odběrové karty do druhého dne. Odběr mléka nebo mleziva byl proveden technikou DMS. Odběrové karty byly rozděleny zvlášť na zóny pro stanovení aminokyselin a mastných kyselin. Zóny, určené pro stanovení mastných kyselin, byly ošetřeny 0,1% roztokem BHT. Vzorky DMS byly uchovávány do doby analýzy při -20 °C.

2.5 Pracovní postup stanovení mastných kyselin v suché kapce mléka

Před samotnou analýzou byla provedena derivatizace MK na odpovídající FAME směsí methanolu a acetylchloridu. FAME byly stanoveny metodou GC s FID.

2.5.1 Příprava vzorku k analýze mastných kyselin plynovou chromatografií (vzorky suché kapky a plasmy)

- **Vzorky plasmy**

Do 1,5ml polypropylenové (PP) zkumavky bylo pipetováno 100 µl plasmy, 100 µl roztoku vnitřního standardu v methanolu (asi 12 µg/ml) a 200 µl vody. Obsah zkumavky byl řádně promíchán a inkubován 5 minut při -20 °C. Poté bylo k směsi přidáno 500 µl n-hexanu a obsah zkumavky řádně třepán na třepače po dobu 5 minut. Následně byla směs odstředěna (2684 x g; 5 min) a horní hexanová vrstva přenesena do zkumavky z pyrexového skla. Extrakce byla opakována a spojené hexanové vrstvy byly odpařeny v atmosféře dusíku při teplotě 50 °C. K odparku bylo pipetováno 1000 µl derivatizačního činidla (směs methanolu a acetylchloridu, 19:1, v/v) a přidáno magnetické míchadlo. Zkumavka byla vložena do termobloku vytemperovaného na 100 °C a se zapnutých mícháním (rychlost 8) a obsah inkubován při 100 °C po dobu 1 hodiny. K vychladlé směsi na laboratorní teplotu bylo pipetováno 2,5 ml 6% K₂CO₃ a směs byla intenzivně třepána po dobu 5 minut. FAME byly extrahovány n-hexanem (2 x 2 ml). Spojené hexanové vrstvy byly odpařeny v atmosféře dusíku (50 °C). Odparek byl rozpuštěn v 100 µl dichlormethanu. Směs byla převedena do insertu vialky a ta uzavřena uzávěrem krimpovacími kleštěmi.

- **Vzorky suché kapky mléka**

Z DMS byl vyseknut terčík o průměru 6 mm a vložen do zkumavky z pyrexového skla. K terčíku bylo poté přidáno 200 µl roztoku vnitřního standardu v methanolu (asi 10 µg/ml) a 300 µl derivatizačního činidla (směs methanolu a acetylchloridu, 19:1, v/v. Obsah zkumavky byl inkubován při 100 °C po dobu 1 hodiny. K vychlazené směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 1250 µl 6% roztoku K₂CO₃ a obsah zkumavky intenzivně třepán 5 minut. FAME byly extrahovány n-hexanem (1 ml), směs byla 5 minut intenzivně třepána, odstředěna (2684 x g, 10 minut) a do čisté zkumavky odebrána horní hexanová vrstva. K zbytku bylo opět přidán 1 ml n-hexanu a extrakce opakována. Spojené hexanové vrstvy byly odpařeny v atmosféře dusíku při 50 °C. Odparek byl rozpuštěn v 100 µl dichlormethanu a směs převedena do insertu vialky a ta uzavřena uzávěrem krimpovacími kleštěmi.

2.5.2 Analytické parametry metod plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Linearita

Linearita je přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Interval mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou stanovované látky, v němž je látka stanovována s určitou přesností, správností a linearitou se nazývá lineární rozsah. Lineární závislost dvou vzájemně zkoumaných veličin lze pak vyjádřit jako

$$y = ax + b,$$

kde a je směrnici kalibrační křivky a b je úsekem na ose y

Důležitým parametrem je tzv. korelační koeficient (R), který charakterizuje těsnost shody dvou analyzovaných proměnných. V případě lineární závislosti nabývá korelační koeficient hodnot ± 1 , přičemž čím více se R blíží jedné, tím těsnější je shoda veličin.

Přesnost

Přesnost je vyjádřena jako shoda mezi opakovanými analýzami téhož vzorku za stejných podmínek. Jako míra přesnosti se používá variační koeficient CV (%).

$$s = \frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}$$
$$CV (\%) = \frac{s}{AVG} \times 100,$$

kde s je směrodatná odchylka, AVG je průměrná hodnota, x_i je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii a n je počet vzorků. Přesnost metody může být ověřena na třech úrovních, opakovatelností (přesnost metody za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu), mezilehlou přesností (shoda výsledků v rámci jedné laboratoře, ale v jiném dni, jiným přístrojem nebo jiným laboratorním pracovníkem) a reprodukovatelností (shoda výsledků mezi různými laboratořemi).

Mez detekce a Mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) spolu úzce souvisí. Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. V separačních metodách se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie.

$$LOQ = \frac{10 \times h}{m}$$

$$LOD = \frac{3 \times h}{m},$$

kde h je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky.

2.5.3 Podmínky pro stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí

Oplach rozpouštědlem: 2x 0,5 µl před nástřikem

Oplach rozpouštědlem: 2x 0,5 µl po nástřiku

Objem dávkovaného vzorku: 0,5 µl

Split mód: 10:1

Teplota nástřiku: 250 °C

Kolona: HP-88, J&W, 100 m x 250 µm x 0,25 µm, stacionární fáze 88 % kyanopropylen a 12 % arylpolysiloxan

Počáteční teplota kolony: 75 °C

Teplotní gradient:

Změna [°C/min]	Teplota [°C]	Čas [min]
-	75	3
10	200	0
0,8	230	5

Délka analýzy: 58 min

Průtok MF (helium): 3 ml/min

Teplota FID: 250 °C

2.6 Postup stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce mléka

Aminokyseliny byly derivatizovány NDA, vzniklé deriváty separovány na reverzní fázi a detegovány fluorescenčním detektorem.

2.6.1 Příprava vzorků

Pro analýzu AMK v DMS byl ze středu odběrové karty vyseknut terčík o průměru 6 mm (odpovídá 10 μ l mléka/kolostra) a umístěn do 1,5 ml PP zkumavky. Na povrch terčíku bylo pipetováno 50 μ l deionizované vody a AMK byly eluovány 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo k terčíku přidáno 150 μ l roztoku norleucinu (asi 10 μ mol/l) a PP zkumavka byla umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázni. Po vyjmutí zkumavky z ultrazvukové lázni byl obsah zkumavky inkubován 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavky odstředěn (1 minuta, 1000 \times g, laboratorní teplota), 100 μ l supernatantu přeneseno do 1,5ml vialky z hnědého skla, přidáno 300 μ l borátového pufru, 20 μ l roztoku KCN a 20 μ l roztoku NDA v ethanolu. Obsah vialky byl řádně promíchán a směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Standardy byly zpracovány stejným způsobem, jen namísto terčíku bylo do 1,5ml PP zkumavky pipetováno 10 μ l (odpovídá objemu mléka/kolostra v 6mm terčíku) jednotlivého směšného standardu AMK a přidáno namísto 50 μ l deionizované vody, jen 40 μ l.

2.6.2 Podmínky pro stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

- Průtok mobilní fáze: 0,75 ml/min
- Tlak na čerpadlech: maximální 20,0 MPa, minimální 2,0 MPa
- Teplota kolony: 37 °C
- Vzorky před nástřikem chlazeny při 8 °C
- Objem dávkovaného vzorku: 5 µl
- Detektor: λ (excitační) 420 nm
 λ (emisní) 480 nm
teplota cely 37 °C
citlivost: nízká
zesílení: $\times 4$
- Eluce: gradientová

Mobilní fáze A: směs acetonitrilu a 10mmol/l Na_2HPO_4 (5:95, v/v), pH 7,2

Mobilní fáze B: směs acetonitrilu a 10mmol/l Na_2HPO_4 (65:35, v/v), pH 7,2

- 0,01 min, 20 % B
- 20,00 min, 32 % B
- 35,00 min, 54,5 % B
- 35,01 min, 100 % B
- 40,00 min, 100 % B
- 40,01 min, 20 % B
- 45,00 min, STOP

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V mateřském mléce, které bylo zpracováno technikou DMS, jsme stanovovali hladiny vybraných MK a AMK. Prvně bylo nutné optimalizovat přípravu vzorku před vlastní analýzou. Důležitou částí přípravy vzorku je derivatizace. Byla testována také extrakce MK a AMK z DMS.

Znalost složení mateřského mléka napomáhá studiu vývoje kojence po porodu a lze na základě této znalosti předejít vzniku různých onemocnění. Saito a kol. využili techniku DMS pro stanovení koncentrace léku podávaného při revmatoidní artritidě. Cílem jejich práce bylo objasnit v jaké míře je novorozenec vystaven danému léčivu. Je nutné testovat i další léčiva podávaná matkám během kojení [56]. K tomuto účelu by mohla dobře posloužit technika DMS, jelikož k analýze stačí jen malý objem vzorku a tím se zabrání plýtvání mateřského mléka, které je pro kojence tak důležité.

3.1 Optimalizace metody stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií s plamenově ionizační detekcí

Při optimalizaci přípravy vzorku před vlastní analýzou byly sledovány hladiny těch MK, které v mateřském mléce dominují. Patří sem zástupci z řad SFA, MUFA a PUFA, jejich seznam je uveden v tabulce 7.

Při derivatizaci vzorku DMS jsme vycházeli ze studie [57].

Tabulka 7 Mastné kyseliny, které se mateřském mléce vyskytují v nejvyšších koncentracích

Zkrácený zápis	Název kyseliny
C14:0	Myristová k.
C16:0	Palmitová k.
C18:0	Stearová k.
<i>cis-9-C16:1</i>	Palmitoolejová k.
<i>cis-9-C18:1</i>	Olejová k.
<i>cis-9,12-C18:2</i>	Linolová k.
<i>cis-9,12,15-C18:3</i>	Linolenová k.
<i>cis-5,8,11,14-C20:4</i>	Arachidonová k.
<i>cis-4,7,10,13,16,19-C22:6</i>	Dokosahexaenová k.

Pro určení nepřesnosti měření a kvantifikaci jednotlivých MK v mateřském mléce, jsme zahrnuli i minoritně zastoupené MK, jejichž seznam je uveden v tabulce 8. Typický chromatografický záznam stanovení mastných kyselin metodou GC-FID je uveden v příloze 7.

Tabulka 8 Minoritně zastoupené mastné kyseliny

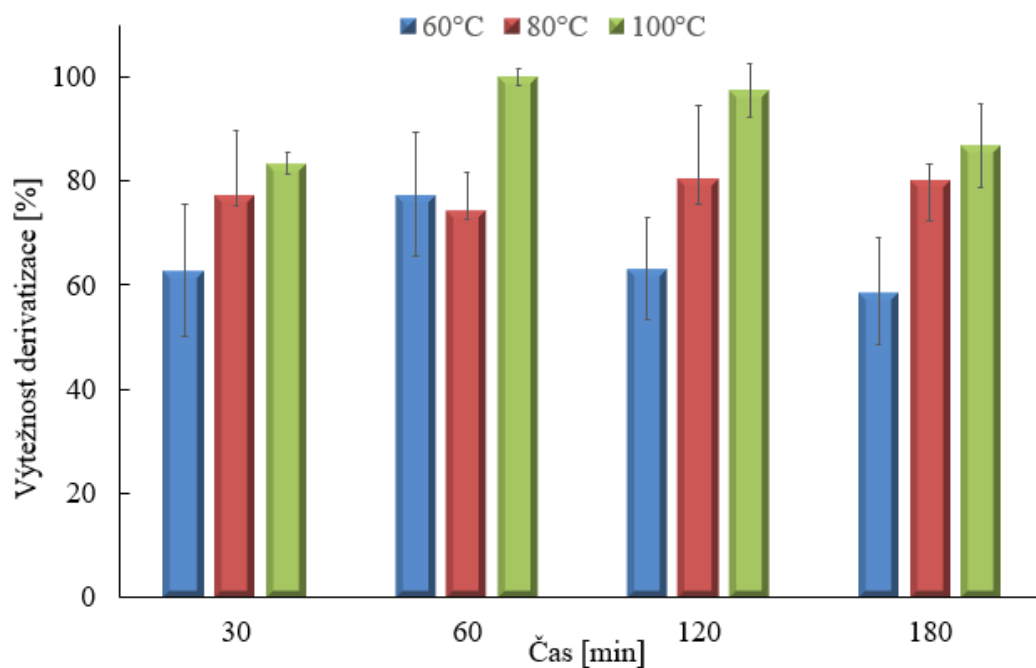
Zkrácený zápis	Název kyseliny
C15:0	Pentadekanová k.
C17:0	Heptadekanová k.
C20:0	Arachová k.
<i>cis-C14:1 n-5</i>	Myristoolejová k.
<i>cis-C20:1 n-9</i>	Eikosenová k.
all-<i>cis</i>-C20:2 n-6	Eikosadienová k.
all-<i>cis</i>-C20:3 n-6	Eikosatrienová k.
all-<i>cis</i>-C20:5 n-3	Eikosapentaenová k.

3.2 Optimalizace derivatizačního kroku mastných kyselin

Byla provedena optimalizace derivatizačního kroku, který probíhal při různých teplotách a v různém čase. Bylo také testováno, jak změna objemu a složení derivatizačního činidla, respektive poměr jeho složek (methanolu a acetylchloridu) ovlivňuje výtěžnost derivatizace MK. Výtěžnost derivatizace MK je uvedena jako relativní výtěžnost vztažená k nejvyšší výtěžnosti derivatizace MK v experimentu.

3.2.1 Optimalizace teploty a doby derivatizačního kroku

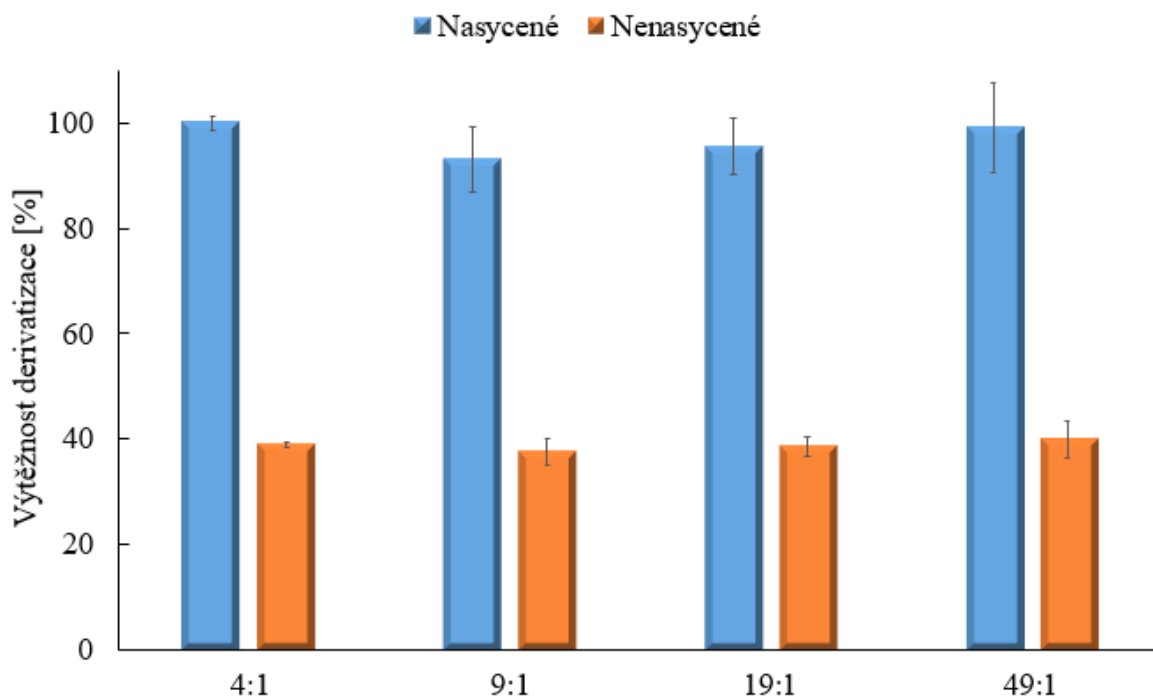
Jelikož výtěžnost derivatizace MK může být ovlivněna teplotou a/nebo dobou reakce, byla optimalizace derivatizačního kroku zaměřena právě na tyto dva parametry. V různých studiích se doba a teplota derivatizace lišily. Obecně lze říci, že se zvyšující se teplotou klesá doba potřebná ke kvantitativnímu provedení derivatizace MK na odpovídající FAME. Gao a kol. použili ve své studii derivatizaci MK při 70 °C po dobu tří hodin [58] a v jiné studii 45 minut při 100 °C [59]. V této práci jsme testovali vliv teploty na výtěžnost derivatizace proběhlé při 60, 80 a 100 °C. Pro každou teplotu byla testována různá doba derivatizace, konkrétně 30, 60, 120 a 180 minut. Z grafu 1 je zřejmé, že výtěžnost derivatizace se po 60 minutách významně nezvyšuje, naopak při teplotě 60 °C a 100 °C dochází k poklesu výtěžnosti se zvyšující se dobou derivatizace. Při derivatizaci tak hraje významnější úlohu teplota než doba, po kterou derivatizace probíhá. Nejvyšší výtěžnosti derivatizace MK bylo dosaženo při teplotě 100 °C, po dobu 60 minut (graf 1). Dosáhli jsme stejných výsledků jako Lepage a Roy [57].



Graf 1 Vliv doby a teploty na výtěžnost derivatizace mastných kyselin

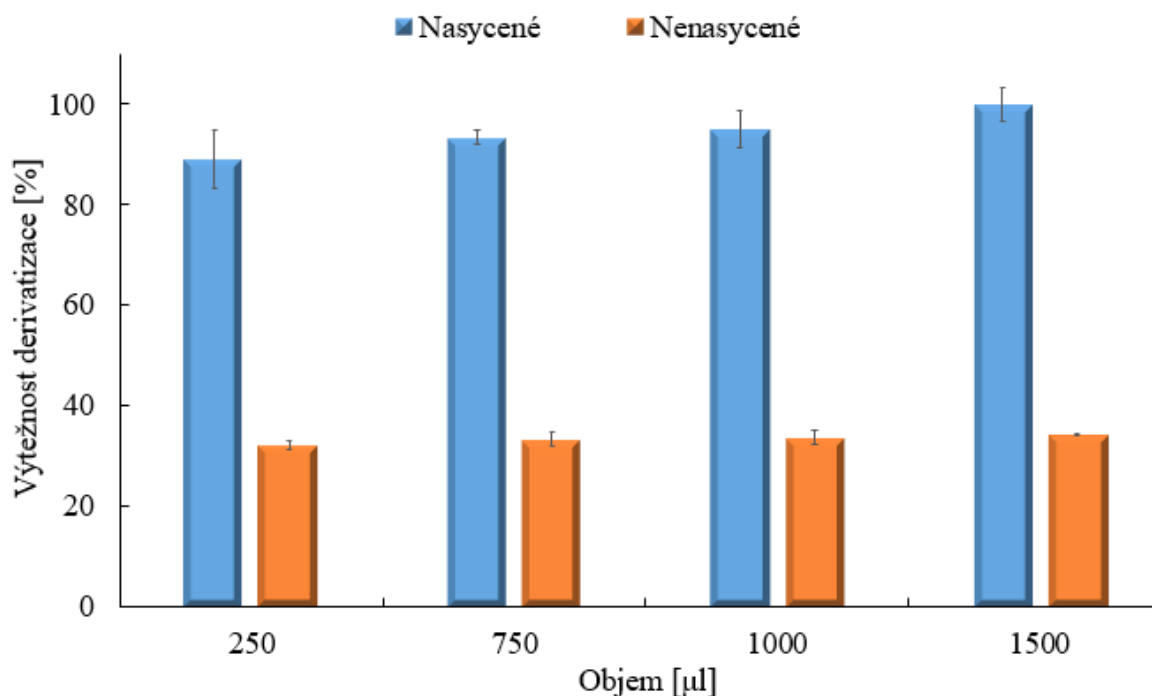
3.2.2 Poměr a objem derivatizačního činidla

Předmětem dalšího zkoumání bylo, jak ovlivňuje objem a složení derivatizačního činidla účinnost derivatizace. K testování byly použity tyto poměry směsi methanolu a acetylchloridu: 4:1, 9:1, 19:1, 49:1 (v/v). Z grafu 2 je patrné, že poměr methanolu a acetylchloridu v reakční směsi nehraje významnou úlohu při ovlivnění výtěžnosti derivatizace. Pro další analýzy jsme zvolili poměr methanolu a acetylchloridu 19:1 (v/v), stejně jako Lillington a kol.[60] a Lepage a Roy [61].



Graf 2 Testování různých poměrů methanolu a acetylchloridu v reakční směsi při derivatizaci MK

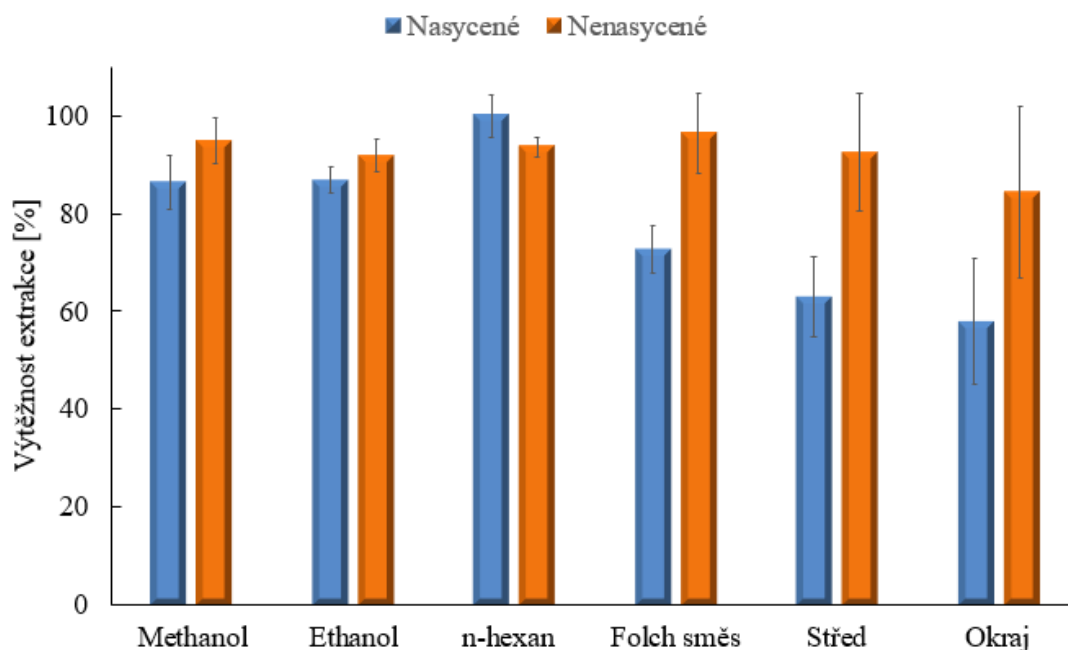
Na základě těchto výsledků bylo následně testováno, zda se mění výtěžnost derivatizace při použití různých objemů derivatizačního činidla smíchaného v poměru 19:1 (v/v). Testované objemy byly 250, 750, 1000 a 1500 μl . Na základě získaných výsledků (graf 3) lze konstatovat, že výtěžnost derivatizace není nijak výrazně ovlivněna množstvím přidávaného derivatizačního činidla.



Graf 3 Testování různých objemů derivatizačního činidla připraveného smícháním methanolu a acetylchloridu v poměru 19:1 (v/v)

3.3 Testování extrakce mastných kyselin ze suché kapky mléka a methylesterů mastných kyselin z reakční směsi

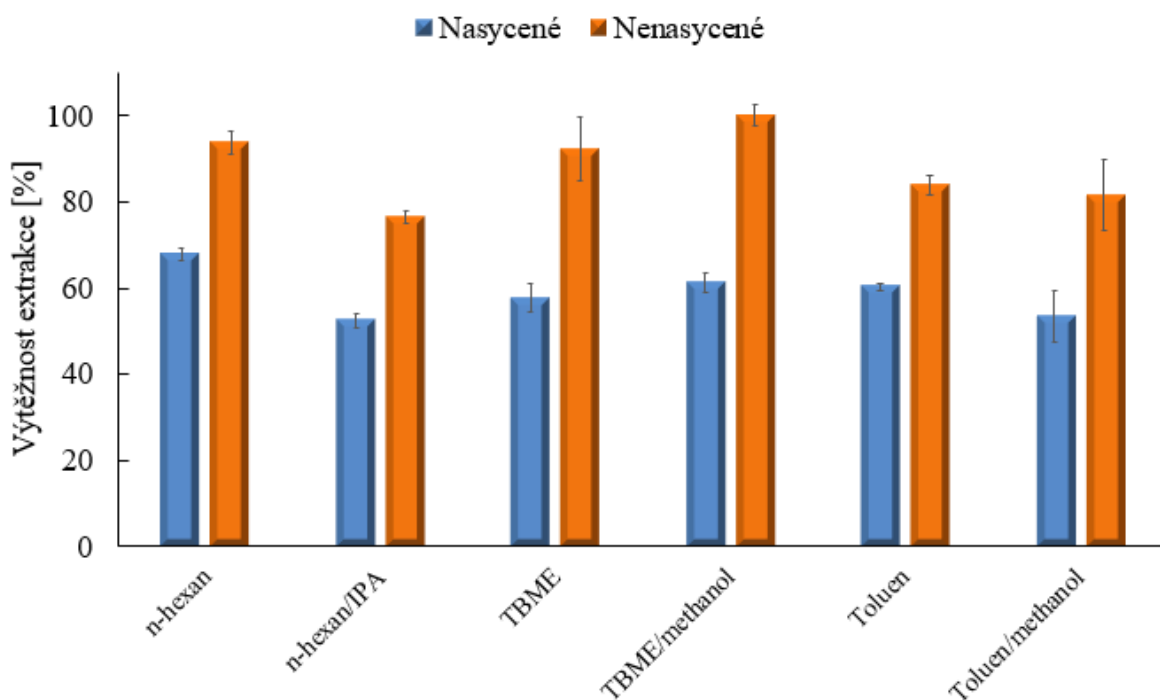
Nejprve jsme testovali extrakci MK z DMS a výsledky porovnávali s přímou derivatizací, bez extrakce. Testovanými extrakčními činidly byly n-hexan, methanol, ethanol a Folchovo činidlo (směs chloroformu a methanolu, 2:1, v/v). Z grafu 4 je patrné, že nejúčinnějším extrakčním činidlem je n-hexan, což se shoduje s výsledky předchozí diplomové práce [62]. Také jsme testovali, zda se hladiny MK budou lišit v závislosti na tom, zda terčík bude vyseknut ze středu či okraje DMS na odběrové kartičce. Zjistili jsme, že pokud je terčík vyseknut z okraje DMS, je výtěžnost MK nižší než, je-li terčík vyseknut ze středu DMS (graf 4). Proto je zapotřebí vždy vysekávat terčík ze středu DMS.



Graf 4 Testování extrakce mastných kyselin ze suché kapky mléka různými extrakčními činidly a vlivu na výtěžnost mastných kyselin, zda byl terčík vyseknut ze středu nebo okraje suché kapky mléka

Folch směs – směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1, (v/v); střed, okraj – terčík vyseknut ze středu nebo okraje suché kapky mléka

Dalším bodem optimalizace byla extrakce FAME. Testovali jsme směs n-hexanu a IPA v poměru 3:2 (v/v), kterou používali ve své práci Hara a Radin [63], směs toluenu a methanolu v poměru 3:1 (v/v), používanou Claytonem a kol. [64] a směs TBME a methanolu v poměru 3:1 (v/v) popsanou ve studii Mathyase a kol. [65]. Testovali jsme také použití samotných organických rozpouštědel, n-hexanu, toluenu a TBME. Z grafu 5 je patrné, že použití samotného toluenu či ve směsi s methanolem nemá zásadní vliv na výtěžnost, jelikož obsah nasyčených a nenasycených MK se příliš nemění. Při porovnání použití směsi TBME a methanolu s použitím samotného TBME, jsme zaznamenali mírný rozdíl ve výtěžnosti, nicméně TBME je při laboratorní teplotě vysoce těkavý a práce s tímto rozpouštědlem je komplikovaná, hrozí vznik chyb při zpracování vzorku. Jako nejvhodnější extrakční činidlo FAME byl zvolen n-hexan. Extrakci lipofilních látek n-hexanem použili ve svých studiích i jiní autoři [53, 59, 62].



Graf 5 Testování extrakce methylesterů mastných kyselin z reakční směsi

3.4 Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v mateřském mléce

V mnoha publikacích je množství MK v biologických vzorcích uváděno jako procentuální zastoupení [57, 58]. My jsme hladiny MK v DMS vyjadřovali v molárních koncentracích ($\mu\text{mol/l}$) určených z tzv. IRF (z angl. Internal Response Factor). Jedná se o jednobodovou kalibraci s využitím vnitřního standardu. Vnitřní standard, který se v analyzovaném vzorku nevyskytuje, ale má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako MK, byl ke všem vzorkům přidáván ve známém množství. V každé sérii měření byla analyzována komerčně dostupná směs FAME se známou koncentrací vnitřního standardu a všech MK. Prvně byly vypočítány IRF pro jednotlivé mastné kyseliny (přílohy 3 a 4) podle vztahu uvedeném v rovnici 8.

$$\text{IRF} = \frac{\text{plocha}_{\text{IS}} \times \text{ctf.konc.}_{\text{MK}}}{\text{ctf.konc.}_{\text{IS}} \times \text{plocha}_{\text{MK}}}$$

Rovnice 8 Vzorec pro výpočet IRF

IS – vnitřní standard; *ctf.konc._{MK}* – certifikovaná koncentrace MK z FAME 37; *ctf.konc._{IS}* – certifikovaná koncentrace vnitřního standardu z FAME 37

Koncentrace jednotlivých MK pak byly vypočítány podle vztahu uvedeném v rovnici 9.

$$\text{Koncentrace MK} = \frac{\text{koncentrace}_{\text{IS}} \times \text{plocha}_{\text{MK}} \times \text{IRF}_{\text{MK}}}{\text{plocha}_{\text{IS}}}$$

Rovnice 9 Vzorec pro výpočet koncentrace mastné kyseliny ve vzorku

V tabulkách 9-10 je shrnuta základní statistická analýza naměřených dat. Hladiny jednotlivých MK ve vzorcích kolostru a zralého mateřského mléka jsou uvedeny v přílohách 1 a 2. Zjistili jsme, že hladina všech sledovaných MK v kolostru (medián = 124 538 $\mu\text{mol/l}$) je výrazně nižší než ve zralém mléce (medián = 221 630 $\mu\text{mol/l}$). Zralé mateřské mléko obsahuje více lipidů, což je v souladu s literaturou [4]. Získaná data jsme statisticky zpracovali v programu Statistica 12, rozdíly v hladinách MK mezi kolostrem a zralém mateřském mlékem jsme testovali metodou Mann-Whitney U testem. Za statisticky významné rozdíly lze považovat ty, kde hladina významnosti $p < 0,05$, v tabulce 9 jsou zvýrazněny červeně. Nejvíce zastoupenou MK v mateřském mléce je kyselina olejová, což potvrzují i jiné studie [68–70].

Tabulka 9 Porovnání hladin vybraných mastných kyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9)

MK	Kolostrum		Zralé mléko		p
	Medián	IQR	Medián	IQR	
C14:0	8088	3951	15113	11925	0,024
C15:0	645	254	840	273	0,061
C16:0	38452	17116	59670	29933	0,018
C17:0	756	305	1015	371	0,039
C18:0	8198	2054	15931	5053	0,002
C20:0	238	65	347	125	0,006
cis-C14:1 n-5	386	228	479	321	0,030
cis-C16:1 n-7	4002	2587	5762	3864	0,039
cis-C18:1 n-9	45360	10119	91161	16273	0,001
all-cis-C18:2 n-6	13718	3570	28952	9898	0,001
all-cis-C18:3 n-3	1095	329	2096	1281	0,011
cis-C20:1 n-9	804	258	899	435	0,736
all-cis-C20:2 n-6	617	257	559	147	0,413
all-cis-C20:3 n-6	671	174	758	337	0,470
all-cis-C20:4 n-6	947	276	1004	478	0,532
all-cis-C20:5 n-3	90	35	138	81	0,014
all-cis-C22:6 n-3	530	146	523	351	0,962

IQR – mezikvartilový rozdíl, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem; p – Mann-Whitneyho U test, hodnoty zvýrazněné červeně jsou statisticky významné ($p < 0,05$). Koncentrace jsou v $\mu\text{mol/l}$.

Jak je z tabulky 9 patrné, hladiny většiny MK se statisticky významně liší v kolostru a zralém mateřském mléku, dle očekávání jsou vyšší hladiny ve zralém mateřském mléce, jelikož mateřské mléko obsahuje celkově více lipidů než kolostrum. Z tohoto důvodu by bylo lepší porovnávat procentuální zastoupení jednotlivých MK v kolostru a mléce (tabulka 10).

Z procentuálního zastoupení lze vypočítat, že v kolostru jsou více zastoupené SFA, v čele s kyselinou palmitovou. Ve zralém mateřském mléce má vyšší zastoupení zejména

kyselina olejová a linolová. V kolostru je významně vyšší zastoupení PUFA řady n-6 a DHA, což může mít vliv na vývoj imunitního systému dítěte. Tyto výsledky a tvrzení se shoduje s literárními údaji [69].

Tabulka 10 Porovnání procentuálního zastoupení vybraných mastných kyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9)

MK	Kolostrum		Zralé mléko		p
	Medián	IQR	Medián	IQR	
C14:0	5,67	1,27	5,09	2,80	0,962
C15:0	0,46	0,04	0,34	0,10	0,024
C16:0	28,68	2,03	25,55	2,87	0,008
C17:0	0,40	0,06	0,32	0,05	0,006
C18:0	6,74	0,68	6,73	1,37	0,885
C20:0	0,24	0,03	0,19	0,02	0,006
<i>cis-C14:1 n-5</i>	0,22	0,05	0,21	0,06	0,665
<i>cis-C16:1 n-7</i>	2,26	1,25	2,21	0,58	0,810
<i>cis-C18:1 n-9</i>	37,19	1,65	39,72	4,15	0,049
all-cis-C18:2 n-6	9,68	1,41	12,94	2,56	0,011
all-cis-C18:3 n-3	0,77	0,21	0,88	0,27	0,532
<i>cis-C20:1 n-9</i>	0,84	0,29	0,44	0,13	0,001
all-cis-C20:2 n-6	0,66	0,22	0,27	0,07	0,001
all-cis-C20:3 n-6	0,50	0,18	0,33	0,09	0,001
all-cis-C20:4 n-6	0,70	0,22	0,42	0,09	0,001
all-cis-C20:5 n-3	0,05	0,01	0,06	0,02	0,885
all-cis-C22:6 n-3	0,38	0,20	0,20	0,05	0,006

IQR – mezikvartilový rozdíl, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem; p – hladina významnosti u Mann-Whitneyho U testu, hodnoty zvýrazněné červeně jsou statisticky významné ($p < 0,05$). Data jsou procentuálním zastoupením jednotlivých mastných kyselin (%)

3.5 Analytické parametry metody plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí

Pro určení nepřesnosti v sérii byl vzorek DMS desetkrát analyzován (10 vzorků stejného mateřského mléka) v ten samý den, za stejných podmínek. Variační koeficienty (CV), vyjadřující nepřesnost metody v sérii jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných mastných kyselin v mateřském mléce a kolostru technikou suché kapky a metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí

MK	AVG	SD	CV [%]
C14:0	7134	692	
C15:0	1684	122	
C16:0	35019	2511	
<i>cis</i> - C16:1 n-7	2969	233	
C17:0	703	47	
C18:0	9787	796	pod 10 %
<i>cis</i> - C18:1 n-9	73405	5338	
C20:0	339	23	
<i>cis</i> - C20:1 n-9	771	54	
<i>all-cis</i> - C20:2 n-6	227	22	
<i>cis</i> - C14:1 n-5	301	31	
<i>all-cis</i> - C18:2 n-6	16979	1891	
<i>all-cis</i> - C18:3 n-3	2134	372	pod 20 %
<i>all-cis</i> - C20:3 n-6	355	42	
<i>all-cis</i> - C20:5 n-3	79	13	
<i>all-cis</i> - C20:4 n-6	476	100	
<i>all-cis</i> - C22:6 n-3	252	79	pod 30 %

AVG – aritmetický průměr; SD - směrodatná odchylka; CV - variační koeficient

U 10 MK ze 17 sledovaných se hodnota variačního koeficientu pohybovala pod 10 %. Většinou to jsou MK, které se v mateřském mléce a kolostru vyskytují ve vyšších koncentracích.

Z důvodu nedostupnosti komerčně dodávaného kontrolního materiálu se známými koncentracemi MK a ani nemožnosti provést výtěžnost metody formou standardních přídavek (nemáme k dispozici standardy všech MK), jsme porovnali námi naměřené koncentrace s literárními údaji. Zjistili jsme, že námi naměřené hladiny MK v mateřském mléce se výrazně neliší od hladin publikovaných jinými autory [70], také námi naměřené hladiny v lidské plazmě jsou podobné s publikovanými daty [71, 72].

3.6 Zastoupení aminokyselin v mateřském mléce

Pozorovali jsme rozdíly mezi koncentracemi AMK v kolostru a zralém mateřském mléce (Tabulka 12). Zjistili jsme, že nejvíce zastoupenou AMK je glutamát, což dokazují i jiné studie [31, 32] a jeho obsah ve zralém mateřském mléce je téměř dvojnásobný než v kolostru. Další majoritně zastoupenou AMK je glutamin, jehož koncentrace ve zralém mléce je výrazně vyšší než v kolostru, což potvrdila i studie Zhang a kol. [31]. Hladina většiny aminokyselin, s výjimkou asparaginu, argininu, threoninu, tyrosinu, tryptofanu, isoleucinu a leucinu, byla vyšší ve zralém mateřském mléce, z toho lze usuzovat to, že složení AMK v mateřském mléce se od počátku kojení mění. Toto tvrzení je podpořeno studií Sadellhoffa a kol [73]. Nejméně zastoupenou AMK je tryptofan, jehož koncentrace nepřesáhla ani u jednoho vzorku 7 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 12 Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v kolostru (n = 8) a zralém mateřském mléce (n = 9) dobrovolných dárcyň

AMK	Kolostrum		Zralé mléko		p*
	Medián	IQR	Medián	IQR	
Asp	28,0	17,0	38,4	6,3	0,092
Glu	395,9	237,7	719,3	144,4	0,018
Asn	14,5	10,6	7,8	8,0	0,532
His	12,4	9,3	20,3	8,8	0,470
Gln	68,4	54,8	238,9	166,1	0,001
Ser	58,3	45,8	72,4	23,8	0,736
Cit	8,5	1,2	11,6	5,0	0,163
Arg	14,7	10,4	7,0	3,3	0,039
Gly	54,8	39,5	79,6	46,1	0,092
Thr	43,8	17,8	39,3	11,3	0,885
Ala	121,1	150,0	161,4	35,7	0,470
Tyr	12,1	8,2	11,8	2,5	0,962
Tau	115,0	101,2	111,7	109,8	0,597
2-AB	5,2	3,6	8,9	1,8	0,014
Val	27,0	15,9	29,6	14,5	0,312
Met	3,7	3,3	3,5	1,0	0,962
Trp	2,9	2,7	2,6	0,9	0,597
Ile	9,3	6,9	7,6	4,5	0,470
Phe	9,5	6,5	10,7	3,7	0,413
Leu	18,4	18,4	18,7	12,7	0,962

IQR – mezikvartilový rozdíl, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem; p – Mann-Whitneyho U test, hodnoty zvýrazněné červeně jsou statisticky významné ($p < 0,05$)

3.7 Analytické parametry metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

3.7.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Pro citlivé a správné stanovení AMK v biologických vzorcích je důležité metodu derivatizace optimalizovat. Optimalizována byla teplota a čas reakce, složení reakční směsi a také množství derivatizačního činidla. V této práci jsme jako derivatizační činidlo použili NDA. Derivatizační krok byl optimalizován k získání maximální výtěžnosti 1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových (CBI) derivátů AMK. Maximální fluorescence byla dosažena po patnáctiminutové inkubaci při laboratorní teplotě, kdy složení reakční směsi bylo následující: 18 µg NDA a 52 µg KCN v 68mmol/l borátovém pufru, pH 9,3. Reakce je celkem rychlá a probíhá již za laboratorní teploty. Zjistili jsme, že stabilita CBI derivátů je minimálně 48 h, pro deriváty většiny AMK dokonce při laboratorní teplotě. Výjimkou jsou deriváty serinu, threoninu a methioninu, jejichž deriváty jsou stabilní pouze po dobu 24 h při 8 °C. Vzniklé deriváty byly detegovány při emisní vlnové délce 480 nm s excitací při 420 nm. Bylo optimalizováno i složení mobilní fáze pro získání relativně nejlepší separace CBI derivátů jednotlivých AMK, v co nejkratším čase. Pro optimalizaci metody byl použit směsný standard AMK a směsný vzorek mateřského mléka potu, který byl smíchaný z několika vzorků mateřského mléka od dárkyň. Byla testována celá řada mobilních fází, především směsi různých pufrů a organických rozpouštědel, jako jsou ACN, methanol a ethanol a řada sekvencí gradientové eluce. Kritéria byla rozlišení, stabilita fluorescence a rychlost analýzy.

3.7.2 Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů

Analýzou jednotlivých standardů AMK byly určeny retenční časy (RT) odpovídajících derivátů AMK. Variační koeficienty retenčních časů se pohybovaly pod 5 %. V příloze 8 je chromatografický záznam stanovení vybraných AMK v lidském mléce metodou HPLC s fluorescenční detekcí, přílohy 8A-8D jsou přiblížením přílohy 8.

3.7.3 Analytické parametry metody stanovení aminokyselin v mateřském mléce

3.7.3.1 Linearita

Pro kvantifikaci hladin vybraných AMK v lidském mléce získaném technikou DMS byla použita metoda kalibrační křivky. Parametry 5 kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 Mez stanovitelnosti, mez detekce a průměrné parametry 5 kalibračních křivek metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

AMK	Směrnice	Intercept	Korelační	LOQ	LOD	Pracovní
	AVG (SD.10 ⁻⁶)	AVG (SD)	koeficient	μmol/l	μmol/l	rozmezí
		μmol/l				μmol/l
Asp	0,0052 (91)	0,0007 (0,0029)	0,9998	5,6	1,8	5,6-212,6
Glu	0,0053 (340)	0,0346 (0,0106)	0,9998	20,1	6,6	20,1-2002,3
Asn	0,0050 (13)	0,0013 (0,0011)	0,9997	2,3	0,8	2,3-201,2
His	0,0048 (12)	0,0038 (0,0018)	0,9996	3,8	1,3	1,3-202,1
Gln	0,0049 (30)	0,0066 (0,0042)	0,9998	8,6	2,8	8,6-509,1
Ser	0,0044 (125)	0,0256 (0,0051)	0,9998	11,5	3,8	11,5-512,4
Cit	0,0058 (9)	0,0153 (0,0029)	0,9992	4,9	1,6	4,9-199,1
Arg	0,0051 (137)	0,0031 (0,0015)	0,9997	3,1	1,0	3,1-199,5
Gly	0,0055 (91)	0,0116 (0,0040)	0,9999	7,2	2,4	7,2-522,2
Thr	0,0045 (116)	0,0133 (0,0020)	0,9998	4,4	1,4	4,4-249,5
Ala	0,0051 (20)	0,0194 (0,0031)	0,9999	6,1	2,0	6,1-1018,1
Tyr	0,0050 (5)	0,0022 (0,0006)	0,9997	1,3	0,4	1,3-97,4
Tau	0,0056 (65)	0,0048 (0,0025)	0,9996	4,5	1,5	4,5-507,8
2-AB	0,0055 (30)	0,0011 (0,0020)	0,9997	3,6	1,2	3,6-205,8
Val	0,0054 (81)	0,0041 (0,0027)	0,9998	5,0	1,6	5,0-243,5
Met	0,0054 (44)	0,0011 (0,0011)	0,9997	2,1	0,7	2,1-193,0
Trp	0,0045 (9)	-0,0004 (0,0008)	0,9998	1,8	0,6	1,8-182,1
Ile	0,0056 (32)	0,0010 (0,0014)	0,9999	2,6	0,9	2,6-202,0
Phe	0,0054 (26)	0,0011 (0,0026)	0,9999	4,9	1,6	4,9-241,2
Leu	0,0055 (39)	0,0023 (0,0017)	0,9999	3,1	1,0	3,1-243,6

Mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) a mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) byly vypočteny z rovnic: $LOQ = 10 S_a/b$; $LOD = 3,3 S_a/b$, kde S_a je standardní odchylka interceptu a b je průměrná směrnice kalibračních křivek; x -intercept (μmol/l) je bod, ve kterém křivka protíná osu x (kde hodnota $y = 0$)

3.7.3.2 Nepřesnost v sérii

Pro určení nepřesnosti v sérii byl vzorek mléka (DMS) desetkrát analyzován (10 vzorků stejného mléka) v ten samý den, za stejných podmínek a při použití jedné kalibrační křivky. Variační koeficienty (CV), vyjadřující nepřesnost metody v sérii jsou uvedeny v tabulce 14. Variační koeficienty nepřesnosti se pohybovaly pod 10 %. Pro biologické vzorky a především pro biologické vzorky získané technikou suché kapky jsou výsledky uspokojivé.

Tabulka 14 Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce technikou suché kapky a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

AMK	AVG ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)	AMK	AVG ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
Asp	74,2	6,8	9,2	Ala	208,9	11,5	5,5
Glu	689,0	52,3	7,6	Tyr	8,2	0,5	6,1
Asn	22,1	2,1	9,5	Tau	201,5	11,1	5,5
His	33,2	2,4	7,2	Val	9,8	0,9	9,2
Gln	201,4	14,9	7,4	Met	35,6	2,0	5,6
Ser	98,9	7,0	7,1	Trp	4,9	0,3	6,1
Cit	10,2	0,8	7,8	Ile	3,1	0,3	9,7
Arg	124,5	8,2	6,6	Phe	8,5	0,3	3,5
Gly	94,5	6,3	6,7	Leu	10,6	0,6	5,7
Thr	66,9	4,1	6,1				

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo potvrdit aplikovatelnost metod stanovení mastných kyselin a aminokyselin ve vzorcích mateřského mléka a kolostra získaných technikou suché kapky. Mastné kyseliny byly převedeny na odpovídající methylestery a analyzovány metodou plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detekcí. Aminokyseliny byly derivatizovány naftalen-2,3-dikarboxaldehydem na odpovídající 1-kyano-2-substituované-benz[*f*]isoindolové deriváty, které byly separovány v systému obrácených fází a detegovány fluorescenčním detektorem. I když bylo analyzováno pouze 17 vzorků mateřského mléka nebo kolostra, lze konstatovat, že prezentované metody jsou dostatečně citlivé pro stanovení mastných kyselin a aminokyselin ve vzorcích mateřského mléka a kolostra získanými technikou suché kapky.

5 SEZNAM LITERATURY

- [1] C. Martin, P.-R. Ling, and G. Blackburn, “Review of Infant Feeding : Key Features of Breast Milk and Infant Formula,” vol. 8, no. 5, pp. 1–11, 2016.
- [2] B. T. Gura, “Nature’s first functional food,” vol. 345, no. 6198, pp. 747–749, 2014.
- [3] S. Truchet and E. Honvo-Houéto, “Physiology of milk secretion,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 31, no. 4, pp. 367–384, 2017.
- [4] A. Klimová, Z. Brázdová, and A. Mydlilová, *Kojení - dar pro život*. Praha: Grada, 1998.
- [5] M. C. Neville, J. Morton, and S. Umemura, “Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation,” *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 48, no. 1, pp. 35–52, 2001.
- [6] M. Boss, H. Gardner, and P. Hartmann, “Normal Human Lactation: Closing the gap [version 1; referees: 4 approved],” *F1000Research*, vol. 7, no. 0, 2018.
- [7] W. W. Pang and P. E. Hartmann, “Initiation of human lactation: Secretory differentiation and secretory activation,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 12, no. 4, pp. 211–221, 2007.
- [8] J. C. Kent, “How Breastfeeding Works,” *J. Midwifery Women’s Heal.*, vol. 52, no. 6, pp. 564–570, 2007.
- [9] R. Lawrence and R. Lawrence M., *Breastfeeding*, 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.
- [10] O. Ballard JD, PhD and A. L. Morrow PhD, MSc, “Human milk composition: Nutrients and Bioactive factors,” vol. 60, no. 1, pp. 1–24, 2014.
- [11] G. M. Hendricks and M. Guo, *Bioactive components in human milk*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [12] D. K. Layman, B. Lönnerdal, and J. D. Fernstrom, “Applications for a-lactalbumin in human nutrition,” *Nutr. Rev.*, vol. 76, no. 6, pp. 444–460, 2018.
- [13] F. Giansanti, G. Panella, L. Leboffe, and G. Antonini, “Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties,” *Pharmaceuticals*, vol. 9, no. 4, pp. 1–15, 2016.
- [14] D. Rai, A. S. Adelman, W. Zhuang, G. P. Rai, J. Boettcher, and B. Lönnerdal, “Longitudinal Changes in Lactoferrin Concentrations in Human Milk: A Global

- Systematic Review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 54, no. 12, pp. 1539–1547, 2014.
- [15] B. Lönnerdal, “Bioactive proteins in breast milk,” *J. Paediatr. Child Health*, vol. 49, no. SUPPL. 1, pp. 1–7, 2013.
- [16] N. J. Andreas, B. Kampmann, and K. Mehring Le-Doare, “Human breast milk: A review on its composition and bioactivity,” *Early Hum. Dev.*, vol. 91, no. 11, pp. 629–635, 2015.
- [17] B. Koletzko, M. Rodriguez-Palmero, H. Demmelmair, N. Fidler, R. Jensen, and T. Sauerwald, “Physiological aspects of human milk lipids,” *Early Hum. Dev.*, vol. 65, no. SUPPL. 2, pp. 3–18, 2001.
- [18] V. J. Sinanoglou *et al.*, “Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study,” *PLoS One*, vol. 12, no. 4, pp. 1–14, 2017.
- [19] X. Q. Zou *et al.*, “Human milk fat globules from different stages of lactation: A lipid composition analysis and microstructure characterization,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 29, pp. 7158–7167, 2012.
- [20] R. Valenzuela and A. Valenzuela, *Lipid Metabolism - Overview about lipid structure*. 2013.
- [21] W. M. N. Ratnayake and C. Galli, “Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper,” *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 55, no. 1–3, pp. 8–43, 2009.
- [22] E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, and A. Zak, “Fatty Acids As Biocompounds: Their Role In Human Metabolism, Health And Disease - A Review. Part 1: Classification, Dietary Sources And Biological Functions,” *Biomed. Pap.*, vol. 155, no. 2, pp. 117–130, Jun. 2011.
- [23] J. Zhu and J. Luo, “The Synthesis of Milk Medium-Chain Fatty Acids in Mammary Gland,” *Fat. Acids*, 2017.
- [24] M. C. Barber, R. A. Clegg, M. T. Travers, and R. G. Vernon, “Lipid metabolism in the lactating mammary gland,” *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1347, no. 2–3, pp. 101–126, 1997.
- [25] N. V. Bhagavan and C.-E. Ha, *Essentials of Medical Biochemistry*. USA: Academic Press, 2011.

- [26] R. K. Murray, K. D. Granner, A. P. Mayes, and W. V. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th ed. USA, 2003.
- [27] J. Lee, H. Lee, S. Kang, and W. Park, "Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances," *Nutrients*, vol. 8, no. 1, p. 23, Jan. 2016.
- [28] J. Vergilio Visentainer *et al.*, "Lipids and Fatty Acids in Human Milk: Benefits and Analysis," *Biochem. Heal. Benefits Fat. Acids*, pp. 1–21, 2018.
- [29] K. Miliku *et al.*, "Human milk fatty acid composition is associated with dietary, genetic, sociodemographic, and environmental factors in the CHILD Cohort Study," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 110, no. 6, pp. 1370–1383, 2019.
- [30] D. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed. New York: Freeman, 2005.
- [31] Z. Zhang, A. S. Adelman, D. Rai, and J. Boettcher, "Amino Acid Profiles in Term and Preterm Human Milk through Lactation: A Systematic Review," vol. 5, no. 12, pp. 4800–4821, 2013.
- [32] C. Agostoni, B. Carratù, C. Boniglia, A. M. Lammardo, E. Riva, and E. Sanzini, "Free glutamine and glutamic acid increase in human milk through a three-month lactation period," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 31, no. 5, pp. 508–512, 2000.
- [33] J. H. J. van Sadelhoff, D. Mastorakou, H. Weenen, B. Stahl, J. Garssen, and A. Hartog, "Short communication: Differences in levels of free amino acids and total protein in human foremilk and hindmilk," *Nutrients*, vol. 10, no. 12, 2018.
- [34] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, 2. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.
- [35] M. H. McNair and M. J. Miller, *Basic Gas Chromatography*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1997.
- [36] G. Moros and G. Helen, "Investigation of the derivatization conditions for GC – MS metabolomics of biological samples," vol. 9, no. 1, pp. 53–65, 2017.
- [37] O. E. Petrova and K. Sauer, "High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP," 2017, pp. 33–43.
- [38] S. Fanali, R. P. Haddad, M.-L. Riekkola, and C. Poole, *Liquid Chromatography:*

Fundamentals and Instrumentation. USA: Elsevier, 2017.

- [39] K. Bielawska, I. Dziakowska, and W. Roszkowska-Jakimiec, "Chromatographic determination of fatty acids in biological material," *Toxicol. Mech. Methods*, vol. 20, no. 9, pp. 526–537, 2010.
- [40] W. A. Yehye *et al.*, "Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 101, pp. 295–312, 2015.
- [41] D. T. Mannion, A. Furey, and K. N. Kilcawley, "Free fatty acids quantification in dairy products," *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [42] W. P. Chen, X. Y. Yang, A. D. Hegeman, W. M. Gray, and J. D. Cohen, "Microscale analysis of amino acids using gas chromatography-mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 878, no. 24, pp. 2199–2208, 2010.
- [43] H. Wang, Y. R. McNeil, T. W. Yeo, and N. M. Anstey, "Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection," *J. Chromatogr. B*, vol. 940, pp. 53–58, Dec. 2013.
- [44] A. P. Carvalho and F. X. Malcata, "Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: Insight studies," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 13, pp. 5049–5059, 2005.
- [45] A. I. Carrapiso and C. García, "Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and in situ transesterification," *Lipids*, vol. 35, no. 11, pp. 1167–1177, 2000.
- [46] K. Ichihara and Y. Fukubayashi, "Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography," *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 635–640, 2010.
- [47] W. W. Christie, "Preparation of fatty acid methyl esters," *Int. News Fats, Oils Relat. Matters*, vol. 3, no. 9, pp. 1031–1034, 1993.
- [48] E. Jiménez-Martín, J. Ruiz, T. Pérez-Palacios, A. Silva, and T. Antequera, "Gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl- tert -butylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food," *J. Agric.*

Food Chem., vol. 60, no. 10, pp. 2456–2463, 2012.

- [49] P. Herbert, L. Santos, and A. Alves, “Simultaneous quantification of primary, secondary amino acids, and biogenic amines in musts and wines using OPA/3-MPA/FMOC-Cl fluorescent derivatives,” *J. Food Sci.*, vol. 66, no. 9, pp. 1319–1325, 2001.
- [50] M. A. Martin, B. Lin, and B. Del Castillo, “The use of fluorescent probes in pharmaceutical analysis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 6, no. 6–8, pp. 573–583, 1988.
- [51] G. Rammouz, M. Lacroix, J. C. Garrigues, V. Poinso, and F. Gourdec, “The use of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 21, pp. 1223–1239, 2007.
- [52] M. Arnao, M. Acosta, and A. Cano, “Antioxidant Activity: An Adaptation for Measurement by HPLC,” pp. 1–6, 2002.
- [53] D. H. Chace, V. R. De Jesús, and A. R. Spitzer, “Clinical chemistry and dried blood spots: increasing laboratory utilization by improved understanding of quantitative challenges,” *Bioanalysis*, vol. 6, no. 21, pp. 2791–2794, Nov. 2014.
- [54] A. Olagunju *et al.*, “Validation and clinical application of a method to quantify nevirapine in dried blood spots and dried breast-milk spots,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 10, pp. 2816–2822, Oct. 2015.
- [55] M. C. Rudolph, B. E. Young, K. H. Jackson, N. F. Krebs, W. S. Harris, and P. S. MacLean, “Human Milk Fatty Acid Composition: Comparison of Novel Dried Milk Spot Versus Standard Liquid Extraction Methods,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 21, no. 3–4, pp. 131–138, 2016.
- [56] J. Saito *et al.*, “Clinical application of the dried milk spot method for measuring tocilizumab concentrations in the breast milk of patients with rheumatoid arthritis,” no. December 2018, pp. 1–8, 2019.
- [57] G. Lepage and C. C. Roy, “Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction,” *J. Lipid Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 114–20, 1986.
- [58] C. GAO *et al.*, “Comparison of breast milk fatty acid composition from mothers of premature infants of three countries using novel dried milk spot technology,”

Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids, vol. 139, no. August, pp. 3–8, 2018.

- [59] K. H. Jackson, J. Polreis, L. Sanborn, D. Chaima, and W. S. Harris, “Analysis of breast milk fatty acid composition using dried milk samples,” *Int. Breastfeed. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [60] J. M. Lillington, D. J. H. Trafford, and H. L. J. Makin, “A rapid and simple method for the esterification of fatty acids and steroid carboxylic acids prior to gas-liquid chromatography,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 111, no. 1, pp. 91–98, 1981.
- [61] G. Lepage and C. C. Roy, “Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification,” *J. Lipid Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 1391–1396, 1984.
- [62] Z. Řeháková, “Stanovení vybraných mastných kyselin v suché kapce krve plynovou chromatografií,” p. 81, 2015.
- [63] A. Hara and N. S. Radin, “Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent,” *Anal. Biochem.*, vol. 90, no. 1, pp. 420–426, 1978.
- [64] E. H. Clayton, C. E. Gulliver, J. W. Piltz, R. D. Taylor, R. J. Blake, and R. G. Meyer, “Improved extraction of saturated fatty acids but not omega-3 fatty acids from sheep red blood cells using a one-step extraction procedure,” *Lipids*, vol. 47, no. 7, pp. 719–727, 2012.
- [65] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, and D. Schwudke, “Lipid extraction by methyl-terf-butyl ether for high-throughput lipidomics,” *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 1137–1146, 2008.
- [66] J. Shan *et al.*, “The Fatty Acids Composition of Human Milk in Different Lactation Stages of Chinese Population,” *Curr. Dev. Nutr.*, vol. 4, no. Supplement_2, pp. 775–775, 2020.
- [67] L. Aumeistere, I. Ciproviča, D. Zavadská, J. Andersons, V. Volkovs, and K. Ceļmalniece, “Impact of maternal diet on human milk composition among lactating women in Latvia,” *Med.*, vol. 55, no. 5, pp. 1–12, 2019.
- [68] L. P. Siziba *et al.*, “Changes in human milk fatty acid composition during lactation: The ulm SPATZ health study,” *Nutrients*, vol. 11, no. 12, 2019.

- [69] R. de Souza Santos da Costa *et al.*, “trans Fatty Acids in Colostrum, Mature Milk and Diet of Lactating Adolescents,” *Lipids*, vol. 51, no. 12, pp. 1363–1373, 2016.
- [70] C. Cruz-Hernandez, S. Goeuriot, F. Giuffrida, S. K. Thakkar, and F. Destailats, “Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1284, pp. 174–179, 2013.
- [71] S. A. Abdelmagid *et al.*, “Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy canadian adults,” *PLoS One*, vol. 10, no. 2, pp. 1–16, 2015.
- [72] S. A. Lagerstedt, D. R. Hinrichs, S. M. Batt, M. J. Magera, P. Rinaldo, and J. P. McConnell, “Quantitative determination of plasma C8-C26 total fatty acids for the biochemical diagnosis of nutritional and metabolic disorders,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 73, no. 1, pp. 38–45, 2001.
- [73] J. H. J. van Sadelhoff *et al.*, “Longitudinal variation of amino acid levels in human milk and their associations with infant gender,” *Nutrients*, vol. 10, no. 9, pp. 1–13, 2018.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 <i>Hladiny mastných kyselin ve vzorcích kolostra, získaných technikou suché kapky</i> ..	76
Příloha 2 <i>Hladiny mastných kyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka, získaných technikou suché kapky</i>	77
Příloha 3 <i>IRF mastných kyselin vyskytujících se v mateřském mléce a kolostru ve vyšších koncentracích</i>	78
Příloha 4 <i>IRF mastných kyselin vyskytujících se v mateřském mléce a kolostru v nižších koncentracích</i>	78
Příloha 5 <i>Hladiny aminokyselin ve vzorcích kolostra, získaných technikou suché kapky</i>	79
Příloha 6 <i>Hladiny aminokyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka, získaných technikou suché kapky</i>	80
Příloha 7 <i>Typický chromatografický záznam stanovení mastných kyselin ve vzorku mateřského mléka, získaného technikou suché kapky</i>	81
Příloha 8 <i>Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[<i>f</i>]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky</i>	88

Příloha 1 Hladiny mastných kyselin ve vzorcích kolostra, získaných technikou suché kapky

MK	Koncentrace MK [$\mu\text{mol/l}$]							
C14:0	4716	12926	10517	9013	10162	7163	6826	3872
C15:0	380	850	914	529	668	622	711	367
C16:0	18526	55408	47743	34388	48781	36211	40693	20378
C17:0	396	1062	1108	592	793	719	800	467
C18:0	5489	11974	10147	7851	8812	7625	8545	4585
C20:0	221	326	328	284	238	238	232	144
<i>cis</i> - C14:1 n-5	170	474	397	211	462	418	374	167
<i>cis</i> - C16:1 n-7	1130	4000	4003	2086	5635	4506	4722	1631
<i>cis</i> - C18:1 n-9	21508	49511	59146	43644	48066	42801	47075	24831
<i>all-cis</i> - C18:2 n-6	4611	14557	16908	16312	13282	14153	12904	6993
<i>all-cis</i> - C18:3 n-3	432	1236	1848	1194	1054	1136	1004	492
<i>cis</i> - C20:1 n-9	661	844	1465	1089	746	764	947	595
<i>all-cis</i> - C20:2 n-6	437	558	1084	1158	583	694	650	462
<i>all-cis</i> - C20:3 n-6	540	662	885	925	750	634	681	483
<i>all-cis</i> - C20:4 n-6	534	1019	1012	1399	882	792	1032	611
<i>all-cis</i> - C20:5 n-3	31	158	105	69	89	92	92	34
<i>all-cis</i> - C22:6 n-3	562	385	815	439	546	377	602	513

Příloha 2 Hladiny mastných kyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka, získaných technikou suché kapky

MK	Koncentrace MK [$\mu\text{mol/l}$]								
C14:0	25676	19328	21591	9463	9556	15113	9666	9848	23386
C15:0	1366	207	1725	782	785	1031	774	840	1056
C16:0	75421	40656	76925	52497	46140	76073	41706	59670	76879
C17:0	1441	525	1490	1015	894	1265	860	1007	1250
C18:0	25999	11773	15931	16826	11705	15956	11469	14972	18216
C20:0	545	290	414	333	282	398	287	347	498
<i>cis</i> - C14:1 n-5	916	188	1179	413	450	657	497	440	762
<i>cis</i> - C16:1 n-7	6713	4887	7891	3785	3855	9614	4027	5762	8574
<i>cis</i> - C18:1 n-9	97527	83765	91161	77845	53971	94117	72364	93144	108550
<i>all-cis</i> - C18:2 n-6	35295	38414	28952	28516	24108	23668	46135	28921	38655
<i>all-cis</i> - C18:3 n-3	545	290	414	333	282	398	287	347	498
<i>cis</i> - C20:1 n-9	899	883	1157	723	483	1137	547	1164	1213
<i>all-cis</i> - C20:2 n-6	594	638	740	456	438	647	531	491	559
<i>all-cis</i> - C20:3 n-6	704	582	1042	395	572	918	758	800	941
<i>all-cis</i> - C20:4 n-6	1004	908	1094	724	709	1367	776	1254	1417
<i>all-cis</i> - C20:5 n-3	138	140	497	80	118	198	115	122	270
<i>all-cis</i> - C22:6 n-3	615	459	1329	281	271	702	305	523	657

Příloha 3 IRF mastných kyselin vyskytujících se v mateřském mléce a kolostru ve vyšších koncentracích

MK	RT [min]	IRF
C14:0	19,86	1,00
C16:0	20,627	1,05
C18:0	20,81	1,03
cis-9-C16:1	22,58	1,03
cis-9-C18:1	22,91	1,55
cis-9,12-C18:2	24,14	0,99
cis-9,12,15-C18:3	24,97	0,98
cis-5,8,11,14-C20:4	32,37	1,15
cis-4,7,10,13,16,19-C22:6	26,30	1,06

RT – retenční čas; IRF – z angl. internal response factor

Příloha 4 IRF mastných kyselin vyskytujících se v mateřském mléce a kolostru v nižších koncentracích

MK	RT [min]	IRF
C15:0	20,81	1,03
C17:0	22,91	0,98
C20:0	27,04	1,03
cis-C14:1 n-5	20,62	1,05
cis-C20:1 n-9	20,81	1,03
all-cis-C20:2 n-6	21,83	0,98
all-cis-C20:3 n-6	22,58	1,03
all-cis-C20:5 n-3	22,91	1,55

RT – retenční čas; IRF – z angl. internal response factor

Příloha 5 Hladiny aminokyselin ve vzorcích kolostra, získaných technikou suché kapky

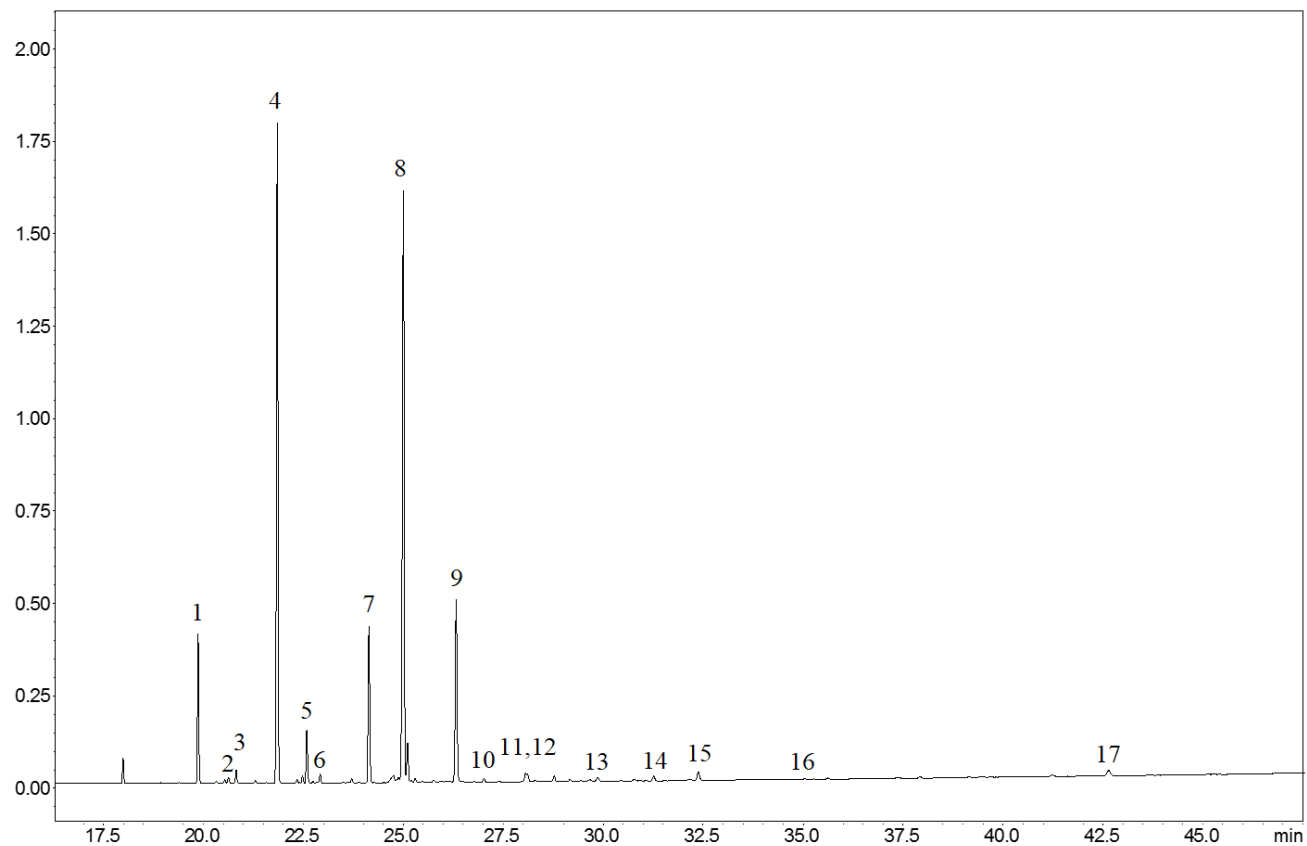
AMK	Koncentrace AMK [$\mu\text{mol/l}$]							
Asp	13,5	8,9	58,6	31,7	35,6	38,9	24,3	21,4
Glu	94,5	138,0	836,1	302,3	599,2	457,2	465,5	334,7
Asn	4,8	3,3	25,6	13,1	23,5	15,9	17,2	9,4
His	8,4	5,2	30,8	30,3	16,6	12,5	12,3	11,6
Gln	35,6	54,0	7,5	74,9	151,3	90,9	144,2	62,0
Ser	47,7	29,8	127,6	128,5	83,8	56,1	60,5	49,4
Cit	8,8	4,7	7,5	21,0	8,7	10,0	8,1	8,4
Arg	17,2	4,4	25,1	65,6	12,5	6,8	9,5	16,9
Gly	35,7	23,7	80,4	134,5	83,4	43,6	58,5	51,2
Thr	24,6	21,7	105,5	50,3	50,6	36,9	54,6	37,3
Ala	54,0	115,8	259,2	81,0	296,5	229,8	126,4	89,2
Tyr	5,5	5,5	18,6	19,3	15,0	12,5	8,4	11,7
Tau	268,7	42,0	179,4	129,7	86,5	100,3	69,1	194,9
2 AB	1,6	2,4	4,7	0,6	12,1	5,7	6,2	5,6
Val	11,8	14,6	53,4	36,4	36,4	27,2	22,5	26,7
Met	1,4	1,6	7,9	6,2	5,4	3,6	2,6	3,8
Trp	1,8	1,1	5,9	6,3	4,2	2,6	2,0	3,1
Ile	4,9	4,3	22,3	18,2	12,6	8,0	7,8	10,6
Phe	4,4	5,2	19,3	14,2	14,7	9,5	9,5	8,7
Leu	8,2	8,9	42,0	40,1	28,5	16,9	14,3	20,0

Cit - citrulin; Tau - taurin; 2-AB – 2-aminomáselná kyselina

Příloha 6 Hladiny aminokyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka, získaných technikou suché kapky

AMK	Koncentrace AMK [$\mu\text{mol/l}$]								
Asp	38,4	26,6	33,9	50,1	36,3	35,0	41,3	39,2	48,8
Glu	790,7	656,8	461,6	743,7	719,3	602,5	512,1	746,9	952,0
Asn	9,6	21,8	14,6	6,6	6,4	7,8	6,6	5,8	21,3
His	21,9	12,0	20,5	12,1	20,3	23,1	10,7	18,6	20,9
Gln	603,7	214,9	106,5	308,6	395,1	167,0	238,9	219,2	381,0
Ser	123,4	80,1	53,6	75,4	72,4	54,4	51,4	78,1	67,1
Cit	14,6	10,2	7,3	11,6	19,4	6,2	11,2	15,2	16,9
Arg	10,7	6,7	4,6	5,3	9,2	7,5	3,8	7,0	8,6
Gly	115,7	170,8	62,5	69,6	73,2	62,6	79,6	86,5	134,1
Thr	90,3	42,9	32,2	39,3	55,3	43,5	28,2	29,0	35,2
Ala	176,9	140,7	130,2	137,8	167,4	173,6	116,3	161,4	226,4
Tyr	17,3	11,8	6,4	9,1	14,5	12,7	11,3	10,3	12,0
Tau	210,9	144,3	88,5	111,7	91,6	201,4	93,1	88,5	233,7
2 AB	20,6	5,9	7,6	9,1	9,7	8,1	5,8	9,4	8,9
Val	70,8	19,9	24,2	26,0	38,6	40,5	28,5	29,6	40,5
Met	6,1	2,7	3,2	5,3	4,0	3,5	3,0	3,3	4,2
Trp	3,3	2,0	2,0	1,7	3,1	2,6	2,0	2,8	2,6
Ile	16,3	7,3	5,3	4,9	11,9	9,0	5,8	7,6	10,3
Phe	14,9	9,1	9,6	10,0	15,5	12,7	8,7	10,7	13,3
Leu	37,6	14,9	11,9	13,8	27,0	21,5	14,3	18,7	28,5

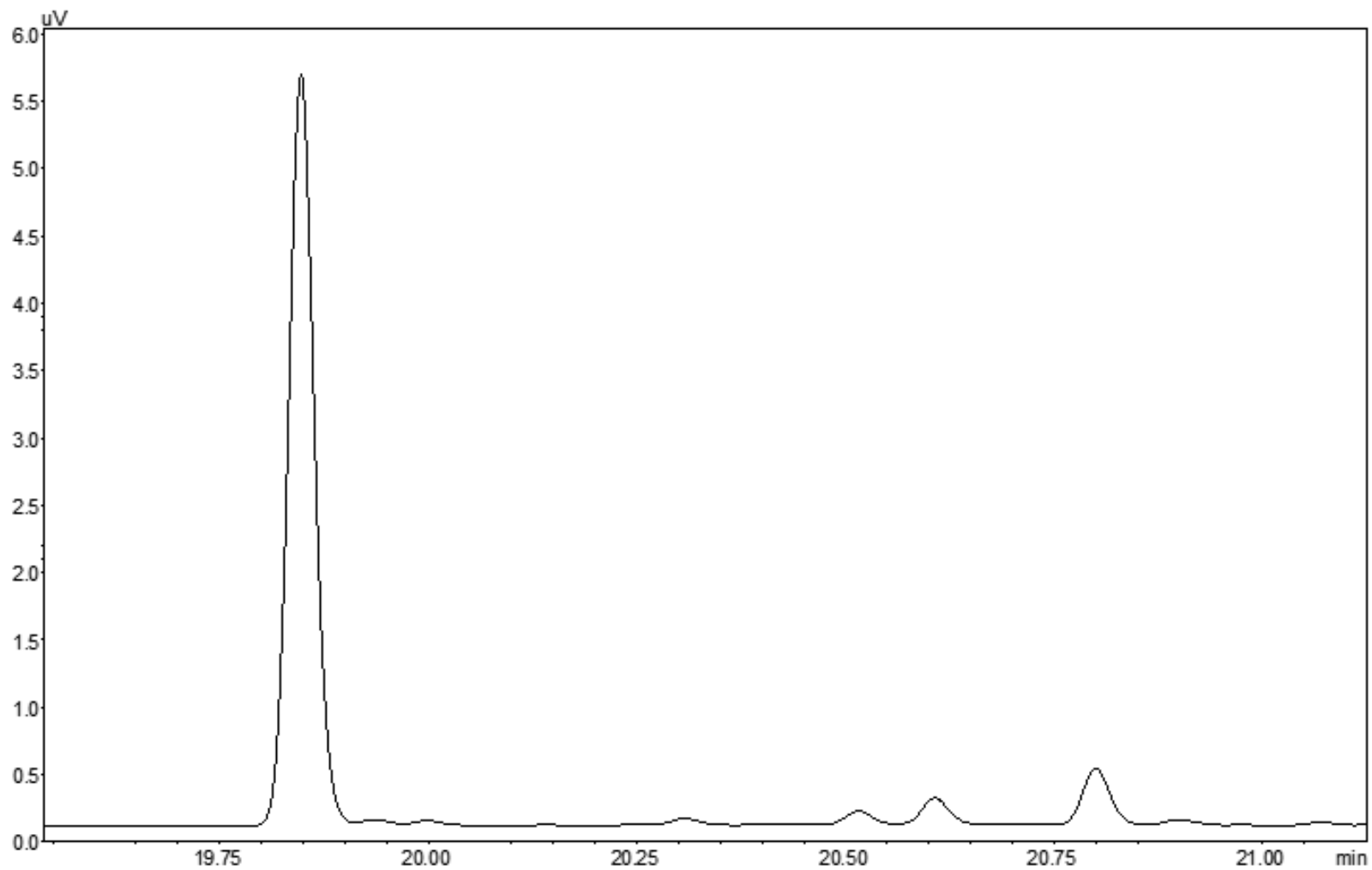
Cit - citrulin; Tau - taurin; 2-AB – 2-aminomáselná kyselina



Příloha 7 Typický chromatografický záznam stanovení mastných kyselin ve vzorku mateřského mléka, získaného technikou suché kapky

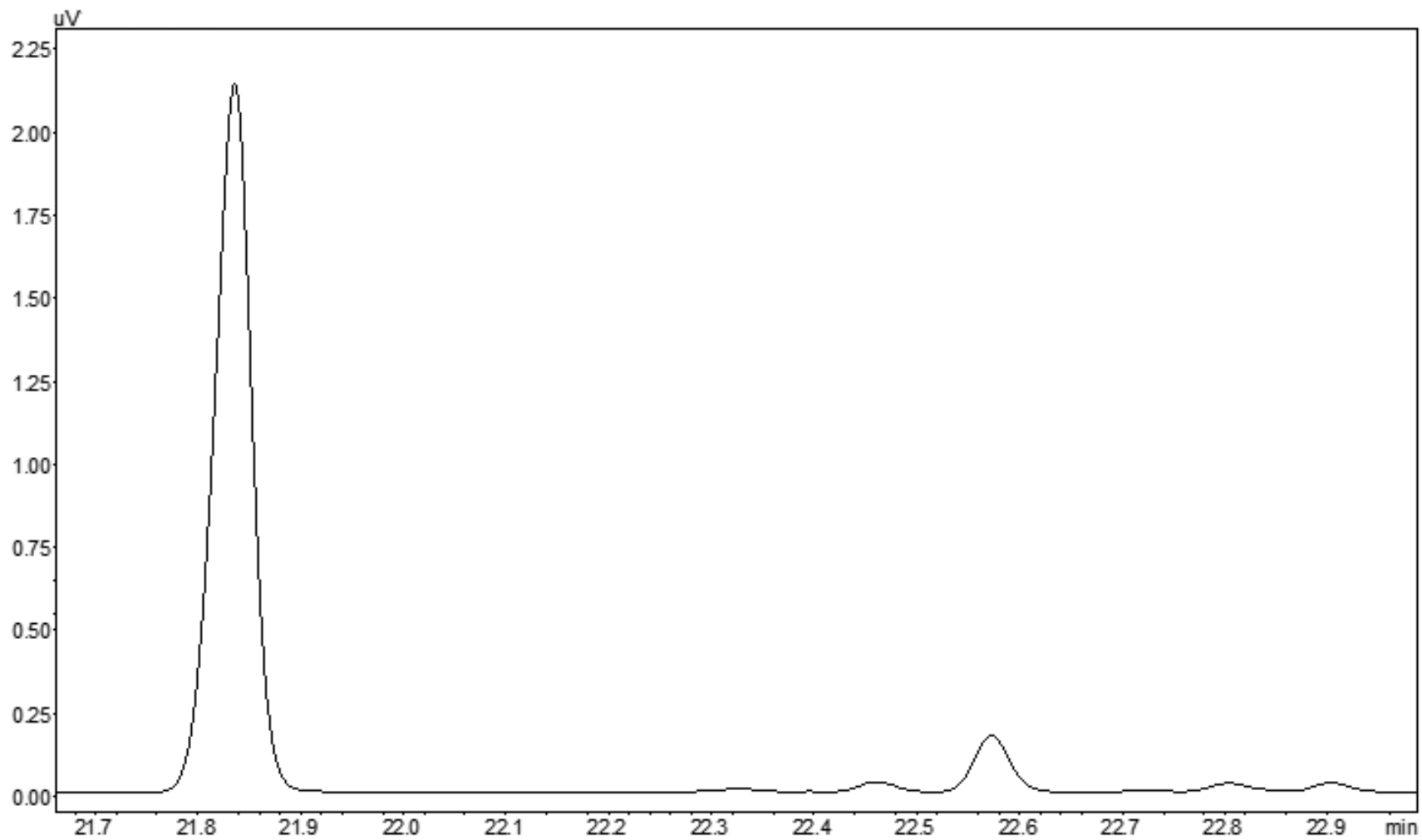
Píky: 1 – C14:0 (12 926 $\mu\text{mol/l}$); 2, *cis*-C14:1 n-5 (474 $\mu\text{mol/l}$); 3 – C15:0 (850 $\mu\text{mol/l}$); 4 – C16:0 (55 406 $\mu\text{mol/l}$); 5 – *cis*-C16:1 n-7 (4000 $\mu\text{mol/l}$); 6 – C17:0 (1062 $\mu\text{mol/l}$); 7 – C18:0 (11 974 $\mu\text{mol/l}$); 8 – *cis*-C18:1 n-9 (49 511 $\mu\text{mol/l}$); 9 – all-*cis*-C18:2 n-6 (14 557 $\mu\text{mol/l}$); 10 – C20:0 (326 $\mu\text{mol/l}$); 11 – all-*cis*-C18:3 n-3 (1236 $\mu\text{mol/l}$); 12 – *cis*-C20:1 n-9 (844 $\mu\text{mol/l}$); 13 – all-*cis*-C20:2 n-6 (558 $\mu\text{mol/l}$); 14 – all-*cis*-C20:3 n-6 (662 $\mu\text{mol/l}$); 15 – all-*cis*-C20:4 n-6 (1019 $\mu\text{mol/l}$); 16 – all-*cis*-C20:5 n-3 (158 $\mu\text{mol/l}$); 17 – all-*cis*-C22:6 (385 $\mu\text{mol/l}$)

GC podmínky: mobilní fáze bylo helium, teplota nástřiku 250 °C, počáteční teplota 75 °C (3 min), teplotní gradient 10 °C/min (200 °C, 0 min), 0,8 °C/min (230 °C, 5 min), průtok mobilní fáze byl 3 ml/min, detekce byla plamenově-ionizační (teplota FID = 250 °C), nástřik byl 0,5 μl .



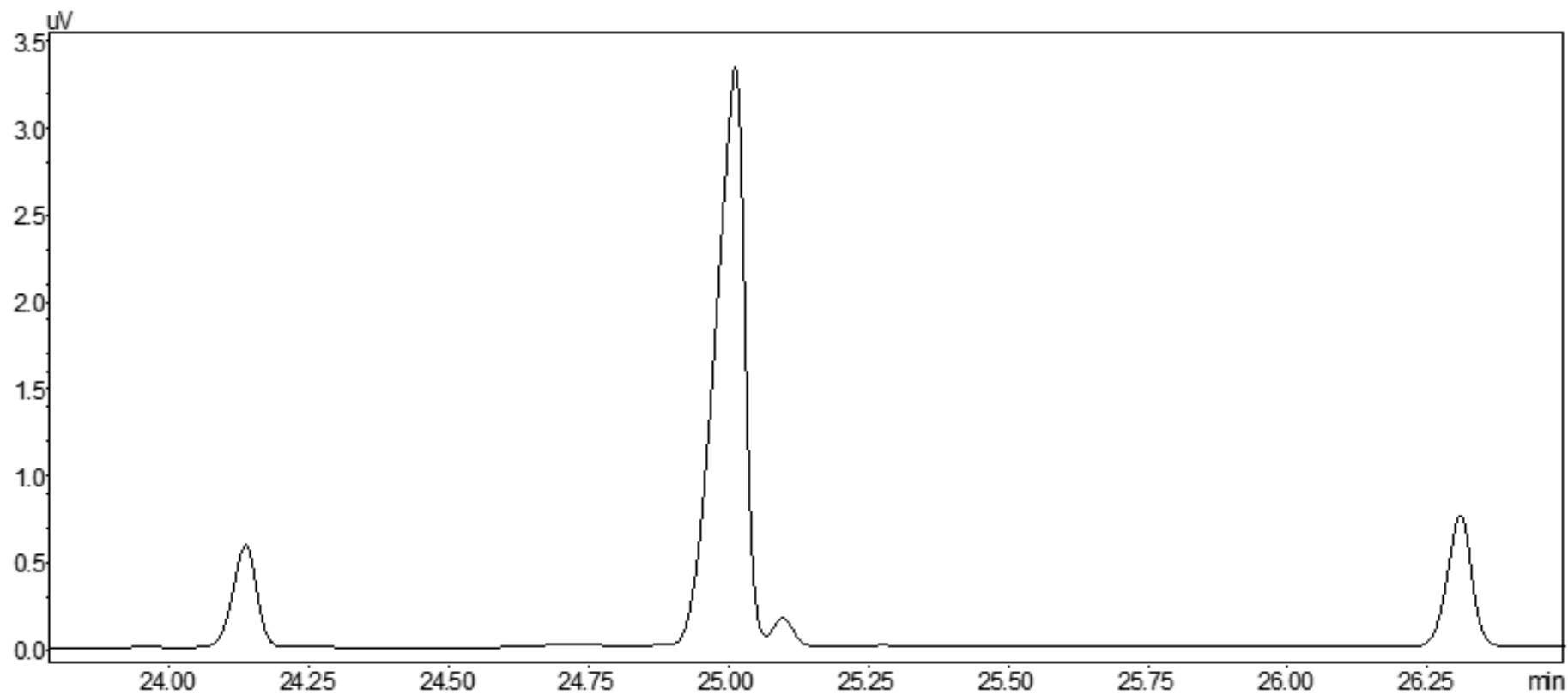
Příloha 7 A Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

C14:0 (19,85 min); *cis*-C14:1 n-5 (20,61 min); C15:0 (20,8 min); GC podmínky: viz příloha 7



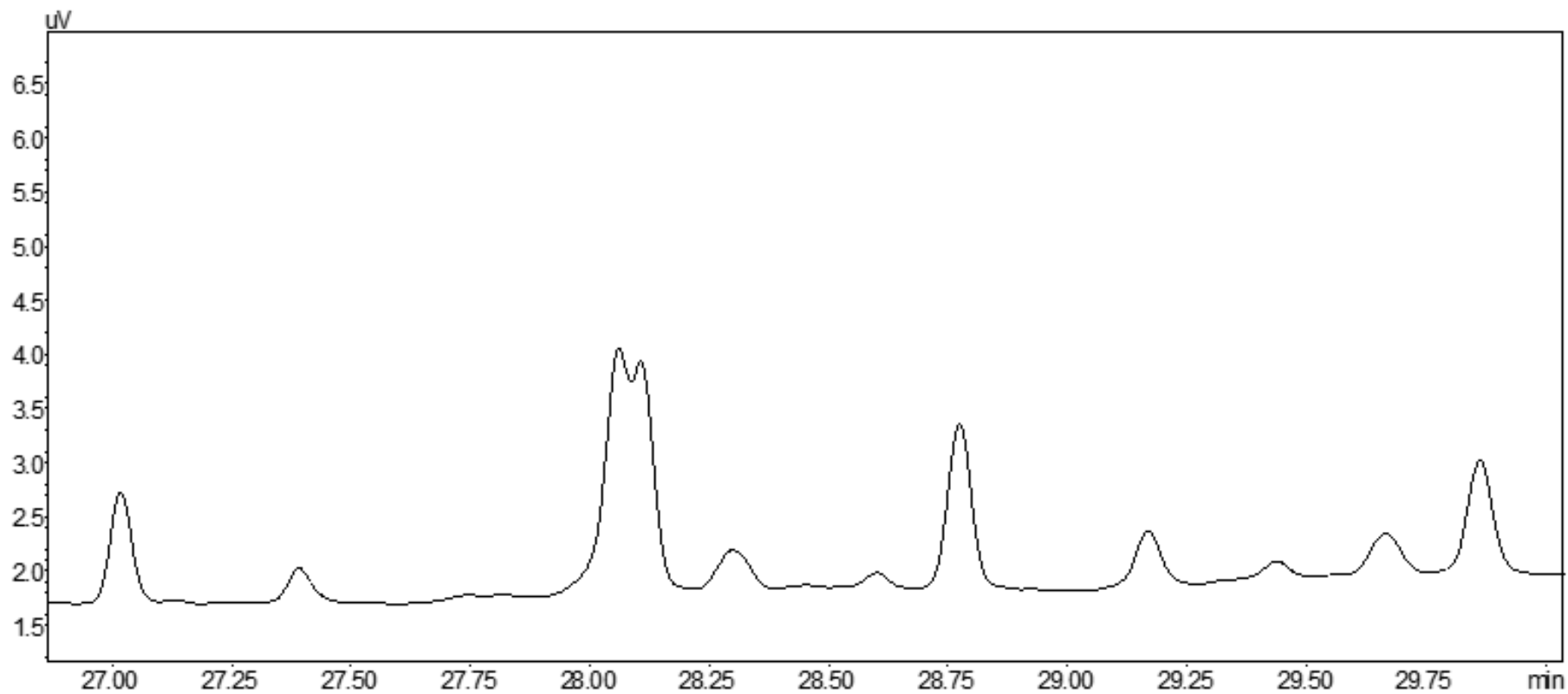
Příloha 7 B Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

C16:0 (21,83 min); *cis*-C16:1 n-7 (22,57 min); C17:0 (22,9 min); GC podmínky: viz příloha 7



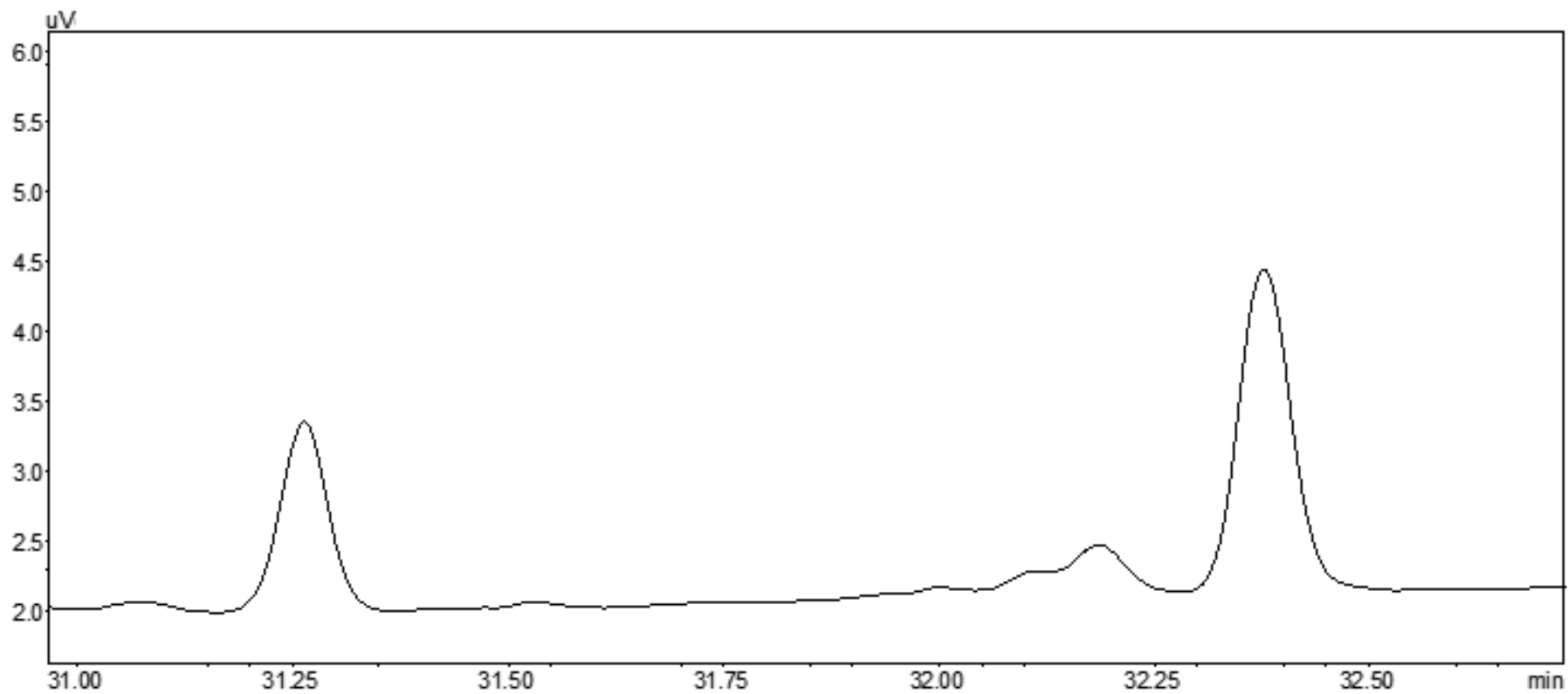
Příloha 7 C Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

C18:0 (24,14 min); *cis*-C18:1 n-9 (25,01 min); *all-cis*-C18:2 n-6 (26,31 min); GC podmínky: viz příloha 7



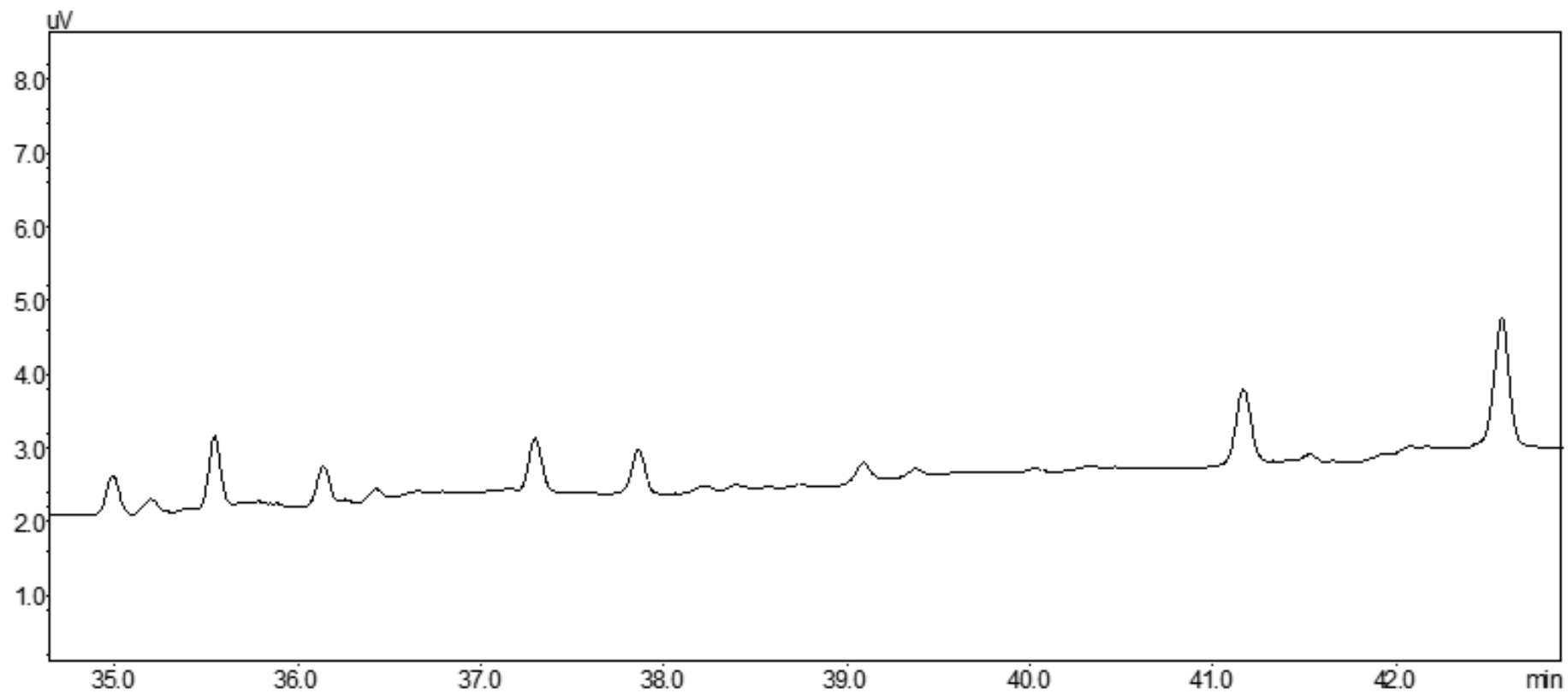
Příloha 7 D Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

C20:0 (27,02 min); all-*cis*-C18:3 n-3 (28,06 min); *cis*-C20:1 n-9 (28,11 min); all-*cis*-C20:2 n-6 (29,86 min); GC podmínky: viz příloha 7



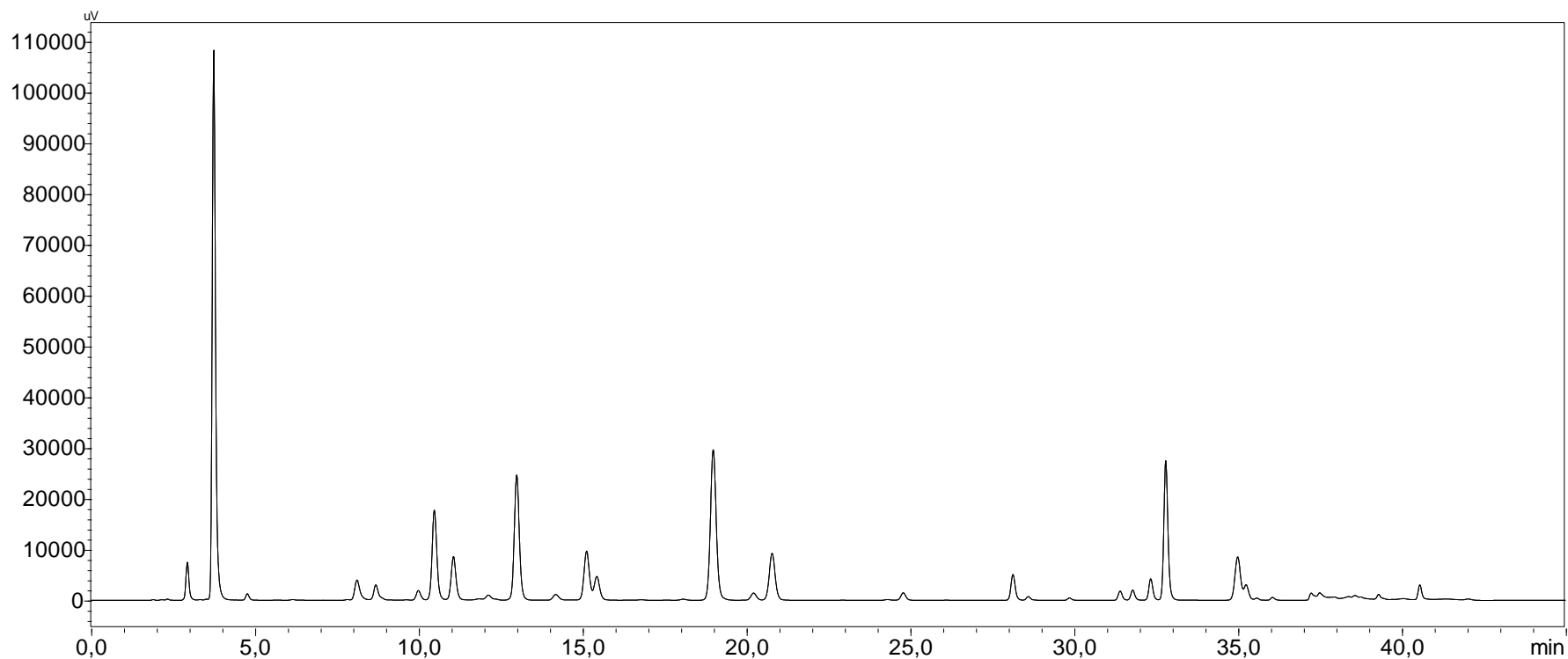
Příloha 7 E Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

all-*cis*-C20:3 n-6 (31,26 min); all-*cis*-C20:4 n-6 (32,38 min); GC podmínky: viz příloha 7



Příloha 7 F Chromatografický záznam stanovení mastných kyselin (methylester derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

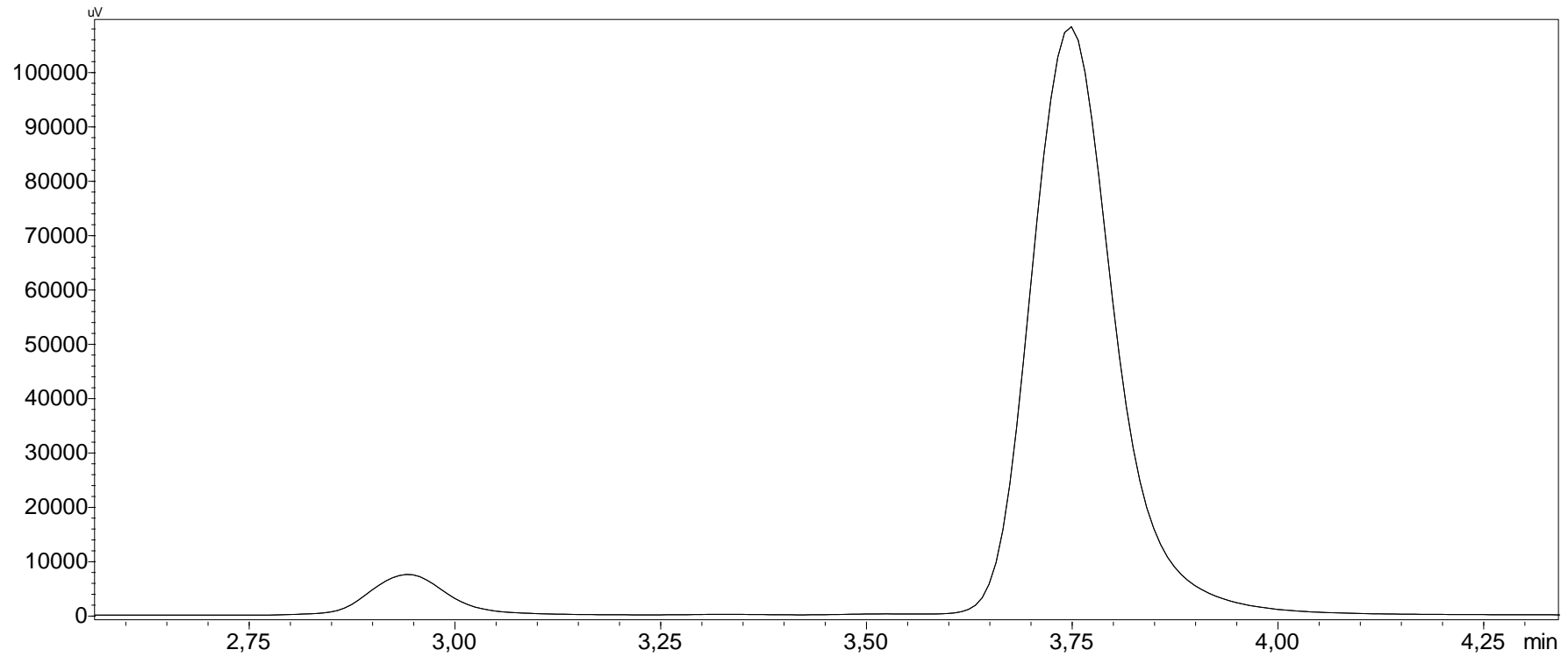
all-*cis*-C20:5 n-3 (34,98 min); all-*cis*-C22:6 (42,58 min); GC podmínky: viz příloha 7



Příloha 8 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky

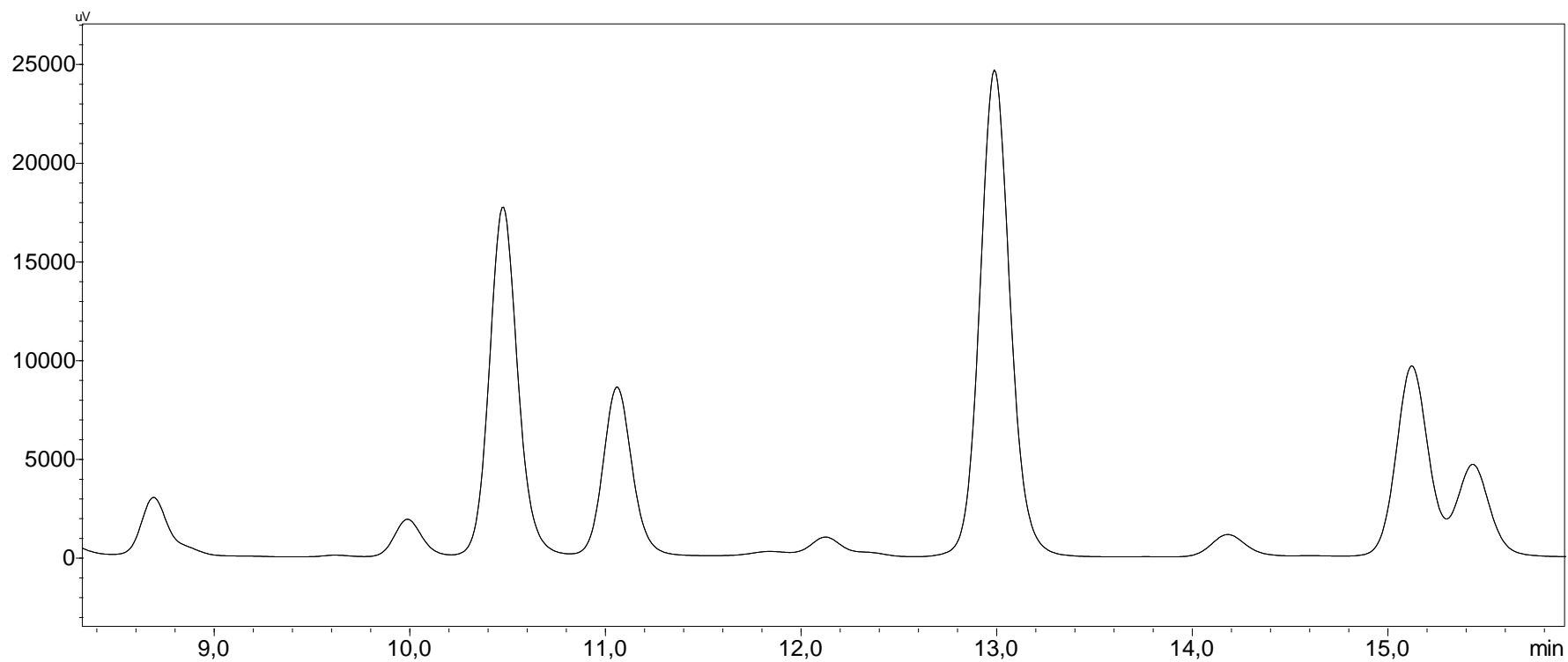
Asp (35,6 $\mu\text{mol/l}$, 2,94 min); Glu (599,2 $\mu\text{mol/l}$, 3,75 min); Asn (23,5 $\mu\text{mol/l}$, 8,69 min); His (16,6 $\mu\text{mol/l}$, 9,99 min); Gln (151,3 $\mu\text{mol/l}$, 10,48 min); Ser (83,8 $\mu\text{mol/l}$, 11,06 min); Cit (8,7 $\mu\text{mol/l}$, 12,13 min); Arg (12,5 $\mu\text{mol/l}$, 14,19 min); Gly (83,4 $\mu\text{mol/l}$, 15,13 min); Thr (50,6 $\mu\text{mol/l}$, 15,44 min); Ala (296,5 $\mu\text{mol/l}$, 18,99 min); Tyr (15,0 $\mu\text{mol/l}$, 20,22 min); Tau (86,5 $\mu\text{mol/l}$, 20,79 min); 2-AB (12,1 $\mu\text{mol/l}$, 24,79 min); Val (36,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,14 min); Met (5,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,60 min); Trp (4,2 $\mu\text{mol/l}$, 29,86 min); Ile (12,6 $\mu\text{mol/l}$, 31,41 min); Phe (14,7 $\mu\text{mol/l}$, 31,79 min); Leu (28,5 $\mu\text{mol/l}$, 32,34 min); Nleu (32,80 min)

HPLC podmínky: mobilní fázi A byla směs acetonitrilu a 10mmol/l Na_2HPO_4 (5:95, v/v), pH 7,2, mobilní fázi B směs acetonitrilu a 10mmol/l Na_2HPO_4 (65:35, v/v), pH 7,2, eluce byla gradientová, 0,01 min – 20 % B, 20,00 min – 32 % B, 35,00 min – 54,5 % B, 35,01 min – 100 % B, 40,00 min – 100 % B, 40,01 min – 20 % B; průtok mobilní fáze byl 0,75 ml/min při 37 °C, detekce byla fluorescenční ($\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 480 \text{ nm}$, nastavení citlivosti bylo nízké se zesílením 4x), nástřik byl 5 μl .



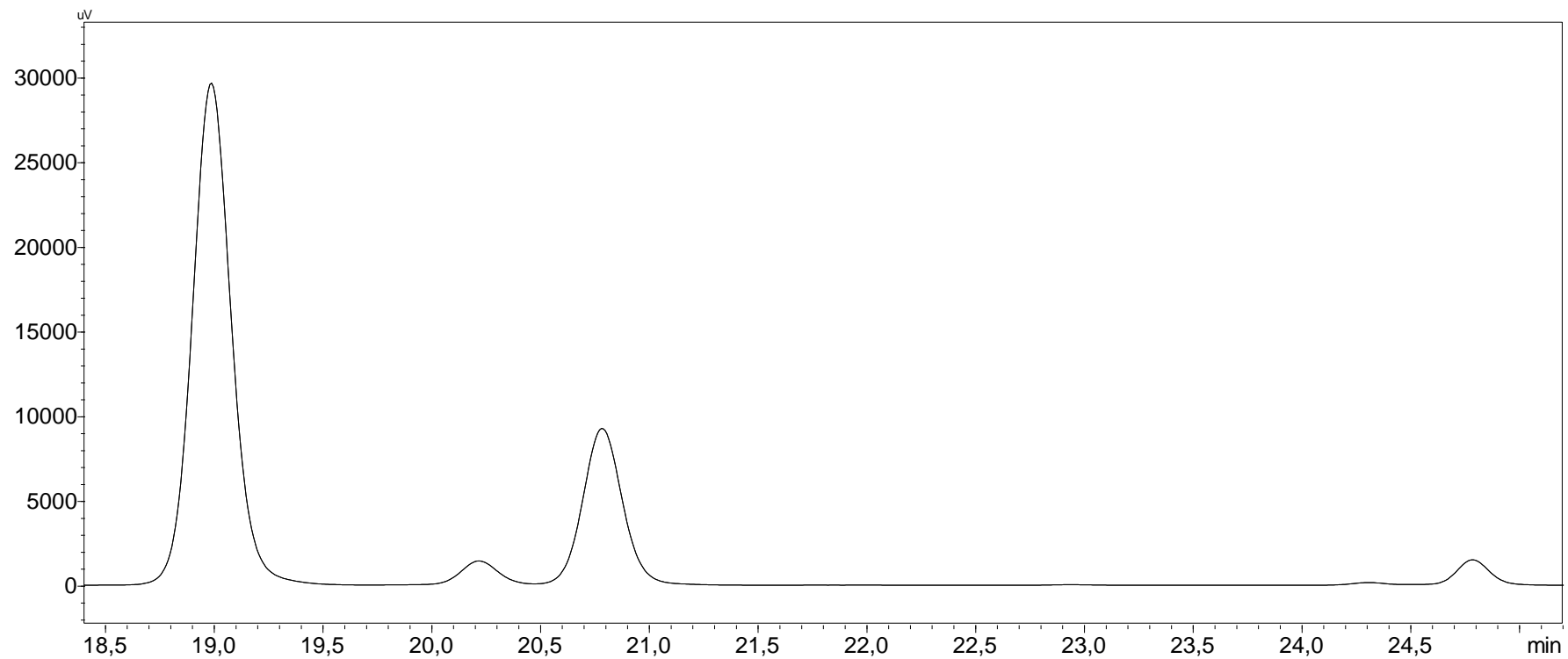
Příloha 8 A Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Asp (35,6 $\mu\text{mol/l}$, 2,94 min); Glu (599,2 $\mu\text{mol/l}$, 3,75 min); HPLC podmínky: viz příloha 8



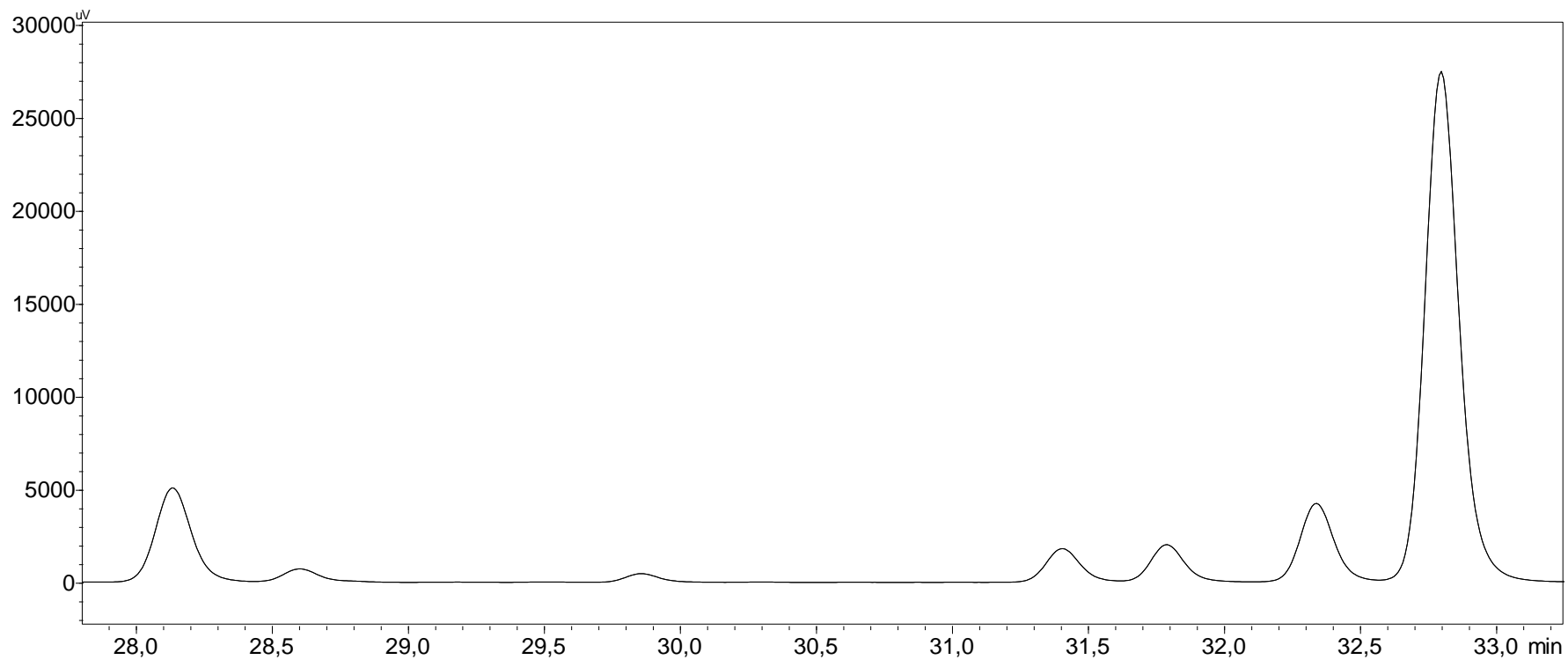
Příloha 8 B Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Asn (23,5 $\mu\text{mol/l}$, 8,69 min); His (16,6 $\mu\text{mol/l}$, 9,99 min); Gln (151,3 $\mu\text{mol/l}$, 10,48 min); Ser (83,8 $\mu\text{mol/l}$, 11,06 min); Cit (8,7 $\mu\text{mol/l}$; 12,13 min); Arg (12,5 $\mu\text{mol/l}$, 14,19 min); Gly (83,4 $\mu\text{mol/l}$, 15,13 min); Thr (50,6 $\mu\text{mol/l}$, 15,44 min); HPLC podmínky: viz příloha 8



Příloha 8 C Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Ala (296,5 $\mu\text{mol/l}$, 18,99 min); Tyr (15,0 $\mu\text{mol/l}$, 20,22 min); Tau (86,5 $\mu\text{mol/l}$, 20,79 min); 2-AB (12,1 $\mu\text{mol/l}$, 24,79 min); HPLC podmínky: viz příloha 8



Příloha 8 D Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Val (36,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,14 min); Met (5,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,60 min); Trp (4,2 $\mu\text{mol/l}$, 29,86 min); Ile (12,6 $\mu\text{mol/l}$, 31,41 min); Phe (14,7 $\mu\text{mol/l}$, 31,79 min); Leu (28,5 $\mu\text{mol/l}$, 32,34 min); Nleu (32,80 min); HPLC podmínky: viz příloha 8