

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALYTICKÁ DERIVATIZACE LÁTEK

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Studijní program:

Forma studia:

Vedoucí disertační práce:

Mgr. Jana Nádvořníková

Analytická chemie

Prezenční

prof. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2024

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Na tomto místě přísluší poděkovat zejména mému školiteli, panu prof. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. především za jeho trpělivost, čas a ochotu věnovat se mi, když bylo potřeba a že takových situací nebylo málo. Jeho cenné připomínky, rady a obrovský přehled nejen na poli analytické chemie vždy pomohly zlepšit kvalitu mých výstupů, což jsem možná nebyla schopná dříve docenit, ale teď si to plně uvědomuji a tímto mu za to děkuji.

Poděkovat bych chtěla i lidem z Katedry analytické chemie UP v Olomouci, nejvíce pak docentce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D., která velkou měrou přispěla svými znalostmi při řešení problémů týkající se analýzy steroidních látek.

V neposlední řadě musím poděkovat své rodině za jejich bezmeznou podporu a fakt, že mě ještě nevydělili, když mým životním úspěchem bylo doposud pouze napsání tří závěrečných prací včetně této. Děkuji i Jakubu Zápalovi za trpělivost, se kterou snášel všechny mé emoční výlevy a jeho rady a nápady při řešení problémů, které se během mého studia vyskytovaly.

Poslední, komu bych ráda poděkovala, je tato osoba:



Souhrn

Disertační práce je zaměřena na optimalizaci a vývoj plynově-chromatografických metod pro látky zejména lipidové povahy. Pozornost byla upřena na vhodné derivatizační reakce, bez kterých by byly analýzy takových sloučenin těžko proveditelné, ne-li nemožné. Přehled nejpoužívanějších a nejznámějších typů derivatizačních reakcí je uveden v teoretické části. Ta rovněž pojednává o látkách, které byly v práci analyzovány, včetně nejběžnějších analytických metod určených pro jejich stanovení. Jednalo se o steroidní látky jako je cholesterol, jeho prekurzory a produkty jeho přeměn, žlučové kyseliny, dále pak mastné kyseliny a sacharidy.

Experimentální část je rozdělena na čtyři části, přičemž každá z nich se věnuje analýze jiného typu látek z různých matric. Za prvé se podařilo vyvinout jednoduchou GC-MS metodu pro rozlišení mezi vnitřně a venkovně ustájeným skotem, která je založena na obsahu 7-dehydrocholesterolu normalizovaného na obsah cholesterolu, a která byla úspěšně aplikována na deset vzorků kravského mléka se známým způsobem ustájení. Dále byla metoda GC-MS optimalizována pro analýzu produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny, kdy se ve spolupráci s jinými analytickými technikami podařilo identifikovat majoritní dehydratační a oxidační produkt. Třetí oblastí, kde byla metoda GC-MS spolu s vhodným derivatizačním postupem použita, byly analýzy vzorků kulturního dědictví. Nejprve byl postup optimalizován na referenčních vzorcích nástěnných maleb a následně aplikován na historické vzorky pocházející z období středověku. Kombinace GC-MS spolu s PCA analýzou zahrnující mnoho důležitých parametrů, jako jsou vybrané poměry mastných kyselin, jejich suma a přítomnost produktů oxidace cholesterolu, se ukázala jako vhodné řešení pro určení konkrétního lipidového pojiva použitého v nástěnné malbě. Poslední část práce je věnována vývoji GC-MS metody pro společnou analýzu polárních i nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osetení hrachu setého dvou různých genotypů lišících se svojí dormancí. Optimalizován byl zejména postup pro analýzu nepolárních látek, kde se jako ideální jevílo zmýdelnění následované extrakcí látek a jejich derivatizace silylačním činidlem. Při společné analýze pak bylo identifikováno více než padesát sloučenin v polární frakci a podobné množství látek, zejména mastných kyselin, ve frakci nepolární.

Summary

The dissertation thesis “Derivatization in chemical analysis” focuses on the optimization and development of gas chromatographic methods for substances, particularly of a lipid nature. Attention is directed towards suitable derivatization reactions, without which analyses of such compounds would be hardly feasible if not impossible. An overview of the most commonly used and well-known types of derivatization reactions is provided in the theoretical part. This section also discusses the substances analyzed in the thesis, including the most common analytical methods used for their determination. These substances include steroid compounds such as cholesterol and its precursors, bile acids, fatty acids, and carbohydrates.

The experimental part is divided into four sections, each dedicated to the determination of different types of substances from diverse matrices. Firstly, a simple GC-MS method was developed to differentiate between internally and externally housed cattle, based on the content of 7-dehydrocholesterol normalized to the cholesterol content. This method was successfully applied to ten samples of cow's milk with known type of housing. Furthermore, the GC-MS method was optimized for the determination of products of chemical dehydration and electrochemical oxidation of chenodeoxycholic acid. Thanks to cooperation with other analytical techniques, the major dehydration and oxidation products were identified. The third area where the GC-MS method, along with a suitable derivatization procedure, was used, involved analyses of cultural heritage samples. Initially, the procedure was optimized on reference samples of wall paintings and then applied to historical samples from the medieval period. The combination of GC-MS with PCA analysis, including many important parameters such as selected fatty acid ratios, sum of selected fatty acids, and the presence of cholesterol oxidation products, proved to be a suitable solution for determining the specific lipid binder used in wall paintings. The last part of the thesis is devoted to the development of a GC-MS method for the simultaneous determination of polar and non-polar substances from a microsample of seeds of two different genotypes of field peas differing in their dormancy. The procedure was optimized, especially for the determination of non-polar substances, where saponification followed by extraction of the substances and their silylation proved to be ideal. In simultaneous determination, over fifty compounds were identified in the polar fraction and a similar number of substances, particularly fatty acids, in the non-polar fraction.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Teoretická část.....	2
2.1 Plynová chromatografie	2
2.2 Derivatizace v plynové chromatografii	3
2.2.1 Alkylace.....	6
2.2.2 Acylace	9
2.2.3 Silylace	11
2.3 Steroidní sloučeniny	15
2.3.1 7-dehydrocholesterol a cholesterol.....	16
2.3.2 Žlučové kyseliny	18
2.4 Mastné kyseliny	20
2.4.1 Možnosti derivatizace mastných kyselin.....	21
2.5 Sacharidy	22
2.5.1 Možné způsoby stanovení různých druhů sacharidů.....	23
3 Cíle disertační práce	25
4 Experimentální část	26
4.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce.....	26
4.1.1 Použité chemikálie a vzorky.....	26
4.1.2 Příprava vzorků	26
4.1.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření.....	27
4.1.4 Statistická analýza dat	27
4.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS	28
4.2.1 Použité chemikálie	28
4.2.2 Příprava vzorků	28

4.2.3	Přístrojové vybavení a podmínky měření.....	30
4.3	Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS.....	30
4.3.1	Chemikálie.....	30
4.3.2	Modelové a historické vzorky nástěnných maleb	31
4.3.3	Umělé stárnutí	33
4.3.4	Zpracování vzorků před GC-MS analýzou	33
4.3.5	Přístrojové vybavení a podmínky měření.....	34
4.3.6	Statistická analýza dat	34
4.4	Profilování metabolitů osetení hrachu pomocí metody GC-MS	35
4.4.1	Použité chemikálie a vzorky.....	35
4.4.2	Příprava vzorků	36
4.4.3	Přístrojové vybavení a podmínky měření.....	38
5	Výsledky a diskuze.....	39
5.1	GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce.....	39
5.1.1	Optimalizace metody.....	39
5.1.2	Stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu ve vzorcích mléka	43
5.2	Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS	45
5.2.1	Optimalizace derivatizačního postupu	45
5.2.2	Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny	46
5.2.3	Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny	48
5.3	Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS.....	51
5.3.1	Derivatizace vzorků před GC-MS analýzou	51
5.3.2	Změny diagnostických poměrů mastných kyselin a dalších parametrů	53

5.3.3 Umělé stárnutí	54
5.3.4 Poměry mastných kyselin a další diagnostické parametry	55
5.3.5 Další charakteristické parametry – steroly	58
5.3.6 PCA analýza	59
5.3.7 Aplikace PCA na reálné historické vzorky	61
5.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS	64
5.4.1 Optimalizace extrakčního postupu pro nepolární látky	64
5.4.2 Analýza polárních látek v mikrovzorcích osemení	69
5.4.3 Společná analýza polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení	72
6 Závěr	74
7 Seznam použité literatury	76
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	92

1 Úvod

Plynová chromatografie (GC) má v separaci a analýze těkavých organických sloučenin dominantní postavení. Co však s molekulami, které se straní pozornosti, protože nemají dostatečnou těkavost nebo tepelnou stabilitu potřebnou pro GC analýzu? Právě zde nastupuje analytická derivatizace a nabízí pomyslný klíč k odemknutí skrytého světa těchto analytů.

Derivatizaci si lze představit jako chemický tanec, při kterém jsou specifické funkční skupiny v molekulách pečlivě nahrazovány novými. Tyto nové skupiny, strategicky zvolené tak, aby poskytovaly lepší těkavost nebo požadované chromatografické chování, umožňují dříve neviditelnému analytu vstoupit na scénu plynové chromatografie. Chemicky modifikovaná molekula, nazývaná derivát, tak disponuje vlastnostmi potřebnými pro separaci a detekci, odhalující její identitu a množství. Otázkou zůstává, co je hlavní motivací pro tuto chemickou manipulaci. Představme si svět polárních molekul, jako jsou aminy, alkoholy a karboxylové kyseliny. Tyto polární sloučeniny se svými intermolekulárními silami pevně drží na sobě, na aktivních místech chromatografického systému a odmítají se posouvat GC kolonou. Derivatizace, vyzbrojena činidly, jako jsou silylační a acylační, nahrazuje tyto polární skupiny objemnějšími a méně interaktivními skupinami. Výsledkem je efektivní separace a analýza celé řady polárních sloučenin. Kromě změny těkavosti nabízí derivatizace další výhody. Může zlepšit chromatografické rozlišení manipulací s polaritou a velikostí molekuly, což vede k lepší separaci od ostatních složek ve vzorku. Dále může také zlepšit detegovatelnost zavedením funkčních skupin, které zvyšují odezvu příslušného detektoru. Výběr správného derivatizačního činidla a reakčních podmínek je zásadní pro zajištění úplné přeměny a minimálních vedlejších reakcí. Navíc derivatizace přidává další krok do analytického pracovního postupu, vyžadující optimalizaci a validaci pro zajištění optimálních dat.

Navzdory složitosti analytické derivatizace jsou výhody z ní plynoucí nepopiratelné. Rozšiřuje dosah plynové chromatografie, což umožňuje analyzovat širokou škálu sloučenin, od farmaceutik a znečišťujících látek v životním prostředí až po biomolekuly nebo vonné a chuťové látky v potravinách. Od odhalování tajemství forenzních důkazů po vývoj nových léků nadále hraje derivatizace klíčovou roli v posouvání hranic analytické vědy.

2 Teoretická část

2.1 Plynová chromatografie

Začátek chromatografie lze datovat kolem roku 1900 prací Michaila Cvětů. Ten vyvinul metodu, pomocí které se mu podařilo rozdělit rostlinné pigmenty v závislosti na použitém adsorbentu a jako první zavedl termín „chromatografie“, skládající se z řeckých slov pro „barvu = χρώμα chroma“ a „psaní = γράφειν graphein“ [1,2]. Právem je tak Michail Cvět často označován za „otce chromatografie“. O několik desetiletí později, ve 40. a 50. letech 20. století byly položeny teoretické základy plynové chromatografie, ke kterým významně přispěli Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Synge, kteří za svou práci v oblasti rozdělovací chromatografie získali v roce 1952 Nobelovu cenu za chemii [3,4]. Zlom nastal o několik let později, kdy A.J.P. Martin spolu s A. Jamesem navázali na předchozí práci a v roce 1952 se jim podařilo rozdělit směs těkavých mastných kyselin pomocí plynové chromatografie [5]. Tato všestranná technika přinesla revoluci v chemické analýze, a dodnes zůstává nepostradatelným nástrojem v různých oborech.

Plynová chromatografie je stále technikou první volby pro separaci těkavých, termálně stabilních sloučenin s molekulovou hmotností nepřevyšující 1000 daltonů a teplotou varu do 400 °C [6–9]. Mezi její hlavní přednosti patří vysoká separační účinnost, citlivost (jednotky ppm až ppb), rychlost analýz (od sekund po minuty), široká škála citlivých detektorů a v neposlední řadě také finanční dostupnost i pro malé laboratoře [6,7]. Výhodou je také možnost analyzovat vzorky v plynném, kapalném, a dokonce pevném skupenství [10]. To dělá z plynové chromatografie unikátní a všestrannou metodu, která nalézá uplatnění při řešení problémů v celé řadě různých odvětví. Jedná se především o analýzu léčiv, vzorků životního prostředí, pesticidů nebo biologických vzorků (krev, moč atd.) v klinické chemii. Opominout nelze ani analýzu potravin a zejména pak ropný průmysl, který umožnil rozmach plynové chromatografie [10]. Vedle provádění analýz široké škály nejrůznějších typů vzorků může být plynová chromatografie použita i ke studiu struktur chemických sloučenin, určování mechanismů a kinetiky chemických reakcí a dále k měření izoterem, adsorpčních tepel nebo aktivitních a difúzních koeficientů [10].

Nicméně množství látek, které mohou být analyzovány pomocí plynové chromatografie přímo, je limitováno. Makromolekulární, velmi polární látky, nebo organické soli nelze analyzovat bez předchozí úpravy, neboť nesplňují podmínky pro GC separaci [9,11,12]. Tyto látky lze ovšem v mnoha případech chemicky modifikovat neboli

derivatizovat tak, aby došlo ke snížení jejich polariry, a naopak zvýšení těkavosti a termální stability. V neposlední řadě je důvodem k derivatizaci i zlepšení detegovatelnosti cílových analytů. Reakce analytu s činidly nesoucími halogenované funkční skupiny umožňuje detekci pomocí detektoru elektronového záchytu (ECD). V poslední době se však derivatizace stále více používá k úpravě ionizačních vlastností pro detekci hmotnostním spektrometrem (MS) [13]. Hmotnostní spektrometr představuje nejvýkonnější dostupný detektor pro plynovou chromatografii. Je citlivý, selektivní a nabízí mnohem lepší kvalitativní informace než konvenční detektory jako jsou plamenově ionizační (FID) nebo ECD. Moderní přístroje pro plynovou chromatografii-hmotnostní spektrometrii jsou malé, spolehlivé a levnější než dříve, proto nahradily v mnoha laboratořích konvenční plynové chromatografy i pro rutinní aplikace [8,14].

2.2 Derivatizace v plynové chromatografii

Ačkoliv je plynová chromatografie široce rozšířenou analytickou technikou nacházející uplatnění v mnoha typech laboratoří po celém světě, má, podobně jako každá jiná technika, několik nedostatků. Hlavním nedostatkem jsou omezené možnosti přímé analýzy málo těkavých, termálně nestabilních látek, často poskytujících asymetrické píky. Takové látky jsou pak analyzovány pomocí jiného typu instrumentace, anebo jsou vhodně chemicky upraveny tak, aby byly zlepšeny jejich plynově chromatografické vlastnosti, jako je těkavost, termální stabilita a/nebo detegovatelnost. Chemickou změnou analytu nemusí být pouze derivatizace, ale jsou používány i jiné způsoby přeměny analytu jako je například pyrolytický rozklad [13].

GC analýza je silně závislá na těkavosti analytů, jež musí být dostatečná, aby došlo k rychlému přechodu látky do plynného stavu. Sloučeniny s velkou relativní molekulovou hmotností jsou méně těkavé a pokud navíc obsahují polární funkční skupiny, vykazují extrémně dlouhé retenční časy a mnohdy nedojde ani k jejich eluci z kolony. Typickými představiteli takových sloučenin jsou léčiva, sacharidy, steroidy aj. Ani sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností nejsou pro GC analýzu ideální, nesou-li polární skupiny. Může totiž potenciálně docházet ke tvorbě iontů a takové sloučeniny mohou vykazovat podobné chování jako ty s větší hmotností [11]. Obecně platí, že čím více polárních skupin v molekule bude, tím nižší bude těkavost v důsledku intermolekulárních interakcí způsobených zpravidla vodíkovou vazbou. Proto jsou aktivní (polární) vodíkové atomy v různých funkčních skupinách typu karboxylová, alkoholová, thiolová, amino a další nahrazovány jinými funkčními skupinami. Na druhou stranu ani velmi těkavé látky nejsou pro analýzu

vhodné, a to zejména kvůli jejich možným ztrátám během zpracování vzorku (např. extrakce nebo odstranění přebytečného rozpouštědla). Derivatizací dojde ke zvýšení jejich molekulové hmotnosti, což minimalizuje ztráty během manipulace se vzorkem a zároveň dojde k lepší separaci od píků rozpouštědel, která obvykle eluují z kolony mezi prvními.

Derivatizace bývá použita pro zlepšení chromatografického chování a tvaru píku. Vzniklý derivát by měl poskytovat jeden symetrický pík odpovídající definovanému produktu výchozí sloučeniny. Velmi polární látky s nízkou těkavostí mají tendenci adsorbovat se na aktivních místech chromatografického systému, čímž obvykle dochází k tzv. chvostování píků spolu se slabou, nebo žádnou odezvou detektoru. Ke chvostování píků může také docházet, pokud je množství látky v chromatografickém systému příliš velké [11,15,16].

Separace blízké příbuzných sloučenin je ve většině případů náročná, až téměř nemožná. Jedná se zejména o opticky aktivní látky jako jsou enantiomery alkoholů, karboxylových kyselin, aminokyselin nebo anomery sacharidů. Problém při separaci mohou způsobovat i steroly lišící se pouze pozicí hydroxylové skupiny. Použitím vhodné metody derivatizace dojde ke značnému zlepšení separace těchto příbuzných látek v důsledku výrazné změny některé z jejich vlastností – například polarity, a tedy i teploty varu. V případě enantiomerů jde o převedení na diastereomerní deriváty pomocí chirálních činidel, které mohou být dále separovány na běžných nechirálních stacionárních fázích. Derivatizace navíc umožňuje separaci komplexních směsí a prohloubení rozdílů mezi analytem a složkami matrice.

Důležitým faktorem je i stabilita sloučenin, zejména ta tepelná. Analyzované látky musí totiž vydržet vysoké teploty v nástřikovém prostoru, při kterých jsou odpařeny do plynné fáze bez toho, aniž by došlo k jejich termálnímu rozkladu nebo reakci s jinými sloučeninami. V případě, že k rozkladu dojde, je v chromatogramu detegováno mnoho píků, které přísluší produktům termálního rozkladu. Kromě tepelné stability lze zvýšit i tu chemickou – chráněním specifických skupin v analytu pomocí derivatizace. Takovou skupinou mohou být například thioly, jež jsou derivatizací chráněny proti oxidaci stopami kyslíku ve vyhřátém nástřikovém prostoru GC.

Další vlastnost, kterou derivatizace pomáhá zlepšit, je detegovatelnost sloučenin, ať už ve smyslu zvětšení odezvy nebo zavedení skupin, které jsou selektivně detegovány daným typem detektoru. Takovým detektorem je například ECD, který dokáže být vysoce citlivý

pro sloučeniny obsahující elektronegativní atomy. Halogeny obecně zvyšují citlivost ECD detektoru v tomto pořadí: $F < Cl < Br < I$. Proto bývají jako derivatizační činidla často používány různé halogenované acylové deriváty, z praktického hlediska nejčastěji fluorované deriváty, např. pentafluorfenylacetyl chlorid, anhydrid kyseliny trifluoroctové (TFAA) nebo anhydrid kyseliny heptafluormásečné (HFBA), který umožňuje detekci močoviny nebo pesticidů. Derivatizace pro GC ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS nebo MS/MS) může poskytnout derivát s jasně definovanou fragmentací včetně charakteristických m/z iontů a napomoci tak lepší identifikaci vzorku. Pro tento účel jsou nejvíce používány trimethylsilyl (TMS) deriváty, o kterých bude řeč v kapitole 2.2.3 [11,14,17].

V drtivé většině případů je derivatizace prováděna před chromatografickým procesem (angl. precolumn derivatization) s cílem zlepšit jak vlastnosti pro chromatografickou separaci, tak pro detegovatelnost. Většina těchto derivatizačních reakcí probíhá již během zpracování vzorku před analýzou a nazývají se proto jako „offline“ derivatizace. Některé reakce mohou ovšem probíhat i „online“ jako je například methylace pomocí tetramethylamonium hydroxidu (TMAH), která probíhá až v nástřiku za vysokých teplot. Je-li derivatizace prováděna pouze za účelem zlepšení detegovatelnosti, může k ní docházet až po chromatografickém procesu (angl. postcolumn derivatization). Nicméně tento způsob je častěji aplikován v kapalinové chromatografii.

V dnešní době je dostupná široká škála nejrůznějších derivatizačních činidel včetně jasně definovaných a dobře popsanych postupů pro jejich konkrétní použití. Tři nejčastěji používané typy reakcí – alkylace, acylace a silylace budou podrobněji rozepsány v následujících kapitolách. Výběr vhodného derivatizačního činidla závisí na několika faktorech, které je třeba uvažovat. Za prvé je to povaha analytu a matrice vzorku, konkrétně jaké funkční skupiny se v molekulách vyskytují, jsou-li tyto skupiny nějak stericky bráněny, jaká je kyselost vodíkového atomu atd. Výhodné je také derivatizovat analyty, které byly předem separovány od zbytku matrice. Dále je třeba uvažovat dopad zamýšlených změn, respektive jaký budou mít vliv na vlastnosti analytu. Důležitá je i zvolená analytická metoda, která má být ke zkoumání použita, s čímž se pojí výběr kolony, volba detekčního systému a jiné. Derivatizační činidlo může být použito samostatně, anebo v kombinaci s rozpouštědlem, jehož funkcí je podpořit rozpuštění analytu a také podpořit průběh derivatizační reakce. Podmínkou je, aby rozpouštědlo nereagovalo s derivatizačním činidlem. To splňují zejména aprotická rozpouštědla jako je pyridin, dimethylformamid

(DMF), dimethylsulfoxid (DMSO) nebo tetrahydrofuran (THF) [11,13,15,18]. Ideální derivatizační reakce by měla splňovat následující:

- derivatizační reakce musí být kompletní (95-100 % vzorku derivatizováno)
- změny ve struktuře analytu v důsledku derivatizace jsou pouze na kýžených místech (funkční skupiny)
- produkty derivatizační reakce jsou odlišitelné a dobře separovatelné od výchozí sloučeniny
- žádné interakce mezi činidlem a aktivními místy v chromatografickém systému, ani laboratorním vybavením (deaktivace skleněných materiálů – silanizace silanolových skupin skla)
- vytvořený derivát je stabilní v čase

Ačkoliv se derivatizace může jevit jako ideální řešení, neboť umožňuje či zlepšuje prováděné analýzy, má i několik nevýhod. Jedná se především o časovou náročnost a možný zdroj chyb, neboť derivatizační reakce jsou krokem navíc při přípravě vzorku a může dojít ke kontaminaci, nebo naopak ztrátě vzorku během manipulace. Dalším problémem je možná tvorba vedlejších produktů, které následně vedou k přebytečným píkům v chromatogramu, které pak mohou způsobovat problémy při separaci hledaných analytů a snižovat výtěžky a citlivost analýz. Samozřejmostí jsou snahy o to, minimalizovat tyto nedostatky. V dnešní době už se tak objevují sofistikované GC systémy, které dokážou sami přidat derivatizační činidlo ke vzorku, míchat, zahřívát a dávkovat automaticky vzorek do systému. Možným způsobem, jak zjednodušit proces přípravy vzorku, omezit množství použitých organických činidel a zabránit nebezpečným situacím během manipulace se vzorky, je již zmiňovaná online derivatizace pomocí IPD (z angl. injector-port-derivatization). Analyty a derivatizační činidla jsou při této metodě dávkovány do vyhřátého nástřikového prostoru GC, ve kterém derivatizace probíhá [19–21].

2.2.1 Alkylace

Při derivatizačních reakcích alkylačního typu je vodíkový atom v karboxylových kyselinách (R-COOH), sulfonových kyselinách (R-SO₂H), alkoholech a fenolech (R-OH), thiolech (R-SH), primárních a sekundárních aminech (R-NH₂ a R-NH-R') a v různých amidech (R-CONH₂, R-SO₂NR₂) nahrazen alkylovou nebo arylovou skupinou. Alkylace je často používána jako první krok, po kterém mohou následovat další derivatizační reakce.

Vzniklé alkyl(aryl) deriváty jsou méně polární než výchozí látka a rovněž jsou potlačeny intermolekulární reakce, což usnadňuje chromatografický proces [14,22].

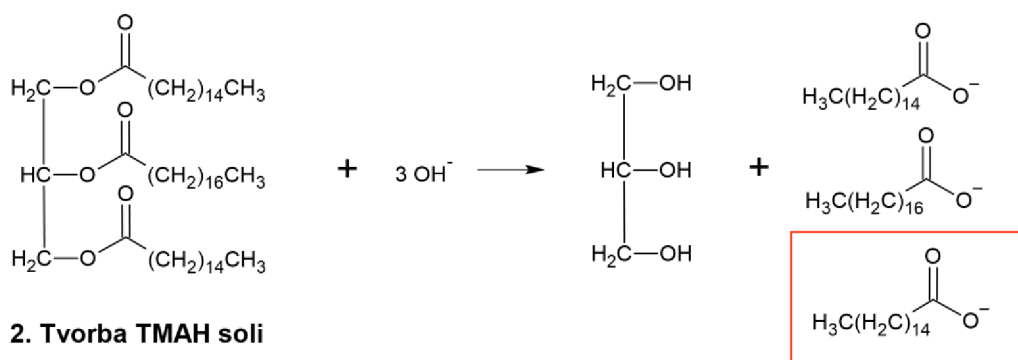
Kyselost vodíku, který má být nahrazen, významně určuje podmínky potřebné k provedení alkylace. Čím méně kyselý vodíkový atom je, tím musí být podmínky reakce intenzivnější. Alkylace slabě kyselých skupin, mezi které lze řadit například -OH skupinu alkoholů, -SH skupinu thiolů nebo -NH skupinu amidů, vyžaduje silně bazické katalyzátory (např. hydrid sodný, methoxid sodný). Naopak funkční skupiny s kyselejší povahou (fenoly, karboxylové kyseliny) jsou derivatizovány za přítomnosti méně bazického katalyzátoru (např. fluorid boritý – BF_3). Z toho plyne, že s klesající kyselostí vodíkového atomu ve funkčních skupinách je nutné použití silnějšího alkylačního činidla, respektive extrémnějších podmínek reakce. S těmito zvyšujícími se nároky na činidla a podmínky reakce je selektivita a použitelnost alkylace značně limitována. Kromě toho mohou extrémní podmínky nutné k provedení reakce způsobit další nežádoucí vedlejší reakce a případné komplikace při interpretaci chromatogramů [18,23–26].

Alkylace nachází uplatnění převážně při derivatizaci organických kyselin, které jsou převáděny na jejich estery, nejčastěji methyl estery. Tento typ alkylace se proto nazývá esterifikace a pro karboxylové kyseliny je dokonce preferovanější před silylací. Alkylestery karboxylových kyselin jsou totiž vysoce stabilní oproti TMS derivátům a v případě potřeby mohou být izolovány a skladovány po delší dobu. Karboxylové kyseliny jsou převáděny na alkylestery nejčastěji reakcí s alkoholem za přítomnosti katalyzátoru, kterým bývají běžně používané kyseliny nebo kyseliny lewisovského typu (např. kyselina chlorovodíková, sírová, trifluoroctová, dále fluorid boritý, acetylchlorid nebo kyselé katechové pryskyřice). Před nadávkováním vzorku do GC je nezbytné odstranit přebytečný katalyzátor. Druhou velkou skupinou látek, u kterých bývá alkylace úspěšně aplikována, jsou sacharidy, zejména mono- a oligosacharidy, kdy bývají methylovány jejich volné hydroxylové skupiny. Alkylaci mohou také podléhat různé steroidní látky, aminokyseliny, katecholaminy nebo barbituráty [11,13,14,17].

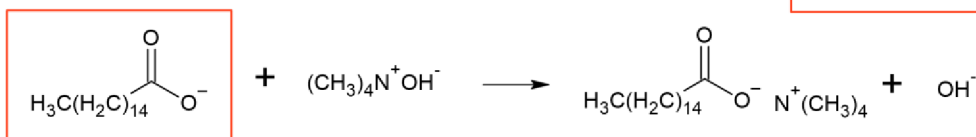
Mezi běžná alkylační činidla a reakce patří alkylhalogenidy s příslušným katalyzátorem, diazoalkany, dialkyl acetaly nebo pyrolytická alkylace využívající N-alkylamoniové soli. Nejvíce používané alkylhalogenidy jsou nízkomolekulární alifatické bromidy nebo jodidy, např. methyl, ethyl, propyl atd., případně benzyl nebo substituovaný benzyl (pentafluorbenzylbromid). Tato činidla jsou nejvíce vhodná pro derivatizaci karboxylových kyselin, fenolických a thiolových skupin. Hydroxylové skupiny mohou být

rovněž derivatizovány, nicméně reakce probíhá pomalu a vyžaduje přítomnost katalyzátoru. Tím může být například oxid stříbrný, který se ve směsi s příslušným alkylhalogenidem používá pro alkylation sacharidů [24]. Další skupinou látek používaných pro alkylation reakce jsou diazoalkany, v čele s diazomethanem, který je používán pro přípravu methylesterů karboxylových kyselin. Využíván je také pro methylation volných hydroxylových skupin vybraných sacharidů [24,27]. Reakce s diazoalkany probíhá takřka okamžitě, jsou-li alkylovány silně kyselou vodíky v karboxylových a sulfonových kyselinách nebo fenolech. U ostatních skupin je nutná přítomnost katalyzátoru, např. Lewisova kyselina – diethyletherát fluoridu boritého pro derivatization alkoholů. Nicméně s diazoalkany je spojována řada nevýhod. Jedná se o silně toxická činidla, která jsou náchylná k explozi při zahřívání nebo kontaktu s určitými materiály. Jsou také silně reaktivní a mohou podléhat řadě adičních a cyklizačních reakcí vedoucích ke tvorbě mnoha nežádoucích vedlejších produktů. Proto jsou v určitých případech preferována jiná činidla, v dnešní době již navíc komerčně dostupná. Jedná se o substituované dimethylformamidy, nejčastěji *N,N*-dimethylformamid dimethyl acetal. Činidla tohoto typu jsou vhodná pro karboxylové kyseliny (i ty stericky bráněné), fenoly a thioly, nicméně s alkoholy nereagují. Speciálním druhem alkylation reakce je pyrolytická alkylation, při které reagují kvartérní *N*-alkylamoniové soli s řadou sloučenin obsahujících aktivní vodíkové atomy (-OH nebo -NH) ve vyhrátém nástřikovém prostoru GC chromatografu. Pyrolytické alkylation podléhají karboxylové kyseliny, fenoly, barbituráty, sulfonamidy a různé heterocyklické dusíkaté sloučeniny (např. puriny) [24]. Činidla se liší dle použitého alkyly, ve většině případů jsou ovšem preferována ta, která poskytují methyl deriváty. Obvykle jsou používány vodné nebo methanolicke roztoky následujících činidel: tetramethylamonium hydroxid (TMAH), fenyltrimethylamonium hydroxid (PhTMAH), trimethylanilin hydroxid nebo *m*-trifluormethylfenyltrimethylamonium hydroxid (TFTMAH). Tvorba derivátů při pyrolytické alkylation zahrnuje několik kroků – viz schéma na obrázku 1. Jsou-li karboxylové kyseliny esterově vázány (např. v triacylglycerolech), dojde v prvním kroku k hydrolytickému štěpení těchto vazeb reakcí se silně bazickým činidlem. Poté dojde k vytvoření *N*-alkylamoniové soli, která podléhá pyrolytickému rozkladu za tvorby kýženého alkylderivátu a terciárního aminu. Rychlost reakcí, vynikající účinnost derivatizatione a snadné použití činí z *N*-alkylamoniových solí jedny z nejpoužívanějších alkylationních činidel [11,14,15,20,22,24,28].

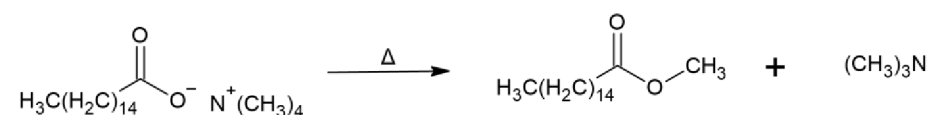
1. Hydrolýza



2. Tvorba TMAH soli



3. Termální disociace - vznik methylesteru kyseliny palmitové



Obr. 1 Zjednodušené schéma methylace mastných kyselin (zde palmitové kyseliny) vázaných v triacylglycerolu (TAG) pomocí činidla TMAH. Převzato z [22,29]

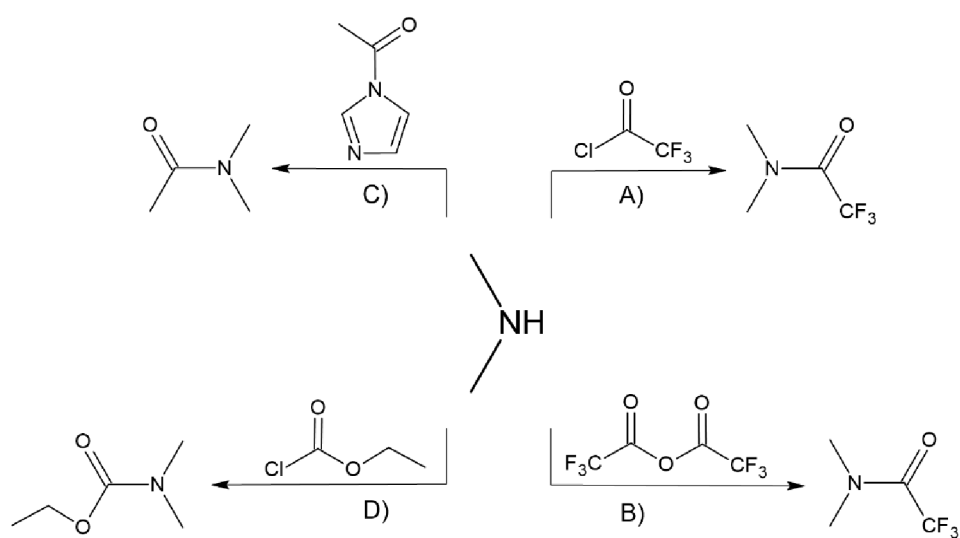
2.2.2 Acylace

Acylace je široce rozšířenou derivatizační metodou pro polární látky. Obecně jsou pomocí acylace nahrazovány aktivní vodíkové atomy u většiny hydroxylových skupin (alkoholy, fenoly, enolizovatelné karbonylové skupiny), amino skupin (primární a sekundární aminy) nebo thiolů. Acylaci mohou za určitých podmínek podléhat i terciární aminy a některé amidy. Na druhou stranu acylaci nepodléhá většina organických kyselin (karboxylové, thiokarboxylové, sulfonové aj.). Důvody pro tvorbu acylderivátů jsou podobné jako u ostatních derivatizačních procedur. Jde především o snížení polaritu vybraných funkčních skupin, což vede k lepším chromatografickým vlastnostem a redukci nežádoucích adsorpčních jevů. Acylace také zlepšuje stabilitu určitých sloučenin tím, že chrání jejich nestabilní funkční skupiny jako je tomu v případě sousedících fenolických skupin v katecholaminech, které jsou velmi náchylné k oxidaci. Připravené acylderiváty bývají těkavější než původní sloučeniny, čehož je využíváno zejména u látek, kde je v molekule přítomno několik různých polárních skupin jako jsou sacharidy nebo aminokyseliny. Je ovšem třeba mít při výběru derivatizačního činidla na paměti, že některá činidla s objemnými skupinami (např. heptafluorbutyryl a vyšší analogy) mohou těkavost naopak snižovat [14,16]. Mnohem častěji je tak acylace prováděna za účelem zlepšení

detegovatelnosti, což má největší přínos u ECD detektoru, jsou-li použita halogenovaná acylační činidla (např. fluorované acylhalogenidy, anhydridy nebo bisacylamidy). Citlivost detekce je tím vyšší, čím více je v molekule činidla atomů fluoru. Odezvu lze zvýšit i začleněním atomů Cl, Br nebo I do činidla, ale u takto vytvořených derivátů je těkavost výrazně nižší. Navíc činidla nesoucí více jak tři atomy chloru jsou nevhodná pro derivatizaci analytů s vyšší molekulovou hmotností [17]. Kromě zlepšení detegovatelnosti u GC-ECD mají deriváty s acylovými skupinami obsahujícími fluor (nebo chlor) lepší vlastnosti pro zachycení elektronů, vyšší elektronovou afinitu a jsou tak zvláště užitečné pro GC-MS analýzu s ionizací v negativním módu (např. NICI = negative ion chemical ionization nebo ECNI-MS = electron capture negative ion mass spectrometry). Acylové deriváty také poskytují charakteristické fragmenty a tím pádem i užitečné informace o struktuře dané látky. V některých případech je dokonce acylace preferovanější metodou před silanizací. Například acylované primární nebo sekundární aminy (amidy) jsou mnohem stabilnější než odpovídající *N*-silyl deriváty. Toho je využíváno například při derivatizaci aminokyselin. Obecně je alkylace a acylace vhodnější pro různé dusíkaté protické skupiny, pro které je nevhodná silylace TMS skupinou z důvodu nestability vazby N-Si [11,13,17,22,26].

Pro reakce acylačního typu je obecně využíváno tří typů činidel: acylhalogenidy, anhydridy kyselin a reaktivní acylové deriváty jako jsou acylované imidazoly, amidy nebo fenoly. Acylhalogenidy jsou obvykle ve formě chloridů nebo bromidů, od jednoduchých sloučenin typu acetylchlorid, až po mnohonásobně substituované jako je například (pentafluorfenyl)acetylchlorid. Jejich hlavní nevýhodou je ovšem tvorba silných anorganických kyselin (např. HCl) jakožto vedlejších produktů reakce, které musí být před chromatografickou analýzou odstraněny, například pomocí bazických látek jako je uhličitan sodný nebo hořečnatý, případně s využitím pyridinu jakožto reakčního média. Pokud by k jejich odstranění nedošlo, mohlo by dojít ke tvorbě rušivých artefaktů, nebo dokonce k poškození chromatografické kolony nebo jiné části chromatografu. Proto bývají preferovanější spíše anhydridy kyselin před acylhalogenidy, neboť vedlejšími produkty bývají slabší kyseliny, které jsou navíc těkavější a lze je tak snadno odpařit. Pro derivatizaci alkoholů, fenolů a aminů jsou běžně používány anhydridy kyseliny octové (acetanhydrid), pentafluorpropionové (PFPA), heptafluormásečné (HFBA) nebo trifluoroctové (TFAA). Nicméně i tato činidla mají několik nedostatků, které plynou zejména z reakčních podmínek. Jak samotné anhydridy kyselin, tak reakční média jsou kyselé povahy, a tudíž tato reakce není vhodná pro derivatizaci sloučenin citlivých na kyselé prostředí. Pro takové sloučeniny

jsou vhodnější spíše činidla, která mají bazickou odstupující skupinu, jako jsou acylimidazoly nebo vybrané amidy: N-methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) nebo bis(trifluoracetamid) (BTFA). Poslední významnou skupinou látek, která je k acylačním reakcím používána, jsou alkyl deriváty odvozené od kyseliny chlormravenčí (např. ethylester kyseliny chlormravenčí). Produktem reakce jsou příslušné karbamáty. Hlavní předností těchto činidel je menší citlivost na přítomnost vody ve vzorcích oproti předchozím činidlům. Proto jsou s oblibou používány pro derivatizace biogenních aminů (aminokyseliny, aminoalkoholy) ve vzorcích s vysokým obsahem vody [13,22,24,30]. Reakce jednoduché sloučeniny – dimethylaminu se čtyřmi různými acylačními činidly je znázorněna na obrázku 2.



Obr. 2 Acylace dimethylaminu čtyřmi různými druhy činidel. A – trifluoracetylchlorid (TFAC) a B – anhydrid kyseliny trifluorocetové (TFAA) poskytující 2,2,2-trifluor-N,N-dimethylacetamid, C – acetylimidazol poskytující N,N-dimethylacetamid, D – ethylchlorformiát poskytující ethyl-dimethylkarbamát. Převzato z [31]

2.2.3 Silylace

Silylační reakce lze bezesporu označit za jednu z nejuniverzálnějších, nejpoužívanějších a nejjednodušších derivatizačních reakcí pro GC a GC-MS analýzy. Obecně je možné silylovat téměř všechny heteroatomy nesoucí aktivní vodíkové atomy. Primárně jsou silylovány sloučeniny s -OH skupinami (alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, oximy, enoly, atd.), dále pak s -NH skupinami (aminy, amidy, iminy) a -SH skupinami (thioly, thiokarboxylové kyseliny). V drtivé většině případů jsou vodíkové atomy nahrazovány trimethylsilylovou skupinou (TMS), výjimkou však není ani použití jiných alkylsilylových derivátů (např. dimethylsilyl, isopropylidimethylsilyl, fenyldimethylsilyl nebo *tert*-butyldimethylsilyl). Blokační protických míst dojde ke snížení dipól-dipólových

interakcí a tím pádem ke zvýšení těkavosti připravených derivátů. Samozřejmostí je také snížení polaritý a zvýšení termální stability. Silylované deriváty tedy vykazují vhodné chromatografické vlastnosti, a navíc poskytují úzké a symetrické píky. Dobrá chromatografická mobilita silylových derivátů se projevuje zejména při použití kapilárních kolon obsahujících nepolární polysiloxanové stacionární fáze. Naopak polární stacionární fáze obsahující volné hydroxylové skupiny, jako je polyethylenglykol (např. Carbowax), jsou velice nevhodné a neměly by být používány při analýze silylovaných derivátů [14]. Vnesení TMS skupin(y) do molekuly je přínosné i z hlediska zlepšení hmotnostně spektrometrických vlastností. Dochází k produkci diagnostických fragmentů, které lze použít pro objasnění struktury a ke vzniku množství charakteristických iontů, kterých lze využít při stopových analýzách v rámci monitorování vybraných iontů (SIM - single ion monitoring) [14,18,22].

Jedním z určujících faktorů účinnosti silylace je povaha analytu, který má být silylován a hraje klíčovou roli při volbě podmínek derivatizace. Bylo zjištěno, že účinnost silylace různých funkčních skupin klesá obvykle v tomto pořadí: R-OH > Ar-OH > R-COOH > R-NH₂ > R-CONH₂ [32]. Toto pořadí však může být významně ovlivněno sterickými faktory. Platí, že reakci snáze podléhají primární skupiny než sekundární, v případě alkoholů pak jsou sekundární skupiny reaktivnější než terciární. Většina reakcí je prováděna pouze v nadbytku silylačního činidla, které již samo o sobě slouží jako rozpouštědlo. V ostatních případech jsou k silylačním činidlům přidávána organická rozpouštědla, jako je např. hexan, ether, benzen nebo toluen. Mnohem častěji jsou však používána polární aprotická rozpouštědla jako pyridin, DMF, DMSO, THF nebo acetonitril. Jejich přídavek usnadňuje nejen rozpuštění vzorku, ale zároveň podporuje i průběh derivatizační reakce. Zásadním kritériem při volbě rozpouštědla je, aby neobsahovalo aktivní vodíkové atomy. Ačkoliv toto kritérium splňuje řada rozpouštědel, jejichž výčet byl uveden výše, upřednostňován bývá v mnoha aplikacích pyridin. Je totiž nejen velmi účinným rozpouštědlem, ale také katalyzátorem, který může působit jako akceptor kyselin (např. HCl) vznikajících při silylačních reakcích zahrnujících organo(chlor)silany. Vedlejší produkty ve formě kyselin totiž mohou způsobovat nežádoucí interference při silylaci [13,14,22,26]. Kromě volby derivatizačního činidla a rozpouštědla mají na účinnost silylace vliv ještě další faktory. Reakce jsou velice citlivé na obsah vody, a proto by měly být vzorky před silylací vysušeny. Jinak může dojít k rozkladu samotného činidla i vzniklých derivátů. Výhodné je navíc použití činidla a rozpouštědla v nadbytku, což může pomoci minimalizovat problémy

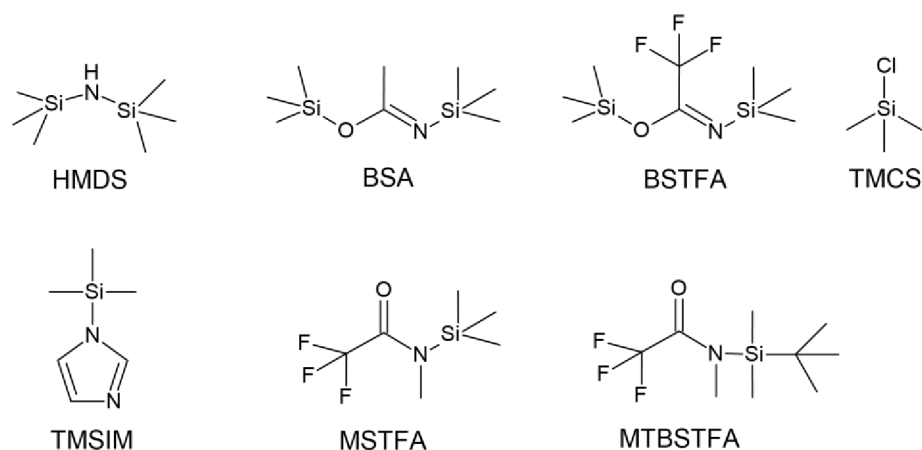
s vlhkostí nebo jinými nečistotami ve vzorku. Silylační reakce vyžadují většinou zahřátí na vyšší teplotu (50-100 °C i více), proto je nutné uvažovat termální stabilitu použitého činidla i silylovaných sloučenin, aby nedocházelo k jejich rozkladu. Doba trvání a teplota reakce se liší v závislosti na struktuře látky, která je derivatizována. Můžou to být řádově minuty při laboratorní teplotě (např. stericky nebráněné primární alkoholy) až hodiny při současném zahřívání na vysokou teplotu například pro terciární hydroxylovou skupinu u kortikosteroidů, která je navíc stericky bráněná [24,26].

V zásadě každá sloučenina obsahující TMS skupinu vázanou k heteroatomu, v některých případech vázanou pouze k atomu uhlíku, může sloužit jako trimethylsilylační činidlo. Během let byla připravena a použita řada TMS činidel s různými reaktivitami, nalézajících uplatnění nejen v analytické, ale i syntetické chemii [33]. Jedním z prvních činidel byl hexamethyldisilazan (HMDS), jenž se používá od 50.let minulého století dodnes. Ačkoliv HMDS není dobrým donorem TMS skupiny, je stále používán kvůli několika výhodám: je cenově dostupný, má relativně nízkou teplotu varu (124–127 °C), jediným vedlejším produktem reakce je amoniak, na rozdíl od silnějších silylačních činidel reaguje selektivněji a může být použit samostatně bez rozpouštědla. Je-li HMDS použit samostatně, je jeho použití značně omezeno a derivatizovány jsou především látky kyselé povahy typu karboxylové kyseliny nebo aminokyseliny. Silylační účinnost HMDS může být zvýšena přidáním kyselých katalyzátorů (např. TMCS, H₂SO₄ nebo (NH₄)₂SO₄). Kombinací HMDS s některým z katalyzátorů lze derivatizovat mnohem více látek – primární, sekundární, i terciární alkoholy, cukry, fenoly, nukleotidy atd. Důležité je také zmínit využitelnost HMDS pro silanizaci anorganických materiálů jako je sklo, silikagel a zejména skleněné kapilární kolony z důvodu deaktivace reaktivních silanolových skupin [9,14,33].

V dnešní době jsou preferovanými a nejpoužívanějšími činidly *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA), *N,O*-bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) a *N*-methyl-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA). Tato činidla jsou oblíbená zejména kvůli jejich vysoké čistotě, velké síle silyl donoru, rychlým reakcím a také díky vysoké těkavosti jak samotných činidel, tak vedlejších produktů [20]. Další používaná činidla zahrnují *N*-trimethylsilylimidazol (TMSIM), *N*-trimethylsilyl-diethylamin (TMSDEA) nebo *N*-trimethylsilyl-dimethylamin (TMSDMA). Účinnost činidel lze hodnotit podle toho, jak snadno dokáží odštěpit silylovou skupinu a na základě této schopnosti je lze seřadit (sestupně) následovně: TMSIM > BSTFA > BSA > MSTFA > TMCS > TMSDEA > TMCS > HMDS. Činidla bývají obvykle používána samostatně, v případě obtížně

derivatizovatelných skupin bývají používány silylační směsi, např. BSA/TMSIM/TMCS v poměru 1:1:1 nebo 3:3:2. Mnohem častěji jsou však činidla používána v kombinaci s katalyzátory, a to buď kyselými (TMCS, trifluoroctová kyselina), nebo bazickými (octan draselný, pyridin) [14,22,33].

BSTFA může být označeno za jedno z nejčastěji používaných silylačních činidel pro analytické derivatizace bezpočtu sloučenin typu X-H. Jde o velmi univerzální činidlo reagující téměř se všemi běžnými protickými centry vyskytujícími se v organických molekulách. Schopnost poskytovat TMS skupinu je obdobná jako u činidel BSA a MSTFA. Oproti BSA disponuje nicméně dvěma velkými výhodami. Tou první z nich je větší těkavost samotného BSTFA a jeho vedlejších produktů ((trimethylsilyl)trifluoracetamid a trifluoracetamid), které tak způsobují menší interference s nízkomolekulárními látkami v porovnání s BSA a jeho vedlejšími produkty. Druhou výhodou je přítomnost atomů fluoru v molekule BSTFA, které mají za následek menší znečištění FID detektoru usazeninami oxidu křemičitého. BSTFA může podobně jako BSA sloužit jako rozpouštědlo. Nicméně pokud se v něm derivatizované sloučeniny nerozpouštějí, je nezbytné použít vhodné rozpouštědlo, jehož výběr by neměl být nahodilý, neboť rozpouštědlo odlišné polarity může výrazně ovlivnit sílu donoru TMS. BSTFA je účinným silylačním činidlem pro alkoholy, fenoly (i ty stericky bráněné), aminokyseliny, thioly, cukry, hydroxylaminy, purinové i pyrimidinové báze, nukleotidy, glukuronidy a další. Často je BSTFA používáno v kombinaci s TMCS (nejčastěji 1%) ke zvýšení účinnosti silylace. Poté je možno derivatizovat některé amidy, sekundární aminy a bráněné hydroxylové skupiny. Vedle BSTFA a BSA je často používáno i činidlo MSTFA. Jeho reaktivita je srovnatelná s BSTFA a BSA, nicméně vedlejší produkty reakce (nejvíce *N*-methyltrifluoracetamid) jsou daleko těkavější než u BSTFA. Proto je MSTFA užitečné pro obzvláště těkavé látky, které eluují z kolony dříve, jinak by mohlo dojít k jejich překrytí vedlejšími produkty. MSTFA je využíváno pro silylaci celé řady polárních látek, zejména pak steroidů [13,17,24,32–34]. Struktury nejpoužívanějších TMS činidel jsou znázorněny na obrázku 3.



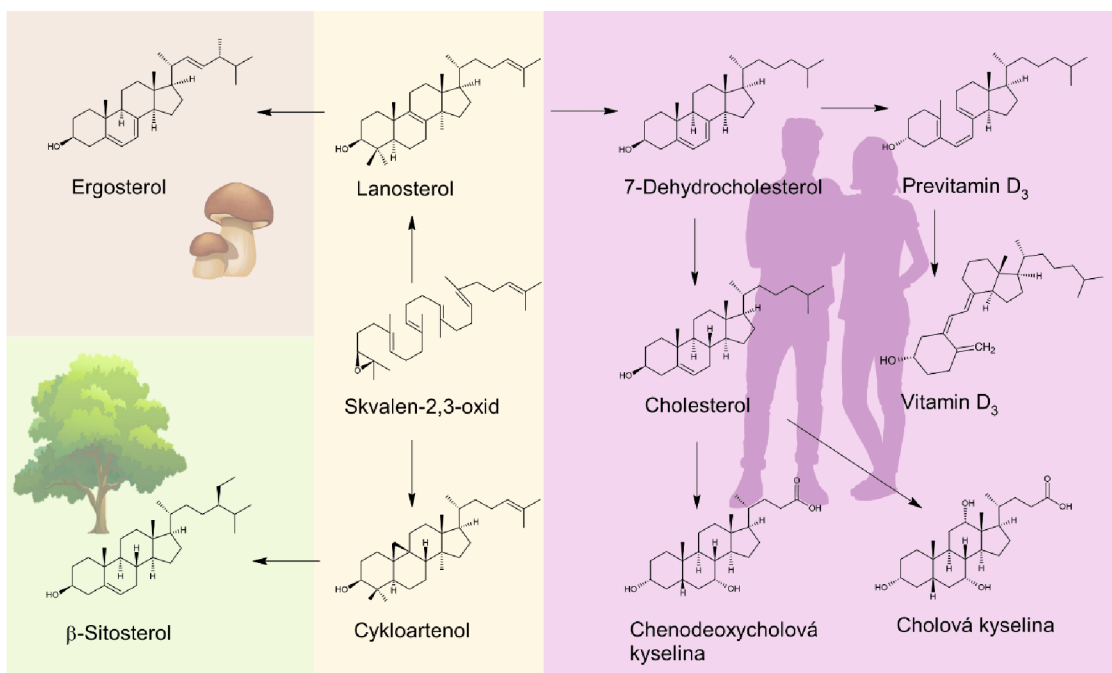
Obr. 3 Chemické struktury vybraných silylačních činidel. Převzato z [17]

Ačkoliv převažuje tvorba TMS derivátů, v určitých případech jsou využívány i jiné substituenty, jak bylo řečeno výše. Rozšířena jsou zejména činidla zavádějící *tert*-butyldimethylsilylovou (TBDMS) skupinu, např. N-methyl-N-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSTFA), která vynikají vysokou stabilitou vůči chemické degradaci oproti TMS. Zvýšená stabilita TBDMS skupiny, zejména proti hydrolyze, vychází z její objemnosti. Obecně jsou silylové deriváty obsahující objemné substituenty stabilnější vůči degradaci díky ztíženému přístupu činidel k reaktivnímu centru na atomu křemíku. TBDMS deriváty nejsou sice tak těkavé jako TMS, na druhou stranu nejsou tolik citlivé na vlhkost, a navíc vykazují specifické hmotnostně-spektrometrické vlastnosti, kterých se dá využít pro identifikaci sloučenin. Jako příklad lze uvést silylaci aminokyselin pomocí MTBSTFA, která se běžně provádí a je výhodnější než silylace poskytující TMS deriváty [17,35–37].

2.3 Steroidní sloučeniny

Steroidy jsou organické sloučeniny tvořené čtyřmi navzájem propojenými kruhy: třemi šestičlennými cyklohexanovými kruhy a jedním pětičlenným cyklopentanovým kruhem. Různé funkční skupiny (a jejich konfigurace) navázané na toto jádro cyklopentanoperhydrofenanthrenu, jeho oxidační stav a přítomnost výrazného postranního řetězce na C17 určují jejich fyziologickou funkci v houbách, rostlinách, zvířatech a lidech. Zkrácená metabolická dráha významných steroidních sloučenin hub, lidí a rostlin je znázorněna na obrázku 4. Steroidy jsou často součástí buněčných membrán, kde ovlivňují jejich tekutost (fluiditu) - např. cholesterol, fungují jako signální molekuly (steroidní

hormony) nebo zprostředkovávají fyziologické funkce, jako je trávení (žlučové kyseliny) [38–40].



Obr. 4 Zkrácená metabolická dráha steroidních sloučenin u rostlin, hub a živočichů. Převzato z [41,42]

Identifikace a kvantifikace přirozeně se vyskytujících steroidů představuje výzvu zejména kvůli jejich drobným rozdílům ve struktuře, výskytu ve velmi složitých směsích a často v nízkých koncentracích. Mezi nejpoužívanější metody pro analýzu těchto sloučenin v biologických a fyziologických matricích patří chromatografické techniky jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Způsoby detekce se liší v závislosti na použité separační technice. V případě HPLC se jedná o spojení s UV nebo fluorescenčním detektorem anebo MS. Použití HPLC-UV je nicméně limitováno s ohledem na fakt, že většina steroidů obsahuje slabé chromofory s absorpcí okolo 200 nm [43]. Detektorem pro GC bývá ve většině případů MS a tato kombinace (GC-MS) je nepostradatelnou metodou pro studium rostlinných sterolů [44]. Před samotnou analýzou je však nutná derivatizace např. acylace nebo silylace [45]. Kromě chromatografických technik jsou také používány elektroforetické, enzymatické a imunologické metody [46–48].

2.3.1 7-dehydrocholesterol a cholesterol

7-dehydrocholesterol (7-DHC) je významným prekurzorem cholesterolu a vitamínu D₃. Působením slunečního záření, konkrétně ultrafialové části spektra (UVB) na pokožku, dojde k fotolytické přeměně 7-DHC na previtamin D₃, který následnou izomerizací přechází na vitamin D₃. Ten je nezbytný pro vstřebávání a využití vápníku a fosforu, které jsou

důležitými prvky pro mineralizaci kostí [49,50]. Dochází-li k hromadění 7-DHC (a jeho isomeru 8-dehydrocholesterolu (8-DHC)) v séru nebo v tkáních, je na vině špatná funkce enzymu 7-dehydrocholesterolreduktázy, jejímž úkolem je redukce dvojnásobné vazby (C7-C8) u 7-DHC za vzniku cholesterolu [51]. Onemocnění způsobené tímto defektem bylo poprvé objeveno v roce 1964 a nazývá se po svých objevitelích Smith-Lemli-Opitzův syndrom. Zvýšená koncentrace 7-DHC a 8-DHC oproti cholesterolu může vést k závažným deformacím, nebo dokonce k úmrtí plodu [52].

Cholesterol je nepostradatelným steroidem pro správnou funkci těla savců. Je součástí buněčných membrán a také slouží jako prekurzor bioaktivních sloučenin, konkrétně žlučových kyselin [40], pohlavních hormonů a kortikoidů [53]. Hladina cholesterolu v plasmě je klíčovým diagnostickým kritériem v medicíně. Jak zvýšené, tak snížené hladiny cholesterolu ukazují na možné zdravotní komplikace. Nejrozšířenějším onemocněním spojeným se zvýšenými hladinami cholesterolu je ateroskleróza, která je příčinou zhruba 50 % všech úmrtí v západním světě [54].

2.3.1.1 Možnosti stanovení 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu

Metody stanovení cholesterolu a 7-DHC mohou být obecně rozděleny do tří hlavních skupin. Ta první zahrnuje klasické chemické metody, jako je například modifikovaná metoda podle Abella-Kendalla, která je rovněž jednou z referenčních metod schválených pro kvantitativní stanovení cholesterolu Národním institutem standardů a technologie (NIST, USA) [55]. Druhou skupinu představují enzymatické postupy [56] a třetí, v současné době nejvíce preferovaná skupina, zahrnuje metody založené na chromatografii a hmotnostní spektrometrii [57,58].

Kvantifikace cholesterolu a jeho prekurzorů je realizována jak HPLC (s UV [59] nebo MS detekcí [60,61]), tak pomocí GC. GC-FID je dle Evropského lékopisu validovanou metodou pro stanovení cholesterolu [62] a je hojně používána i pro analýzu cholesterolu ve vzorcích potravin [63–65]. Častější je však spojení GC s MS detektorem [66–69], které nabízí řadu výhod jako je vysoká specifita, citlivost a možnost určení struktur steroidů, nacházejících se navíc často ve směsích [45].

Cholesterol a 7-DHC jsou obvykle před GC-MS analýzou derivatizovány zejména kvůli jejich vyšší polaritě způsobené přítomností hydroxylových skupin. Nederivatizované polární molekuly mají větší tendence interagovat s aktivními centry v chromatografickém systému, což vede ke špatné separaci a rozšiřování chromatografických píků. Derivatizací

dojde ke snížení polariry, a tedy i ke zvýšení tĕkavosti, navíc je zlepšena termální stabilita, citlivost a tvar píkú [11,57]. Hydroxylová skupina je u tĕchto sterolů nejčastĕji převádĕna na TMS derivát pomocí činidel jako je BSA, BSTFA nebo MSTFA, ať už samotných nebo s přidavkem katalyzátoru (1% TMCS) [45,65]. Výhodou TMS derivátů oproti jiným (např. TBDMS, pentafluorfenyldimethylsilyl ether) je zejména jednoduchost jejich přípravy, vysoká tepelná stabilita a nízká polarita [70]. Další výhodou je také množství diagnostických fragmentových iontů vznikajících po elektronové ionizaci v hmotnostním spektrometru. Navíc jsou v literatuře podrobnĕ popsány fragmentační dráhy TMS derivátů cholesterolu i jeho prekurzorů [71,72]. Kromĕ TMS derivátů bývají připravovány i acetylované deriváty reakcí s acetylchloridem nebo anhydridem kyseliny octové. Acetylace je však ménĕ populární kvůli potencionálním vedlejším reakcím, které vedou k tvorbĕ více derivátů [73,74].

2.3.2 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou steroidní molekuly, u většiny živočichů tvořené z 24 uhlíků. Na steroidním skeletu je navázán postranní řetĕzec, který nese karboxylovou skupinu. Jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu a skladovány ve žlučníku [75]. Hrají hlavní roli při trávení lipidů, kdy plní řadu funkcí. První a nejdůležitĕjší z nich je vyloučení cholesterolu z tĕla jeho přemĕnou na žlučové kyseliny. Takto vzniklé žlučové kyseliny jsou označovány jako primární a jedná se o cholovou (CA) a chenodeoxycholovou (CDCA) kyselinu. Novĕ biosyntetizované žlučové kyseliny jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem, vylučovány do žluči a poté do lumenu tenkého stĕva. Po sekreci jsou žlučové kyseliny dekonjugovány v tenkém stĕvě a přibližně 95 % z nich je reabsorbováno prostřednictvím portálního krevního obĕhu zpĕt do jater a pouze 5 % je vyloučeno z tĕla ve formĕ stolice. Ty z nich, které reabsorpci uniknou, jsou v tlustém stĕvě modifikovány anaerobními bakteriemi, což má za následek tvorbu sekundárních žlučových kyselin (deoxycholová (DCA) a litholová kyselina) [40,76,77]. Další funkcí je usnadnění vstřebávání lipidů z potravy, včetně vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K) a cholesterolu. Žlučové kyseliny navíc působí jako důležitĕ regulální molekuly [40,78].

2.3.2.1 Stanovení žlučových kyselin

Při různých stĕvních onemocněních je syntĕza a vylučování žlučových kyselin abnormální, což narušuje jak syntĕzu cholesterolu, tak jeho metabolismus, což vede ke zvýšené koncentraci žlučových kyselin v plazmĕ, moči a stolici. To má za následek akumulaci prekurzorů cholesterolu nebo žlučových kyselin a následné klinické malformace.

Navíc akumulace tří hlavních žlučových kyselin (CA, CDCA a DCA) v lidském těle v abnormálně vysokých koncentracích vede k cytotoxicitě. Analýza žlučových kyselin je tedy důležitým diagnostickým nástrojem pro onemocnění jater a střev [75,79,80]. Pro jejich analýzu v různých biologických vzorcích, jako je sérum, žluč a stolice jsou používány zejména metody imunochemické (ELISA z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays nebo CLIA - Chemiluminescent ImmunoAssays) a chromatografické (HPLC-MS, GC-MS) [81–85]. V poslední době jsou vyvíjeny i elektrochemické metody jakožto levnější a rychlejší alternativa oproti stávajícím metodám [86,87].

GC-MS se ukázala jako nejuniverzálnější a dostatečně citlivá pro kvantifikaci nano- až pikomolů žlučových kyselin přítomných v biologických vzorcích. Důležitá je také pro analýzu komplexních směsí nekonjugovaných žlučových kyselin, zejména kvůli bohatým strukturním informacím získaným díky elektronové ionizaci a následné fragmentaci. Dostupný je navíc i velký počet publikovaných referenčních spekter, která mohou identifikaci značně ulehčit [81]. Žlučové kyseliny musejí být před GC-MS analýzou derivatizovány s ohledem na jejich malou těkavost způsobenou přítomností několika funkčních skupin v molekule (-COOH, -OH, -C=O aj.).

Karboxylová skupina je nejčastěji převáděna na methyl ester pomocí čerstvě připraveného diazomethanu. Výhodou této metody je vysoká specifita pro karboxylovou skupinu a minimum vedlejších produktů, které by mohly vznikat. Při přípravě a používání diazomethanu je však třeba dbát zvýšené opatrnosti, neboť je velmi toxický [22,45]. Proto jsou již v dnešní době komerčně dostupná methylační činidla na bázi diazomethanu [88], která jsou s oblibou používána pro tvorbu methyl esterů karboxylových kyselin [89]. Kromě diazomethanu jsou pro methylaci používány i jiné alkylační metody, většinou v podobě reakce s methanolem, katalyzované anorganickými kyselinami (sírová, chlorovodíková) [90,91]. Hydroxylové skupiny bývají zpravidla chráněny alkylsilylací nebo acetylací, která byla spíše používána v dřívější době. TMS ethery jsou oblíbené pro jednoduchost přípravy, vysokou účinnost silanizačních reakcí a širokou škálu komerčně dostupných činidel. Rychlost silylace hydroxylových skupin se výrazně liší v závislosti na jejich povaze (primární, sekundární, terciární, ekvatoriální, axiální) a sterické dostupnosti. Pro většinu stericky nebráněných hydroxylových skupin plně postačuje samotné činidlo BSA, případně ve směsi s TMCS. V kombinaci s trimethyljodsilanem (TMSI) umožňuje silylaci hydroxylových skupin v jakékoliv poloze. Používáno je také činidlo BSTFA, které je stejně reaktivní jako BSA, ovšem činidlo i vedlejší produkty jsou těkavější. Nelze opomenout ani

dříve používanou silanizační směs sestávající z HMDS, TMCS a pyridinu, nejčastěji v poměru 3:1:9 nebo 2:1:3 [45,75,92]. Derivatizace karboxylových a hydroxylových skupin probíhá ve dvou oddělených krocích, což prodlužuje přípravu vzorku před analýzou, a proto byly hledány způsoby, jak obě funkční skupiny derivatizovat v jednom kroku. Jednou takovou možností je použití anhydridu kyseliny heptafluormásečné, bohužel tento postup skýtá značná omezení, neboť vzniklé deriváty podléhají snadno tepelnému rozkladu a v případě žlučových kyselin s keto skupinou jsou detegovány dva píky [93,94]. Kromě hydroxylových skupin jsou často přítomny i oxoskupiny, které by mohly poskytovat enol-TMS ethery a více produktů, pokud by byly pouze silanizovány. Těmto nežádoucím jevům se lze vyhnout přeměnou oxoskupiny na oxim, obvykle methyloxim a až poté derivatizovat hydroxylové skupiny TMS činidlem [95].

2.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou alifatické karboxylové kyseliny, které se od sebe odlišují délkou řetězce (případně jeho rozvětvením), stupněm nenasycenosti a případnými funkčními skupinami, které na ně mohou být navázány. V závislosti na délce řetězce, respektive počtu uhlíkových atomů mohou být rozděleny na krátké těkavé mastné kyseliny (C1 – C5), středně dlouhé mastné kyseliny (C6 – C14), dlouhé mastné kyseliny (> C15) a velmi dlouhé mastné kyseliny (> C40). Většina přírodních mastných kyselin má ve svém nerozvětveném řetězci sudý počet atomů uhlíku. Jedná-li se o nenasycené kyseliny, všechny jejich dvojné vazby jsou v *cis* konformaci. Vyskytují se jako volné nebo jsou součástí složitějších molekul – lipidů. Vázány mohou být i na jiné organické molekuly jako jsou proteiny, alkoholy nebo cukry [9,96,97]. Mastné kyseliny slouží jako zdroj energie a jsou hlavními složkami buněčných membrán, kde ovlivňují jejich strukturu a tekutost. Rovněž jsou prekurzory mnoha signálních molekul - např. eikosanoidů, které regulují různé procesy jako je zánět, srážení krve nebo produkce hormonů [98,99].

Chromatografie je nejvhodnějším nástrojem pro analýzu mastných kyselin z jednoduchých i komplexních vzorků. Využívány jsou různé druhy chromatografické separace (tenkovrstvá chromatografie, superkritická fluidní chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie), nicméně standardem a bezesporu nejfrekventovanější metodou analýzy mastných kyselin je plynová chromatografie [4,9]. GC analýze předchází derivatizace mastných kyselin za účelem zvýšení těkavosti, zlepšení separace, potlačení silné adsorpce a snížení chvostování píků. Derivatizace může dále zlepšit mez detekce a v některých případech poskytnout cenné informace při fragmentaci v MS [9].

2.4.1 Možnosti derivatizace mastných kyselin

2.4.1.1 *Methylace*

Methylace je nejpoužívanější a nejrozšířenější způsob derivatizace mastných kyselin, kdy pomocí různých činidel (a katalyzátorů) dochází k přeměně karboxylové skupiny mastné kyseliny na příslušný methylester [4,9,11,100,101]. Připravené methylestry mastných kyselin jsou v literatuře známy pod zkratkou FAMES nebo FAME derivatives (z angl. fatty acid methyl esters) a pod touto zkratkou se mohou objevovat i dále v textu.

Během methylace jsou lipidy transesterifikovány za přítomnosti katalyzátoru a alkoholu – methanolu, který nahradí organickou funkční skupinu původního esteru, např. glycerolovou nebo sfingosinovou. Pro přípravu vyšších esterů může být namísto methanolu použit i ethanol, 2-propanol nebo butanol. Katalyzátory mohou být kyselé nebo zásadité povahy. Kyselina chlorovodíková, sírová a fluorid boritý jsou typickými zástupci kyselých katalyzátorů. Oproti tomu methanolický roztok hydroxidu draselného nebo sodného (obvykle o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a methoxid sodný jsou používány při bazické transesterifikaci. Bazicky katalyzovaná methanolýza probíhá mnohem rychleji (do 2 minut za laboratorní teploty pro glycerolipidy) a za mírnějších teplotních podmínek než ta kyselá katalyzovaná. Navíc nedochází k problémům s izomerií dvojných vazeb a činidla jsou méně agresivní, tudíž se s nimi lépe manipuluje při zpracování vzorku. Jedinou nevýhodou je nemožnost použití bazické transesterifikace pro methylaci volných mastných kyselin [4,100–102]. Samotné methylaci musí nicméně předcházet extrakce mastných kyselin z matrice vzorku. K tomuto účelu jsou často používány metody extrakce z kapaliny do kapaliny využívající kombinace organických rozpouštědel navržené Folchem [103] nebo Bligh a Dyerem [104]. Někdy může být po extrakci zařazen ještě další krok – saponifikace neboli zmýdelnění. To umožňuje štěpit esterové vazby a v případě potřeby oddělit zmýdelnitelný podíl (mastné kyseliny) od nezmýdelnitelné frakce (vyšší mastné alkoholy, steroly aj.) [101,105].

Další možností, jak připravit FAMES, je reakce s diazomethanem [106]. Při této esterifikační reakci dochází pouze k selektivní methylaci volných mastných kyselin v přítomnosti jiných lipidů. Nevýhodou tohoto činidla je extrémní toxicita a vysoká reaktivita, neboť je známo, že reakcí diazomethanu s dvojnými vazbami, karbonylovými nebo fenolickými skupinami vznikají různé artefakty [9,100,107].

Zpracování vzorku před analýzou je ve všech výše zmíněných případech poměrně dlouhé, zahrnující mnoho kroků, které mohou vést k jeho kontaminaci, nebo naopak ke ztrátě analytů. Proto byly hledány možnosti, jak zpracování vzorku co nejvíce zjednodušit, ideálně tak, aby extrakce i methylace proběhly zároveň v jednom kroku. Jednokroková methylace bývá často prováděna methanolickým roztokem kyseliny chlorovodíkové, přičemž reakční podmínky se mohou významně lišit v závislosti na typu katalyzátoru, polaritě přidávaných rozpouštědel, obsahu vody ve vzorku, reakční teplotě a době reakce [102,108,109]. Značné zjednodušení v přípravě vzorku přináší i kvartérní amoniové soli jako již zmíněný TMAH, PhTMAH nebo TFTMAH v methanolu, které slouží jako rychlá (trans)esterifikační činidla bez nutnosti extrakce před analýzou. Specifická je u těchto činidel reakce za velmi vysokých teplot, kterých je dosahováno v nástřikovém prostoru GC. Jsou-li tedy mastné kyseliny nástříknuty spolu s některým z těchto činidel, dojde k jejich přeměně na kvartérní soli, které jsou okamžitě pyrolyzovány za vzniku FAMES a příslušného aminu [11,17,100,110].

2.4.1.2 Silylace

Kromě methyl esterů bývají také často připravovány TMS estery mastných kyselin. V závislosti na typu mastné kyseliny jsou používána různá činidla a katalyzátory. Je-li přítomna pouze karboxylová skupina, pak plně postačuje HMDS. Substituované kyseliny (např. hydroxykyseliny) nebo dikarboxylové kyseliny už vyžadují extrémnější reakční podmínky, což splňuje BSTFA nebo MSTFA v kombinaci s katalyzátorem TMCS. Vedle TMS derivátů jsou hojně připravovány i TBDMS deriváty mastných kyselin pomocí činidla MTBSTFA, které jsou relativně stabilní a často používané pro hydroxylované mastné kyseliny. Výhodou TMS (nebo TBDMS) derivátů oproti methyl esterům je aplikace na širší okruh mastných kyselin, včetně těch nenasycených a rozvětvených [11,17,111–113].

2.5 Sacharidy

Jako sacharidy jsou označovány polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony obsahující ve své molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy a také jejich deriváty, které z nich vznikají různými reakcemi (oxidačními, redukčními, substitučními aj.). V závislosti na jejich relativní molekulové hmotnosti, respektive počtu monosacharidových jednotek je můžeme dělit na monosacharidy (1), disacharidy (2), oligosacharidy (3-10) a polysacharidy (> 10). Sacharidy se mohou vyskytovat jak volně, tak jako součást glykoproteinů, glykolipidů anebo jsou kovalentně vázány k různým látkám typu

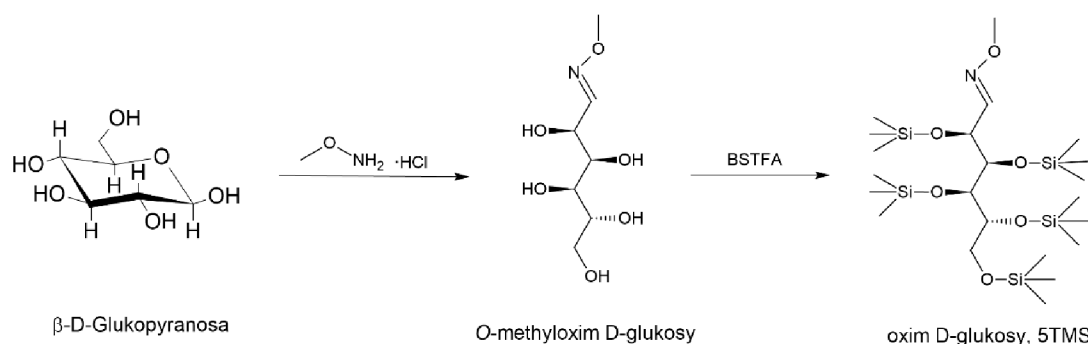
flavonoidy, terpenoidy, steroidy aj. Sacharidy jsou významné složky živých organismů, ve kterých plní mnoho funkcí. Jsou stavebním materiálem všech rostlinných buněk a tkání, slouží jako důležitý zdroj potravy a energie živočichů a zásobárna živin rostlin (uložená v kořenech, semenech a plodech). Dále jsou klíčovými sloučeninami pro biosyntézu proteinů a lipidů a jsou funkčními složkami nukleových kyselin (RNA, DNA) [114–117].

2.5.1 Možné způsoby stanovení různých druhů sacharidů

Způsob analýzy se liší podle povahy vzorku sacharidu. Jedná-li se o směs monosacharidů, pak jsou pro jejich identifikaci a kvantifikaci používány nejvíce chromatografické a spektroskopické postupy. Jak GC, tak LC jsou rozšířenými metodami analýzy sacharidů, nicméně LC byla dříve preferovanější kvůli možnosti analyzovat sacharidy bez nutnosti derivatizace, která je naopak pro GC nezbytná. V dnešní době se dostává do popředí metoda vysokoúčinné aniontově-výměnné chromatografie (HPAEC), která je hojně používána pro stanovení sacharidů, ať už jde o rutinní monitorování nebo výzkumné aplikace [118,119].

GC nabízí vysoké rozlišení a citlivost, reprodukovatelnost, nižší citlivost separační kolony vůči matricovým efektům a dostupnost široké škály detektorů včetně MS. Tyto vlastnosti činí z GC-MS výkonnou techniku pro analýzu komplexních směsí, poskytující podrobné informace o struktuře hledaných analytů. Nicméně sacharidy jakožto polární, hydrofilní, málo těkavé a tepelně citlivé sloučeniny nejsou vhodné pro přímou analýzu pomocí GC-MS a vyžadují derivatizaci [14,120]. Příprava derivátů sacharidů pro GC-MS však není jednoduchá z několika důvodů. Za prvé je nutné zohlednit vysoký počet funkčních skupin v molekule (min. jedna na každém atomu uhlíku, většina z nich jsou -OH skupiny). Dále je to přítomnost různých tautomerních forem v roztoku vedoucí ke vzniku komplikovaných chromatogramů. A v neposlední řadě je třeba uvažovat labilitu některých molekul a v některých případech i jejich sterické bránění. Navíc MS fragmentace blízkých izomerů je velmi podobná a rozhodujícím údajem pro identifikaci se tak stává pouze retenční čas [11,121]. Jednokrokové derivatizační techniky typu silylace, methylylace, acetylace a trifluoracetylace jsou používány pro analýzu polyalkoholů a neredukujících sacharidů (ty bez volné karbonylové funkční skupiny, která by se mohla oxidovat, např. sacharóza a trehalóza). Naopak redukující sacharidy vyžadují obvykle dvou nebo více krokovou derivatizaci, která omezí množství isomerních píků, které by jinak vznikaly v důsledku reaktivity volné karbonylové skupiny. Při dvoukrokové derivatizaci se nejprve převede karbonylová skupina na specifický derivát, který již dále nebude poskytovat různé

tautomery. Toho je dosaženo buď redukcí, např. tetrahydridoboritanem sodným (NaBH_4), která poskytne příslušné cukerné alkoholy (alditoly) nebo reakcí se (substituovanými) hydroxylaminy, které poskytnou odpovídající oximy. Ve druhém kroku jsou nechráněné primární a sekundární hydroxylové skupiny derivatizovány, např. (trifluor)acetylací nebo trimethylsilylací [120,122]. Redukce karbonylové skupiny pomocí NaBH_4 je velmi účinná a eliminuje možnost vzniku anomerních derivátů. Acetylace vzniklých alditolů je navíc poměrně jednoduchá a vzniklé deriváty – alditol acetáty značně zjednodušují chromatogramy, neboť poskytují jeden pík pro každý sacharid. Nevýhodou této metody je časová náročnost, ačkoliv jsou jednotlivé kroky přípravy jednoduché a také fakt, že více cukrů může vytvořit stejný derivát. Respektive různé aldosity mohou po redukcí poskytnout stejný alditol - např. D-arabiosa i D-lyxosa poskytují D-arabinitol. V případě ketos je situace ještě složitější, neboť jsou možné dvě cesty, kterými může být -OH skupina připojena na uhlík C-2 [9,121,123]. Druhou možností je tvorba oximů, nejčastěji pomocí O-methylhydroxylaminu ve formě hydrochloridu, které mohou být silanizovány za vzniku TMS oximů – viz obrázek 5. Tento způsob poskytuje dva píky příslušející dvěma formám oximu – (Z) a (E), které existují ve vodných roztocích redukujících sacharidů a samozřejmě pouze jeden pík jde-li o neredukující sacharidy. TMS oximy jsou těkavější, a proto je metoda použitelná pro různé druhy sacharidů, včetně aldonových kyselin (cukerných kyselin) a dovoluje tak současné stanovení neutrálních sacharidů, polyalkoholů, aldonových kyselin a dalších složek jako jsou karboxylové kyseliny, aminokyseliny aj., nejčastěji v matricích přírodního původu (např. ovoce). Metoda může být modifikována, kdy namísto silylace oximů dojde k jejich dehydrataci a následnému převedení na nitroalditol acetáty, které pak poskytují pouze jeden pík pro každý sacharid. Tento postup je nicméně aplikovatelný pouze na aldosity a nikoliv ketosy [120,121,124–126].



Obr. 5 Derivatizace $\beta\text{-D-Glukopyranosy}$. V prvním kroku dojde k vytvoření O-methyloximu D-glukosy reakcí s hydrochloridem O-methylhydroxylaminu. Následuje silylace BSTFA za tvorby silylovaného derivátu oximu D-glukosy. Převzato z [122,127]

3 Cíle disertační práce

Předložená disertační práce si kladla za cíl především optimalizaci stávajících GC-MS metod a dále vývoj metod nových pro analýzu látek převážně lipidové povahy jako jsou mastné kyseliny, steroidy a žlučové kyseliny. Tyto analýzy probíhaly v různorodých maticích rostlinného i živočišného původu, a proto bylo nutné optimalizovat zejména extrakční postupy pro sledované analyty. Jelikož se jednalo ve většině případů o látky polární, málo těkavé, byla nezbytná derivatizace, které byla věnována obzvlášť pozornost, neboť bez ní by nebylo možno některé látky identifikovat, natož kvantifikovat. Konkrétní cíle práce lze shrnout do několika bodů:

- vývoj jednoduché GC-MS metody pro rozlišení kravského mléka pocházejícího z vnitřního a venkovního chovu
- vývoj a optimalizace GC-MS metody pro analýzu produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny
- vývoj metody pro rozlišení lipidových pojiv na bázi oleje a vajec v nástěnných malbách a aplikace této metody na reálné historické vzorky nástěnných maleb
- vývoj metody pro společnou analýzu polárních a nepochárních látek z jednoho mikrovzorku osemení hrachu setého

4 Experimentální část

4.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce

4.1.1 Použité chemikálie a vzorky

7-dehydrocholesterol (7-DHC), cholesterol (CHOL), izotopově značený cholesterol- $25,26,26,26,27,27,27\text{-D}_7$ (CHOL-D7), epicoprostanol (EPI), pyridin a *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) byly pořízeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Methanol, *n*-heptan a *n*-hexan analytické čistoty byly zakoupeny v PENTA (Praha, Česká republika). 2-propanol (čistoty HPLC) od VWR chemicals (Radnor, Pennsylvánie, USA). Chlorid sodný a hydroxid sodný byly získány od Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a kyselina chlorovodíková od firmy Honeywell (Charlotte, Severní Karolína, USA). Ultračistá voda (rezistivita $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) byla získána z Milli-Q aparatury (Merck, Darmstadt, Německo). Roztoky standardů steroidních látek (7-DHC, CHOL, CHOL-D7 a EPI) o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly připraveny v 2-propanolu a skladovány v lednici při teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Devět regionálních vzorků kravského mléka bylo pořízeno na těchto moravských farmách: Červenka, Hustopeče nad Bečvou, Kokory, Poruba, Rožnov pod Radhoštěm, Valašská Bystřice a Vrbátky. Na třech z nich (Červenka, Rožnov pod Radhoštěm a Vrbátky) měly krávy volný přístup na venkovní pastvu, u zbylých farem byly krávy ustájeny uvnitř budovy s volným přístupem po jejich prostorách. Čerstvé, nepasterizované vzorky mléka byly odebrány osobně na farmě z mlékomatů. Jeden vzorek byl zakoupen v místním obchodním řetězci. Jednalo se o pasterizované mléko s označením „Bio”, které na základě legislativy (Zákon č. 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství [128]) pocházelo z venkovního chovu a mělo také certifikát o původu (CZ-BIO-002). Všechny vzorky mléka byly skladovány při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do doby, než byly analyzovány.

4.1.2 Příprava vzorků

Do centrifugační zkumavky (15 ml) bylo naváženo 2,5 g mléka a přidáno 50 μl vnitřního standardu (IS) epicoprostanolu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Bylo přidáno 0,5 ml nasyceného vodného roztoku NaCl, 4 ml methanolu, 0,35 ml 1M-HCl a 5 ml *n*-heptanu. Směs byla po dobu 30 minut protřepávána a následně centrifugována 5 minut při 4400 rpm ($2770 \times g$). Horní heptanová vrstva byla odebrána do čisté zkumavky a bylo k ní přidáno 0,5 ml

hydroxidu sodného v methanolu ($2,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Směs byla zahřívána na vodní lázni po dobu 30 minut při $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Každých 5 minut byla navíc vortexována 20 s. Po ukončení methanolýzy a vychladnutí reakční směsi na laboratorní teplotu byly přidány 4 ml deionizované vody a 1 ml 1M-HCl, aby došlo k částečné neutralizaci roztoku. Výsledná směs byla jemně protřepána a centrifugována 6 minut při 4400 rpm ($2770 \times g$). Extrakce *n*-heptanem s následnou methanolýzou byla opakována celkem čtyřikrát za účelem získání co největších extrakčních výtěžků. Horní organické fáze získané z jednotlivých kroků byly spojeny dohromady, převedeny do 20 ml skleněné vialky a odfoukány proudem dusíku při $75 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledná žlutě zbarvená hustá kapalina obsahující methylestery mastných kyselin a steroidy byla převedena do 2 ml GC autosamplerové vialky. 20 ml skleněná vialka byla třikrát vypláchnuta 1 ml *n*-heptanu a roztok byl přidán k obsahu 2 ml GC vialky a odfoukán proudem dusíku. Derivatizace byla prováděna pomocí 50 μl BSTFA v prostředí 50 μl pyridinu při $90 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Po vychladnutí byly derivatizované vzorky doplněny *n*-hexanem na objem 1 ml a analyzovány pomocí GC-MS. Všechny vzorky byly připraveny v triplikátech a každý byl nastříknut třikrát (celkem tedy devět analýz).

4.1.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Plynový chromatograf Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Nosný plyn – Helium (čistota 5,5; konstantní rychlost průtoku 0,9 ml/min, SIAD, Bergamo, Itálie). Kapilární kolona – OPTIMA-5MS, 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Teplotní program: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min) – $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ – $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 min); nástřik 2 μl ($280 \text{ }^\circ\text{C}$), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC a SIM, kde byly vybrány vždy tři charakteristické ionty každého steroidu pro identifikaci a jeden ion (podtržený) pro kvantifikaci. Byly sledovány následující ionty: *m/z* 215, 370 a 355 pro EPI; *m/z* 336, 375 a 465 pro CHOL-D7; *m/z* 129, 329 a 368 pro CHOL (129 *m/z* v případě EPI jako IS a 329 *m/z* když byl jako IS použit CHOL-D7); *m/z* 325, 351 a 456 pro 7-DHC.

4.1.4 Statistická analýza dat

Pro zpracování dat byl použit statistický software QC.Expert 3.2 (TriloByte Ltd., Pardubice – Staré Hradiště, ČR). Analýze byly podrobeny následující parametry: linearita, limity detekce (L_D) a kvantifikace (L_Q) a relativní směrodatná odchylka obsahu analytu. Linearita byla testována takzvaným F_L testem věrohodnostního poměru, který je založen na porovnání residuálního součtu čtverců lineárního (RSC_L) a kvadratického regresního modelu

(RSC_Q) – rovnice 1 [129]. Nulová hypotéza uváděla, že kvadratický člen b_2 je roven nule ($H_0: b_2 = 0$) a byla testována proti alternativní hypotéze, ve které byl kvadratický člen nenulový ($H_1: b_2 \neq 0$). Testovací kritérium (rovnice 1) bylo porovnáno s kritickou hodnotou $F_{crit}(1, n-3)$ Fisher-Snedecorovy F-distribuce, kde n je počet kalibračních bodů. Hodnoty L_D a L_Q byly vypočítány v souladu s normou ISO 11843-2:2000, která je založena na doporučení dle IUPAC [130]. L_D byl stanoven jako poměr směrodatné odchylky úseku kalibrační přímky a směrnice kalibrační závislosti. L_Q byl vypočten jako koncentrace odpovídající nejmenší úrovni signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce od kalibrace rovna 0,1 [129]. Software byl rovněž použit ke statistickému srovnání hodnot získaných pro vnitřně a venkovně ustájené krávy pomocí nepárového dvouvýběrového Studentova t -testu. Tento test byl rovněž aplikován pro porovnání obsahu CHOL a 7-DHC při použití dvou různých vnitřních standardů (EPI, CHOL-D7).

$$F_L = \frac{(RSC_L - RSC_Q)(n - 3)}{RSC_Q}$$

(1)

4.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS

4.2.1 Použité chemikálie

Standardy žlučových kyselin: chenodeoxycholová (CDCA), cholová (CA), deoxycholová (DCA), lithocholová (LCA), ursodeoxycholová (UDCA) a derivatizační činidla (BSTFA, MSTFA a TMCS), pyridin a $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ byly pořízeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Ze standardů žlučových kyselin byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v acetonu, které byly skladovány v lednici při teplotě 5°C do doby analýzy. Acetonitril, ethylacetát, hydroxid sodný a dusičnan stříbrný byly z Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Koncentrovaná kyselina chloristá pocházela z Lachemy (Brno, Česká republika) a n -hexan z PENTA (Praha, Česká republika).

4.2.2 Příprava vzorků

4.2.2.1 Optimalizace derivatizace

Pro derivatizační reakce byl použit standard chenodeoxycholové kyseliny (CDCA) o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, ze kterého bylo odebráno $30 \mu\text{l}$ do vialky a odfoukáno pod proudem dusíku. Použita byla silylační činidla: BSTFA, MSTFA a kombinace BSTFA s TMCS. V případě BSTFA a MSTFA bylo k odparku CDCA přidáno $50 \mu\text{l}$ pyridinu a 50

μl derivatizačního činidla. U vzorků s TMCS byl navíc přidán 1 μl tohoto činidla, a to buď normálně, nebo pod hladinu roztoku (vzorky označeny velkým písmenem A). Derivatizační směs byla zahřívána: I - 30 minut při 80 °C a II - 60 minut při 120 °C.

4.2.2.2 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny a analýza standardů žlučových kyselin

Roztok CDCA ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v acetonitrilu byl dehydratován 0,1M-HClO₄ při 50 °C po dobu 10 minut. Poté byly 2 ml vzorku částečně neutralizovány 0,9 ml 0,2M-NaOH. Obsah acetonitrilu byl snížen odfoukáním proudem dusíku na objem cca 1 ml a vzorek byl extrahován 1 ml ethylacetátu. Extrakce probíhala na třepačce (10 minut/1300 rpm) a poté bylo odebráno 750 μl ethylacetátové fáze, která byla odpařena v proudě dusíku do sucha. Vzorek byl derivatizován 50 μl BSTFA v 50 μl pyridinu s přídatkem 1 μl TMCS při teplotě 90 °C po dobu 30 minut a před GC-MS analýzou byl doplněn na objem 1 ml *n*-hexanem.

Dehydratační produkt CDCA (označen jako VB-A-325) a oxidační produkt (VB-A-498) byly synteticky připraveny na Katedře organické chemie (Univerzita Karlova, Praha, ČR). Tyto standardy spolu s ostatními standardy žlučových kyselin (CA, LCA, DCA, a UDCA) byly rozpuštěny v acetonu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), bylo odebráno 30 μl, odfoukáno proudem dusíku do sucha a derivatizováno směsí BSTFA + pyridin + TMCS v poměru 50:50:1 při 90 °C po dobu 30 minut. Pro elektrochemickou oxidaci byl roztok standardu VB-A-325 ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) připraven v 0,1M-NaClO₄ v acetonitrilu.

4.2.2.3 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny

Elektrochemický článek byl složen z platinové síťkové elektrody, referentní Ag/Ag⁺ elektrody (Ag/0,01M-AgNO₃, 1M-NaClO₄ v CH₃CN) a pomocné platinové síťkové elektrody, oddělené od měrného roztoku solným můstkem obsahujícím 0,5M-NaClO₄. Roztok CDCA ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl dehydratován (viz výše) a následně oxidován při 1,2 V po dobu 30 minut. V rámci optimalizace probíhala oxidace i při vyšším potenciálu – 1,4 V a také v různých časových intervalech v rozmezí od 5 do 30 minut. Objem 2 ml elektrolyzátu byl částečně zneutralizován 0,9 ml 0,2M-NaOH, odpařen v proudě dusíku na cca 1 ml a extrahován 1 ml ethylacetátu. Extrakce probíhala na třepačce (10 minut/1300 rpm) a poté bylo odebráno 750 μl ethylacetátové fáze, která byla odpařena v proudě dusíku do sucha. Vzorek byl derivatizován dle postupu uvedeného výše. Kromě ethylacetátu byla pro extrakci vyzkoušena i jiná rozpouštědla – chloroform a toluen, která byla použita ve stejném objemu jako ethylacetát.

Elektrochemická oxidace v průtoku byla prováděna s využitím průtokové cely EcaFlow s pracovní porézní uhlíkovou elektrodou, referenční Ag/AgCl elektrodou v nasyceném KCl s přídavkem AgNO₃ a pomocnou platinovou elektrodou. Elektrochemická oxidace standardů probíhala při potenciálu 1,7 V za průtoků 20, 50 a 100 µl/min (VB-A-325) a 50 µl/min (CDCA). Zpracování elektrolyzátů probíhalo poté stejným způsobem jako bylo popsáno v předchozím odstavci včetně derivatizace.

4.2.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Většina analýz byla prováděna pomocí plynového chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Nosným plynem bylo helium (5,5; Siad, Itálie) s konstantní rychlostí průtoku 0,9 ml/min. Kapilární kolona – OPTIMA-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Teplotní program: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 320 °C (20 min); nástřik 2 µl (300 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC. Pro MS/MS experimenty byl použit plynový chromatograf Agilent 7890B s hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem Agilent 7010 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Separace probíhala na dvou kapilárních kolonách HP-5MS UI spojených v sérii (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm každá z nich) s konstantní průtokovou rychlostí 1,2 respektive 1,4 ml/min. Dusík (4,8; Messer Group GmbH, Německo) s průtokem 1,5 ml/min byl použit jako kolizní plyn a helium (5,5; Siad, Itálie) s průtokem 2,25 ml/min jako „quencher gas“. Teplotní program byl následující: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 320 °C (20 min); nástřik 1 µl (300 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. Celkový čas jedné analýzy byl 49 minut. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC a v režimu MRM, kdy byl sledován vznik iontu *m/z* 266 (produktový ion) z *m/z* 518 (prekurzorový ion). Fragmentace iontu *m/z* 266 byla provedena při kolizní energii 30 eV.

4.3 Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS

4.3.1 Chemikálie

Methanol, 2-propanol a *n*-hexan analytické čistoty byly pořízeny z PENTA (Praha, Česká republika). Toluén (čistota p.a.) byl pořízen ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). 3-(trifluormethyl)fenyltrimethylamonium hydroxid (TFTMAH), 5% *w/v* v methanolu (známý jako MethPrep II) byl dodán firmou Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japonsko). Standardy mastných kyselin: azelaová

(2C₉), suberová (2C₈), palmitová (C_{16:0}), stearová (C_{18:0}), olejová (C_{18:1}), linolová (C_{18:2}), linolenová (C_{18:3}) spolu se standardem cholesta-3,5-dien-7-onu byly dodány od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Zásobní roztoky standardů mastných kyselin o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ byly připraveny v *n*-hexanu a zásobní roztok cholesta-3,5-dien-7-onu (1 mg·ml⁻¹) v 2-propanolu. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 5 °C.

4.3.2 Modelové a historické vzorky nástěnných maleb

Pro přípravu modelových vzorků byly použity následující pigmenty: červená hlínka, Egyptská modř a indigo od firmy ZECCHI (Florence, Itálie). Azurit, olovnato-cínčitá žluť (Pb-Sn žluť) a okr byly zakoupeny u Kremer Pigmente GmbH & Co. KG (Aichstetten, Německo). Olejové pojivo bylo připraveno ze směsi polymerizovaného lněného oleje (Umton Colours, Děčín, Česká republika) a čištěného lněného oleje (H. Schmincke & Co.-GmbH & Co.KG, Erkrath, Německo). Čerstvé slepičí vejce bylo zakoupeno v místním obchodě. Pro přípravu pojiva byl použit pouze žloutek, který byl od bílku ručně oddělen.

Byly připraveny dvě identické cihličky z vápenné omítky na základě historických postupů [131]. Základ bloků jádrové omítky, sloužící jako podklad, byl tvořen z hrubého křemičitého písku (Tomi-písek s.r.o., Česká republika) a hašeného vápna (Vápenka Čertovy schody, Česká republika) v poměru 3:1. Tato jádrová vrstva následně tvrdla cca čtyři dny ve vlhkém prostředí. Po vytvrdnutí (nikoliv však úplném zaschnutí) byl povrch strhnut před nanesením horní omítky, která byla připravena z hašeného vápna a jemnějšího písku (velikost částic do 2 mm) v poměru 1:2. Tenká vrstva této omítky byla ponechána pouze do zavadnutí a filcována jemným filcem. Následně byla tzv. kletována kočičím jazýčkem. Během procesů filcování a kletování byl povrch mírně vlhčen, aby se malta lépe utáhla a vápno vyvstalo více na povrch. Jednotlivé práškové pigmenty byly na podložních sklíčkách smíchány za pomoci špachtle s pojivy (vejce/olej) a nanесeny na suchý povrch vápenné omítky jako čtverečky o velikosti cca 1 cm² (viz fotografie na obrázku 6). Pár dní po zaschnutí byly z jedné cihličky odebrány vzorky a označeny jako NA (not aged = nestárnuté). Druhý blok omítky byl podroben umělému stárnutí.



Obr. 6 Blok vápenné omítky se čtverečky (cca 1 cm²) pojiv (lněný olej a vejce) se šesti různými pigmenty

Historické vzorky nástěnných maleb pocházely ze tří oblastí. Jednalo se o středověké nástěnné malby z Přemyslovského paláce u kostela sv. Václava v Olomouci (vzorky označeny jako OL1037 – OL1189). Dále pak vzorky z hradní kaple Navštívení Panny Marie v Bečově nad Teplou (vzorky DJ14 – DJ21). Třetí oblast byla v Rakousku a jednalo se o pozdně gotickou deskovou malbu ze sbírky Tyrolského zemského muzea (vzorky AT2600 a AT2601). Podrobnosti o vzorcích jsou uvedeny v tabulce I. Vzorky byly odebrány již dříve pověřenými osobami a u některých z nich byly provedeny předběžné analýzy v podobě mikrochemických a histochemických důkazů (mimo pracoviště univerzity). Z každého vzorku bylo odebráno minimální množství materiálu za pomoci skalpelu pod stereomikroskopickou kontrolou.

Tabulka I Seznam vzorků historických nástěnných maleb použitých k analýze včetně výsledků předběžných analýz týkajících se typu použitého pojiva a pigmentu (prováděných dříve)

Oblast/označení vzorku	Pigment	Biblická událost	Předběžné mikrochemické a histochemické důkazy
Olomouc			
OL1037	olovnatá běloba, olovnato-cínčitá žluť, azurit	Zvěstování Panny Marie	přítomnost bílkovin, stopy olejí, fosfor
OL1040	olovnatá běloba		
OL1051	původně olovnatý pigment – přeměněn na PbO ₂ , příměs hematitu	Oplakávání Krista	přítomnost bílkovin, fosfor (možná přítomnost vysychavého oleje)
OL1054	okr, zrna révové černi		

OL1180	olovnatá běloba, révová čern		
OL1181	olovnatá běloba, olovnato-cínčitá žluť, vrstva rumělky s miniem, révová čern		
OL1182	olovnatá běloba, olovnato-cínčitá žluť, azurit, příměs révová čern a červený lak	Zmrtvýchvstání Krista	přítomnost vysychavých olejů a bílkovin, malé množství přírodní pryskyřice
OL1187	azurit, olovnatá běloba, révová čern, zrna minia		
OL1189	olovnatá běloba, aurit, příměs okru, révová čern		
Bečov nad Teplou			
DJ14	azurit	Korunování Panny Marie	-
DJ17	olovnatá běloba, realgar	Smrt Panny Marie	vykazování fluorescence pod UV
DJ21	okr, modrý pigment – možná azurit	Zvěstování Panny Marie	
Rakousko			
AT2600	-	Ukřižování s Marií a Janem	-
AT2601	-		-

4.3.3 Umělé stárnutí

Umělé stárnutí bylo realizováno pomocí komory SOLARBOX 3000E RH (CO.FO.ME.GRA., Miláno, Itálie), vybavené xenonovou lampou, která simuluje celé optické spektrum slunce. Parametry byly nastaveny takto: záření Xe lampy $500 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, teplota $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a relativní vlhkost $\sim 75 \%$. Modelový blok omítky byl za těchto podmínek ponechán 504 hodin. Po této době byl vytáhnut a byly odebrány referenční vzorky – jeden čtvereček velikosti cca 1 cm^2 pro každý druh pojiva a pigmentu. Vzorky byly označeny jako UV1. Blok byl poté vrácen do komory a stárnutí pokračovalo dalších 1008 hodin, přičemž vždy po 504 hodinách byly vzorky odebrány (značeno UV2, respektive UV3). Celková doba umělého stárnutí tak činila 1512 hodin.

4.3.4 Zpracování vzorků před GC-MS analýzou

Malé kousky odebraných referenčních vzorků (cca 0,1 – 0,2 mg) byly vloženy do skleněného kónického insertu (objem 50 μl) umístěného v GC autosamplerové vialce. Bylo přidáno 20 μl derivatizační směsi, která se skládala z jednoho dílu 5% w/v methanického roztoku MethPrep II a dvou dílů směsi rozpouštědel (methanol:toluen v poměru 1:2, v/v). Výsledná směs byla vortexována 30 s, sonifikována 10 min v ultrazvukové lázni a následně zahřívána 1 hodinu na $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly vzorky centrifugovány 5 min při 4400 rpm, supernatanty byly přeneseny do nových insertů

a analyzovány pomocí GC-MS. Sada měřených vzorků obsahovala 7 vzorků s vaječným pojivem (jeden nepigmentovaný vzorek a 6 vzorků s pigmenty uvedenými výše) a 7 vzorků s olejovým pojivem (stejně pigmenty jako v případě vejce) pro každé stádium umělého stárnutí (NA, UV1, UV2 a UV3). Každý ze vzorků byl nastříknut třikrát. Celkově bylo v jednom kroku stárnutí provedeno 21 analýz pro vzorky vaječného pojiva a 21 analýz pro vzorky se lněným olejem. Historické vzorky nástěnných maleb byly připravovány stejným způsobem, pouze s tím rozdílem, že bylo použito menší množství vzorku (cca < 0,1 mg).

4.3.5 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Chromatografické analýzy byly prováděny na dvou GC-MS přístrojích, kdy jeden byl v Olomouci (GC-MS 1) a druhý ve Vídni (GC-MS 2). Jednalo se o stejný typ – plynový chromatograf Agilent 6890 spojený s hmotnostním detektorem (MSD) Agilent 5973N (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Nosný plyn – Helium (5,5; konstantní rychlost průtoku 0,9 ml/min, SIAD, Bergamo, Itálie). Kapilární kolony – OPTIMA-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Macherey-Nagel, Düren, Německo), která byla použita v Olomouci a J&W DB-5MS UI, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ve Vídni. Teplotní program: 50 °C (1 min) – 10 °C/min – 320 °C (12 min); nástřik 2 μl (300 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC. Identifikace sloučenin byla založena na srovnání příslušných hmotnostních spekter analyzovaných sloučenin se spektry dostupných standardů a/nebo se spektry z knihovny spekter NIST 2020 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, USA).

4.3.6 Statistická analýza dat

K ověření základních předpokladů o datech a statistickému porovnání dvou výběrů byl použit statistický software QC.Expert 3.2 (TriloByte Ltd., Pardubice – Staré Hradiště, ČR). Normalita dat byla ověřena vizuálně pomocí histogramu a Q-Q grafu a dále pomocí statistických testů: Momentový test (dle Jarque-Beera) a Kolmogorovův-Smyrnovův test (K-S test). Momentový test je založen na shodě šikmosti a špičatosti s normálním rozdělením [132,133] a K-S test je založen na rozdílu teoretické a výběrové distribuční funkce [134,135]. Porovnání získaných výsledků vaječného a olejového pojiva bylo provedeno nepárovým dvouvýběrovým Studentovým *t*-testem. Tento *t*-test byl rovněž použit k porovnání výsledků z přístroje GC-MS 1 a GC-MS 2.

Získaná data z GC-MS byla dále podrobena analýze prostřednictvím analýzy hlavních komponent (PCA), zahrnující jednorozměrné škálování (univariate scaling). Výsledná

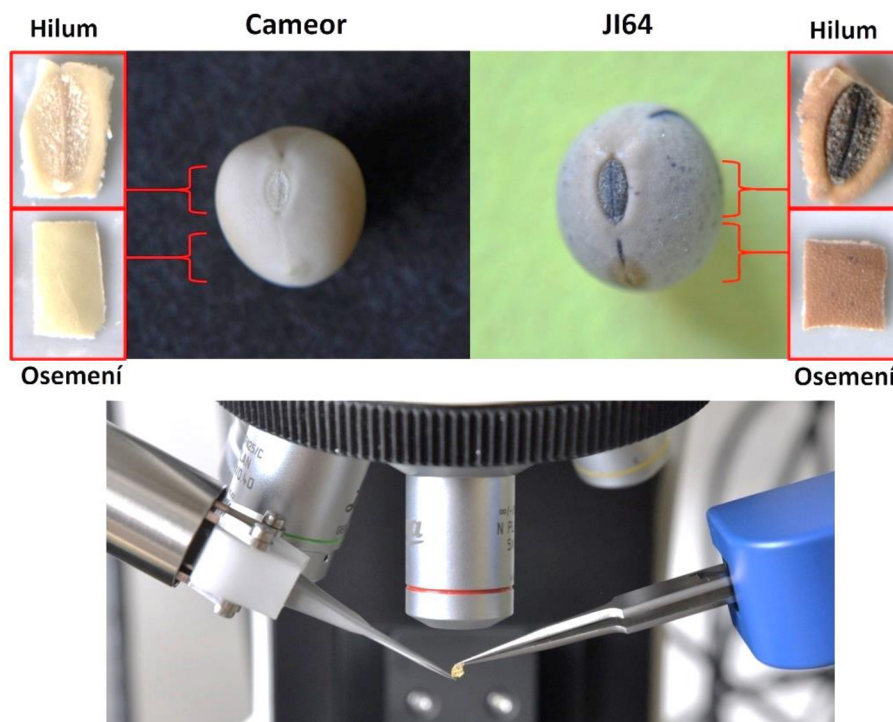
transformovaná datová matice byla poté přenesena do R Statistical Software (verze 4.1.2, R Core Team 2021, Vídeň, Rakousko), volně dostupného statistického výpočetního prostředí. Výchozí balíček s označením „stats“ byl použit pro provádění PCA a usnadnění vizualizace. Výsledky byly vyhodnoceny generováním biplotu a použitím nehierarchické metody shlukování využívající nejbližších středů (k-means clustering). Shluky jsou reprezentovány 95% intervaly spolehlivosti kolem jejich středu (těžiště), což odpovídá průměru bodů přiřazených každému shluku.

4.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS

4.4.1 Použité chemikálie a vzorky

Aceton, ethanol, hydroxid draselný, kyselina chlorovodíková, methanol a *n*-hexan analytické čistoty byly pořízeny z PENTA (Praha, Česká republika). Toluén (čistota p.a.), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA), *O*-methylhydroxylamin hydrochlorid a pyridin byly pořízeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). 3-(trifluormethyl)fenyltrimethylamonium hydroxid (TFTMAH), 5% *w/v* v methanolu (MethPrep II) byl dodán firmou Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japonsko). Ultračistá voda (rezistivita 18,2 MΩ·cm) byla získána z Milli-Q aparatury (Merck, Darmstadt, Německo).

Vzorky semen hrachu setého (*Pisum sativum*) byly obdrženy z Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci, kde byly za přesně definovaných podmínek vypěstovány ve skleníku v období únor-květen 2019. Jednalo se o dva různé genotypy lišící se dormancí – dormantní genotyp označovaný JI64 a nedormantní Cameor. Zralá semena byla sklizena ručně, usušena při laboratorní teplotě a následně skladována za pokojové teploty na tmavém a suchém místě. Před analýzou byla semena mechanicky narušena tak, aby bylo možné oddělit od sebe jednotlivé části obalu semen – osemení a hilum. Tvar a okraje oddělených kusů byly upraveny za pomoci nástrojů mikromanipulátoru pod mikroskopickou kontrolou tak, aby měly čtvercový tvar a podobný povrch – viz obrázek 7.



Obr. 7 Úprava vzorků hrachu setého genotypu Cameor a JI64. Malé kousky osemení a hila byly připraveny za pomoci mikronástrojů – mikronůžky a mikropinzeta

4.4.2 Příprava vzorků

4.4.2.1 Extrakce rozpouštědlem

Byly naváženy kousky (průměrně 0,42 mg) osemení hrachu dvou genotypů (Cameor a JI64) a k nim bylo přidáno rozpouštědlo (aceton nebo hexan) o objemu 420 μl . Vzorky byly sonifikovány po dobu 150 minut a poté 30 minut třepány na třepačce. Následně byly centrifugovány 5 minut při 4400 rpm, supernatanty byly převedeny do insertových vialek a rozpouštědlo odfoukáno proudem dusíku při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly derivatizovány 20 μl činidla BSTFA v prostředí pyridinu (20 μl) 30 minut při 80 $^{\circ}\text{C}$. Po vychladnutí byly vzorky analyzovány pomocí GC-MS.

4.4.2.2 (Trans)esterifikace činidlem MethPrep II

Malé kousky osemení dvou genotypů hrachu (cca 0,5 mg) byly vloženy do reakční vialky a k nim bylo přidáno 20 μl derivatizační směsi, která se skládala z jednoho dílu 5% w/v methanického roztoku MethPrep II a dvou dílů směsi rozpouštědel (methanol:toluen v poměru 1:2, v/v). Výsledná směs byla vortexována 30 s, sonifikována 10 min v ultrazvukové lázni a následně zahřívána 1 hodinu na 60 $^{\circ}\text{C}$. Po vychladnutí na laboratorní

teplotu byly vzorky centrifugovány a supernatanty přeneseny do kónických insertů v autosamplerových vialkách a analyzovány pomocí GC-MS.

4.4.2.3 Zmýdelnění ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a derivatizace MSTFA

Kousky osemení hrachu genotypů JI64 a Cameor byly hydrolyzovány 100 μl 1M- KOH v 70 % ethanolu. Směs byla vortexována 30 s a následně zahřívána 60 minut na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla reakční směs okyselena 20 μl 6M-HCl a bylo přidáno 100 μl deionizované vody. Uvolněné mastné kyseliny byly extrahovány do 100 μl *n*-hexanu. Po jeho přidání byla výsledná směs vortexována 30 s, sonifikována 15 minut v ultrazvukové lázni a následně centrifugována 5 minut při 4400 rpm. Supernatanty byly převedeny do kónických insertových vialek a postup extrakce se 100 μl *n*-hexanu byl opakován. Příslušné extrakty byly spojeny a následně odpařeny proudem dusíku při 40 °C do sucha. Poté byly derivatizovány 30 μl činidla MSTFA po dobu 30 minut při 80 °C.

4.4.2.4 Methanolýza/methylace

Ke vzorkům osemení hrachu bylo přidáno 40 μl toluenu, 150 μl methanolu a 30 μl 1,2 % (w/v) HCl v methanolu. Směs byla 30 s vortexována a poté zahřívána 1 hodinu na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 50 μl deionizované vody a 100 μl *n*-hexanu, vortexováno 30 s, sonifikováno 15 min v ultrazvukové lázni a poté centrifugováno 5 minut při 4400 rpm. Supernatant byl odebrán do kónické insertové vialky a extrakce 100 μl *n*-hexanu byla opakována. Supernatanty byly poté spojeny, odpařeny v proudu dusíku do sucha a následně byl objem rekonstituován 30 μl *n*-hexanu.

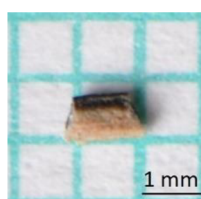
4.4.2.5 Extrakce polárních látek

Vzorky osemení byly extrahovány 100 μl methanolu, kdy byly nejprve 30 s vortexovány, 20 minut zahřívány na vodní lázni při 70 °C a poté 30 minut sonifikovány v ultrazvukové lázni. Následně bylo přidáno 100 μl deionizované vody a směs byla 15 minut sonifikována v ultrazvukové lázni. Po skončení sonifikace byly vzorky centrifugovány 5 minut při 4400 rpm. Do insertových vialek byla odebrána kapalná fáze a odpařena proudem dusíku při 40 °C do sucha. K odparkům bylo přidáno 30 μl hydrochloridu *O*-

methyldihydroxylaminu rozpuštěného v pyridinu ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a směs byla zahřívána 90 minut při $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Následovala derivatizace $50 \text{ } \mu\text{l}$ MSTFA po dobu 30 minut při $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.2.6 Extrakce polárních i nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení

Za pomoci mikronůžek byly připraveny vzorky osemení o velikosti cca 1 mm^2 (obrázek 8). Nejprve byly extrahovány polární látky methanolem (podmínky viz předchozí kapitola 4.4.2.5) a po centrifugaci byl odebraný supernatant zpracován dle postupu v kapitole 4.4.2.5. Zbylý pevný materiál ve vialce by vysušen proudem dusíku a následně k němu bylo přidáno $100 \text{ } \mu\text{l}$ 1-M KOH v 70 % ethanolu. Zmýdelnění s následnou extrakcí látek do *n*-hexanu a jejich silanizace probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2.3.



Obr. 8 Mikrovzorek hrachu setého (hilum genotypu JI64)

o velikosti přibližně $1 \times 1 \text{ mm}$

4.4.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

4.4.3.1 Mikromanipulátor

Mikrovzorky osemení byly připraveny pomocí elektronicky řízeného mikromanipulátoru Quick Pro (MicroSupport, Shizuoka, Japonsko) pod mikroskopickou kontrolou (DM2700 M, Leica, Wetzlar, Německo). Pravé rameno mikromanipulátoru bylo vybaveno mikropinzetou pro uchycení vzorku a levé rameno elektronicky řízenými mikronůžkami, které byly ovládány softwarově (MicroSupport, Shizuoka, Japonsko).

4.4.3.2 GC-MS

Plynový chromatograf Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Nosný plyn – Helium (5,5; konstantní rychlost průtoku $0,9 \text{ ml/min}$, SIAD, Itálie). Kapilární kolona – OPTIMA-5MS, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ } \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Teplotní program: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min) – $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ – $320 \text{ }^\circ\text{C}$ (12 min); nástřik $2 \text{ } \mu\text{l}$ ($280 \text{ }^\circ\text{C}$), dávkovací puls $275,8 \text{ kPa}$, 24 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC. Identifikace sloučenin byla založena na srovnání příslušných hmotnostních spekter analyzovaných sloučenin se spektry dostupných standardů a/nebo se spektry z knihovny spekter NIST 2020 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, USA).

5 Výsledky a diskuze

5.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce [136]

5.1.1 Optimalizace metody

5.1.1.1 Extrakce

Prvním krokem optimalizace metody byl výběr vhodného extrakčního činidla a počet extrakčních kroků tak, aby bylo dosaženo co největších výtěžků cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu. Za tímto účelem byla vybrána tři rozpouštědla, která se nejčastěji používají pro extrakci steroidních látek a mastných kyselin z mléka – chloroform, *n*-hexan a *n*-heptan [137]. Počet extrakčních kroků byl 1–6. Optimálních výtěžků bylo dosaženo po čtyřikrát opakované extrakci, přičemž extrakční výtěžky pro CHOL byly v rozmezí 97–99 % a pro 7-DHC 92–99 % v závislosti na použitém rozpouštědle. Čtyři opakované extrakce byly nezbytné pro kvantitativní extrakci obou steroidů, neboť byla použita poměrně velká navážka mléka (2,5 g) z důvodu řádově nižšího obsahu 7-DHC oproti CHOL. Nejnižších výtěžků bylo dosaženo při extrakci chloroformem, naopak nejvyšší byly zaznamenány u *n*-hexanu a *n*-heptanu, jak bylo předpokládáno. Pro výběr ideálního extrakčního činidla byly však brány v potaz i další vlastnosti. Jednou z nich byla mísitelnost s methanolem (MeOH), který je často používán ke srážení mléčných proteinů. Oba uhlovodíky jsou sice částečně mísitelné s MeOH, nicméně mísitelnost *n*-heptanu je v rozmezí 5–40 °C o něco menší než *n*-hexanu [138]. To znamená, že ve srovnání s *n*-hexanem jsou extrakční vlastnosti *n*-heptanu ovlivněny methanolem méně. Vlastnosti rozpouštědla mohou být ovlivněny i složkami matrice, ze které extrakce probíhá, a proto by jim měla být rovněž věnována pozornost. V případě kravského mléka je to obsah vody, který u mléka činí až 90 % [139]. Rozpustnost vody v *n*-heptanu je prokazatelně nižší než v *n*-hexanu [140], tím pádem tak do něj přejde méně vody pocházející z mléka a v důsledku toho dojde k menším změnám vlastností rozpouštědla a potlačení následné hydrolyzy ve prospěch preferované methanolýzy. Navíc nižší mísitelnost *n*-heptanu s MeOH (nebo vodou) povede k lepší separaci dvou fází. Za zmínku stojí i fakt, že *n*-hexan je těkavější a více neurotoxický v porovnání s *n*-heptanem [141]. Je tak více nebezpečný zejména pokud jsou jeho páry vdechovány pracovníky laboratoře, což mimo jiné potvrdily i studie zabývající se důsledky expozice *n*-hexanem prováděné na lidech a zvířatech [142,143]. Všechny výše zmíněné důvody vedly k použití *n*-heptanu pro extrakci CHOL a 7-DHC ze vzorků mléka.

5.1.1.2 Alkoholýza

Prvním nezbytným krokem analýzy steroidů bývá jejich uvolnění z vázaných forem dané matrice [45]. K tomu slouží obecně dva mechanismy. Jedná se o alkalickou hydrolyzu (někdy též zmýdelnění neboli saponifikaci), která je mnohými autory upřednostňována pro její jednoduchost a rychlost přípravy vzorku [57,144]. Druhou možností je pak extrakce lipidů následovaná hydrolyzou nebo jinou, podobnou reakcí, například alkoholýzou [145,146]. V rámci optimalizace metody byly vyzkoušeny oba postupy, nicméně saponifikace vodným roztokem NaOH nepřinášela kýžené výsledky, neboť docházelo během extrakce *n*-heptanem ke tvorbě silné vrstvy emulze a špatnému oddělování fází. Tato vrstva obsahovala pravděpodobně sodné soli mastných kyselin. Tento problém byl popsán již v dřívějších studiích [147]. Z toho důvodu byla použita alkoholýza, při které byly nejprve steroidy extrahovány do *n*-heptanu a získané extrakty byly následně podrobeny alkoholýze methanolickým roztokem NaOH. U této úpravy vzorku nedocházelo k žádným problémům a vytvořené methyl estery mastných kyselin ani nijak neovlivňovaly separaci. Informace o zastoupení mastných kyselin může být naopak chápána jako výhoda, neboť poskytuje širší vhled do složení poměrně komplexního vzorku, kterým mléko bezesporu je [148].

5.1.1.3 Derivatizace a kvantifikace

Získané produkty CHOL a 7-DHC po extrakci a alkoholýze bylo nutno nejprve převést na vhodnou formu pro GC-MS analýzu za pomoci derivatizace. Jak bylo popsáno v teoretické části, pro hydroxylové skupiny steroidů je nejvhodnější metodou derivatizace silylace, které jak analyty, tak použité vnitřní standardy ochotně podléhaly za tvorby stabilních TMS derivátů. Posledním krokem optimalizace byl výběr vhodné metody kvantifikace obou steroidů, které se ve vzorku mléka nacházely v odlišných koncentracích od setin mg/100 g (7-DHC) po jednotky až desítky mg/100 g mléka (CHOL). Postupně byla vyzkoušena metoda standardního přídavku, metody vnitřního standardu a metody absolutní kalibrace. První z nich – metoda standardního přídavku nebyla spolehlivá, neboť dávala zcela odlišné výsledky v porovnání se zbylými dvěma metodami, a navíc byla časově náročná. Zbylé dvě metody poskytovaly přibližně stejné výsledky, v práci však byla použita metoda vnitřního standardu z důvodu jednoduchosti a rychlosti přípravy vzorků. Ta byla během optimalizace realizována ve dvou modifikacích – metoda vnitřního standardu s relativním odezvoým faktorem (IS RRF) a s kalibrací (IS kalibrace). Zároveň byly zkoumány dva různé vnitřní standardy (IS). Jednalo se o epicoprostanol (EPI) a izotopově značený cholesterol-D7 (CHOL-D7). Výsledky kvantifikace CHOL a 7-DHC v komerčním

vzorku mléka s využitím těchto dvou přístupů a vnitřních standardů jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II Srovnání různých technik použitých pro kvantifikaci CHOL a 7-DHC v komerčním vzorku mléka. Uvedené nejistoty představují standardní odchylky (SD) pro tři opakovaná měření ze tří fyzických replik ($n = 9$)

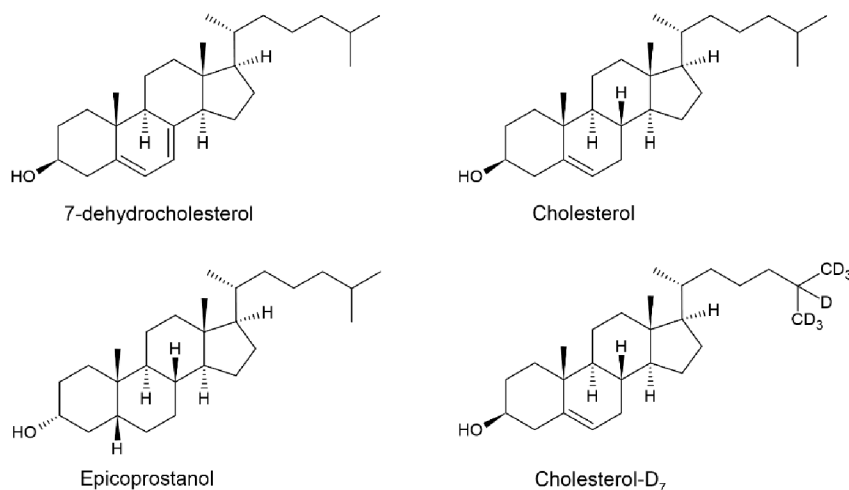
Metoda kvantifikace	IS	Obsah analytu (mg/100 g)	
		CHOL \pm SD	7-DHC \pm SD
IS relativní odezvo- vý faktor	EPI	9,8 \pm 0,2	0,034 \pm 0,006
	CHOL-D7	9,8 \pm 0,2	0,034 \pm 0,002
IS kalibrace	EPI	9,8 \pm 0,4	0,037 \pm 0,003
	CHOL-D7	9,7 \pm 0,3	0,035 \pm 0,002

7-DHC – 7-dehydrocholesterol, EPI – epicoprostanol, CHOL – cholesterol, CHOL-D7 – cholesterol-D7, IS – vnitřní standard, SD – relativní odchylka

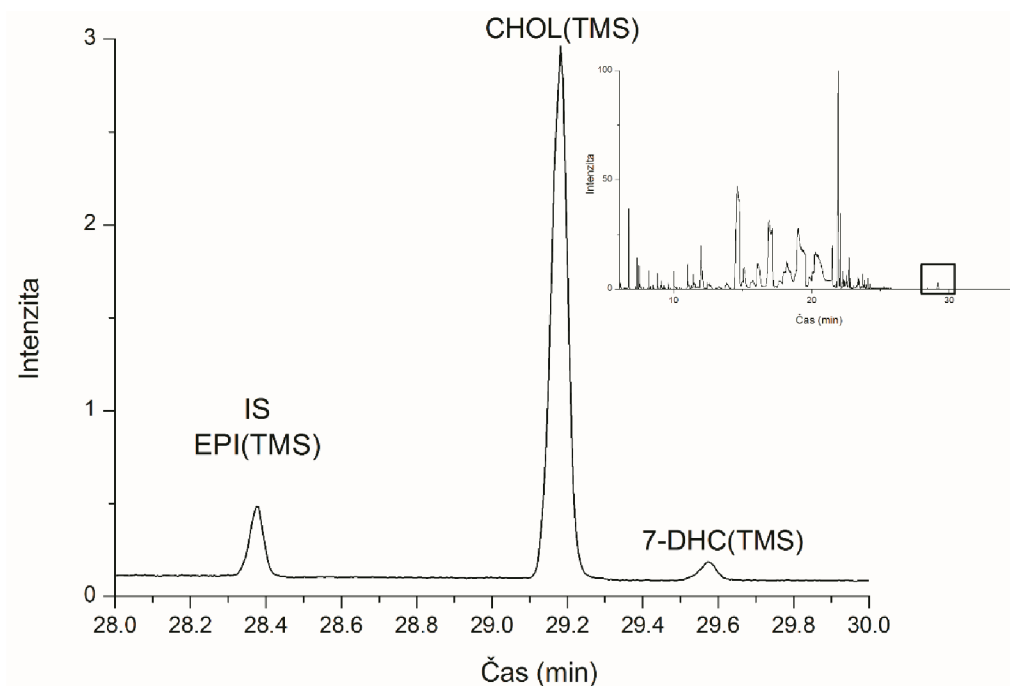
RRF byly stanoveny z opakovaných nástřiků tří vzorků vážených standardů s definovaným přídatkem váženého IS a byly přibližně rovny jedné v případě CHOL (1,055 s EPI a 1,078 s CHOL-D7). Naopak u 7-DHC se hodnoty RRF významně lišily od jedné a činily 3,101 při použití EPI a 0,622 pro CHOL-D7. Koncentrace všech standardů byla 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V případě IS kalibrace byly výsledky získány z kalibrační závislosti vytvořené vynesím poměru plochy píku analytu a IS proti koncentraci analytu. Rozmezí koncentrace bylo 200–600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro CHOL a 0,4–4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro 7-DHC.

Na první pohled je patrné, že obě metody kvantifikace poskytovaly téměř shodné výsledky neohledě na použitý IS. Průměrný obsah CHOL a 7-DHC činil 9,8 mg/100 g, respektive 0,035 mg/100 g v komerčním vzorku mléka. Výsledky byly porovnány statisticky pomocí nepárového Studentova t -testu. Nejprve byly porovnány obsahy sledovaných analytů získané v rámci jedné metody kvantifikace za použití IS EPI a CHOL-D7. Dále pak byly porovnávány výsledky obsahu CHOL a 7-DHC získané dvěma metodami kvantifikace při použití stejného IS (např. IS RRF s EPI vs IS kalibrace s EPI). Jak obě metody kvantifikace, tak oba IS poskytovaly statisticky ekvivalentní výsledky na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, a dokonce i na $\alpha = 0,01$, což znamená, že obě metody i oba IS mohou být použity ekvivalentně. U vzorků mléka byla nicméně použita metoda IS kalibrace, neboť dle [149] přináší výhody v podobě korekce ztrát analytu během přípravy vzorku a také vysoké přesnosti kvantifikace. Pro analýzu reálných vzorků byl jako vnitřní standard použit

EPI z důvodu nižší ceny a obecně lepší dostupnosti v porovnání s isotopově značeným CHOL-D₇ a z důvodu absence v mléčných produktech nebo jiných potravinách [150]. Jeho struktura je velice podobná cholesterolu, liší se pouze absencí dvojné vazby [151], jak je ukázáno na obrázku 9. EPI je rovněž dobře separovaný od ostatních analytů (obrázek 10), je stabilní a univerzální pro použití v různých detekčních systémech (FID, MS). Jeho výhody dokládá i četnost použití jako IS pro cholesterol (a jeho prekurzory) v nejrůznějších matricích, například v séru, plodové vodě [68] nebo mléce [152].



Obr. 9 Chemické struktury analyzovaných sterolů



Obr. 10 Výřez z TIC chromatogramu derivatizovaného vzorku komerčního mléka s koncentrací IS 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (IS EPI(TMS) – vnitřní standard epicoprostanol, CHOL(TMS) – cholesterol, 7-DHC(TMS) – 7-dehydrocholesterol). V pravém horním rohu je zobrazen celý TIC chromatogram tohoto vzorku s vyznačenou částí, která je zvětšena ve výřezu

Vzhledem k použití kalibrační závislosti bylo nezbytné otestovat její linearitu. Bylo proto připraveno 5 kalibračních roztoků CHOL a 7-DHC s konstantním množstvím EPI jako IS ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), které byly derivatizovány pomocí BSTFA podobně jako vzorky mléka a analyzovány GC-MS. Poměr plochy píku mezi CHOL (nebo 7-DHC) a EPI byl vynesena proti koncentraci CHOL (nebo 7-DHC) v rozmezí od $0,01\text{--}0,15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro 7-DHC a $5\text{--}100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro CHOL. Získaná data byla následně použita pro konstrukci lineárního regresního modelu, jehož vhodnost byla potvrzena jak grafickou analýzou reziduí, tak F_L testem (detaily v kapitole 4.1.4 včetně rovnice pro výpočet F_L hodnoty). Linearita kalibrační závislosti pro CHOL a 7-DHC byla potvrzena, neboť vypočtená F_L hodnota (1,138 pro CHOL a 1,644 pro 7-DHC) byla nižší než kritická hodnota $F_{crit} = 18,513$ na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.1.2 Stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu ve vzorcích mléka

Navržená metoda byla aplikována na deset různých vzorků mléka se známým typem ustájení – vnitřní nebo venkovní. Samotný obsah 7-DHC se nejevil jako vhodný ukazatel pro rozlišení mezi vnitřním a venkovním ustájením z důvodu významných rozdílů v hustotě mléka. Proto byl obsah 7-DHC normalizován na obsah cholesterolu v příslušném vzorku. Poměr 7-DHC/CHOL byl poté vynásoben faktorem o hodnotě 1000 z důvodu lepší přehlednosti výsledků, neboť koncentrace těchto dvou sledovaných analytů se lišila o tři řády. Výsledné poměry jsou uvedeny v tabulce III. Obsah cholesterolu se pohyboval přibližně v rozmezí od $12 \text{ mg}/100 \text{ g}$ (mléko z obchodního řetězce) do téměř $21 \text{ mg}/100 \text{ g}$ (Kokory A). 7-dehydrocholesterol byl v rozmezí od $0,006 \text{ mg}/100 \text{ g}$ (Červenka) do $0,053 \text{ mg}/100 \text{ g}$ (Kokory C). Jak je patrné, pasterizace neměla příliš velký vliv na obsah CHOL a 7-DHC, což je v souladu s literaturou [139], nicméně tento jev nebyl nijak více zkoumán.

Tabulka III Obsah cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu a jejich poměr v analyzovaných vzorcích mléka

Původ vzorku	Typ ustájení/mléka	Obsah analytu (mg/100 g)		
		CHOL \pm SD	7-DHC \pm SD	(7-DHC/CHOL) *1000
Místní obchod	OUT/ P	$12,1 \pm 0,3$	$0,012 \pm 0,001$	0,99
Červenka	OUT/UN	$17,2 \pm 0,4$	$0,006 \pm 0,001$	0,35
Vrbátky	OUT/UN	$17,4 \pm 0,3$	$0,008 \pm 0,003$	0,46
Rožnov p. Radhoštěm	OUT/UN	$20,3 \pm 1,4$	$0,027 \pm 0,007$	1,33
Poruba A	IN/P	$15,3 \pm 0,5$	$0,035 \pm 0,006$	2,29

Poruba B	IN/UN	16,8 ± 0,3	0,044 ± 0,010	2,62
Valašská Bystřice	IN/UN	18,0 ± 0,5	0,047 ± 0,009	2,61
Kokory A	IN/UN	20,6 ± 1,5	0,048 ± 0,006	2,33
Kokory B	IN/UN	20,1 ± 1,4	0,043 ± 0,003	2,14
Kokory C	IN/UN	18,6 ± 1,2	0,053 ± 0,005	2,85

7-DHC – 7-dehydrocholesterol, CHOL – cholesterol, IN – vnitřní ustájení, OUT – venkovní ustájení, P – pasterizováno, UN – nepasterizováno, SD – směrodatná odchylka

Limity detekce a kvantifikace (L_D a L_Q) byly vypočteny na základě směrnice IUPAC. L_D nabýval hodnot 0,00055 mg/100 g a 0,00396 mg/100 g pro CHOL, respektive pro 7-DHC. Hodnoty L_Q byly 0,000814 mg/100 g a 0,00560 mg/100 g pro CHOL, respektive 7-DHC.

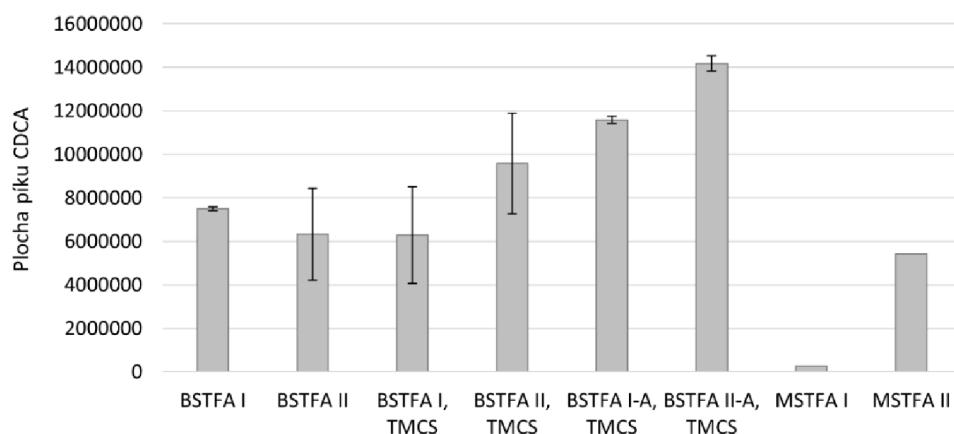
Získané hodnoty parametru (7-DHC/CHOL)*1000 pro vnitřní a venkovní chov byly porovnány statisticky. Grafická analýza ukázala přibližně normální rozdělení dat v obou souborech kolem jejich středních hodnot μ_1 a μ_2 , a proto byl použit nepárový Studentův t -test. Nulová hypotéza $H_0: \mu_1 = \mu_2$ byla testována proti alternativní hypotéze $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$. Kritické hodnoty pro t na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a $0,01$, s počtem stupňů volnosti $v = 8$ ($v = n_1 + n_2 - 2$) byly 2,306 a 3,356. Vypočtená hodnota (7,416) byla větší než kritické hodnoty a nulová hypotéza byla tím pádem zamítnuta. To znamená, že mezi hodnotami parametru (7-DHC/CHOL)*1000 pro krávy chované uvnitř a venku na pastvě je statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$.

Výsledky uvedené v této části byly publikovány v práci [136], která byla součástí rozsáhlé studie zabývající se elektrochemickými metodami pro charakterizaci a analýzu steroidních látek (Projekt GAČR reg. č. 19-11268S). V rámci této studie byla také využita metoda GC-MS jako jedna ze srovnávacích metod pro nově vyvíjenou metodu diferenčně pulsní voltametrie (DPV) pro stanovení cholesterolu v mléčných produktech. Jelikož se jednalo o mléčné produkty s různým obsahem tuku (od 1,5 % do 12 %), bylo nezbytné optimalizovat extrakční postup a způsob kvantifikace cholesterolu. Výsledky z GC-MS se velice dobře shodovaly s výsledky z DPV (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) na rozdíl od výsledků z HPLC-UV. Uvedené výsledky byly publikovány v práci [153].

5.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS [154,155]

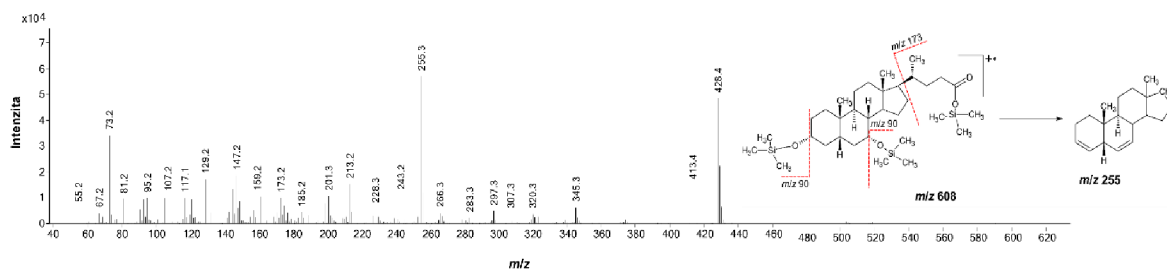
5.2.1 Optimalizace derivatizačního postupu

Analýzám dehydratačního a oxidačního produktu chenodeoxycholové kyseliny (CDCA) předcházely analýzy se samotnou kyselinou, aby bylo zjištěno její hmotnostně-spektrometrické chování za různých podmínek. V kapitole 2.3.2.1 bylo řečeno, že žlučové kyseliny nelze analyzovat pomocí GC-MS bez předchozí derivatizace s ohledem na množství jejich funkčních skupin, s čímž souvisí vysoká polarita a nízká těkavost. Jak lze vidět na obrázku 4 (kapitola 2.3), CDCA obsahuje dvě hydroxylové skupiny a jednu karboxylovou, proto se jako jednou z možných variant derivatizace nabízela silylace. V prvotních experimentech byl zkoumán vliv typu silylačního činidla, doby a teploty derivatizace na výtěžek produktu CDCA (respektive na plochu píku) – obrázek 11.



Obr. 11 Optimalizace derivatizace CDCA

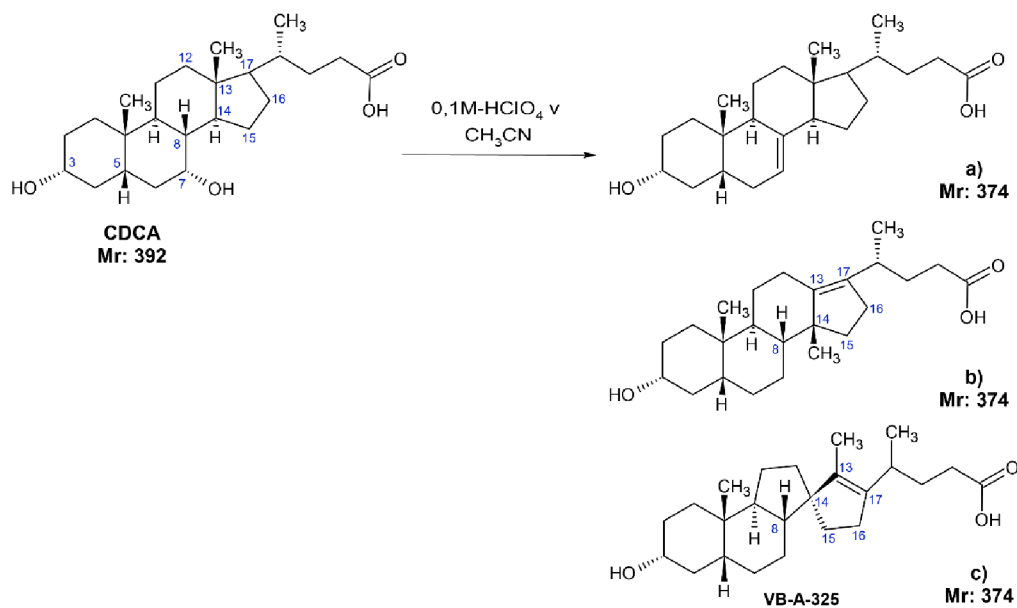
Jak je z grafu na tomto obrázku patrné, největší derivatizační účinnosti bylo dosaženo při použití BSTFA v kombinaci s 1% TMCS, který byl dávkován pod hladinu roztoku BSTFA a pyridinu (vzorek označen jako BSTFA II-A, TMCS) a tato derivatizační směs byla zahřívána 60 minut na 120 °C. Nicméně ve všech případech byl po derivatizaci v čase 30,435 minut detegován symetrický pík náležící CDCA se třemi TMS skupinami. Nejintenzivnějším iontem v MS spektru byl m/z 255, který odpovídá ztrátě dvou silanolů (TMSOH) a celého alifatického řetězce nesoucího karboxylovou skupinu (obr. 12).



Obr. 12 Hmotnostní spektrum CDCA (3TMS) s naznačenou fragmentací a návrhem struktury nejintenzivnějšího iontu m/z 255

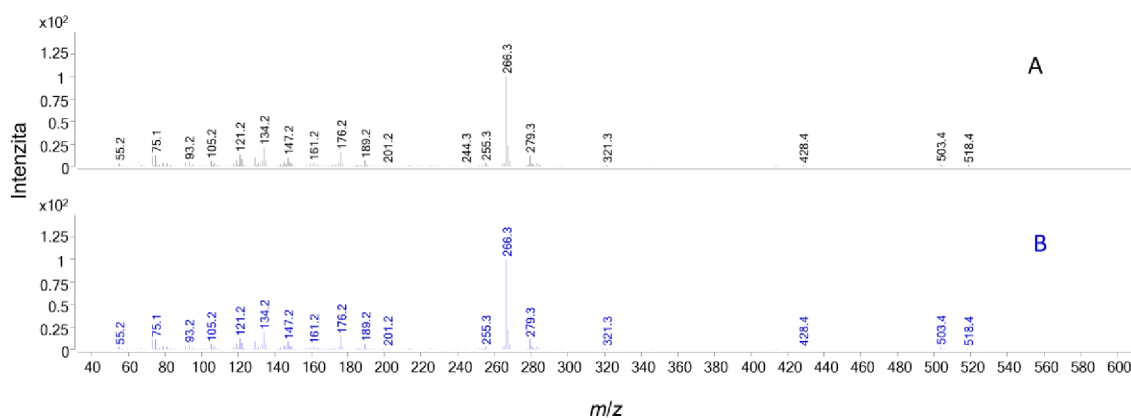
5.2.2 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny

Žlučové kyseliny byly dlouhou dobu považovány za neaktivní pro přímé redoxní procesy a pro elektrochemii tedy ne úplně ideální látky. Od 90. let minulého století bylo vydáno pouze minimální množství publikací zabývajících se elektrochemickou redukcí [156,157], nebo oxidací žlučových kyselin [158,159]. Nicméně později bylo ukázáno, že primární žlučové kyseliny lze chemicky aktivovat *in situ* použitím 0,1M-HClO₄ v acetonitrilu. V tomto prostředí dochází k dehydrataci primárních žlučových kyselin a výsledné molekuly pak mohou být snadno elektrochemicky oxidovány pomocí různých typů elektrod, např. borem dopovaný diamant, platina nebo skelný uhlík [87]. CDCA byla tedy dehydratována s využitím silné kyseliny chloristé v acetonitrilu a byla navržena struktura dehydratačního produktu (obrázek 13), která byla později upravena, neboť NMR experimenty prokázaly, že po dehydrataci na uhlíku C7 dochází k migraci dvojné vazby, která se tak nachází mezi uhlíky C13-C17 (podrobný mechanismus je uveden ve zmiňované publikaci na začátku kapitoly 5.2) [154].



Obr. 13 Navržené struktury produktů dehydratace CDCA kyselinou chloristou v acetonitrilu. a) - původní návrh struktury, b) - upravený návrh struktury, c) skutečná struktura dehydratačního produktu

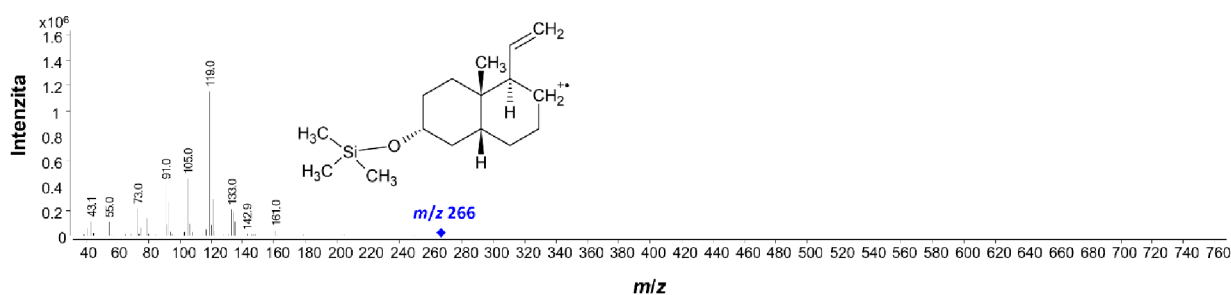
Dehydratační produkt byl synteticky připraven (označen jako VB-A-325) a analyzován GC-MS. Následně bylo provedeno srovnání tohoto produktu se silylovaným ethylacetátovým extraktem získaným po dehydrataci CDCA. Potvrdilo se, že VB-A-325 je skutečně majoritním produktem dehydratace CDCA. Srovnání MS spekter je uvedeno na obrázku 14. Ve spektru lze vidět dominantní ion m/z 266. Dále jsou to ionty m/z 518 a 503, které odpovídají molekulárnímu iontu (518) a ztrátě $[M^{+}-15]$. Velice slabě je přítomen i ion m/z 428, který odpovídá ztrátě TMSOH $[M^{+}-90]$.



Obr. 14 Hmotnostní spektra A – CDCA po dehydrataci 0,1M-HClO₄ v CH₃CN, B – synteticky připravený produkt dehydratace CDCA (VB-A-325)

Struktura iontu m/z 266 i struktura té části molekuly, která z molekulárního iontu odpadá, byla v počátcích práce záhadou. Běžně totiž u primárních a sekundárních žlučových kyselin probíhá fragmentace tak, že jsou odštěpeny TMSOH a celý postranní alifatický řetězec nesoucí karboxylovou skupinu za vzniku nejintenzivnějšího iontu ve spektru, a to

m/z 253, 255, nebo 257 v závislosti na počtu hydroxylových skupin v molekule (třem -OH skupinám přísluší m/z 253, dvěma m/z 255 a jedné pak m/z 257). Analýzy silylovaných žlučových kyselin, konkrétně CDCA, UDCA, DCA, CA a LCA skutečně potvrdily popsany způsob fragmentace. Nicméně pokud by tímto způsobem měla probíhat i fragmentace dehydratačního produktu CDCA s navrženou strukturou na obrázku 13 b), měl by být dominantním iontem ve spektru m/z 256 a nikoliv m/z 266. Bylo tedy zřejmé, že fragmentace dehydratačního produktu probíhá pravděpodobně jiným způsobem než samotné žlučové kyseliny, a proto byly provedeny MS/MS experimenty ke zjištění povahy iontu m/z 266. Jako prekurzorový ion byl vybrán m/z 518, což je molekulární ion silylovaného dehydratačního produktu a byl sledován přechod 518→266. Ten potvrdil, že ion m/z 266 je skutečně fragment vznikající z molekulárního iontu dehydratačního produktu CDCA a nejedná se tedy o žádnou interferující nebo koelující sloučeninu. Ion m/z 266 byl následně vybrán jako prekurzorový ion a podroben fragmentaci (obr. 15), která ukázala, že je tento ion ve formě kation-radikálu. Návrh struktury tohoto iontu je rovněž uveden na obrázku 15. Skutečná struktura produktu dehydratace CDCA (obr. 13 c) byla zjištěna až s pomocí rozsáhlých NMR experimentů. Tyto experimenty ukázaly, že během dehydratace v silné anorganické kyselině dochází jednak k migraci dvojné vazby, ale také k tzv. Wagner-Meerweinovu přesmyku [160], který má za následek přeskupení C a D steroidního kruhu v molekule CDCA. Výsledkem těchto přeměn byl tedy vznik produktu dehydratace CDCA se stejnou molekulovou hmotností, jakou měl předběžně navrhovaný (obrázky 13 a) a b)), nicméně fragmentace tohoto produktu po elektronové ionizaci probíhá zcela odlišně.

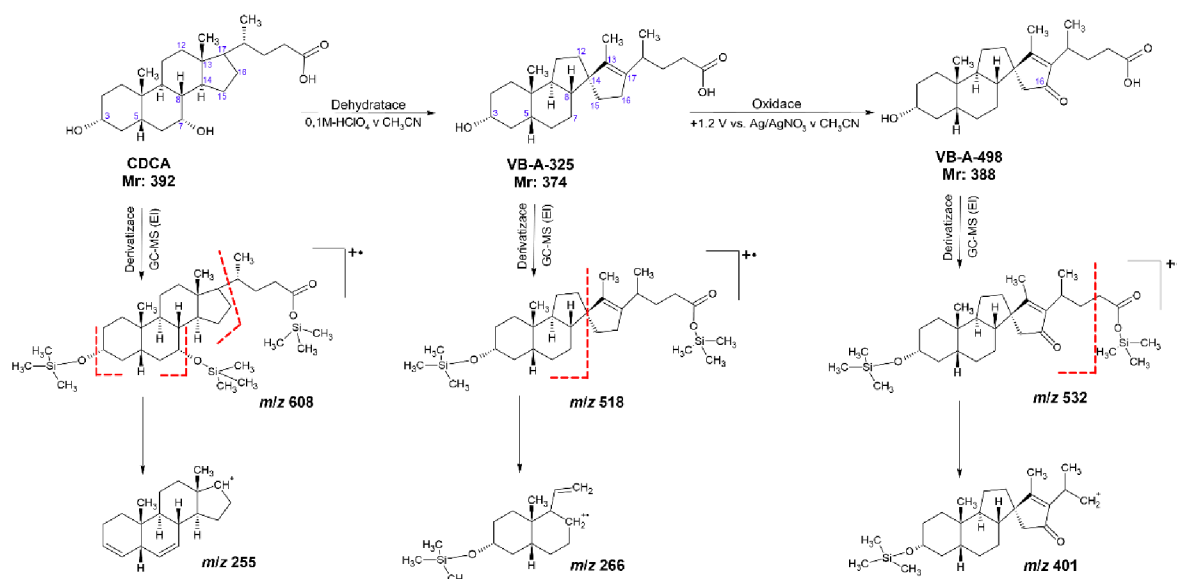


Obr. 15 Fragmentace prekurzorového iontu m/z 266 a návrh jeho struktury ve formě kation-radikálu

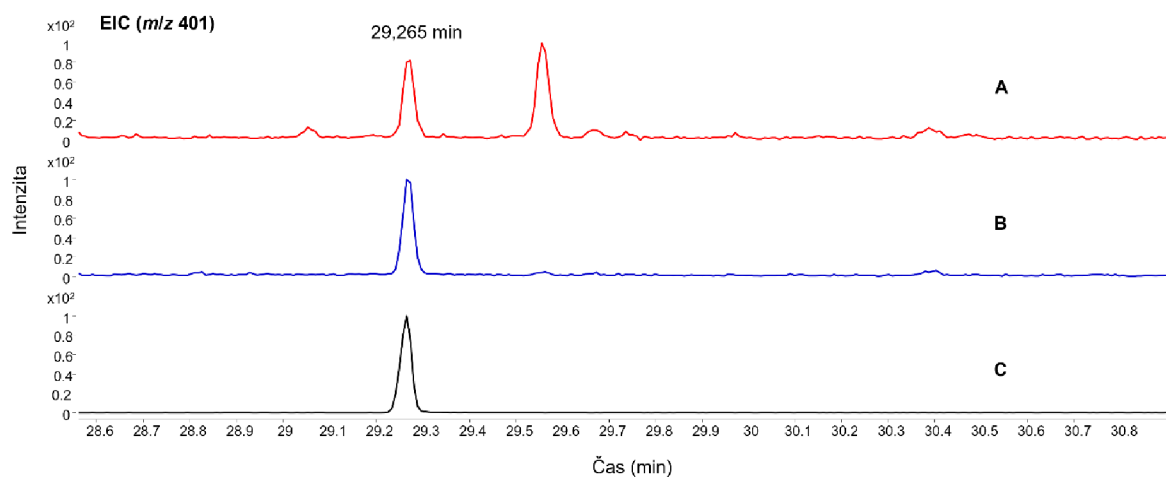
5.2.3 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny

Synteticky připravený produkt dehydratace VB-A-325 byl elektrochemicky oxidován na platinové elektrodě a pomocí LC/APCI-MS byl identifikován majoritní oxidační produkt – spirocyklický C(16) enon (obr. 16), který byl následně také synteticky připraven a dále značen jako VB-A-498. Poté byla na platinové elektrodě oxidována CDCA, která poskytovala několik oxidačních produktů, mezi nimiž byl detegován i zmíněný

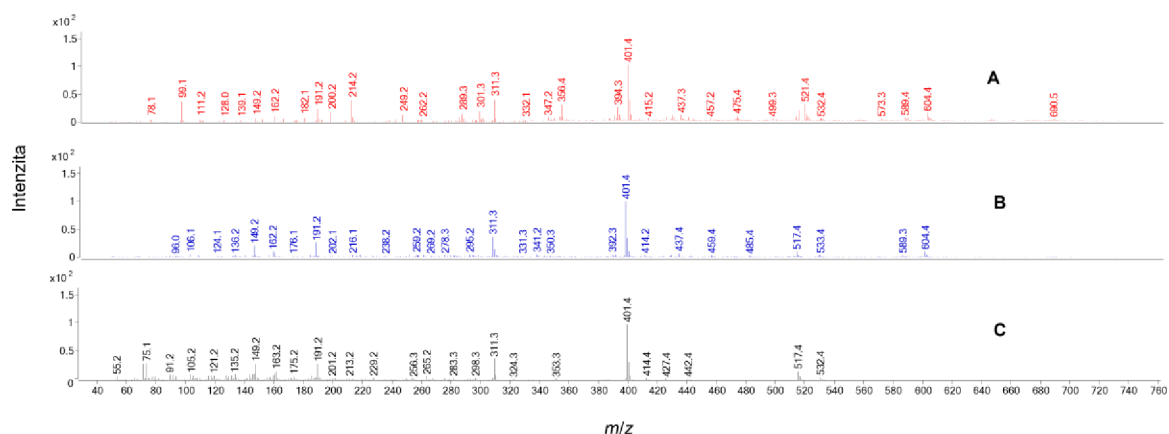
spirocyklický C(16) enon. Jeho struktura byla potvrzena na základě srovnání retenčních časů a MS spekter CDCA a VB-A-325 po elektrochemické oxidaci a VB-A-498, jak je ukázáno na obrázcích 17 a 18.



Obr. 16 Schéma elektrochemické oxidace CDCA s dehydratačním mezikrokem. Struktury silylovaných molekul (CDCA, její dehydratační (VB-A-325) a oxidační produkt (VB-A-498)) spolu se strukturami nejintenzivnějších iontů vzniklých fragmentací těchto sloučenin po elektronové ionizaci



Obr. 17 Rekonstruovaný iontový chromatogram pro m/z 401. V čase 29,265 min oxidační produkt CDCA získaný A - elchem. ox. CDCA, B - elchem. ox. produktu dehydratace CDCA (VB-A-325), C – synteticky připravený oxidační produkt CDCA (VB-A-498)



Obr. 18 Srovnání hmotnostních spekter pro A – CDCA po elchem. ox., B – dehydratační produkt CDCA (VB-A-325) po elchem. ox., C – oxidační produkt CDCA (VB-A-498)

Proces elektrochemické oxidace byl optimalizován za účelem dosažení co největšího výtěžku oxidačního produktu. Jedním z parametrů pro optimalizaci byl potenciál, při kterém probíhala oxidace. Testovány byly dva, 1,2 V a 1,4 V, přičemž větší výtěžek oxidačního produktu byl pozorován při nižším potenciálu, tedy 1,2 V. Dále byl zkoumán vliv doby oxidace, kdy byly testovány tři časové úseky – 5, 10 a 30 minut. Oxidace trvající pouze 5 minut nebyla dostačující, neboť došlo k přeměně pouze nepatrného množství dehydratačního produktu na produkt oxidační. Po 10 a 30 minutách byl již téměř všechen dehydratační produkt přeměněn na oxidační produkt, přičemž plochy píku oxidačního produktu byly takřka totožné po 10 i 30minutové oxidaci. Optimalizován byl také výběr vhodného rozpouštědla, do kterého měly být neutralizované elektrolyzáty extrahovány. Při volbě vhodného rozpouštědla byl brán ohled zejména na analytické koncové metody, tedy GC-MS a HPLC-MS. Vybráni byli tři zástupci – chloroform, ethylacetát a toluen. GC-MS analýzy ukázaly, že intenzity signálů pro dehydratační a/nebo oxidační produkt byly srovnatelné pro všechna tři rozpouštědla. Nicméně nakonec byl zvolen ethylacetát, a to s ohledem na jeho vysokou čistotu a nižší toxicitu ve srovnání se zbylými dvěma rozpouštědly. V rámci optimalizace byla vyzkoušena i oxidace v průtokovém systému (EcaFlow), a to oxidace VB-A-325 a poté i samotné CDCA po dehydrataci. Byly použity tři průtokové rychlosti (20, 50 a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$) a největšího výtěžku oxidačního produktu (VB-A-498) bylo dosaženo při 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ v případě oxidace standardu VB-A-325. Průtoková rychlost 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla poté zvolena jako výchozí pro elektrolyzu CDCA v průtoku, nicméně byl detegován pouze produkt dehydratační, nikoliv však oxidační. Ani snížení nebo naopak zvýšení průtokové rychlosti nepomohlo k detekci oxidačního produktu a z tohoto důvodu nebyly žádné další GC-MS analýzy elektrolyzátů získaných z průtokové cely prováděny.

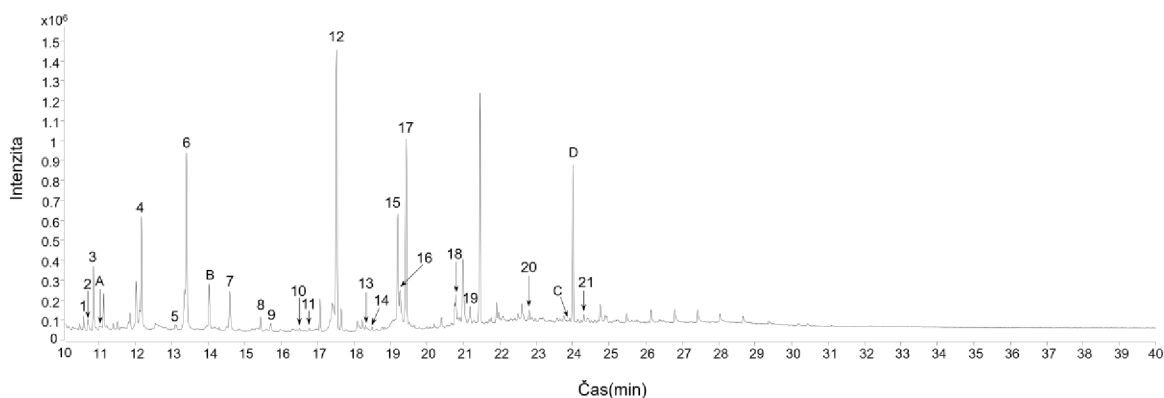
5.3 Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS [161]

Nástěnné malby představují nedílnou součást kulturního dědictví a jsou předmětem vědeckého zkoumání z mnoha důvodů. Jedním z nich je zjišťování jejich původního materiálového složení. Existuje několik různých způsobů malby na omítku – například technika zvaná „secco“, při které je malováno na suchý podklad, a tudíž je nezbytné použít pojivo, ve kterém jsou příslušné pigmenty rozmíchány a následně je směs nanášena na suchý podklad. Takovým pojivem může být například kasein, kliš, vysychavé oleje nebo vejce [162,163]. Analýzy těchto pojiv jsou poměrně náročné s ohledem na jejich komplexní složení, minimální dostupné množství a malý poměr pojiva k pigmentu (cca 10 % w/v). GC-MS představuje zlatý standard pro analýzu těchto organických pojiv, zejména pak těch na bázi lipidů a je založena na analýze mastných kyselin a použití vybraných poměrů mastných kyselin jako je např. poměr kyseliny palmitové k stearové (P/S) nebo azelaové ku palmitové (A/P) [164–167]. Ačkoliv jsou tyto poměry zavedené a v praxi běžně používané, jejich použití pro správnou identifikaci lipidových pojiv představuje mnoho problémů. Obvykle jsou totiž výsledky vyjádřeny jako poměry ploch chromatografických píků namísto koncentrací, což vede k potenciálním variacím v závislosti na použité metodologii [166]. V důsledku toho se pak výsledky různých vědeckých pracovníků mohou výrazně lišit, což zdůrazňuje omezenou spolehlivost a přesnost této metody.

5.3.1 Derivatizace vzorků před GC-MS analýzou

Analýza lipidových pojiv je založena na GC-MS analýze mastných kyselin, které ale musí být nejprve uvolněny z příslušných triacylglycerolů [165]. Uvolněné mastné kyseliny jsou následně převedeny na vhodnou formu pro analýzu, kterou bývají nejčastěji methyl estery mastných kyselin (FAMES). Obvykle se FAMES připravují saponifikací následovanou methylací, například diazomethanem [168,169] nebo methanolem za kyselé katalýzy [14]. Vzhledem k tomu, že tato procedura zahrnuje několik kroků (hydrolyza, okyselení, extrakce, derivatizace), které jsou jednak časově náročné a mohou vést ke kontaminaci nebo naopak ztrátě vzorku během manipulace, bývá nahrazována jednoduššími postupy [170]. Využití kvartérních amoniových hydroxidů může být jedním z nich. Používána je celá řada různých alkylamoniových hydroxidů, konkrétně TMAH, PhTMAH nebo TFTMAH. Nejčastěji používaným činidlem je právě posledně zmiňovaný – TFTMAH, který je jednokrokovým (trans)esterifikačním činidlem, které vyžaduje malou nebo žádnou přípravu vzorku, a proto je postup rychlejší než tradiční metody [171–173]. To je velmi

výhodné zejména u historických vzorků nástěnných maleb, které bývají dostupné v minimálním množství a u kterých by se mělo zamezit složitým operacím během zpracování vzorků, aby nedošlo k jejich případným ztrátám. Činidlo TFTMAH je navíc méně bazické než ostatní činidla a nevyžaduje příliš vysoké reakční teploty, což zamezuje vzniku případných nežádoucích vedlejších reakcí [174]. Pro usnadnění solubilizace nepolárních analytů je doporučováno používat TFTMAH v kombinaci s rozpouštědly typu benzen, toluen nebo methanol. Směs byla zahřívána na 60 °C, což je optimální teplota pro dosažení maximálních výtěžků, jak bylo popsáno dříve [28,175]. Ve vzorcích s obsahem vaječného a olejového pojiva byla identifikována řada mastných kyselin (obrázek 19 a tabulka IV), které byly u obou pojiv víceméně stejné, lišily se pouze četností zastoupení. Zvláštní pozornost však byla věnována azelaové, olejové, palmitové, sebakové, stearové a suberové kyselině a jejich charakteristickým poměrům (P/S, A/P, O/S a A/Su).



Obr. 19 TIC chromatogram vzorku s obsahem lněného oleje a pigmentem indigo po umělém stárnutí (UV3). Identifikované methylestery mastných kyselin jsou označeny číselně (1-21) a degradační produkty indigotinu a indirubinu abecedně (A-D). Všechny sloučeniny jsou uvedeny v tabulce IV

Tabulka IV Mastné kyseliny a degradační produkty odvozené od indigotinu a indirubinu identifikované ve vzorcích s obsahem lněného oleje (UV3) a pigmentem indigo. Stejně sloučeniny byly identifikovány také ve vzorcích s obsahem vaječného pojiva. Identifikace byla provedena na základě srovnání s příslušnými hmotnostními spektry v knihovně NIST a s literárními zdroji [176]

Označení	Retenční čas (min)	Sloučenina
1	10,577	Methylester kyseliny dekanové (kaprínová kyselina)
2	10,689	Methylester kyseliny 8-oxooktanové
3	10,848	Dimethylester kyseliny heptandiové (pimelová kyselina)
4	12,165	Dimethylester kyseliny oktandiové, (suberová kyselina)
5	13,083	Methylester kyseliny 9-oxodekanové
6	13,410	Dimethylester kyseliny nonandiové (azelaová kyselina)
7	14,585	Dimethylester kyseliny dekandiové (sebaková kyselina)
8	15,427	Methylester kyseliny tetradekanové (myristová kyselina)
9	15,700	Dimethylester kyseliny undekandiové
10	16,499	Methylester kyseliny pentadekanové

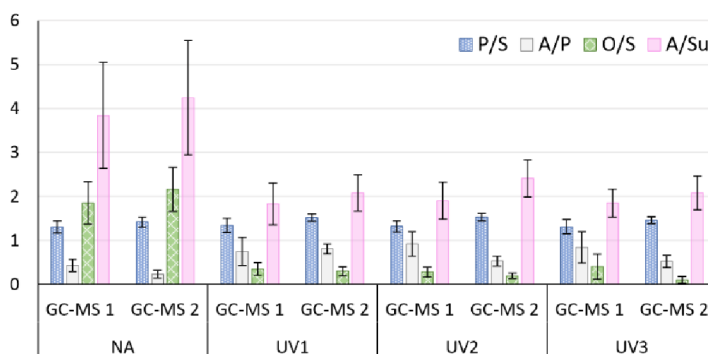
11	16,763	Dimethylester kyseliny dodekandiové
12	17,538	Methylester kyseliny hexadekanové (palmitová kyselina)
13	18,280	Dimethylester kyseliny 4-oxododekandiové
14	18,491	Methylester kyseliny heptadekanové, (margarová kyselina)
15	19,208	Methylester kyseliny cis-oktadec-9-enové, (olejová kyselina)
16	19,259	Methylester kyseliny trans-oktadec-9-enové, (elaidová kyselina)
17	19,447	Methylester kyseliny oktadekanové (stearová kyselina)
18	20,789	Methylester kyseliny cis-9,10-epoxyoktadekanové
19	21,177	Methylester kyseliny eikosanové (arachidová kyselina)
20	22,793	Methylester kyseliny dokosanové (behenová kyselina)
21	24,297	Methylester kyseliny tetrakosanové (lignocerová kyselina)
A	11,020	Methylanthranilát (methyl-2-aminobenzoát)
B	14,023	Methyl 2-(methoxykarbonyl)fenylmethylkarbamát
C	23,324	3-methoxy-2-(2-methoxy-1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-methyl-1H-indol
D	24,064	2-bis-(N-methylindol-3-methoxy)

5.3.2 Změny diagnostických poměrů mastných kyselin a dalších parametrů

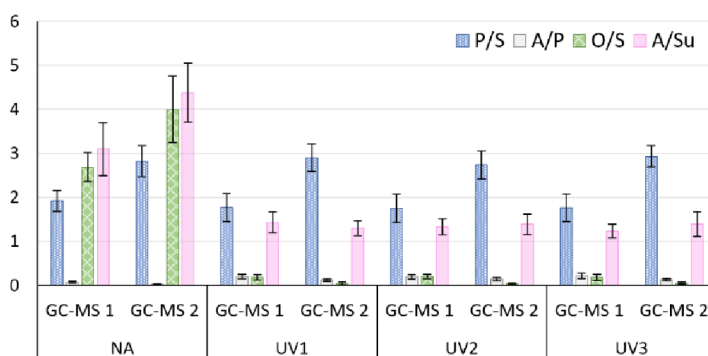
Diagnostické poměry mastných kyselin jsou již od 60.let minulého století používány k rozlišení mezi různými druhy lipidových pojiv, která jsou analyzována pomocí GC-MS. Ať už se jedná o rozlišení mezi jednotlivými oleji jako je například lněný, makový nebo ořechový, případně rozlišení mezi olejovým a vaječným pojivem. Dříve se věřilo, že dané poměry jsou pro určitý typ lipidového pojiva konstantní a při identifikaci pojiva se spoléhalo pouze na ně. Nicméně v literatuře lze nalézt velmi významné rozdíly mezi hodnotami. Například poměr P/S se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 4,1 pro vaječné pojivo [177,178] a od 1,2 do 2 pro lněný olej [174,179]. Větší variabilita hodnot u vaječného pojiva je zapříčiněna několika faktory, jako je konkrétní část vaječné složky použitá k analýze (bílek, žloutek, nebo celé vejce) nebo parametry hardwarového vybavení použitého k analýze, kterým se předchozí studie příliš nezabývaly. Předběžné experimenty prováděné v rámci optimalizace metody s různým hardwarovým uspořádáním však naznačily, že se hodnoty poměrů mastných kyselin mohou významně lišit v závislosti na použitém přístrojovém vybavení. Proto byly modelové vzorky nástěnných maleb analyzovány stejnou metodou ve dvou laboratořích v Olomouci (GC-MS 1) a ve Vídni (GC-MS 2) na dvou téměř identických GC-MS přístrojích, které se od sebe nepatrně lišily, a to stacionární fází a výrobcem kolony. Obě kolony byly nepolární s 5 % difenyl – 95 % dimethylpolysiloxanovou fází v GC-MS 1 (OPTIMA-5MS) [180] a fenylarylenovým polymerem prakticky ekvivalentním s 5 % difenyl – 95 % dimethylpolysiloxanem v GC-MS 2 (DB- 5MS, Low bleed, ultra inert) [181].

5.3.3 Umělé stárnutí

Referenční vzorky nástěnných maleb byly podrobeny umělému stárnutí, aby bylo možné lépe porozumět chemickým změnám ve složení lipidových pojiv a mechanismům, ke kterým během stárnutí dochází. Tyto vzorky mohou podléhat určitým přeměnám, jako jsou fotooxidační procesy, štěpení a degradační reakce, které běžně probíhají během desetiletí nebo dokonce staletí. V laboratoři mohou být nicméně tyto procesy značně urychleny s využitím UV světla, vlhkosti a zvýšených teplot [170,173]. Diagnostické poměry mastných kyselin a suma relativního zastoupení vybraných dikarboxylových kyselin - ΣD (azelaová, sebaková a suberová) byly sledovány napříč jednotlivými kroky stárnutí, od čerstvě připravených vzorků (NA) až po ty nejvíce zestárlé (UV3). Významné rozdíly v těchto parametrech byly pozorovány nejen mezi kroky stárnutí, ale také mezi vaječným a olejovým pojivem. Obrázky 20 a 21 ukazují rozdíly mezi jednotlivými parametry v olejovém a vaječném pojivu. Průměrné hodnoty a standardní odchylky těchto parametrů byly vypočteny ze sedmi vzorků s různými pigmenty, z nichž každý byl nastříknut třikrát ($n = 21$ analýz).

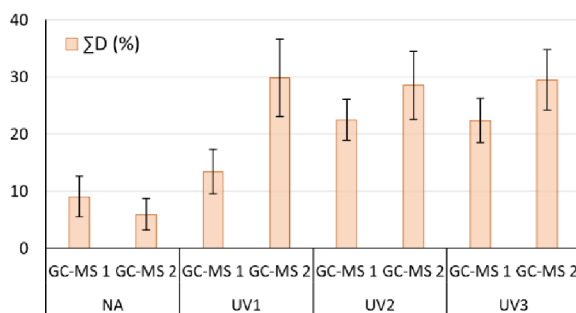


(a)

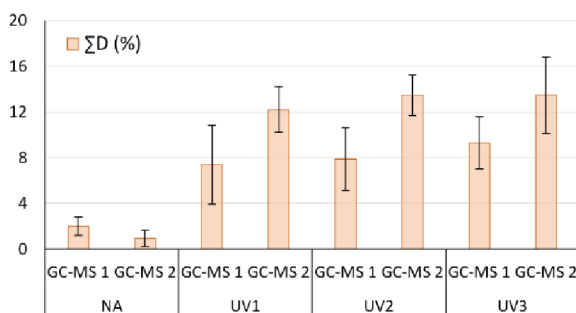


(b)

Obr. 20 Sloupcové grafy znázorňující změny poměrů mastných kyselin v referenčních vzorcích olejového (graf a) a vaječného pojiva (graf b) během umělého stárnutí. Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu daného poměru vypočtenou z ploch chromatografických píků sedmi vzorků, každý z nich byl nastříknut třikrát. Standardní odchylky byly vypočítány stejným způsobem



(c)



(d)

Obr. 21 Sloupcové grafy znázorňující změny v sumě relativního zastoupení dikarboxylových kyselin (ΣD) v referenčních vzorcích olejového (graf c) a vaječného pojiva (graf d) během umělého stárnutí. Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu parametru ΣD sedmi vzorků, každý z nich byl nastříknutý třikrát. Standardní odchylky byly vypočítány stejným způsobem

5.3.4 Poměry mastných kyselin a další diagnostické parametry

Jak lze vidět na obrázku 20, poměr P/S byl téměř konstantní ve vzorcích vaječného i olejového pojiva během jednotlivých kroků stárnutí. Pro lněný olej byly průměrné hodnoty poměrů P/S z kroků NA, UV1, UV2 a UV3 1,32 a 1,48 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Tyto hodnoty se velmi dobře shodují s rozsahem uváděným v literatuře (1,3 – 1,6) [182–184]. Pro srovnání, poměry P/S vypočtené pro vaječné pojivo nabývaly hodnot 1,80 (GC-MS 1) a 2,85 (GC-MS 2). V literatuře je uváděna průměrná hodnota poměru P/S kolem 3 [166,183].

Druhým významným poměrem používaným pro rozlišení mezi vaječným pojivem a vysychavými oleji je A/P. Ten udává stupeň oxidace a vysychání, které probíhají během stárnutí, a proto se tento poměr časem zvyšuje [170,185]. To ukazuje i obrázek 20, kde lze vidět, že průměrné hodnoty A/P vzrostly u všech vzorků během umělého stárnutí více než dvojnásobně. Z počátečních hodnot před začátkem stárnutí - 0,43 a 0,23 došlo u lněného oleje během stárnutí k nárůstu až na hodnoty 0,92 a 0,81 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Naměřené hodnoty se velice dobře shodují s těmi v literatuře [170,179]. Oproti tomu hodnoty poměru A/P u vejce byly výrazně nižší. Poměr dosahoval hodnot 0,07 a 0,02 před začátkem stárnutí a po něm se zvýšil na 0,22 a 0,14 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Podle literatury [183] jsou hodnoty

A/P u vajec obvykle menší než 0,3, což je v souladu se získanými hodnotami. Překvapivě nejvyšší hodnoty A/P nebyly nalezeny u nejvíce zestárlých vzorků lněného oleje (UV3), ale byly dosaženy u vzorků UV2 a UV1. To lze vysvětlit potenciálním odpařováním kyseliny azelaové z povrchu vzorku během stárnutí pod UV světlem, jak je popsáno v [173].

Během umělého stárnutí byl sledován i poměr O/S, který je významný zejména pro oleje, neboť charakterizuje stupeň jejich zralosti [178,186]. Během umělého stárnutí došlo k významnému poklesu poměru O/S v důsledku úbytku kyseliny olejové. U vzorků lněného oleje došlo k poklesu z hodnot 1,85 a 2,16 na 0,28 a 0,10 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Ještě větší pokles byl zaznamenán u vejce, a to z hodnot 2,69 a 4,00 na 0,18 a 0,04 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Výzkumy prováděné na historických uměleckých dílech dokládají hodnoty poměru O/S menší než 0,5 [183]. Výsledky ukazují, že umělé stárnutí značně urychluje oxidaci kyseliny olejové, která je díky své dvojně vazbě k oxidaci vysoce náchylná a může tak být považována za jeden z cenných ukazatelů stupně oxidace [170,173].

Posledním sledovaným poměrem byl poměr A/Su, který je nepostradatelný pro zhodnocení tepelných úprav, které mohly nastat při zpracování lněného oleje. Například polymerovaný lněný olej je připravován zahřátím na vysoké teploty a oproti běžnému lněnému oleji rychleji schne a méně žloutne [170,187]. Během umělého stárnutí došlo k poklesu průměrných hodnot A/Su. U vzorků lněného oleje došlo k poklesu z 3,84 a 4,24 na 1,83 a 2,41 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Lněné oleje za studena lisované (tzv. raw), které nebyly nijak tepelně upravovány, mívají hodnoty A/Su obvykle větší než šest, naopak u tepelně zpracovaných olejů nabývá poměr hodnot 2-3 [170]. Vzhledem k tomu, že na přípravu modelových vzorků byla použita směs polymerovaného a čištěného lněného oleje, jsou výsledky v souladu s hodnotami z literatury. Ačkoliv má tento poměr větší vypovídací hodnotu pro olejová pojiva, byl sledován i u těch vaječných, kde docházelo k podobnému trendu jako u oleje, a to k poklesu hodnot z 3,10 a 4,38 až na hodnoty 1,23 a 1,39 (GC-MS 1 a GC-MS 2). Nejvýznamnější pokles nastal mezi kroky NA a UV1, s výjimkou vzorků vajec, která byla měřena pomocí GC-MS 1, kde konečný krok UV3 vedl k nejnižší průměrné hodnotě 1,23. To potvrzuje, že proces umělého stárnutí byl vysoce účinný už po prvním kroku stárnutí.

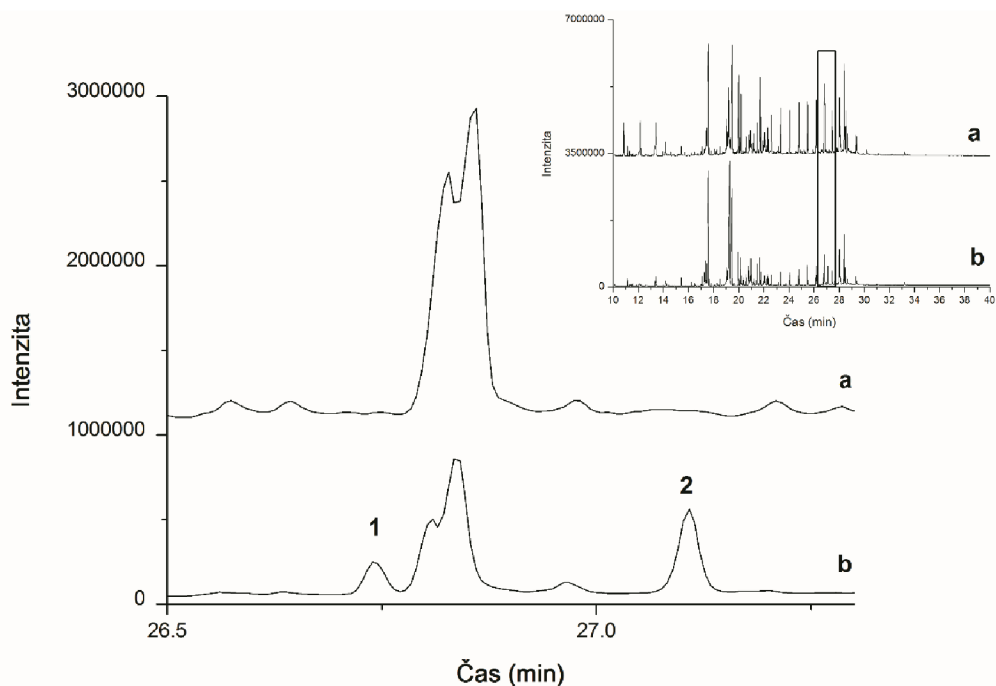
Kromě charakteristických poměrů mastných kyselin byl sledován i jiný parametr, a to součet relativního zastoupení vybraných dikarboxylových kyselin (ΣD %), konkrétně suberové (C₈), azelaové (C₉) a sebakové (C₁₀) kyseliny, které jsou hlavními oxidačními produkty C₁₈ nenasycených mastných kyselin [105,165]. Byl zaznamenán postupný nárůst

parametru $\sum D$ během umělého stárnutí, a to zejména u lněného oleje, ve kterém je obsaženo více nenasycených mastných kyselin ve srovnání s vejcem. Nejvyšší hodnoty byly dle očekávání pozorovány po konečném kroku stárnutí (UV3), konkrétně 22,37 % a 29,47 % pro lněný olej a 9,30 % a 13,48 % pro vejce (GC-MS 1 a GC-MS 2). Výsledky jsou uvedeny na obrázku 21 jakožto průměrné hodnoty získané ze tří opakovaných nástřiků každého vzorku a jsou v souladu s literárními údaji [166,182].

Získané výsledky byly porovnány i statisticky. Nejprve bylo nezbytné ověřit normalitu dat. Ta byla ověřena vizuálně z histogramu a Q-Q grafu a pomocí momentového a K-S testu. Testovací kritéria χ^2_{exp} pro momentový test a D pro K-S test byla porovnána s kritickými hodnotami pro χ^2 a D na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ s počtem stupňů volnosti ν ($\nu = n - 1$). Nulová hypotéza uváděla, že data pochází z normálního rozdělení ($H_0: \chi^2_{\text{exp}} \text{ (or } D) < \chi^2_{(1-\alpha)}$) a byla testována proti alternativní hypotéze, kdy data nepochází z normálního rozdělení ($H_1: \chi^2_{\text{exp}} \text{ (or } D) > \chi^2_{(1-\alpha)}$). Vypočtené hodnoty χ^2_{exp} a D byly menší než kritické hodnoty, tudíž nulová hypotéza byla přijata. Poté byly porovnávány výsledky poměrů mastných kyselin a parametru $\sum D$ z každého kroku umělého stárnutí mezi olejovým a vaječným pojivem (vždy v rámci jednoho instrumentu – GC-MS 1 nebo GC-MS 2) pomocí dvouvýběrového (nepárového) Studentova t -testu. Tento test vycházel z průměrných hodnot a směrodatných odchylek uváděných na obrázcích 20 a 21. Nulová hypotéza uváděla, že střední hodnoty porovnávaných výběrů jsou si rovny ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) a byla testována proti alternativní hypotéze, která zamítala rovnost středních hodnot dvou výběrů ($H_1: \mu_1 \neq \mu_2$). Naměřené t hodnoty byly porovnány s kritickými t hodnotami na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a počtem stupňů volnosti ν ($\nu = n_1 + n_2 - 2$). Vypočtené hodnoty pro všechny vzorky a všechny parametry s výjimkou jednoho (poměr A/Su pro NA vzorky měřené na GC-MS 2) byly větší než kritické hodnoty, a proto byla nulová hypotéza zamítnuta. Tento test tak prokázal statisticky významný rozdíl mezi vaječným a olejovým pojivem. Dvouvýběrový t -test byl dále použit k porovnání výsledků získaných měřeními na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2. Na zvolené hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými dvěma GC-MS přístroji kromě sedmi hodnot. Jednalo se o: A/P, A/Su, O/S (UV1) a A/Su, O/S (NA) se lněným olejem a poměr A/Su (UV1 a UV2) u vaječného pojiva. Rozdíly v naměřených hodnotách dvěma GC-MS přístroji byly pravděpodobně způsobeny heterogenitou olejového a zejména vaječného pojiva společně s malým počtem fyzických replik pro každý vzorek.

5.3.5 Další charakteristické parametry – steroly

Vzhledem k popsaným odchylkám v diagnostických parametrech a možnému vlivu různých faktorů na naměřené hodnoty je více než vhodné prozkoumat další specifické látky indikující typ pojíva. Například steroly nabízejí slibnou skupinu markerů pro detekci vaječného pojíva. Cholesterol obvykle tvoří až 5 % celkového obsahu lipidů ve vejcích [188], což je mnohonásobně více než je obsah jakéhokoli sterolu ve vysychavých olejích [165]. Proto je cholesterol často považován za indikátor přítomnosti vaječného pojíva [167,187–189]. Spoléhat se pouze na cholesterol však může vést k nepřesným výsledkům kvůli jeho autooxidaci [190,191], jak je znázorněno na obrázku 22. Zatímco cholesterol byl před stárnutím (NA) přítomen ve všech vzorcích vaječného pojíva, již během počátečního kroku stárnutí (UV1) zmizel. Následně byla pozornost upřena na produkty oxidace cholesterolu (COP z angl. cholesterol oxidation product), kdy se podařilo ve všech stařených vzorcích vaječného pojíva identifikovat následující sloučeniny: cholesta-4,6-dien-3-ol, cholesta-4,6-dien-3-on, cholesta-3,5-dien, cholest-5-en-3-on, a cholesta-3,5-dien-7-on. Poslední zmiňovaný – cholesta-3,5-dien-7-on byl dominantní a vyskytoval se i u nejvíce stařených vzorků (UV3), proto bývá používán jako marker vaječného pojíva v historických vzorcích [182,192,193]. Žádný z těchto COP, ani samotný cholesterol nebyly detegovány ve vzorcích olejového pojíva. Steroly, jako je β -sitosterol, stigmasterol, a isofukosterol, byly navíc identifikovány jak ve vaječném pojívu, tak v lněném oleji, i když poslední dva jmenovaní převládají více v lněném oleji [194,195]. Ve stopovém množství se však mohou objevit i ve vejcích [196]. Správná interpretace proto vyžaduje kvantitativní zhodnocení výskytu těchto látek, nejlépe pomocí vhodné statistické metody, jako je analýza hlavních komponent.



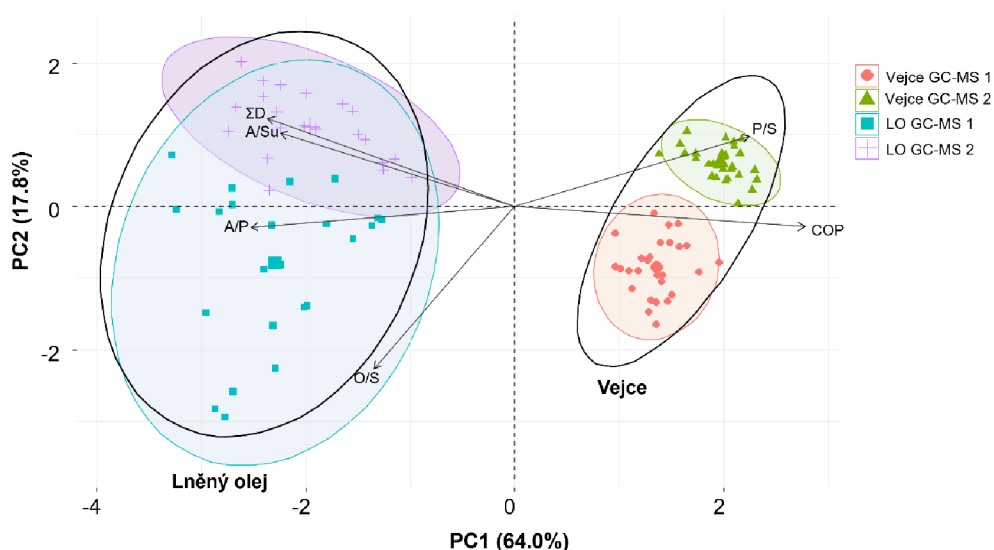
Obr. 22 Výřez z chromatogramů vzorků vaječného pojiva bez pigmentu po umělém stárnutí, krok UV1 (a) a před stárnutím (b). Vyznačené látky jsou: 1 – cholesterol methyl ether, 2 – cholesterol. V pravém horním rohu jsou zobrazeny celé TIC chromatogramy těchto vzorků před (b) a po (a) umělém stárnutí

5.3.6 PCA analýza

Kombinace diagnostických poměrů mastných kyselin společně s oxidačními produkty cholesterolu a dalšími markery nemusí být vždy plně dostačující pro přesnou identifikaci lipidových pojiv. Produkty oxidace cholesterolu se sice jeví jako velice slibné markery vaječného pojiva, nicméně v historických vzorcích může být problém takové látky identifikovat. To je často způsobeno jejich extrémně nízkými koncentracemi, které se často blíží nebo klesají pod limit detekce metody [182]. Poměry mastných kyselin se pro změnu nejeví jako ideální nástroj k odlišení lipidových pojiv z důvodu jejich snadné ovlivnitelnosti různými faktory, jak bylo naznačeno v předchozích kapitolách. To může vést k nesprávné interpretaci naměřených hodnot, neboť běžným postupem je srovnání získaných hodnot s referenčními hodnotami z literatury, které tak mohou být potenciálně zavádějící. Například poměr P/S pro modelové vzorky vajec v konečném kroku stárnutí (UV3) měřených na přístroji GC-MS 1 nabýval průměrné hodnoty $1,76 \pm 0,31$. Taková hodnota poměru P/S by mohla být mylně interpretována jako ukazatel lněného oleje, pokud by byla hodnocena bez dalšího kontextu pouze srovnáním s literárními zdroji [179,197]. Proto je třeba zdůraznit důležitost zahrnutí kontrolních vzorků k ověření referenčních hodnot pro analýzu a rozlišení pojiv na bázi vajec a oleje. Získání autentických historických vzorků s přesně zdokumentovaným původem a metodami přípravy je však vzácné a poměrně náročné. Kvůli

nedostatku takových vzorků je jejich rutinní použití jako referenčních standardů nepraktické. Navrhovaný přístup zahrnující modelové vzorky s dobře definovanými protokoly přípravy, ideálně spojený se současnými sofistikovanými postupy a technikami umělého stárnutí, představuje účinnou a nákladově efektivní strategii k řešení tohoto omezení.

Pro správnou interpretaci získaných dat pak vhodným nástrojem může být analýza hlavních komponent (PCA). PCA je běžně používána k odlišení proteinových poživ na základě různého zastoupení jednotlivých aminokyselin [167,183]. K rozlišení lipidových poživ se však PCA téměř nepoužívá. Pro tvorbu PCA grafu bylo využito dat získaných měřením referenčních vzorků olejového a vaječného pojiva na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2 po konečném kroku umělého stárnutí (UV3). Tato sada vzorků byla vybrána záměrně, aby se svým složením co nejvíce přibližovala reálným historickým vzorkům a mohla tak být použita jako reference pro identifikaci lipidového pojiva právě v těchto historických vzorcích. Pro PCA analýzu bylo uvažováno šest proměnných: poměry P/S, A/P, O/S, A/Su, parametr ΣD a přítomnost, nebo absence jakéhokoliv COP. Jak lze vidět na obrázku 23, první dvě komponenty (PC) přispěly k 81,8 % celkového rozptylu v datech. Hlavní komponenty PC1 a PC2 představovaly 64,0 % a 17,8 % celkové variability. PC1 korelovala zejména s proměnnými COP, A/P, P/S, A/Su a ΣD , přičemž nejsilnější korelace byla pozorována u poměru A/P a COP. Navíc A/P úzce souvisí s parametry A/Su a ΣD , což naznačuje, že zvýšení poměru A/P povede i k vyšším hodnotám u zmíněných parametrů. Oproti tomu u komponenty PC2 lze vidět pouze negativní korelaci s poměrem O/S.



Obr. 23 PCA biplot referenčních vzorků vaječného a olejového pojiva (LO) po umělém stárnutí (UV3) získaných měřením pomocí GC-MS 1 a GC-MS 2. Elipsy představují oblasti s 95 % intervalem spolehlivosti, které zahrnují těžiště každého shluku dat. Černé vektory představují zátěže šesti proměnných: poměry kyselin A/P, A/Su, O/S, P/S, sumu relativního zastoupení azelaové, sebakové a suberové kyseliny (ΣD) a přítomnost/nepřítomnost oxidačního produktu cholesterolu (COP)

Z obrázku 23 je také patrné, že biplot vizuálně oddělil vaječná a olejová pojiva (černé elipsy) a dále jsou vidět i dva shluky náležící vaječnému pojivu měřenému na GC-MS 1 a GC-MS 2 (červené a zelené elipsy). Toto prostorové oddělení je pravděpodobně způsobeno nízkou homogenitou vzorků vajec a v důsledku toho i rozdílnými poměry P/S (průměrné hodnoty $1,76 \pm 0,31$ pro GC-MS 1 a $2,93 \pm 0,24$ pro GC-MS 2) a O/S (průměrná hodnota $0,18 \pm 0,07$ pro GC-MS 1 oproti $0,05 \pm 0,02$ pro GC-MS 2). Naopak u vzorků lněného oleje je pozorován překryv shluků, což reflektuje pouze drobné rozdíly v proměnných získaných analýzou na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2. Kromě vizuálního rozdělení pojiv znázorňuje biplot také vztah mezi příslušným pojivem a šesti proměnnými. Poměr P/S a přítomnost COP významně souvisí s vejci, což naznačuje, že cholesterol nebo jeho oxidační produkty jsou obecně přítomné pouze ve vejcích. Vyšší podíl kyseliny palmitové v živočišných tucích, než ve vysychavých olejích vede k vyššímu poměru P/S pozorovanému u vajec [164]. Naproti tomu vzorky lněného oleje jsou spojeny s proměnnými, jako jsou poměry A/P, A/Su, O/S a parametr ΣD . To dokazuje vyšší koncentrace nenasycených mastných kyselin (linolenová, linolová, a olejová) a jejich degradačních produktů (dikarboxylové kyseliny azelaová, sebaková a suberová) v olejích ve srovnání s vejci [105].

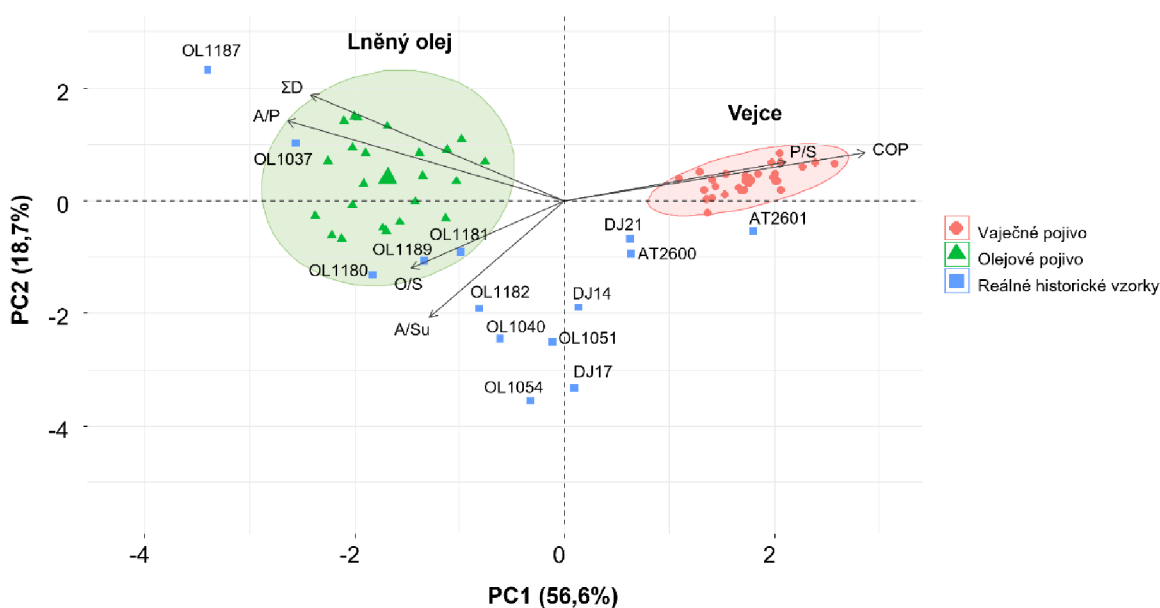
5.3.7 Aplikace PCA na reálné historické vzorky

Čtrnáct vzorků historických nástěnných maleb pocházejících z různých období a tří odlišných lokací bylo analyzováno pomocí GC-MS 1 a následně podrobena PCA analýze. Hodnoty poměrů mastných kyselin a parametru ΣD jsou pro tyto vzorky uvedeny v tabulce V.

Tabulka V Hodnoty poměrů mastných kyselin a parametru ΣD pro historické vzorky nástěnných maleb získané měřením pomocí GC-MS 1

Vzorek	P/S	A/P	O/S	A/Su	ΣD (%)
OL1037	1,48	1,29	0,22	3,90	31,27
OL1040	1,20	0,33	0,24	5,46	3,89
OL1051	1,10	0,05	0,32	3,94	0,96
OL1054	1,26	0,02	0,35	6,57	0,47
OL1180	1,41	0,93	0,33	5,79	15,16
OL1181	1,43	0,74	0,28	3,88	11,06
OL1182	1,26	0,38	0,23	5,18	9,11
OL1187	1,62	2,05	0,10	4,02	36,39
OL1189	1,34	0,77	0,28	4,52	12,91
AT2600	1,24	0,05	0,36	-	0,80
AT2601	1,22	-	0,34	-	-
DJ14	1,42	0,19	0,30	3,53	2,40
DJ17	2,10	0,22	0,43	7,73	2,33
DJ21	1,75	0,23	0,21	2,14	6,55

K sestavení PCA biplotu byly použity referenční vzorky nástěnných maleb měřené na GC-MS 1 po konečném kroku stárnutí (UV3). Uvažovány byly stejné proměnné jako v předešlé PCA analýze, tedy: poměry P/S, A/P, O/S, A/Su, parametr ΣD a přítomnost/absence jakéhokoliv COP. Z obrázku 24 lze vidět, že první dvě komponenty (PC) přispěly k 75,3 % celkového rozptylu v datech. Hlavní komponenty PC1 a PC2 představovaly 56,6 % a 18,7 % celkové variability. PC1 korelovala zejména s proměnnými COP, P/S, A/P, O/S, a ΣD , přičemž nejsilnější korelace byla pozorována u poměru A/P a COP. PC2 slabě korelovala s poměrem A/Su.



Obr. 24 PCA biplot zkonstruovaný z hodnot získaných měření referenčních vzorků vaječného a olejového pojiva po umělém stárnutí (UV3) a reálných historických vzorků nástěnných maleb. Vzorky byly měřeny pomocí GC-MS 1. Elipsy představují oblasti s 95 % intervalem spolehlivosti, které zahrnují těžiště každého shluku dat. Černé vektory představují zátěže šesti proměnných (stejně jako na obrázku 23)

Na obrázku 24 je vidět rozdělení vaječného a olejového pojiva (červená a zelená elipsa) společně s 14 body (modře zbarveno) náležícími historickým vzorkům. Pouze u čtyř z nich se podařilo jednoznačně určit, že byl použit lněný olej jako pojivo, a to konkrétně u vzorků: OL1037, OL1180, OL1181 a OL1189. To je navíc v souladu s předběžnými mikrochemickými a histochemickými důkazy, které byly prováděny již dříve. Vzorky OL1182 a OL1187 jsou sice mimo elipsu příslušející vzorkům se lněným olejem, nicméně se nachází velice blízko ní a lze tedy předpokládat, že se v těchto vzorcích budou nacházet stopy vysychavých olejů. U vzorku OL1187 je téměř jisté, že byl použit vysychavý olej vzhledem k vysokým hodnotám poměru A/P (2,05) a parametru ΣD (39,39 %), které jsou typické pouze pro vysychavé oleje [105]. Vzorky z Rakouska (AT2600 a AT2601) a jeden vzorek z Bečova nad Teplou (DJ21) jsou na druhou stranu v blízkosti shluku náležícího vaječnému pojivu. Poměrně nízké hodnoty poměru A/P (0,05 a 0,23 pro AT2600

a DJ21, u AT2601 byly hodnoty pod limitem detekce dané metody) a parametru ΣD skutečně poukazují na možnou přítomnost vaječného pojiva, nicméně hodnoty P/S byly okolo 1,23 (AT2600 a AT2601) a 1,75 pro DJ21, což odpovídá spíše hodnotám pro lněný olej. Pravděpodobně se tedy bude jednat o směs vaječného a olejového pojiva (známé jako „tempera grassa“), ve které převažuje vaječná složka. Zbytek vzorků (DJ14, DJ17, OL1040, OL1051 a OL1054) se nachází v oblasti mezi oběma pojivy a je zde vidět silná korelace s poměrem A/Su. Ten nabýval poměrně vysokých hodnot, které poukazují na to, že byl použit olej, který nebyl nijak tepelně upravován. U vzorků OL1040, OL1051, OL1054 a DJ14 byly zaznamenány nízké hodnoty poměru P/S (v rozmezí 1,10 – 1,42) a O/S (<0,5), které jsou typické pro olejová pojiva, nicméně hodnoty poměru A/P byly u těchto vzorků $\leq 0,3$ spolu s hodnotami parametru $\Sigma D < 5 \%$, což jsou hodnoty typické pro vaječné pojivo. Vzorek DJ17 měl také nízké hodnoty A/P a ΣD , ovšem poměr P/S nabýval hodnoty 2,10. U těchto vzorků lze tedy usuzovat na přítomnost vaječného pojiva s příměsí vysychavého oleje. Je třeba dodat, že u žádného ze vzorků nebyl detegován žádný produkt oxidace cholesterolu. U šesti vzorků (OL1051, OL1054, OL1182, OL1189, AT2600 a AT2601) bylo nicméně identifikováno pět steroidních látek, konkrétně: isofukosterol, methyl ether β -sitosterolu, methyl ether stigmasterolu, stigmasta-3,5-dien a γ -sitosterol, které se nacházejí ve větší míře v olejích, ale v omezené míře se mohou vyskytovat i ve vejcích, jak bylo uvedeno v kapitole 5.3.5.

5.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS [198,199]

5.4.1 Optimalizace extrakčního postupu pro nepolární látky

Extrakce různých druhů látek z rostlinného materiálu je často prováděna pomocí Soxhletovy extrakce, macerací nebo rozpouštědly za zvýšeného tlaku a teploty, případně s využitím superkritických tekutin. V takových případech je obvykle zapotřebí většího množství rostlinného materiálu (semena, kořeny, stonky, listy aj.) v řádech miligramů až gramů. Vzhledem k limitovanému množství rostlinného materiálu při analýze osemení a snaze nalézt efektivní postup, jak z co nejmenšího kousku osemení získat maximální informaci o zastoupených látkách, byly proto hledány alternativní způsoby extrakce. Obecně se jedná o dva přístupy, kdy prvním z nich je extrakce rozpouštědlem z povrchu rostlinného materiálu a druhou možností je pak chemické narušení (např. hydrolýza) povrchu s následnou extrakcí uvolněných látek. Jelikož je extrakce rozpouštědlem jeden z nejjednodušších způsobů extrakce rostlinného materiálu, byla použita i v této práci. Extrakce hexanem s následnou silanizací BSTFA dovolila u obou genotypů detegovat pouze některé mastné kyseliny, a to konkrétně kyselinu kapronovou, enanthovou, kaprylovou, pelargonovou, laurovou, palmitovou a stearovou. Extrakce acetonem byla o poznání horší a detegovány byly pouze tyto látky: kyselina pelargonová, myristová, stearová a monoacylglycerol kyseliny palmitové. Identifikace všech látek probíhala na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST, 2020 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, USA). Molekulové hmotnosti společně s retenčními časy a vybranými ionty k detekci jsou uvedeny v tabulce VI. V této tabulce jsou uvedeny i látky, které byly identifikovány po (trans)esterifikaci činidlem MethPrep II.

Tabulka VI Identifikované sloučeniny v hexanových a acetonových extraktech a po derivatizaci činidlem MethPrep II ve vzorcích hrachu setého genotypu Cameor a JI64. Ionty vyznačené tučně jsou nejintenzivnějšími v MS spektrech

Látka	Retenční čas (min)	Molekulová hmotnost po silanizaci ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Ionty k detekci (m/z)	Molekulová hmotnost po methylaci ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Ionty k detekci (m/z)
Kapronová kyselina (hexanová)	8,428	188,35	75 , 117, 173	130,16	74 , 87, 99
Enanthová kyselina (heptanová)	9,744	202,37	75 , 117, 187	144,18	74 , 87, 113

Kaprylová kyselina (oktanová)	11,081	216,40	75, 117, 201	158,21	74 , 87, 127
Pelargonová kyselina (nonanová)	12,386	230,42	73, 117, 215	172,23	74 , 87, 141
Laurová kyselina (dodekanová)	16,003	272,51	73, 117, 257	214,32	74 , 87, 214
Palmitová kyselina (hexadekanová)	20,028	328,61	73, 117, 313	270,42	74 , 87, 270
Stearová kyselina (oktadekanová)	21,801	356,66	73, 117, 341	298,47	74 , 87, 298
Myristová kyselina (tetradekanová)	18,091	300,56	73 , 117, 285	242,37	74 , 87, 242
Monoacylglycerol kyseliny palmitové	24,733	474,87	73, 371	344,50	-
Jantarová kyselina (butandiová)	7,751	262,47	73, 147 , 247	146,09	55, 115
Kaprinová kyselina (dekanová)	11,935	244,46	73, 117, 229	186,27	74 , 87, 155
Lignocerová kyselina (tetrakosanová)	16,811	440,82	73, 117 , 425, 440	382,63	74 , 87, 382
Tridekanová kyselina	15,687	286,56	73, 117 , 271, 286	228,37	74 , 87, 228
Pentadekanová kyselina	17,884	314,59	74, 117 , 299, 314	256,40	74 , 87, 256

Nízká účinnost extrakce rozpouštědlem vedla k hledání jiných postupů, jak uvolnit a analyzovat co největší množství látek z jednoho malého kousku obalu semen hrachu. A jelikož se na základě předchozích studií mělo jednat především o mastné kyseliny, které jsou hojně zastoupeny u obou genotypů [200], byl adaptován postup ze zpracování vzorků nástěnných maleb (trans)esterifikačním činidlem MethPrep II. U genotypu JI64 se podařilo detegovat pouze šest mastných kyselin: kyselina jantarová, pelargonová, laurová, myristová, palmitová a stearová. Stejně kyseliny byly detegovány i v genotypu Cameor, ve kterém byly oproti JI64 navíc přítomny ještě kyseliny kaprinová, tridecylová, pentadecylová a lignocerová.

Extrakce acetonem (hexanem) následovaná silanizací ani methylace činidlem MethPrep II neposkytovaly kýžené výsledky a těmito postupy bylo detegováno pouze omezené množství mastných kyselin. Proto byly vyzkoušeny další způsoby zpracování vzorku. S ohledem na mechanickou tvrdost osemení i hila (obzvláště u genotypu JI64) a velikost vzorků (plocha cca 1 mm²) byla použita hydrolyza, respektive zmýdelnění, které mělo přispět k narušení povrchu obalu semen a tím k lepšímu uvolnění analytů, které byly poté silanizovány. To se také potvrdilo, jak dokazuje tabulka VII. U obou genotypů bylo detegováno velké množství mastných kyselin (C9 – C28) včetně několika jejich (hydroxy)derivátů a mastných alkoholů jako jsou dodekanol (C12), pentadekanol (C15),

hexadekanol (C16), heptadekanol (C17), oktadekanol (C18), eikosanol (C20), dokosanol (C22), trikosanol (C23), tetrakosanol (C24), hexakosanol (C26) a oktakosanol (C28). Dále pak pentacyklické triterpenoidy typu α - a β -amyrin, které byly detegovány u obou genotypů a kyseliny oleanolová, betulinová a ursolová, které se vyskytovaly pouze v hilu Cameoru.

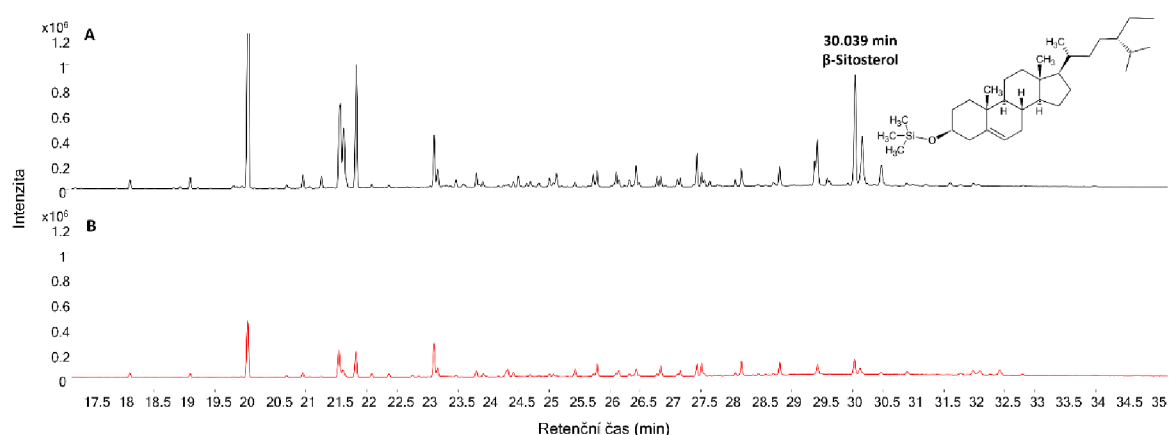
Tabulka VII Identifikované sloučeniny po zmýdelnění ve vzorcích hrachu setého genotypu Cameor a JI64. Ionty vyznačené tučně jsou nejintenzivnějšími v MS spektrech

Látka	Ret. čas (min)	Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹)	Molekulová hmotnost po silanizaci (g·mol ⁻¹)	Ionty k detekci (m/z)	Cameor/ JI64
Nasycené MK					
Pelargonová k. (nonanová)	12,420	158,238	230,420	73, 117, 215	-/+
Kaprinová k. (dekanová)	13,656	172,268	272,507	73, 117, 257	-/+
Laurová k. (dodekanová)	15,987	200,318	272,507	73, 117, 257	-/+
Myristová k. (tetradekanová)	18,104	228,371	300,560	73 , 117, 285	+/+
Pentadekanová k.	19,097	242,398	314,590	74, 117 , 299	+/+
Palmitová k. (hexadekanová)	20,056	256,424	328,610	73, 117, 313	+/+
Heptadekanová k. (margarová)	20,955	270,451	342,632	73 , 117, 327	+/+
Stearová k. (oktadekanová)	21,831	284,477	356,660	73, 117, 341	+/+
Nonadekanová k.	22,669	298,504	370,685	73, 117 , 355	+/+
Ikosanová k. (arachidová)	23,474	312,530	384,712	73 , 117, 369	+/+
Heneikosanová k.	24,258	326,600	398,738	73 , 117 , 383	-/+
Dokosanová k. (behenová)	25,007	340,584	412,765	73 , 117 , 397	+/+
Trikosanová k.	25,735	354,610	426,791	73, 117 , 411	+/+
Lignocerová kyselina (tetrakosanová)	26,437	368,637	440,820	73, 117 , 425	+/+
Pentakosanová k.	27,118	382,700	458,844	73, 117 , 439	+/+
Hexakosanová k. (cerotová)	27,773	396,690	468,871	73, 117 , 453	-/+
Oktakosanová k. (montanová)	29,038	424,743	496,924	73, 117 , 481	-/+
Nenasycené MK					
trans-hexadec-9-enová k. (palmitoelaidová)	19,808	254,408	328,605	73 , 117, 311	+/+
cis-oktadec-9-enová k., (olejová)	21,615	282,461	354,643	73 , 117, 339	+/+
cis,cis-oktadeca-9,12-dienová k. (linolová)	21,572	280,446	352,627	73 , 262, 337	-/+
cis-eikosa-11-enová k.	23,279	310,510	382,696	73, 129, 367	-/+
cis-dokos-13-enová k.	24,837	338,568	410,749	73 , 129, 395	+/+
cis-tetrakos-15-enová k.	26,287	366,600	438,802	73 , 129, 423	-/+
Hydroxykyseliny					
3-hydroxymyristová	19,942	244,370	388,750	147, 233 , 373	+/-
16-hydroxyhexadekanová	23,113	272,420	416,620	73, 385, 401	+/+
2-hydroxyhexakosanová	28,691	412,700	556,000	147, 439 , 541	-/+
Rozvětvené MK					

13-methyl-cis-tetradek-9-enová	18,927	240,380	312,000	73, 117, 297	-/+
Dikarboxylové MK					
Butandiová k. (jantarová)	11,846	118,088	262,450	73, 147, 247	+/-
2-hydroxybutandiová k. (jablečná)	14,190	134,090	350,631	73, 147, 335	+/-
2-hydroxypentandiová k. nonandiová k. (azelaová)	15,221	132,115	364,657	73, 129, 247	+/-
hexadekandiová k.	17,607	188,221	332,583	73, 129, 317	+/-
oktadekandiová k.	23,815	286,407	430,000	73, 204, 415	+/-
25,305	314,460	458,822	73, 204, 443	+/-	
Mastné alkoholy					
dodekan-1-ol	15,015	186,334	258,515	75, 243	+/-
pentadekan-1-ol	20,684	228,414	300,595	75, 285, 299	-/+
hexadekan-1-ol	19,217	242,441	314,622	75, 299	+/-
heptadekan-1-ol	22,376	256,467	328,648	75, 313	+/-
oktadekan-1-ol	21,059	270,494	342,675	75, 327	+/+
eikosan-1-ol	22,757	298,547	370,728	75, 355	+/+
dokosan-1-ol	26,107	326,600	398,781	75, 383	+/+
trikosan-1-ol	25,073	340,627	412,808	75, 397	+/+
tetrakosan-1-ol	27,417	354,653	426,834	75, 426	-/+
hexakosan-1-ol	27,162	382,700	454,888	75, 439	+/+
oktakosan-1-ol	28,448	410,771	482,941	75, 467	+/+

MK – mastná kyselina, +/- přítomnost/absence dané látky u genotypu Cameor nebo JI64

Méně početnou skupinou byly fytosteroly, konkrétně kampesterol, isofukosterol a β -sitosterol, který byl ve větší míře zastoupen v hilu JI64 (obr. 25). Zajímavostí bylo, že pouze v hilu Cameoru byly detegovány dikarboxylové kyseliny (C4, C5, C9, C16 a C18), zatímco v hilu JI64 byly detegovány dlouhé mastné kyseliny s 26 a 28 uhlíky (hexakosanová a oktakosanová kyselina), které jsou dle literatury charakteristickými markery právě tohoto dormantního genotypu [200,201].



Obr. 25 TIC chromatogram vzorků hrachu setého genotypu JI64 (A) a Cameor (B) po zmydelnění a derivatizaci BSTFA. V čase 30,04 min vyznačen pík β -sitosterolu-TMS

Ačkoliv byla po procesu zmydelnění s následnou extrakcí a silanizací detegována celá řada nepolárních látek, byl v rámci optimalizace metody vyzkoušen ještě jeden přístup, který byl převzat z literatury [102] a mírně modifikován. Jednalo se o jednokrokovou

methanolýzu/methylaci využívající běžně dostupných chemikálií, jako je koncentrovaná kyselina chlorovodíková, methanol a toluen. Tato metoda byla vyvinuta zejména pro přípravu FAMES, které jsou po skončení reakce extrahovány do *n*-hexanu, nicméně její použití nemusí být omezeno pouze na ně. Methanolýzu/methylaci lze provádět za mírných podmínek (inkubace 16 hodin při 45 °C), nebo zrychlených podmínek, kdy jsou vzorky inkubovány pouze hodinu při 90 °C. Na počátku práce byly vyzkoušeny obě modifikace methanolýzy/methylace a jelikož poskytovaly shodné výsledky, byla dále použita rychlejší varianta z důvodu značné časové úspory. Detegovány byly podobné skupiny látek jako v případě zmýdelnění, a to mastné kyseliny (C15 – C26), (hydroxy)deriváty mastných kyselin, mastné alkoholy (undekanol, hexadekanol a oktadekanol). Dále fytosteroly (kampesterol, ergosterol, fukosterol, stigmasterol, stigmasta-3,5-dien, β -sitosterol, 26,27-dinorergosta-5,23-dien-3 β -ol) a pentacyklické triterpenoidy α - a β -amyrin. V porovnání se zmýdelněním nebyly v *n*-hexanovém extraktu po methanolýze/methylaci detegovány žádné dikarboxylové kyseliny s výjimkou kyseliny hexadekandiové (C16) a zároveň bylo detegováno pouze několik mastných alkoholů. Dále se podařilo detegovat nasycené kyseliny s delším uhlíkovým řetězcem (C15) na rozdíl od kyselin s kratším řetězcem (C9, C10 atd.) po zmýdelnění. Zároveň však nebyly detegovány dlouhé mastné kyseliny s 26 a 28 uhlíky, které jsou typické pro genotyp JI64. Naopak bylo v *n*-hexanovém extraktu po methanolýze/methylaci detegováno mnohem větší množství hydroxyderivátů mastných kyselin a více fytosterolů než po zmýdelnění. Porovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin v obou genotypech pomocí methanolýzy/methylace je uvedeno v tabulce VIII.

Tabulka VIII Identifikované sloučeniny po methanolýze/methylaci ve vzorcích hrachu setého genotypu *Cameor a JI64*. Ionty vyznačené tučně jsou nejintenzivnějšími v MS spektrech

Látka	Ret. čas (min)	Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹)	Molekulová hmotnost po methylaci (g·mol ⁻¹)	Ionty k detekci (m/z)	Cameor/ JI64
Nasycené MK					
Pentadekanová k.	17,851	242,398	256,400	74 , 87, 256	+/+
Palmitová k. (hexadekanová)	18,876	256,424	270,420	74 , 87, 270	+/+
Heptadekanová k. (margarová)	19,844	270,451	284,477	74 , 87, 284	+/+
Stearová k. (oktadekanová)	20,792	284,477	298,470	74 , 87, 298	+/+
Nonadekanová k.	21,678	298,504	312,530	74 , 87, 312	-/+
Ikosanová k. (arachidová)	22,539	312,530	326,557	74 , 87, 326	+/+
Heneikosanová k.	23,364	326,600	340,584	74 , 87, 340	+/-
Dokosanová k. (behenová)	24,161	340,584	354,600	74 , 87, 354	+/+
Trikosanová k.	24,928	354,610	368,637	74 , 87, 368	+/+

Lignocerová k. (tetrakosanová)	25,673	368,637	382,630	74, 87, 382	+/+
Pentakosanová k.	26,382	382,700	396,690	74, 87, 396	+/+
Hexakosanová k. (cerotová)	27,075	396,690	410,717	74, 87, 410	-/+
Nenasycené MK					
cis-oktadec-9-enová k., (olejová)	20,560	282,461	354,643	73, 117, 339	+/-
cis,cis-oktadeca-9,12- dienová k. (linolová)	20,506	280,446	352,627	73, 262, 337	+/+
cis,cis,cis-oktadeca-9,12,15- trienová k. (linolenová)	20,569	278,430	292,456	79, 95, 292	+/+
cis-dokos-13-enová k.	23,979	338,568	410,749	73, 129, 395	+/+
Hydroxykyseliny					
10-hydroxyhexadekanová k.	28,442	272,424	286,400	55, 169, 201	-/+
16-hydroxyhexadekanová	21,538	272,424	286,400	55, 74, 256	+/+
2-hydroxypentadekanová k.	19,075	258,400	272,420	69, 213, 272	+/-
2-hydroxyhexadekanová k.	20,052	272,424	286,450	43, 227, 286	+/+
2-hydroxyheptadekanová k.	21,000	286,450	300,477	57, 241 300	+/-
2-hydroxyoktadekanová k.	21,910	300,500	314,500	43, 255, 314	-/+
2-hydroxydokosanová k.	25,169	356,600	370,600	97, 311, 369	+/+
2-hydroxytetrakosanová k.	26,635	384,600	398,663	57, 339, 398	+/+
2-hydroxypentakosanová k.	27,324	398,700	412,000	57, 354, 412	+/-
Dikarboxylové MK					
hexadekandiová k.	21,909	286,410	314,460	98, 241, 283	+/-
Mastné alkoholy					
undekan-1-ol	18,419	173,308	-	55, 69, 154	-/+
hexadekan-1-ol	22,200	242,441	-	55, 69, 196	+/-
oktadekan-1-ol	23,862	270,494	-	43, 83, 252	+/-

MK – mastná kyselina, +/- přítomnost/absence dané látky u genotypu Cameor nebo JI64

5.4.2 Analýza polárních látek v mikrovzorcích osemení

Práce byla zaměřena především na nepolární látky, zejména pak mastné kyseliny, které se na základě předchozích analýz (ASAP-MS, LDI-MS, MALDI) ukázaly jako významné ukazatele pro rozlišení dormantního a nedormantního genotypu hrachu setého. Neméně důležitou skupinou látek byly nicméně i ty polární, zejména pak sacharidy. Jednak proto, že sacharidy jsou jednou z hlavních chemických složek hrachu a tvoří až 60 % sušiny jeho semen [202] a dále také proto, abychom dostali komplexnější přehled o chemickém složení osemení dvou různých genotypů hrachu.

Úprava vzorků spočívala nejprve v extrakci polárních látek do methanolu a poté v převedení sacharidů na příslušné oximy reakcí s hydrochloridem methoxyaminu v pyridinu. Vzhledem k povaze látek (vysoce polární, obsahující mnoho hydroxylových skupin, respektive mnoho aktivních atomů vodíku) musely být vzorky před GC-MS analýzou derivatizovány, a to pomocí silanizace. Tvorba takovýchto trimethylsilyl-oxim derivátů je hojně používána pro stanovení cukrů v komplexních směsích, neboť tyto deriváty vykazují dobré chromatografické vlastnosti a poskytují jednoduché chromatogramy [121,203].

Výsledkem byla identifikace zhruba padesáti sloučenin, převážně cukrů, cukerných alkoholů, a cukerných kyselin (karboxylové kyseliny odvozené od monosacharidů) u obou genotypů – viz tabulka IX. Jednalo se zejména o monosacharidy s šesti uhlíkovými atomy a disacharidy složené rovněž z šestiuhlíkatých monosacharidů. Výjimkou byla pouze D-arabiosa, jakožto jediný zástupce pentos. Mezi genotypy navíc nebyly zaznamenány žádné změny, co se zastoupení jednotlivých cukerných sloučenin týče. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou [200], kdy v osemeni dormantních i nedormantních semen hrachu převažovaly mono a oligosacharidy složené právě z hexosových jednotek. Kromě sacharidů byla identifikována i řada dalších polárních sloučenin. Konkrétně aminokyseliny, organické kyseliny a fenolické sloučeniny. Zajímavostí bylo, že více fenolických sloučenin (arbutin, epigallokatechin, kyselina gallová a kyselina 3-hydroxybenzoová) se vyskytovalo u genotypu JI64, což má spojitost s dormancí těchto semen [200,204]. Fenolické látky v semenech totiž způsobují inhibici jejich klíčení a vyskytují se tedy ve větším množství právě u dormantního typu semen [205–207].

Tabulka IX Identifikované sloučeniny v polární frakci hrachu setého genotypu Cameor a JI64 po extrakci a derivatizaci (tvorba oxim derivátů následovaná silylací MSTFA). Číslo před TMS uvádí počet TMS skupin v molekule a ME značí počet methylů. Ionty k detekci vyznačené tučně jsou nejintenzivnějšími v hmotnostním spektru

	Látka	Ret. čas (min)	Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹)	Molekulová hmotnost po silanizaci (g·mol ⁻¹)	Ionty k detekci (m/z)
AMINOKYSELINY	β-Alanin	13,375	89,093	3TMS, 305,637	73, 174 , 248
	Asparagová	14,585	133,103	3TMS, 349,646	100, 147, 232
	Gama-aminomáselná	14,663	103,120	3TMS, 319,663	73, 174 , 304
	Glycin	11,788	75,067	3TMS, 291,610	73, 174 , 248
	L-Isoleucin	11,615	131,173	2TMS, 275,535	73, 158 , 218
	Serin	12,550	105,093	3TMS, 321,636	73, 204 , 218
	L-Threonin	12,914	119,119	3TMS, 335,663	73 , 218, 291

	Citronová	18,037	192,124	4TMS, 480,848	73, 273, 465
	3,4-dihydroxybenzoová	17,936	154,120	3TMS, 370,664	73, 193, 370
	Fumarová	12,262	116,072	2TMS, 260,434	73, 147, 245
	Gallová	19,386	170,121	4TMS, 458,844	73, 281, 458
	3-hydroxybenzoová	15,766	138,121	2TMS, 282,483	193, 223, 267
	Jablčná	14,192	134,087	3TMS, 350,631	73, 147, 233
	Jantarová	11,826	118,088	2TMS, 262,450	73, 147, 247
	Šikimová	17,884	174,151	4TMS, 462,846	73, 204, 462
	Šřavelová	9,315	90,035	2TMS, 234,397	73, 147, 190
	Vinná	16,075	150,087	4TMS, 438,811	73, 147, 292
	D-allosa	19,145	180,156	5TMS, 1ME, 570,103	73, 205, 319
	D-arabinsa, methyloxim	16,396	150,130	4TMS, 1ME 467,896	73, 103, 307
	D-fruktosa	18,696	180,156	5TMS, 1ME, 570,103	73, 217, 307
	D-galaktopyranosid (methyl)	18,125	194,180	4TMS, 1ME, 482,980	73, 204, 217
	D-galaktosa	18,897	180,156	5TMS, 1ME, 570,103	73, 205, 319
	β-Gentiobiosa	27,180	342,297	8TMS, 1ME, 948,787	73, 204, 361
	D-glukosa	18,839	180,155	5TMS, 1ME, 570,103	73, 147, 319
	α-L-rhamnopyranosyl-D- glukosy	28,565	326,297	6TMS, 848,752	73, 204, 217
	D-psíkosa	18,800	180,156	5TMS, 1ME, 570,103	73, 103, 307
	Sacharosa	25,499	342,296	8TMS, 919,745	73, 361, 437
	D-talosa	18,958	180,156	5TMS, 1ME, 570,103	73, 205, 319
	L-arabinitol	17,050	152,146	5TMS, 513,051	73, 217, 307
	Erythritol	14,518	122,120	4TMS, 410,844	73, 147, 217
	Glucitol	19,291	182,172	6TMS, 615,259	73, 147, 319
	Mannitol	26,688	182,079	6TMS, 615,259	73, 147, 319
	Myo-inositol	20,819	180,160	6TMS, 613,243	73, 147, 305
	L-Threitol	14,421	122,120	4TMS, 410,844	73, 147, 217
	Xylitol	16,788	152,146	5TMS, 513,051	73, 217, 307
	2-deoxy-arabino- glukonová	21,020	194,095	5TMS, 555,045	73, 147, 245
	Erythronová	15,160	136,102	4TMS, 424,828	73, 147, 292
	D-galaktarová	20,410	210,139	6TMS, 643,226	73, 292, 333
	D-galaktonová	19,952	196,155	6TMS, 629,242	73, 147, 292
	D-galakturonová	23,285	194,139	5TMS, 555,045	73, 204, 292
	D-glukarová	20,130	210,139	6TMS, 643,231	73, 147, 292
	D-glukonová	19,999	196,155	6TMS, 629,242	73, 147, 292
	2-keto-L-glukonová	17,710	213,171	5TMS, 555,045	73, 147, 292
	β-glukosid gentiosové k.	28,277	154,122	6TMS, 748,143	73, 361
	Ribonová	17,550	166,129	5TMS, 527,035	73, 147, 292
	Arbutin	24,903	272,251	5TMS, 633,223	73, 254, 450
	Asterbatanosid A	26,326	430,400	6TMS, 862,127	73, 259, 348
	Epigallocatechin	27,419	306,272	6TMS, 739,354	73, 355, 456
	Fenyl-β-D-glukuronid	29,494	270,243	4TMS, 558,382	73, 147, 375
FENOL. LÁTKY					
ALDONOVÉ KYSELINY (CUKERNÉ KYSELINY)					
ALDITOLY (CUKERNÉ ALKOHOLY)					
SACHARIDY					
ORGANICKÉ KYSELINY					

5.4.3 Společná analýza polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení

Předchozí odstavce se věnovaly optimalizaci extrakčního postupu pro nepolární látky a zvláště extrakci polárních látek. V případě těch nepolárních se jako vhodnější jevílo zmýdelnění s extrakcí do *n*-hexanu následované silanizací, neboť se tak podařilo detegovat více sloučenin oproti methanolýze/methylaci, včetně dlouhých nasycených mastných kyselin typických pro genotyp JI64. U polárních látek optimalizace extrakce prováděna nebyla, neboť se zvolený postup jeví jako velmi vhodný s ohledem na množství detegovaných sloučenin a dobré chromatografické vlastnosti. Tyto postupy (pro nepolární a polární látky) byly nicméně prováděny vždy s novým kouskem obalu semen hrachu obou genotypů. Bylo tedy výzvou pokusit se spojit tyto dva postupy a aplikovat je na jeden mikrovzorek obalu semen hrachu.

Oproti samotnému zmýdelnění došlo při tomto společném stanovení k drobným změnám, co se zastoupení látek týče. V nepolární frakci, získané z hila genotypu JI64, byly detegovány nasycené mastné kyseliny v rozmezí C14 – C26 a dvě nenasycené mastné kyseliny (olejová a linolenová). Největší rozdíl byl zaznamenán v případě mastných alkoholů, kdy byly detegovány pouze dva, a to dodekanol a oktadekanol. Látky steroidní povahy byly detegovány také jenom dvě – β -sitosterol a kampesterol. Podobné změny byly pozorovány i u genotypu Cameor. Detegovány byly nasycené mastné kyseliny C15 – C24, pouze jedna hydroxykyselina (3-hydroxymyristová), z dikarboxylových kyselin šlo o jantarovou, jablečnou a azelaovou kyselinu. Z mastných alkoholů se podařilo detegovat hexadekanol, heptadekanol, oktadekanol, eikosanol a dokosanol. Nebyly detegovány žádné nenasycené mastné kyseliny ani steroidní látky. Polární frakce obsahovala až na pět výjimek (glycin, maltosa, arabinitol, glycerol a beta-glukosid gentisové kyseliny) stejné látky, které byly u obou genotypů identifikovány již dříve (viz tabulka IX).

Z těchto výsledků vyplývá, že společná analýza polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení je velmi účinná a podařilo se pomocí ní identifikovat téměř srovnatelné množství látek jako když byly metody použity zvláště na větších kusech obalu semen hrachu. Absence některých látek v nepolární frakci, např. kyseliny oktakosanové, mastných alkoholů a sterolů mohla být způsobena menším množstvím vzorku, neboť i v případě většího množství se detekce výše zmíněných látek pohybovala takřka na hranici limitu detekce dané metody. U polárních látek byly pozorovány jen zanedbatelné změny v jejich zastoupení, což mohlo být způsobeno jednoduše tím, že cukry jsou narozdíl od lipidů

majoritními látkami, ze kterých je tvořen obal semene. Navíc je jejich uvolnění z matrice mnohem snazší, než je tomu například u mastných kyselin, které jsou vázány v triglyceridech [202,208,209].

6 Závěr

V předložené disertační práci byly studovány možnosti analýz látek převážně nepolární povahy pomocí GC-MS s využitím derivatizačních postupů. První část práce je věnována vývoji jednoduché GC-MS metody pro odlišení kravského mléka pocházejícího z venkovního nebo vnitřního chovu. K tomuto odlišení nelze využít pouze koncentraci samotného cholesterolu nebo jeho prekurzorů, neboť tyto hodnoty jsou ovlivněny expozicí slunečními paprsky a obsah cholesterolu může být navíc ovlivněn řadou dalších faktorů jako jsou stáří a fyzická kondice zvířete, krmivo nebo stupeň laktace. Použitím relativních poměrů mezi analyty (7-DHC/CHOL) namísto pouhého použití koncentrace každého z nich jako samostatného markeru byla podstatně zesílena rozlišovací schopnost metody. To dokazují i výsledky měření deseti různých vzorků mléka, kdy čtyři z nich pocházely z venkovního chovu a zbylých šest z chovu vnitřního. Hodnota parametru (7-DHC/CHOL)*1000 se pohybovala v rozmezí 0,35 – 1,34 pro venkovně chované krávy a naopak vnitřní chov zaznamenal nárůst hodnot, které byly v rozmezí 2,14 – 2,85. Navržená GC-MS metoda kvantifikace 7-dehydrocholesterolu a normalizace na množství cholesterolu přítomného v mléce by tak mohla najít uplatnění při rozlišení mezi venkovním a vnitřním chovem krav, a navíc by se mohla stát účinným nástrojem pro ověřování životních podmínek hospodářských zvířat a ověřování potenciálních ekologických tvrzení výrobců mléčných produktů.

Dále byla GC-MS použita k analýzám produktů vzniklých elektrochemickou přeměnou chenodeoxycholové kyseliny (CDCA). Jelikož je CDCA elektrochemicky neaktivní, musel elektrochemické oxidaci předcházet krok navíc v podobě dehydratace kyselinou chloristou. Tento krok však nevedl k pouhému odštěpení molekuly vody, ale zejména k neočekávanému přesmyku C a D kruhu steroidního skeletu. Dehydratovaná CDCA byla elektrochemicky oxidována a vzhledem k tomu, že vznikalo velké množství oxidačních produktů, byl na základě LC-MS analýz vybrán a synteticky připraven ten nejvíce zastoupený. Tímto způsobem byl připraven i produkt dehydratace. GC-MS analýzy potvrdily přítomnost těchto produktů (dehydratačního a oxidačního) v extraktech CDCA po dehydrataci, respektive po oxidaci na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter synteticky připravených standardů se získanými extrakty, respektive elektrolyzáty CDCA.

GC-MS představuje zavedenou a v praxi běžně používanou techniku sloužící k identifikaci různých druhů pojiv v nástěnných malbách a je založena zejména na analýze methylesterů mastných kyselin, respektive jejich charakteristických poměrů. V rámci této studie byly analyzovány referenční vzorky nástěnných maleb obsahující lněný olej a vejce s šesti různými pigmenty. Analýzy byly prováděny na dvou GC-MS přístrojích s téměř identickým hardwarovým uspořádáním (rozdíl spočíval pouze v typu stacionární fáze) za účelem posouzení možné variability výše uvedených poměrů a parametrů. Dále byl zkoumán vliv umělého stárnutí na složení modelových vzorků. Zatímco se většina parametrů během stárnutí měnila dle očekávání, poměr P/S zůstal po celou dobu téměř konstantní. Stárnutí mělo větší vliv na nenasycené mastné kyseliny, kdy byl zaznamenán jejich výrazný pokles. Naopak dikarboxylové kyseliny (azelaová, sebaková a suberová) zaznamenaly prudký nárůst, neboť vznikají v důsledku oxidace nenasycených kyselin. Značný rozdíl v hodnotách P/S u zestárnutého vaječného pojiva mezi přístroji GC-MS 1 ($1,76 \pm 0,31$) a GC-MS 2 ($2,93 \pm 0,24$) vedl ke zkoumání dalších vhodných markerů, kterými se jeví produkty oxidace cholesterolu, zejména pak cholesta-3,5-dien-7-on. Identifikace takových markerů je však náročná z hlediska množství vzorku, poměru pojiva k pigmentu a zejména počátečního množství cholesterolu, ze kterého se tyto produkty následně vytvářejí. Proto byla použita PCA analýza, která kombinuje více parametrů, a která se ukázala jako velmi účinná při rozlišení mezi olejovým a vaječným pojivem, i přesto, že se hodnoty P/S značně odchylovaly od referenčních hodnot v literatuře a byly svým způsobem zavádějící. PCA analýza byla následně použita na reálné vzorky historických nástěnných maleb, kdy se podařilo u čtyř vzorků jednoznačně prokázat přítomnost lněného oleje jako pojiva. U ostatních vzorků se jednalo pravděpodobně o směs vaječného a olejového pojiva.

Poslední studovanou oblastí byl vývoj GC-MS metody pro současnou analýzu polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení hrachu setého, který spočíval především v optimalizaci postupu pro stanovení nepolárních látek. Nejvhodnějším postupem z hlediska množství detegovaných látek bylo zmýdelnění v alkoholickém roztoku hydroxidu draselného s následnou extrakcí látek do *n*-hexanu. Takto došlo k efektivnímu narušení povrchu vzorku a uvolnění hledaných analytů. Při společném stanovení byly vzorky nejprve extrahovány směsí methanol/voda – tím došlo k uvolnění polárních látek, které byly dále zpracovány a zbylý mikrovzorek osemení byl podroben zmýdelnění za účelem stanovení nepolárních látek.

7 Seznam použité literatury

- [1] M.S. Tswett, O novoy kategorii adsorbtsionnykh yavleniy i o primeneniyy ikh k biokhimiicheskomu analizu, Trudy Varshavskogo Obshchestva Estestvoispytatelei, Otdelenie Biologii 14 (1905) 20–39.
- [2] L.S. Ettre, M. S. Tswett, and the Invention of Chromatography: Part I: Life and Early Work (1872–1903), in: Chapters in the Evolution of Chromatography, 1st ed., Imperial College Press, London, UK, 2008: pp. 49–59.
- [3] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins., *Biochem J.* 35 (1941) 1358–68. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>.
- [4] C.F. Poole, Gas chromatography, 1st ed, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2012.
- [5] A.T. James, A.J.P. Martin, Gas-liquid Partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to. Dodecanoic Acid, 50 (1952).
- [6] C.F. Poole, I.D. Wilson, M. Cooke, Encyclopedia of Separation Science, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000.
- [7] H.M. McNair, J.M. Miller, Basic gas chromatography, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.
- [8] I.D. Wilson, C.F. Poole, eds., Handbook of methods and instrumentation in separation science, Elsevier/Academic Press, London; Burlington, MA, 2009.
- [9] C.F. Poole, A. Townshend, P. Worsfold, Encyclopedia of Analytical Science, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2005.
- [10] R.L. Grob, E.F. Barry, eds., Modern practice of gas chromatography, 4th ed, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2004.
- [11] J. Drozd, J. Drozd, J. Novák, Chemical derivatization in gas chromatography, Elsevier Scientific Pub. Co. Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North-Holland, Amsterdam New York, 1981.
- [12] L.-K. Ng, M. Hupé, Simple gas chromatographic method for the assay of salts of carboxylic acids as their trimethylsilyl derivatives, *Journal of Chromatography A* 637 (1993) 104–108. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83105-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83105-2).
- [13] S. C. Moldoveanu, V. David, Derivatization Methods in GC and GC/MS, in: P. Kusch (Ed.), Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application, IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81954>.
- [14] K. Blau, J.M. Halket, Handbook of Derivatives for Chromatography, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 1993.
- [15] D.R. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reaction, Wiley & Sons, New York, USA, 1979.
- [16] V.G. Zaikin, J.M. Halket, Derivatization in Mass Spectrometry—2. Acylation, *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 9 (2003) 421–434. <https://doi.org/10.1255/ejms.576>.
- [17] P. Hušek, Derivatization, in: Encyclopedia of Separation Science, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000: pp. 434–443.

- [18] J. Pawliszyn, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2012.
- [19] Q. Wang, L. Ma, C. Yin, L. Xu, Developments in injection port derivatization, *Journal of Chromatography A* 1296 (2013) 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.036>.
- [20] S.N. Atapattu, A. Temerdashev, Recent advances in gas chromatography injection port derivatization in analytical method development, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 168 (2023) 117334. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117334>.
- [21] X. Wang, S. Wang, Z. Cai, The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 52 (2013) 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.005>.
- [22] V.G. Zaikin, J.M. Halket, *A handbook of derivatives for mass spectrometry*, 1st ed., IM Publications, Chichester, UK, 2009.
- [23] J.M. Halket, V.G. Zaikin, Derivatization in Mass Spectrometry— 3. Alkylation (Arylation), *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 10 (2004) 1–19. <https://doi.org/10.1255/ejms.619>.
- [24] C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1991.
- [25] R.J. Ouellette, J.D. Rawn, Ethers and Epoxides, in: *Organic Chemistry*, 2nd Edition, Elsevier, 2018: pp. 507–536. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812838-1.50017-7>.
- [26] Sigma-Aldrich. Derivatization Reagents - For Selective Response and Detection in Complex Matrices, (2024). <https://www.greghoundchrom.com/DownloadsNew/6/Sigma%20Derivatization%20Reagents%20Brochure%20GH.pdf>.
- [27] M.L. Wolfrom, D.I. Weisblat, W.H. Zophy, S.W. Waisbrot, The Action of Diazomethane upon Acyclic Sugar Derivatives. I, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 201–203. <https://doi.org/10.1021/ja01846a045>.
- [28] V. Pitthard, P. Finch, T. Bayerová, Direct chemolysis-gas chromatography-mass spectrometry for analysis of paint materials, *J. Sep. Science* 27 (2004) 200–208. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301617>.
- [29] Nakakuni, Yamasaki, Yoshitake, Takehara, Yamamoto, Methyl Ether-Derivatized Sterols and Coprostanol Produced via Thermochemolysis Using Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH), *Molecules* 24 (2019) 4040. <https://doi.org/10.3390/molecules24224040>.
- [30] F. Orata, Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, in: M. Ali Mohd (Ed.), *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/33098>.
- [31] H. Kataoka, Gas Chromatography of Amines as Various Derivatives, in: *Journal of Chromatography Library*, Elsevier, 2005: pp. 364–404. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(05\)80016-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(05)80016-8).
- [32] J.M. Halket, V.G. Zaikin, Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation, *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 9 (2003) 1–21. <https://doi.org/10.1255/ejms.527>.
- [33] G. Van Look, G. Simchen, J. Heberle, Silylating agents: derivatization reagents, protecting-group reagents, organosilicon compounds, analytical applications, synthetic

- applications, 2nd ed., Fluka Chemie; Fluka Chemicals, Buchs, Gillingham, Dorset, 1995.
- [34] K. Zhu, B. Gu, M. Kerry, M. Mintert, J. Luong, M. Pursch, Elimination of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide interference by base treatment in derivatization gas chromatography mass spectrometry determination of parts per billion of alcohols in a food additive, *Journal of Chromatography A* 1490 (2017) 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.025>.
- [35] C. Schummer, O. Delhomme, B. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis, *Talanta* 77 (2009) 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>.
- [36] I. Molnár-Perl, Zs.F. Katona, GC-MS of amino acids as their trimethylsilyl/t-butyl dimethylsilyl Derivatives: In model solutions III, *Chromatographia* 51 (2000) S228–S236. <https://doi.org/10.1007/BF02492811>.
- [37] T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, E.S. Chernetsova, I.A. Revelsky, Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1474–1478. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301492>.
- [38] P.L. Yeagle, Cholesterol and the cell membrane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 822 (1985) 267–287. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90011-5).
- [39] M. Beato, Gene regulation by steroid hormones, *Cell* 56 (1989) 335–344. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90237-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90237-7).
- [40] A.F. Hofmann, L.R. Hagey, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2461–2483. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7568-6>.
- [41] A. Cabianca, L. Müller, K. Pawlowski, P. Dahlin, Changes in the Plant β -Sitosterol/Stigmasterol Ratio Caused by the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita*, *Plants* 10 (2021) 292. <https://doi.org/10.3390/plants10020292>.
- [42] R.B. Jäpelt, J. Jakobsen, Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis, *Front. Plant Sci.* 4 (2013). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00136>.
- [43] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, W.L. Roberts, B. Yue, J. Bergquist, A.W. Meikle, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories, *Clinical Biochemistry* 44 (2011) 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.008>.
- [44] A. Rahier, P. Benveniste, Mass Spectral Identification of Phytosterols, in: *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1989: pp. 223–250.
- [45] H.L.J. Makin, D.B. Gower, eds., *Steroid Analysis*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9775-1>.
- [46] H. Sirén, T. Tavaststjerna, M.-L. Riekkola, Capillary electrophoresis and liquid chromatography for determining steroids in concentrates of purified water from Päijänne Lake, *Journal of Chromatography A* 1649 (2021) 462233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462233>.

- [47] M.D. Krasowski, D. Drees, C.S. Morris, J. Maakestad, J.L. Blau, S. Ekins, Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction, *BMC Clin Pathol* 14 (2014) 33. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-14-33>.
- [48] B.A. Skålhegg, N. Norman, An enzymatic method for the determination of hormonal steroids in the urine, *Journal of Steroid Biochemistry* 5 (1974) 673–679. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(74\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(74)90011-9).
- [49] A. Brown, A. Dusso, E. Slatopolsky, Vitamin D, in: *Seldin and Giebisch's the Kidney : Physiology and Pathophysiology*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2008: pp. 1803–1849.
- [50] A.V. Prabhu, W. Luu, L.J. Sharpe, A.J. Brown, Cholesterol-mediated Degradation of 7-Dehydrocholesterol Reductase Switches the Balance from Cholesterol to Vitamin D Synthesis, *Journal of Biological Chemistry* 291 (2016) 8363–8373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699546>.
- [51] W.J. Griffiths, J. Abdel-Khalik, P.J. Crick, M. Ogundare, C.H. Shackleton, K. Tuschl, M.K. Kwok, B.W. Bigger, A.A. Morris, A. Honda, L. Xu, N.A. Porter, I. Björkhem, P.T. Clayton, Y. Wang, Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169 (2017) 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.018>.
- [52] D.W. Smith, L.M.D. Lemli, J.M. Opitz, A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies, *The Journal of Pediatrics* 64 (1964) 210–217. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(64\)80264-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(64)80264-X).
- [53] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones, *Endocrine Reviews* 25 (2004) 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>.
- [54] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature* 407 (2000) 233–241. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- [55] L.L. Abell, B.B. Levy, B.B. Brodie, F.E. Kendall, A SIMPLIFIED METHOD FOR THE ESTIMATION OF TOTAL CHOLESTEROL IN SERUM AND DEMONSTRATION OF ITS SPECIFICITY, *Journal of Biological Chemistry* 195 (1952) 357–366. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50907-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50907-3).
- [56] G.R. Warnick, Measurement of Cholesterol and other Lipoprotein Constituents in the Clinical Laboratory, *Cclm* 38 (2000) 287–300. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.041>.
- [57] T.T.N. Dinh, L.D. Thompson, M.L. Galyean, J.C. Brooks, K.Y. Patterson, L.M. Boylan, Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10 (2011) 269–289. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00158.x>.
- [58] L.-H. Li, E.P. Dutkiewicz, Y.-C. Huang, H.-B. Zhou, C.-C. Hsu, Analytical methods for cholesterol quantification, *Journal of Food and Drug Analysis* 27 (2019) 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.001>.
- [59] E.H. Goh, S.M. Colles, K.D. Otte, HPLC analysis of desmosterol, 7-dehydrocholesterol, and cholesterol, *Lipids* 24 (1989) 652–655. <https://doi.org/10.1007/BF02535083>.

- [60] W. Liu, L. Xu, C. Lamberson, D. Haas, Z. Korade, N.A. Porter, A highly sensitive method for analysis of 7-dehydrocholesterol for the study of Smith-Lemli-Opitz syndrome, *Journal of Lipid Research* 55 (2014) 329–337. <https://doi.org/10.1194/jlr.D043877>.
- [61] K.D.S. Bezerra, N.R.A. Filho, Development of Methods to Quantify Free and Conjugated Steroids in Fatty Matrices by HPLC–MS/MS, *ACS Omega* 5 (2020) 12270–12277. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00984>.
- [62] Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, *European Pharmacopoeia*, 5th Edition (2004) 1279–1280.
- [63] D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography, *Journal of Dairy Science* 81 (1998) 2833–2840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75842-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75842-4).
- [64] D. Naviglio, M. Gallo, L.L. Grottaglie, C. Scala, L. Ferrara, A. Santini, Determination of cholesterol in Italian chicken eggs, *Food Chemistry* 132 (2012) 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.002>.
- [65] T.T.N. Dinh, L.D. Thompson, M.L. Galyean, J.C.L. Brooks, M.L. Boylan, Determination of Total Cholesterol in Meat and Poultry by Gas Chromatography: Single-Laboratory Validation, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 95 (2012) 472–488. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-224>.
- [66] G. Stewart, C. Gosselin, S. Pandian, Selected ion monitoring of tert-butyldimethylsilyl cholesterol ethers for determination of total cholesterol content in foods, *Food Chemistry* 44 (1992) 377–380. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90271-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90271-3).
- [67] A. Adachi, T. Kobayashi, Identification of vitamin D₃ and 7-dehydrocholesterol in cow's milk by gas chromatography-mass spectrometry and their quantitation by high-performance liquid chromatography, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 25 (1979) 67–78. <https://doi.org/10.3177/jnsv.25.67>.
- [68] R.I. Kelley, Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts, *Clinica Chimica Acta* 236 (1995) 45–58. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06038-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06038-4).
- [69] L. Pizzoferrato, S. Nicoli, C. Lintas, GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products, *Chromatographia* 35 (1993) 269–274. <https://doi.org/10.1007/BF02277508>.
- [70] A.S. Kollmeier, M.K. Parr, Mass spectral fragmentation analyses of isotopically labelled hydroxy steroids using gas chromatography/electron ionization low-resolution mass spectrometry: A practical approach, *Rapid Comm Mass Spectrometry* 34 (2020) e8769. <https://doi.org/10.1002/rcm.8769>.
- [71] R. Ryhage, E. Stenhagen, Mass spectrometry in lipid research, *Journal of Lipid Research* 1 (1960) 361–90.
- [72] J. Diekman, C. Djerassi, Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl esters, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 1005–1012. <https://doi.org/10.1021/jo01279a033>.
- [73] C. Aubert, J.-F. Rontani, Use of Trifluoro-Acetate Derivatives for GC-MS and GC-MS/MS Quantification of Trace Amounts of Stera-3 β ,5 α ,6 β -Triols (Tracers of Δ 5-

- Sterol Autoxidation) in Environmental Samples, *Molecules* 28 (2023) 1547. <https://doi.org/10.3390/molecules28041547>.
- [74] S.L. Abidi, Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils, *Journal of Chromatography A* 935 (2001) 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3).
- [75] A.K. Batta, G. Salen, Bile acids, in: *Encyclopedia of Separation Science*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000: pp. 2124–2130.
- [76] P.B. Hylemon, J. Harder, Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems, *FEMS Microbiology Reviews* (1999) 475–488. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00382.x>.
- [77] N.I. Hanafi, A.S. Mohamed, S.H. Sheikh Abdul Kadir, M.H.D. Othman, Overview of Bile Acids Signaling and Perspective on the Signal of Ursodeoxycholic Acid, the Most Hydrophilic Bile Acid, in the Heart, *Biomolecules* 8 (2018) 159. <https://doi.org/10.3390/biom8040159>.
- [78] P.B. Hylemon, H. Zhou, W.M. Pandak, S. Ren, G. Gil, P. Dent, Bile acids as regulatory molecules, *Journal of Lipid Research* 50 (2009) 1509–1520. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900007-JLR200>.
- [79] A.F. Hofmann, The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease, *Arch Intern Med* 159 (1999) 2647. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.22.2647>.
- [80] Frédéric.M. Vaz, S. Ferdinandusse, Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine* 56 (2017) 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.003>.
- [81] W.J. Griffiths, J. Sjövall, Bile acids: analysis in biological fluids and tissues, *Journal of Lipid Research* 51 (2010) 23–41. <https://doi.org/10.1194/jlr.R001941>.
- [82] Y. Liu, Z. Rong, D. Xiang, C. Zhang, D. Liu, Detection technologies and metabolic profiling of bile acids: a comprehensive review, *Lipids Health Dis* 17 (2018) 121. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0774-9>.
- [83] M. Dutta, J. Cai, W. Gui, A.D. Patterson, A review of analytical platforms for accurate bile acid measurement, *Anal Bioanal Chem* 411 (2019) 4541–4549. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01890-3>.
- [84] J.M. Street, D.J. Trafford, H.L. Makin, The quantitative estimation of bile acids and their conjugates in human biological fluids., *Journal of Lipid Research* 24 (1983) 491–511. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37955-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37955-4).
- [85] G. Kakiyama, A. Muto, H. Takei, H. Nittono, T. Murai, T. Kurosawa, A.F. Hofmann, W.M. Pandak, J.S. Bajaj, A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS, *Journal of Lipid Research* 55 (2014) 978–990. <https://doi.org/10.1194/jlr.D047506>.
- [86] J. Klouda, J. Barek, P. Kočovský, T. Herl, F.-M. Matysik, K. Nesměrák, K. Schwarzová-Pecková, Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration, *Electrochemistry Communications* 86 (2018) 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.11.024>.
- [87] J. Klouda, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Barek, K. Schwarzová-Pecková, A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples,

- Bioelectrochemistry 134 (2020) 107539.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107539>.
- [88] (Trimethylsilyl)diazomethane solution, Sigma-Aldrich (2024).
<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/362832>.
- [89] G. Alvelius, O. Hjalmarson, W.J. Griffiths, I. Björkhem, J. Sjövall, Identification of unusual 7-oxygenated bile acid sulfates in a patient with Niemann-Pick disease, type C, *Journal of Lipid Research* 42 (2001) 1571–1577. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32210-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32210-0).
- [90] A.K. Batta, G. Salen, K.R. Rapole, M. Batta, P. Batta, D. Alberts, D. Earnest, Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool, *Journal of Lipid Research* 40 (1999) 1148–1154. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33519-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33519-7).
- [91] X. Zhao, Z. Liu, F. Sun, L. Yao, G. Yang, K. Wang, Bile Acid Detection Techniques and Bile Acid-Related Diseases, *Front. Physiol.* 13 (2022) 826740. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.826740>.
- [92] C. Tsaconas, P. Padiou, G. Maume, M. Chessebeuf, N. Hussein, N. Pitoizet, Gas chromatography-mass spectrometry of isobutyl ester trimethylsilyl ether derivatives of bile acids and application to the study of bile sterol and bile acid biosynthesis in rat liver epithelial cell lines, *Analytical Biochemistry* 157 (1986) 300–315. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90631-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90631-7).
- [93] B.C. Musial, C.N. Williams, Quantitative assay of conjugated and free bile acids as heptafluorobutyrate derivatives by gas-liquid chromatography., *Journal of Lipid Research* 20 (1979) 78–85. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40653-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40653-4).
- [94] R. Edenharter, J. Slemr, Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of bile acids as trifluoroacetyl-hexafluoroisopropyl and heptafluorobutyryl derivatives, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 222 (1981) 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)81027-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)81027-0).
- [95] J.P. Thenot, E.C. Horning, MO-TMS Derivatives of Human Urinary Steroids for GC and GC-MS Studies, *Analytical Letters* 5 (1972) 21–33. <https://doi.org/10.1080/00032717208066084>.
- [96] S. Petrovic, A. Arsic, Fatty Acids: Fatty Acids, in: *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 2016: pp. 623–631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00277-4>.
- [97] G.C. Burdge, P.C. Calder, Introduction to Fatty Acids and Lipids, in: P.C. Calder, D.L. Waitzberg, B. Koletzko (Eds.), *World Review of Nutrition and Dietetics*, S. Karger AG, 2015: pp. 1–16. <https://doi.org/10.1159/000365423>.
- [98] P.C. Calder, Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health, *J Parenter Enteral Nutr* 39 (2015). <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>.
- [99] C. De Carvalho, M. Caramujo, The Various Roles of Fatty Acids, *Molecules* 23 (2018) 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>.
- [100] N.C. Shantha, E. Napolitano, Review Gas chromatography of fatty acids, *Journal of Chromatography* (1992) 37–51. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85673-h](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85673-h).
- [101] H.-H. Chiu, C.-H. Kuo, Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples, *Journal of Food and Drug Analysis* 28 (2020) 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.003>.

- [102] K. Ichihara, Y. Fukubayashi, Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography, *Journal of Lipid Research* 51 (2010) 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>.
- [103] J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *Journal of Biological Chemistry* 226 (1957) 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- [104] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (1959) 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [105] M.P. Colombini, F. Modugno, *Organic mass spectrometry in art and archaeology*, 1st pub., Wiley, Chichester, UK, 2009.
- [106] Hermann. Schlenk, J.L. Gellerman, Esterification of Fatty Acids with Diazomethane on a Small Scale, *Anal. Chem.* 32 (1960) 1412–1414. <https://doi.org/10.1021/ac60167a011>.
- [107] S. Bauer, M. Neupert, G. Spiteller, Characterization of artefacts produced by treatment of organic acids with diazomethane, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 309 (1984) 243–259. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(84\)80032-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(84)80032-8).
- [108] A.I. Carrapiso, C. García, Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and *in situ* transesterification, *Lipids* 35 (2000) 1167–1177. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0633-8>.
- [109] S. Meier, S.A. Mjøs, H. Joensen, O. Grahl-Nielsen, Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues, *Journal of Chromatography A* 1104 (2006) 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.045>.
- [110] L.D. Metcalffe, C.N. Wang, Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters Using Organic Base-Catalyzed Transesterification, *Journal of Chromatographic Science* 19 (1981) 530–535. <https://doi.org/10.1093/chromsci/19.10.530>.
- [111] C. Williams, L.L. Mbuyane, F.F. Bauer, L. Mokwena, B. Divol, A. Buica, A Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Fatty Acids and Sterols in Yeast and Grape Juice, *Applied Sciences* 11 (2021) 5152. <https://doi.org/10.3390/app11115152>.
- [112] E.L. Nimz, S.L. Morgan, On-Line Derivatization for Complex Fatty Acid Mixtures by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of Chromatographic Science* 31 (1993) 145–149. <https://doi.org/10.1093/chromsci/31.4.145>.
- [113] P.M. Woollard, Selective silylation using tert-butyl dimethylsilyl reagents: Their use in the quantification of fatty acids, *Biol. Mass Spectrom.* 10 (1983) 143–154. <https://doi.org/10.1002/bms.1200100308>.
- [114] M. Černý, T. Trnka, M. Buděšínský, *Sacharidy*, 1. vyd., Česká společnost chemická, Praha, ČR, 2010.
- [115] A. Blanco, G. Blanco, Chapter 4 - Carbohydrates, in: *Medical Biochemistry*, Academic Press, 2017: pp. 73–97.

- [116] L. Cole, P.R. Kramer, *Macronutrients*, in: *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*, Elsevier, 2016: pp. 157–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00005-0>.
- [117] M. Sinnott, *Carbohydrate chemistry and biochemistry: structure and mechanism*, 2nd ed., RSC Publishing, Cambridge, UK, 2013.
- [118] C. Corradini, A. Cavazza, C. Bignardi, High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012 (2012) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/487564>.
- [119] A. Nouara, C. Panagiotopoulos, R. Sempéré, Simultaneous determination of neutral sugars, alditols and anhydrosugars using anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: Application for marine and atmospheric samples, *Marine Chemistry* 213 (2019) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2019.05.002>.
- [120] M. Becker, T. Zweckmair, A. Forneck, T. Rosenau, A. Potthast, F. Liebner, Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin, *Journal of Chromatography A* 1281 (2013) 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.053>.
- [121] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro, Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 1226–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>.
- [122] M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1568 (2018) 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>.
- [123] K. Li, S. Liu, Y. Tan, N. Chao, X. Tian, L. Qi, W.A. Powell, X. Jiang, Y. Gai, Optimized GC-MS Method To Simultaneously Quantify Acetylated Aldose, Ketose, and Alditol for Plant Tissues Based on Derivatization in a Methyl Sulfoxide/1-Methylimidazole System, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4011–4018. <https://doi.org/10.1021/jf3053862>.
- [124] Md.A. Islam, J. Lee, S.-H. Yoo, Effect of oximation reagents on gas chromatographic separation of eight different kinds of mono- and di-saccharides, *Food Chemistry* 386 (2022) 132797. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132797>.
- [125] Z. Lai, O. Fiehn, Mass spectral fragmentation of trimethylsilylated small molecules, *Mass Spectrometry Reviews* 37 (2018) 245–257. <https://doi.org/10.1002/mas.21518>.
- [126] P. Finch, Z. Merchant, The structures of D-arabinose and D-glucose oximes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1975) 1682. <https://doi.org/10.1039/p19750001682>.
- [127] L. Yi, S. Shi, Z. Yi, R. He, H. Lu, Y. Liang, MeOx-TMS derivatization for GC-MS metabolic profiling of urine and application in the discrimination between normal C57BL/6J and type 2 diabetic KK-Ay mice, *Anal. Methods* 6 (2014) 4380–4387. <https://doi.org/10.1039/C3AY41522H>.

- [128] Zákon o ekologickém zemědělství a o změně zákona č. 368/1992 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů, 2000. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/cze182674.pdf>.
- [129] M. Meloun, J. Militký, *Statistical Data Analysis: A practical guide*, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd., New Delhi, India, 2011.
- [130] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure and Applied Chemistry* 67 (1995) 1699–1723. <https://doi.org/10.1351/pac199567101699>.
- [131] d'Andrea C. Cennini, D.V. Thompson, *The Craftman's Handbook: The Italian "Il Libro Dell'Arte"*, Dover Publications, Inc., New York, NY, 1954.
- [132] C.M. Jarque, A.K. Bera, Efficient Tests for Normality, Homoscedasticity and Serial Independence of Regression Residuals, *Economics Letters* 6 (1980) 255–259. [https://doi.org/10.1016/0165-1765\(80\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0165-1765(80)90024-5).
- [133] C.M. Jarque, A.K. Bera, A Test for Normality of Observations and Regression Residuals, *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique* 55 (1987) 163. <https://doi.org/10.2307/1403192>.
- [134] A. Kolmogorov, Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione, *Giornale Dell'Istituto Italiano Degli Attuari* (1933) 83–91.
- [135] H. Smirnov, Sur les Ecart de la Courbe de Distribution Empirique, *Recueil Mathématique (Matematicheskii Sbornik)* (1939) 3–26.
- [136] J. Nádvorníková, J. Skopalová, P. Krejčí, P. Bednář, P. Barták, GC–MS determination of 7-dehydrocholesterol and cholesterol in milk to verify eco-friendly conditions in cow housing, *Journal of Food Composition and Analysis* 122 (2023) 105471. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105471>.
- [137] M.M. Cascant, C. Breil, S. Garrigues, M. De La Guardia, A.S. Fabiano-Tixier, F. Chemat, A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane, *Anal Bioanal Chem* 409 (2017) 3527–3539. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0323-9>.
- [138] R.W. Kiser, G.D. Johnson, M.D. Shetlar, Solubilities of Various Hydrocarbons in Methanol, *J. Chem. Eng. Data* 6 (1961) 338–341. <https://doi.org/10.1021/je00103a009>.
- [139] R.G. Jensen, The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000, *Journal of Dairy Science* 85 (2002) 295–350. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4).
- [140] J. Polak, B.C.-Y. Lu, Mutual Solubilities of Hydrocarbons and Water at 0 and 25 °C, *Can. J. Chem.* 51 (1973) 4018–4023. <https://doi.org/10.1139/v73-599>.
- [141] M.L. Hernandez-Viadel, R. Rodrigo, V. Felipe, Selective regional alterations in the content or distribution of neuronal and glial cytoskeletal proteins in brain of rats chronically exposed to 2,5-hexanedione, *Toxicol Ind Health* 18 (2002) 333–341. <https://doi.org/10.1191/0748233702th154oa>.
- [142] Y. Takeuchi, Y. Ono, N. Hisanaga, J. Kitoh, Y. Sugiura, A comparative study on the neurotoxicity of n-pentane, n-hexane, and n-heptane in the rat., *Occupational and Environmental Medicine* 37 (1980) 241–247. <https://doi.org/10.1136/oem.37.3.241>.
- [143] V. Carelli, F. Franceschini, S. Venturi, P. Barboni, G. Savini, G. Barbieri, E. Pirro, C. La Morgia, M.L. Valentino, F. Zanardi, F.S. Violante, S. Mattioli, *Grand Rounds:*

- Could Occupational Exposure to *n*-Hexane and Other Solvents Precipitate Visual Failure in Leber Hereditary Optic Neuropathy?, *Environ Health Perspect* 115 (2007) 113–115. <https://doi.org/10.1289/ehp.9245>.
- [144] M. Fenton, Chromatographic separation of cholesterol in foods, *Journal of Chromatography A* 624 (1992) 369–388. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85689-Q](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85689-Q).
- [145] R.L. Glass, Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters, *Lipids* 6 (1971) 919–925. <https://doi.org/10.1007/BF02531175>.
- [146] E. Karrar, I.A.M. Ahmed, M.F. Manzoor, W. Wei, F. Sarpong, X. Wang, Lipid-soluble vitamins from dairy products: Extraction, purification, and analytical techniques, *Food Chemistry* 373 (2022) 131436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131436>.
- [147] C.G. Walton, W.M.N. Ratnayake, R.G. Ackman, Total Sterols in Seafoods: Iatroscan TLC/FID Versus the Kovacs GLC/FID Method, *J Food Science* 54 (1989) 793–795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07884.x>.
- [148] M.A. Nurseitova, F.B. Amutova, A.A. Zhakupbekova, A.S. Omarova, A.B. Kondybayev, G.A. Bayandy, N.N. Akhmetsadykov, B. Faye, G.S. Konuspayeva, Comparative study of fatty acid and sterol profiles for the investigation of potential milk fat adulteration, *Journal of Dairy Science* 102 (2019) 7723–7733. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15620>.
- [149] I.G. Zenkevich, E.D. Makarov, Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation, *Journal of Chromatography A* 1150 (2007) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.083>.
- [150] P.H. Laakso, Collaborators:, A. Sheridan, A.M. Lampi, F. Lacoste, H.G. Janssen, J. Idar Hilde, P. Van Beek, S. Wretling, T. Kuechler, Determination of Plant Stanols and Plant Sterols in Phytosterol Enriched Foods with a Gas Chromatographic-Flame Ionization Detection Method: NMKL Collaborative Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 97 (2014) 1097–1108. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-011>.
- [151] E.B. Hoving, Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 671 (1995) 341–362. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00223-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00223-6).
- [152] I.J.A. Hamdan, L.M. Sanchez-Siles, E. Matencio, G. Garcia-Llatas, M.J. Lagarda, Cholesterol Content in Human Milk during Lactation: A Comparative Study of Enzymatic and Chromatographic Methods, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 6373–6381. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02205>.
- [153] L. Benešová, J. Klouda, E. Bláhová, K. Nesměrāk, P. Kočovský, J. Nádvořníková, P. Barták, J. Skopalová, K. Schwarzová-Pecková, Non-enzymatic electrochemical determination of cholesterol in dairy products on boron-doped diamond electrode, *Food Chemistry* 393 (2022) 133278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133278>.
- [154] J. Veselý, J. Skopalová, V. Bhosale, P. Kočovský, M. Májek, J. Klouda, K. Jelšíková, K. Nesměrāk, J. Nádvořníková, M. Zajacová Cechová, V. Chromý, R. Jerga, P. Barták, P. Bednář, M. Kuzma, J. Zápal, S. Petrželová, K. Schwarzová-Pecková, Acid-Induced Back-Bone Rearrangement and Electrochemical Oxidation of Chenodeoxycholic Acid Leads to the Formation of Spirocyclic Enone, *Journal of the American Chemical Society* Under review (2024).

- [155] J. Nádvořníková, P. Barták, J. Skopalová, GC-MS Analýza Oxidačních Produktů Chenodeoxycholové kyseliny, in: Slovenská chemická spoločnosť a Česká společnost chemická, Vysoké Tatry, Horní Smokovec, 2021: pp. 170–171.
- [156] T. Ferri, L. Campanella, G. De Angelis, Differential-pulse polarographic determination of cholic acids, *Analyst* 109 (1984) 923. <https://doi.org/10.1039/an9840900923>.
- [157] X. Liu, L. Wang, S. Zhang, X. Deng, X. Tang, X. Huang, Electrochemical Behavior of Deoxycholic Acid on Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode, *Electroanalysis* 18 (2006) 2385–2388. <https://doi.org/10.1002/elan.200603665>.
- [158] M.F. Chaplin, Analysis of bile acids and their conjugates using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 664 (1995) 431–434. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00488-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00488-Q).
- [159] S. Scalia, S. Tirendi, P. Pazzi, E. Bousquet, Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection, *International Journal of Pharmaceutics* 115 (1995) 249–253. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00307-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00307-Q).
- [160] K. Orito, M. Ohto, H. Sugimoto, A wagner–meerwein rearrangement of the cholestane skeleton induced by a long-range intramolecular hydrogen abstraction by alkoxy radicals; the first example of long-range intramolecular addition of an alkoxy radical to a carbon–carbon double bond, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1990) 1076–1078. <https://doi.org/10.1039/C39900001076>.
- [161] J. Nádvořníková, V. Pitthard, O. Kurka, L. Kučera, P. Barták, Egg vs. Oil in the Cookbook of Plasters: Differentiation of Lipid Binders in Wall Paintings Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Principal Component Analysis, *Molecules* 29 (2024) 1520. <https://doi.org/10.3390/molecules29071520>.
- [162] P. Mora, L. Mora, P. Philippot, *La conservazione delle pitture murali*, 2nd ed., Compositori, Bologna, 2001.
- [163] C. Cennini, L. Broecke, Cennino Cennini's 'Il libro dell'arte': a new English translation and commentary with Italian transcription, Archetype, London, 2015.
- [164] M. Schilling, H. Khanjian, Gas chromatographic determination of the fatty acid and glycerol content of lipids. I. The effects of pigments and aging on the composition of oil paints., in: ICOM Committee for Conservation Preprints, 11th Triennial Meeting, Edinburgh, Scotland, 1996: pp. 220–227.
- [165] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, England, n.d.
- [166] M.P. Colombini, F. Modugno, M. Giacomelli, S. Francesconi, Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 846 (1999) 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00344-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00344-1).
- [167] M.P. Colombini, F. Modugno, A. Giacomelli, Two procedures for suppressing interference from inorganic pigments in the analysis by gas chromatography–mass spectrometry of proteinaceous binders in paintings, *Journal of Chromatography A* 846 (1999) 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00192-2).

- [168] K.R. Sutherland, Solvent Extractable Components of Oil Paint Films, PhD Thesis, University of Amsterdam, Faculty of Science, Van 't Hoff Institute for Molecular Sciences, 2001. https://pure.uva.nl/ws/files/3748786/18808_UBA002000534_07.pdf.
- [169] M.T. Doménech-Carbó, Novel analytical methods for characterising binding media and protective coatings in artworks, *Analytica Chimica Acta* 621 (2008) 109–139. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.056>.
- [170] F.C. Izzo, 20th Century Artist's Oil Paints: A Chemical-Physical Survey, Dissertation thesis, Ca' Foscari University, 2011.
- [171] S. Sotiropoulou, G. Sciutto, A.L. Tenorio, J. Mazurek, I. Bonaduce, S. Prati, R. Mazzeo, M. Schilling, M.P. Colombini, Advanced analytical investigation on degradation markers in wall paintings, *Microchemical Journal* 139 (2018) 278–294. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.007>.
- [172] E. Tammekivi, S. Vahur, M. Vilbaste, I. Leito, Quantitative GC–MS Analysis of Artificially Aged Paints with Variable Pigment and Linseed Oil Ratios, *Molecules* 26 (2021) 2218. <https://doi.org/10.3390/molecules26082218>.
- [173] V. Pitthard, S. Stanek, M. Griesser, T. Muxeneder, Gas Chromatography – Mass Spectrometry of Binding Media from Early 20th Century Paint Samples from Arnold Schönberg's Palette, *Chroma* 62 (2005) 175–182. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0595-7>.
- [174] E. Manzano, L.R. Rodríguez-Simón, N. Navas, R. Checa-Moreno, M. Romero-Gámez, L.F. Capitan-Vallvey, Study of the GC–MS determination of the palmitic–stearic acid ratio for the characterisation of drying oil in painting: La Encarnación by Alonso Cano as a case study, *Talanta* 84 (2011) 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.012>.
- [175] R. White, J. Pilc, Analyses of Paint Media, *National Gallery Technical Bulletin* 17 (1996) 91–103.
- [176] J. Poulin, A New Methodology for the Characterisation of Natural Dyes on Museum Objects Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Studies in Conservation* 63 (2018) 36–61. <https://doi.org/10.1080/00393630.2016.1271097>.
- [177] M. Schilling, D. Carson, H. Khanjian, Gas chromatographic determination of the fatty acid and glycerol content of lipids. IV. Evaporation of fatty acids and the formation of ghost images by framed oil paintings., in: *ICOM Committee for Conservation Preprints, 12th Triennial Meeting, Lyon, France, 1999*: pp. 242–247.
- [178] S. Wei, A Study of Natural Organic Binding Media Used in Artworks and of Their Ageing Behaviour by GC/FID and GC/MS, PhD Thesis, Vienna University of Technology, 2007.
- [179] M. Schilling, H. Khanjian, D. Carson, Fatty acid and glycerol content of lipids; effects of ageing and solvent extraction on the composition of oil paints., *Journal of Technology for Architecture and Environment* 1997 (n.d.) 71–78.
- [180] MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, (2024). <https://www.mn-net.com/gc-column-nonpolar-low-polar-optima-5-ms-30-m-l-0.25-mm-id-0.25-m-df-726220.30>.
- [181] Agilent Technologies, (2024). <https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/low-bleed-gc-ms-columns/db-5ms-columns>.

- [182] M.P. Colombini, F. Modugno, R. Fuoco, A. Tognazzi, A GC-MS study on the deterioration of lipidic paint binders, *Microchemical Journal* 73 (2002) 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00062-0).
- [183] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli, GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts, *Microchemical Journal* 67 (2000) 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00075-8).
- [184] I. Degano, J. La Nasa, E. Ghelardi, F. Modugno, M.P. Colombini, Model study of modern oil-based paint media by triacylglycerol profiling in positive and negative ionization modes, *Talanta* 161 (2016) 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.017>.
- [185] I. Bonaduce, L. Carlyle, M.P. Colombini, C. Duce, C. Ferrari, E. Ribechini, P. Selleri, M.R. Tiné, New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study, *PLoS ONE* 7 (2012) e49333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049333>.
- [186] V. Pitthard, M. Griesser, S. Stanek, T. Bayerova, Study of Complex Organic Binding Media Systems on Artworks Applying GC-MS Analysis: Selected Examples from the Kunsthistorisches Museum, Vienna, *Macromolecular Symposia* 238 (2006) 37–45. <https://doi.org/10.1002/masy.200650606>.
- [187] J. Mills, R. White, Organic Mass-Spectrometry of Art Materials: Work in Progress, *National Gallery Technical Bulletin* 6 (1982) 3–18.
- [188] A. Andreotti, I. Bonaduce, M.P. Colombini, G. Gautier, F. Modugno, E. Ribechini, Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous, and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4490–4500. <https://doi.org/10.1021/ac0519615>.
- [189] M. Serefidou, S. Bracci, D. Tapete, A. Andreotti, L. Biondi, M.P. Colombini, C. Giannini, D. Parenti, Microchemical and microscopic characterization of the pictorial quality of egg-tempera polyptych, late 14th century, Florence, Italy, *Microchemical Journal* 127 (2016) 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.03.001>.
- [190] J.S. Mills, R. White, The Identification of Paint Media from the Analysis of Their Sterol Composition: A Critical View, *Studies in Conservation* 20 (1975) 176. <https://doi.org/10.2307/1505737>.
- [191] O.F. Van Den Brink, E.S.B. Ferreira, J. Van Der Horst, J.J. Boon, A direct temperature-resolved tandem mass spectrometry study of cholesterol oxidation products in light-aged egg tempera paints with examples from works of art, *International Journal of Mass Spectrometry* 284 (2009) 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2008.11.005>.
- [192] J.J. Boon, S. Peulvé, O.F. Van Den Brink, M. Duursma, D. Rainford, Molecular aspects of mobile and stationary phases in ageing tempera and oil paint films, *Early Italian Paintings: Techniques and Analysis, Symposium, Maastricht 1997* (n.d.) 35–56.
- [193] S.A. Buckley, A.W. Stott, R.P. Evershed, Studies of organic residues from ancient Egyptian mummies using high temperature-gas chromatography-mass spectrometry and sequential thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 124 (1999) 443–452. <https://doi.org/10.1039/a809022j>.

- [194] W. Herchi, S. Harrabi, K. Sebei, S. Rochut, S. Boukhchina, C. Pepe, H. Kallel, Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L., *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (2009) 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.001>.
- [195] M. Rubner-Institut, Fatty Acid Composition, Tocopherol and Sterol Contents in Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Varieties, Iran. *J. Chem. Chem. Eng.* 36 (2017).
- [196] G.A. Antova, V.T. Gerzilov, Z.Y. Petkova, V.N. Boncheva, I.N. Bozhichkova, D. St Penkov, P.B. Petrov, Comparative analysis of nutrient content and energy of eggs from different chicken genotypes, *J Sci Food Agric* 99 (2019) 5890–5898. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9863>.
- [197] E. Kouloumpi, G. Lawson, V. Pavlidis, The contribution of gas chromatography to the resynthesis of the post-Byzantine artist's technique, *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 803–812. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0802-x>.
- [198] J. Nádvorníková, P. Krejčí, P. Bednář, P. Barták, Pea seed coat metabolite profiling by GC/MS, in: *Book of Abstracts and Program, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Olomouc, ČR, 2022*: pp. 148–149.
- [199] J. Nádvorníková, P. Krejčí, Z. Žingor, Š. Dostál, D. Vysloužilová, P. Bednář, P. Barták, Pea Seed Metabolite Profiling Using Combined GC/MS and PyGC-MS Analysis, in: *Hungarian Society for Separation Sciences, Budapest, Hungary, 2022*: p. 135.
- [200] P. Krejčí, M.Z. Cechová, J. Nádvorníková, P. Barták, L. Kobrlová, J. Balarynová, P. Smýkal, P. Bednář, Combination of electronically driven micromanipulation with laser desorption ionization mass spectrometry – The unique tool for analysis of seed coat layers and revealing the mystery of seed dormancy, *Talanta* 242 (2022) 123303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123303>.
- [201] M. Cechová, M. Válková, I. Hradilová, A. Janská, A. Soukup, P. Smýkal, P. Bednář, Towards Better Understanding of Pea Seed Dormancy Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *IJMS* 18 (2017) 2196. <https://doi.org/10.3390/ijms18102196>.
- [202] D.-T. Wu, W.-X. Li, J.-J. Wan, Y.-C. Hu, R.-Y. Gan, L. Zou, A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications, *Foods* 12 (2023) 2527. <https://doi.org/10.3390/foods12132527>.
- [203] U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R.N. Trethewey, L. Willmitzer, Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry, *The Plant Journal* 23 (2000) 131–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x>.
- [204] I. Hradilová, O. Trněný, M. Válková, M. Cechová, A. Janská, L. Prokešová, K. Aamir, N. Krezdorn, B. Rotter, P. Winter, R.K. Varshney, A. Soukup, P. Bednář, P. Hanáček, P. Smýkal, A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.), *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>.
- [205] M.C. Inácio, R.M. Moraes, P.C. Mendonça, L.J.F. Morel, S.C. França, B.W. Bertoni, A.M.S. Pereira, Phenolic Compounds Influence Seed Dormancy of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), a Medicinal Plant of the Brazilian Savannah, *AJPS* 04 (2013) 129–133. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.41017>.

- [206] V. Sedláková, S.Ć. Zeljković, N. Štefelová, P. Smýkal, P. Hanáček, Phenylpropanoid Content of Chickpea Seed Coats in Relation to Seed Dormancy, *Plants* 12 (2023) 2687. <https://doi.org/10.3390/plants12142687>.
- [207] I. Hradilová, M. Duchoslav, J. Brus, V. Pechanec, M. Hýbl, P. Kopecký, L. Smržová, N. Štefelová, T. Vaclávek, M. Bariotakis, J. Machalová, K. Hron, S. Pirintsos, P. Smýkal, Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits, *PeerJ* 7 (2019) e6263. <https://doi.org/10.7717/peerj.6263>.
- [208] L. Zhong, Z. Fang, M.L. Wahlqvist, G. Wu, J.M. Hodgson, S.K. Johnson, Seed coats of pulses as a food ingredient: Characterization, processing, and applications, *Trends in Food Science & Technology* 80 (2018) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.021>.
- [209] M. Longstaff, J.M. McNab, Digestion of fibre polysaccharides of pea (*Pisum sativum*) hulls, carrot and cabbage by adult cockerels, *Br J Nutr* 62 (1989) 563–577. <https://doi.org/10.1079/BJN19890058>.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

7-DHC	7-dehydrocholesterol
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ASAP	sonda pro analýzu pevných vzorků za atmosférického tlaku
BF ₃	fluorid boritý
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CA	cholová kyselina
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
CH ₃ CN	acetonitril
COP	cholesterol oxidation products (ox. produkty cholesterolu)
DCA	deoxycholová kyselina
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPV	diferenční pulzní voltametrie
ECD	electron capture detector (detektor elektronového záchytu)
EPI	epicoprostanol
FAME	fatty acid methyl esters(s) (methylestery mastných kyselin)
FID	flame ionization detector (plamenový ionizační detektor)
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
HMDS	hexamethyldisilazan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHOL	cholesterol
CHOL-D7	cholesterol-25,26,26,26,27,27,27-D7
iPrOH	propan-2-ol
IS	internal standard (vnitřní standard)
LC	kapalinová chromatografie
LCA	litocholová kyselina
LD	limit detekce
LQ	limit kvantifikace
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MeOH	methanol
MRM	multiple reaction monitoring

MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCA	principal component analysis (analýza hlavních komponent)
PhTMAH	fenyltrimethylamonium hydroxid
SD	standard deviation (standardní odchylka)
SIM	selected ion monitoring (sledování vybraného iontu)
tBuMe	<i>tert</i> -butyl methyl ether
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TFA	trifluoroctová kyselina
TFAA	trifluoroacetic anhydride (anhydrid kyseliny trifluoroctové)
TFTMAH	<i>m</i> -(trifluormethyl)fenyltrimethylamonium hydroxid
THF	tetrahydrofuran
TIC	total ion chromatogram (celkový iontový proud)
TMAH	tetramethylamonium hydroxid
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilyl
TMSIM	trimethylsilylimidazol
TMSOH	trimethylsilanol
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UV	ultrafialové světlo

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Analytická derivatizace látek

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí disertační práce:

Mgr. Jana Nádvorníková

Analytická chemie

prof. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2024

Souhrn

Disertační práce je zaměřena na optimalizaci a vývoj plynově-chromatografických metod pro látky zejména lipidové povahy. Pozornost byla upřena na vhodné derivatizační reakce, bez kterých by byly analýzy takových sloučenin těžko proveditelné, ne-li nemožné. Přehled nejpoužívanějších a nejznámějších typů derivatizačních reakcí je uveden v teoretické části. Ta rovněž pojednává o látkách, které byly v práci analyzovány, včetně nejběžnějších analytických metod určených pro jejich stanovení. Jednalo se o steroidní látky jako je cholesterol, jeho prekurzory a produkty jeho přeměn, žlučové kyseliny, dále pak mastné kyseliny a sacharidy.

Experimentální část je rozdělena na čtyři části a každá z nich se věnuje analýze jiného typu látek z různorodých matric. Za prvé se podařilo vyvinout jednoduchou GC-MS metodu pro rozlišení mezi vnitřně a venkovně ustájeným skotem, která je založena na obsahu 7-dehydrocholesterolu normalizovaného na obsah cholesterolu, a která byla úspěšně aplikována na deset vzorků kravského mléka se známým způsobem ustájení. Dále byla metoda GC-MS optimalizována pro analýzu produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny, kdy se ve spolupráci s jinými analytickými technikami podařilo identifikovat majoritní dehydratační a oxidační produkt. Třetí oblastí, kde byla metoda GC-MS spolu s vhodným derivatizačním postupem použita, byly analýzy vzorků kulturního dědictví. Nejprve byl postup optimalizován na referenčních vzorcích nástěnných maleb a následně aplikován na historické vzorky pocházející z období středověku. Kombinace GC-MS spolu s PCA analýzou zahrnující mnoho důležitých parametrů, jako jsou vybrané poměry mastných kyselin, jejich suma a přítomnost produktů oxidace cholesterolu, se ukázala jako vhodné řešení pro určení konkrétního lipidového pojiva použitého v nástěnné malbě. Poslední část práce je věnována vývoji GC-MS metody pro společnou analýzu polárních i nepolárních látek z jednoho kusu mikrovzorku osemení hrachu setého dvou různých genotypů lišících se dormancí. Optimalizován byl zejména postup pro stanovení nepolárních látek, kde se jako ideální jevílo zmýdelnění následované extrakcí látek a jejich derivatizací silylačním činidlem. Při společném stanovení pak bylo identifikováno více než padesát sloučenin v polární frakci a podobné množství látek, zejména mastných kyselin a jejich derivátů, v nepolární frakci.

Summary

The dissertation thesis “Derivatization in chemical analysis” focuses on the optimization and development of gas chromatographic methods for substances, particularly of a lipid nature. Attention is directed towards suitable derivatization reactions, without which analyses of such compounds would be hardly feasible if not impossible. An overview of the most commonly used and well-known types of derivatization reactions is provided in the theoretical part. This section also discusses the substances analyzed in the thesis, including the most common analytical methods used for their determination. These include steroid compounds such as cholesterol and its precursors, bile acids, fatty acids, and carbohydrates.

The experimental part is divided into four sections, each dedicated to the determination of different types of substances from diverse matrices. Firstly, a simple GC-MS method was developed to differentiate between internally and externally housed cattle, based on the content of the cholesterol precursor - 7-dehydrocholesterol normalized to the cholesterol content. This method was successfully applied to ten samples of cow's milk with a known type of housing. Furthermore, the GC-MS method was optimized for the determination of products of chemical dehydration and electrochemical oxidation of chenodeoxycholic acid. Through collaboration with other analytical techniques, the major dehydration and oxidation products were identified. The third area where the GC-MS method, along with a suitable derivatization procedure, was used, involved analyses of cultural heritage samples. Initially, the procedure was optimized on reference samples of wall paintings and then applied to historical samples from the medieval period. The combination of GC-MS with PCA analysis, including many important parameters such as selected fatty acid ratios, a sum of selected fatty acids, and the presence of cholesterol oxidation products, proved to be a suitable solution for determining the specific lipid binder used in wall paintings. The last part of the thesis is devoted to the development of a GC-MS method for the simultaneous determination of polar and non-polar substances from a single microsample of seeds of two different genotypes of field peas differing in their dormancy. The procedure was optimized, especially for the determination of non-polar substances, where saponification followed by extraction of the substances and their silylation proved to be ideal. In simultaneous determination, over fifty compounds were identified in the polar fraction and a similar number of substances, particularly fatty acids, in the non-polar fraction.

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Teoretická část	2
2.1 Derivatizace v plynové chromatografii.....	2
2.2 Látky steroidní povahy	3
2.3 Mastné kyseliny	4
2.4 Sacharidy	5
3 Cíle disertační práce.....	6
4 Experimentální část.....	7
4.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce	7
4.1.2 Příprava vzorků.....	7
4.1.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření	7
4.1.4 Statistická analýza dat.....	7
4.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS	8
4.2.1 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny a analýza standardů žlučových kyselin	8
4.2.2 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny	8
4.2.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření	8
4.3 Analýza organických poživ na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS	9
4.3.1 Modelové a historické vzorky nástěnných maleb	9
4.3.2 Umělé stárnutí	10
4.3.3 Zpracování vzorků před GC-MS analýzou	10
4.3.4 Přístrojové vybavení a podmínky měření	10
4.3.5 Statistická analýza dat.....	10
4.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS	11

4.4.1 Použité vzorky	11
4.4.2 Příprava vzorků	11
4.4.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření	12
5 Výsledky a diskuze	13
5.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce [73].....	13
5.1.1 Optimalizace metody	13
5.1.2 Analýza cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu ve vzorcích mléka	14
5.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS [81,82].....	16
5.2.1 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny	16
5.2.2 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny	16
5.3 Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS [84]	18
5.3.1 Změny diagnostických poměrů mastných kyselin a dalších parametrů	18
5.3.2 Poměry mastných kyselin a další diagnostické parametry	19
5.3.3 PCA analýza	20
5.3.4 Aplikace PCA na reálné historické vzorky	21
5.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS [92,93].....	22
5.4.1 Optimalizace extrakčního postupu pro nepolární látky	22
5.4.2 Analýza polárních látek v mikrovzorcích osemení.....	23
5.4.3 Společná analýza polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení	23
6 Závěr	25
7 Seznam použité literatury	27
8 Životopis	34

1 Úvod

Plynová chromatografie (GC) má v separaci a analýze těkavých organických sloučenin dominantní postavení. Co však s molekulami, které se straní pozornosti, protože postrádají těkavost nebo tepelnou stabilitu potřebnou pro GC analýzu? Právě zde nastupuje analytická derivatizace a nabízí pomyslný klíč k odemknutí skrytého světa těchto analytů.

Derivatizaci si lze představit jako chemický tanec, při kterém jsou specifické funkční skupiny v molekulách pečlivě nahrazovány novými. Tyto nové skupiny, strategicky zvolené pro jejich zvýšenou těkavost nebo požadované chromatografické chování, umožňují dříve neviditelnému analytu vstoupit na scénu plynové chromatografie. Chemicky modifikovaná molekula, nazývaná derivát, tak disponuje vlastnostmi potřebnými pro separaci a detekci, odhalující její identitu a množství. Otázkou zůstává, co je hlavní motivací pro tuto chemickou manipulaci. Představme si svět polárních molekul, jako jsou aminy, alkoholy a karboxylové kyseliny. Tyto polární sloučeniny se svými intermolekulárními silami pevně drží na sobě a na stacionárních fázích, a odmítají se posouvat GC kolonou. Derivatizace, vyzbrojena činidly, jako jsou silylační a acylační činidla, nahrazuje tyto polární skupiny objemnějšími a méně interaktivními skupinami. Výsledkem je efektivní separace a analýza celé řady polárních sloučenin. Kromě změny těkavosti nabízí derivatizace další výhody. Může zlepšit chromatografické rozlišení manipulací s polaritou a velikostí molekuly, což vede k lepší separaci od ostatních složek ve vzorku. Dále může také zlepšit detekovatelnost zavedením funkčních skupin, které zvyšují odezvu příslušného detektoru. Výběr správného derivatizačního činidla a reakčních podmínek je zásadní pro zajištění úplné přeměny a minimálních vedlejších reakcí. Navíc derivatizace přidává další krok do analytického pracovního postupu, vyžadující optimalizaci a validaci pro zajištění optimálních dat.

Navzdory složitosti analytické derivatizace jsou výhody z ní plynoucí nepopíratelné. Rozšiřuje dosah plynové chromatografie, což umožňuje analyzovat širokou škálu sloučenin, od farmaceutik a znečišťujících látek v životním prostředí až po biomolekuly nebo vonné a chuťové látky v potravinách. Od odhalování tajemství forenzních důkazů po vývoj nových léků nadále hraje derivatizace klíčovou roli v posouvání hranic analytické vědy.

2 Teoretická část

2.1 Derivatizace v plynové chromatografii

Plynová chromatografie je i dnes technikou první volby pro separaci těkavých, termálně stabilních sloučenin s molekulovou hmotností nepřevyšující 1000 daltonů a teplotou varu do 400 °C [1–4]. Mezi její hlavní přednosti patří vysoká separační účinnost, citlivost, rychlost analýz, široká škála citlivých detektorů a v neposlední řadě také finanční dostupnost i pro malé laboratoře [1,2]. Výhodou je také možnost analyzovat vzorky v plynném, kapalném, a dokonce pevném skupenství [5]. To dělá z plynové chromatografie unikátní a všestrannou metodu, která nalézá uplatnění při řešení problémů v celé řadě různých odvětví. Nicméně množství látek, které mohou být analyzovány pomocí plynové chromatografie přímo, je limitováno. Makromolekulární, velmi polární látky, nebo organické soli nelze analyzovat bez předchozí úpravy, neboť nesplňují podmínky pro GC separaci [4,6,7]. Tyto látky lze ovšem v mnoha případech chemicky modifikovat neboli derivatizovat tak, aby došlo ke snížení jejich polarit, a naopak zvýšení těkavosti a termální stability. V neposlední řadě je důvodem k derivatizaci i zlepšení detekovatelnosti cílových analytů. V dnešní době je dostupná široká škála nejrůznějších derivatizačních činidel včetně jasně definovaných a dobře popsanych postupů pro jejich konkrétní použití, přičemž nejčastěji používané jsou tyto tři typy reakcí – alkylace, acylace a silylace. Výběr vhodného derivatizačního činidla závisí na několika faktorech. Za prvé je to povaha analytu a matrice vzorku, konkrétně jaké funkční skupiny se v molekulách vyskytují, jsou-li tyto skupiny nějak stericky bráněny, jaká je kyselost vodíkového atomu atd. Výhodné je také derivatizovat analyty, které byly předem separovány od zbytku matrice. Důležitá je i zvolená analytická metoda, která má být ke zkoumání použita, s čímž se pojí výběr kolony, volba detekčního systému atd. Derivatizační činidlo může být použito samostatně, anebo v kombinaci s rozpouštědlem, jehož funkcí je podpořit rozpuštění analytu a také podpořit průběh derivatizační reakce. Podmínkou je, aby rozpouštědlo nereagovalo s derivatizačním činidlem. To splňují zejména aprotická rozpouštědla jako je například pyridin nebo tetrahydrofuran [6,8–10]. Ideální derivatizační reakce by měla splňovat následující:

- derivatizační reakce musí být kompletní (95-100 % vzorku derivatizováno)
- změny ve struktuře analytu v důsledku derivatizace jsou pouze na kýžených místech (funkční skupiny)

- produkty derivatizační reakce jsou odlišitelné a dobře separovatelné od výchozí sloučeniny
- žádné interakce mezi činidlem a chromatografickým systémem, ani laboratorním vybavením
- vytvořený derivát je stabilní v čase

2.2 Látky steroidní povahy

7-dehydrocholesterol (7-DHC) je významným prekurzorem cholesterolu a vitamínu D₃. Jeho hromadění v séru nebo v tkáních vede ke vzniku závažných onemocnění jako je např. Smith-Lemli-Opitzův syndrom [11]. Cholesterol je součástí buněčných membrán a slouží jako prekurzor bioaktivních sloučenin, konkrétně žlučových kyselin [12], pohlavních hormonů a kortikoidů [13]. Hladina cholesterolu v plasmě je klíčovým diagnostickým kritériem v medicíně. Jak zvýšené, tak snížené hladiny cholesterolu ukazují na možné zdravotní komplikace (např. ateroskleróza) [14]. Kvantifikace cholesterolu a jeho prekurzorů je realizována pomocí GC-FID [15], častější je však spojení GC-MS [16–19]. Cholesterol a 7-DHC jsou obvykle před GC-MS analýzou derivatizovány zejména kvůli jejich vyšší polaritě způsobené přítomností hydroxylových skupin. Hydroxylová skupina je u těchto sterolů nejčastěji převáděna na TMS derivát pomocí činidel jako je BSA, BSTFA nebo MSTFA, ať už samotných nebo s přidavkem katalyzátoru (1% TMCS) [20,21]. Výhodou TMS derivátů oproti jiným (např. TBDMS) je zejména jednoduchost jejich přípravy, vysoká tepelná stabilita a nízká polarita [22]. Další výhodou je také množství diagnostických fragmentových iontů vznikajících po elektronové ionizaci v hmotnostním spektrometru [23,24].

Žlučové kyseliny jsou steroidní molekuly syntetizované v játrech z cholesterolu a skladované ve žlučníku [25]. Jejich funkcí je zejména vylučování cholesterolu z těla jeho přeměnou na žlučové kyseliny. Takto vzniklé žlučové kyseliny jsou označovány jako primární a jedná se o cholovou (CA) a chenodeoxycholovou (CDCA) kyselinu. Další funkcí je usnadnění vstřebávání lipidů z potravy včetně vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Žlučové kyseliny navíc působí jako důležité regulační molekuly [12,26]. Analýza žlučových kyselin je důležitým diagnostickým nástrojem pro onemocnění jater a střev [25,27,28]. Používány jsou zejména metody imunochemické (ELISA) a chromatografické (HPLC-MS, GC-MS) [29–33]. V poslední době jsou vyvíjeny i metody elektrochemické [34,35]. GC-MS se ukázala jako nejuniverzálnější a dostatečně citlivá pro kvantifikaci nano- až pikomolů žlučových kyselin v biologických vzorcích [29]. Žlučové kyseliny musí být před GC-MS

analýzou derivatizovány s ohledem na jejich malou těkavost způsobenou přítomností několika funkčních skupin v molekule (-COOH, -OH, -C=O aj.). Karboxylová skupina je nejčastěji převáděna na methyl ester pomocí čerstvě připraveného diazomethanu [20,36] nebo reakcí s methanolem katalyzovanou silnými anorganickými kyselinami [37,38]. Hydroxylové skupiny bývají zpravidla chráněny alkylsilylací, jejíž rychlost závisí na povaze hydroxyly a sterickém uspořádání. Pro většinu stericky nebráněných hydroxylových skupin plně postačuje samotné činidlo BSA nebo BSTFA, případně ve směsi s TMCS [20,25,39]. Pro současnou derivatizaci karboxylové i hydroxylové skupiny je možné použití anhydridů perfluorovaných nízkomolekulárních kyselin a jejich směsí s fluorovanými alkoholy [40,41]. Kromě hydroxylových skupin jsou často přítomny i oxoskupiny, které bývají přeměny na oxim (obvykle methyloxim) a až poté jsou derivatizovány hydroxylové skupiny TMS činidlem [42].

2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou alifatické karboxylové kyseliny, které bývají v závislosti na počtu uhlíkových atomů rozdělovány na krátké těkavé mastné kyseliny (C1 – C5), středně dlouhé mastné kyseliny (C6 – C14), dlouhé mastné kyseliny (>C15) a velmi dlouhé mastné kyseliny (> C40) [4,43,44]. Mastné kyseliny jsou zdrojem energie a hlavními složkami buněčných membrán, kde ovlivňují jejich strukturu a tekutost. Rovněž jsou prekurzory mnoha signálních molekul [45,46].

Nejfrekventovanější metodou analýzy mastných kyselin je plynová chromatografie [4,47], které předchází derivatizace mastných kyselin, nejčastěji methylací, vedoucí ke vzniku methylesterů mastných kyselin (zkratka FAME) [4,6,47–49]. FAME mohou být připraveny transesterifikací lipidů za přítomnosti katalyzátoru a alkoholu – methanolu, který nahradí alkoholovou složku původního esteru. Katalyzátory mohou být kyselé (HCl, H₂SO₄) nebo zásadité povahy (methanolický roztok KOH, methoxid sodný). Samotné methylaci musí nicméně předcházet extrakce mastných kyselin z matrice vzorku. K tomuto účelu jsou často používány metody extrakce z kapaliny do kapaliny využívající kombinace organických rozpouštědel [50,51]. Někdy může být po extrakci zařazen ještě další krok – saponifikace neboli zmýdelnění. To umožňuje štěpit esterové vazby a v případě potřeby oddělit zmýdelnitelný podíl (mastné kyseliny) od nezmýdelnitelné frakce (vyšší mastné alkoholy, steroly aj.) [49,52]. FAME mohou být připraveny také reakcí s diazomethanem [53], při které dochází pouze k selektivní methylaci volných mastných kyselin v přítomnosti jiných lipidů [4,48,54]. Dalším způsobem methylace je jednokroková derivatizace

prováděná methanolickým roztokem kyseliny chlorovodíkové [55–57]. Značné zjednodušení v přípravě vzorku přináší i kvartérní amoniové soli (např. TMAH, PhTMAH nebo TFTMA), které slouží jako rychlá (trans)esterifikační činidla bez nutnosti extrakce před analýzou. Specifická je u těchto činidel reakce za velmi vysokých teplot, kterých je dosahováno v nástřikovém prostoru GC [6,48,58,59].

2.4 Sacharidy

Sacharidy jsou polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony obsahující ve své molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy. V závislosti na počtu monosacharidových jednotek je můžeme dělit na monosacharidy (1), disacharidy (2), oligosacharidy (3-10) a polysacharidy (>10). Sacharidy jsou stavebním materiálem všech rostlinných buněk a tkání, důležitým zdrojem potravy a energie živočichů a zásobárna živin rostlin. Jsou klíčovými sloučeninami pro biosyntézu proteinů a lipidů a jsou funkčními složkami nukleových kyselin (RNA, DNA) [60–63].

GC i LC jsou rozšířenými metodami analýzy sacharidů, nicméně GC nabízí vysoké rozlišení a citlivost, reprodukovatelnost, nižší citlivost separační kolony vůči matricovým efektům a dostupnost široké škály detektorů včetně MS [64,65]. Před GC analýzou je však nezbytná derivatizace, neboť sacharidy obsahují vysoký počet funkčních skupin, mohou se vyskytovat v různých tautomerních formách, některé molekuly mohou být labilní a v některých případech jsou funkční skupiny stericky bráněny [6,66]. Jednokrokové derivatizační techniky (např. silylace, methylace, acetylace) jsou používány pro analýzu polyalkoholů a neredukujících sacharidů. Naopak redukující sacharidy vyžadují obvykle dvou nebo více krokovou derivatizaci s ohledem na reaktivitu volné karbonylové skupiny. Při dvoukrokové derivatizaci se karbonylová skupina nejprve převede na specifický derivát, který již dále nebude poskytovat různé tautomery. Toho je dosaženo buď redukcí, např. tetrahydridboritanem sodným, která poskytne příslušné cukerné alkoholy (alditoly) nebo oximací, nejčastěji pomocí *O*-methylhydroxylaminu ve formě hydrochloridu. Ve druhém kroku jsou nechráněné primární a sekundární hydroxylové skupiny derivatizovány, např. (trifluor)acetylací nebo trimethylsilylací. TMS oximy jsou těkavější, a proto je metoda použitelná pro různé druhy sacharidů, včetně aldonových kyselin (cukerných kyselin) a dovoluje tak současné stanovení neutrálních sacharidů, polyalkoholů, aldonových kyselin a dalších složek jako jsou karboxylové kyseliny, aminokyseliny aj. [65–69].

3 Cíle disertační práce

Předložená disertační práce si kladla za cíl především optimalizaci stávajících GC-MS metod a dále vývoj metod nových pro analýzu látek převážně lipidové povahy jako jsou mastné kyseliny, steroidy a žlučové kyseliny. Tyto analýzy probíhaly v různorodých maticích rostlinného i živočišného původu, a proto bylo nutné optimalizovat zejména extrakční postupy pro sledované analyty. Jelikož se jednalo ve většině případů o látky polární, málo těkavé, byla nezbytná derivatizace, které byla věnována obzvlášť pozornost, neboť bez ní by nebylo možno některé látky identifikovat, natož kvantifikovat. Konkrétní cíle práce lze shrnout do několika bodů:

- vývoj jednoduché GC-MS metody pro rozlišení kravského mléka pocházejícího z vnitřního a venkovního chovu
- vývoj a optimalizace GC-MS metody pro analýzu produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny
- vývoj metody pro rozlišení lipidových pojiv na bázi oleje a vajec v nástěnných malbách a aplikace této metody na reálné historické vzorky nástěnných maleb
- vývoj metody pro společnou analýzu polárních a nepochárních látek z jednoho mikrovzorku osetení hrachu setého

4 Experimentální část

4.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce

4.1.2 Příprava vzorků

Bylo naváženo 2,5 g mléka a přidáno 50 μl vnitřního standardu (IS) epicoprostanolu (EPI) o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bylo přidáno 0,5 ml nasyceného vodného roztoku NaCl, 4 ml methanolu, 0,35 ml 1M-HCl a 5 ml *n*-heptanu. Směs byla po dobu 30 min protřepávána a následně centrifugována 5 min při 4400 rpm. Horní heptanová vrstva byla odebrána do čisté zkumavky a bylo k ní přidáno 0,5 ml NaOH v methanolu (2,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Směs byla zahřívána ve vodní lázni po dobu 30 min při 45 °C. Každých 5 minut byla vortexována 20 s. Po ukončení methanolýzy a vychladnutí reakční směsi na laboratorní teplotu byly přidány 4 ml deionizované vody a 1 ml 1M-HCl pro částečnou neutralizaci roztoku. Výsledná směs byla jemně protřepána a centrifugována 6 min při 4400 rpm. Extrakce *n*-heptanem s následnou methanolýzou byla opakována celkem čtyřikrát. Horní organické fáze získané z jednotlivých kroků byly spojeny dohromady a odfoukány proudem dusíku při 75 °C. Výsledná žlutě zbarvená hustá kapalina obsahující methylestery mastných kyselin a steroidy byla převedena do autosamplerové vialky. Derivatizace byla prováděna 50 μl BSTFA v prostředí 50 μl pyridinu při 90 °C po dobu 30 min. Po vychladnutí byly derivatizované vzorky doplněny *n*-hexanem na objem 1 ml a analyzovány pomocí GC-MS. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech a každý byl nastříknut třikrát.

4.1.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Plynový chromatograf Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N (Agilent, Santa Clara, CA, USA) a kapilární kolonou – OPTIMA-5MS, 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (Macherey-Nagel, Německo). Teplotní program: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 300 °C (20 min); nástřik 2 μl (280 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s.

4.1.4 Statistická analýza dat

Pro zpracování dat byl použit statistický software QC.Expert 3.2 (TriloByte Ltd., Pardubice, ČR). Analýze byly podrobeny následující parametry: linearita, limity detekce (L_D) a kvantifikace (L_Q) a relativní směrodatná odchylka obsahu analytu. Linearita byla testována takzvaným F_L testem věrohodnostního poměru [70]. Hodnoty L_D a L_Q byly vypočítány v souladu s normou ISO 11843-2:2000 [71].

4.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS

4.2.1 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny a analýza standardů žlučových kyselin

Roztok CDCA ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v CH_3CN byl dehydratován 0,1M- HClO_4 při 50 °C po dobu 10 minut. Poté byly 2 ml vzorku částečně neutralizovány 0,9 ml 0,2M- NaOH . Obsah CH_3CN byl snížen odfoukáním proudem dusíku na objem cca 1 ml a vzorek byl extrahován 1 ml ethylacetátu (třepáno na třepačce 10 min/1300 rpm) a poté bylo odebráno 750 μl ethylacetátové fáze, která byla odpařena v proudu dusíku do sucha. Vzorek byl derivatizován 50 μl BSTFA v 50 μl pyridinu s přídavkem 1 μl TMCS při teplotě 90 °C po dobu 30 min a před GC-MS analýzou byl doplněn na objem 1 ml *n*-hexanem.

Dehydratační produkt CDCA (VB-A-325) a oxidační produkt (VB-A-498) byly synteticky připraveny na Katedře organické chemie (Univerzita Karlova, ČR). Tyto standardy spolu s ostatními standardy žlučových kyselin (CA, LCA, DCA a UDCA) byly rozpuštěny v acetonu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), bylo odebráno 30 μl , odfoukáno proudem dusíku do sucha a derivatizováno směsí BSTFA + pyridin + TMCS v poměru 50:50:1 při 90 °C po dobu 30 min. Pro elektrochemickou oxidaci byl roztok standardu VB-A-325 ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) připraven v 0,1M- NaClO_4 v CH_3CN .

4.2.2 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny

Elektrochemický článek byl složen z Pt síťkové elektrody, referentní Ag/Ag^+ elektrody ($\text{Ag}/0,01\text{M-}\text{AgNO}_3$, 1M- NaClO_4 v CH_3CN) a pomocné Pt síťkové elektrody, oddělené od měrného roztoku solným můstkem obsahujícím 0,5M- NaClO_4 . Roztok CDCA ($9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl dehydratován (viz výše) a následně oxidován při 1,2 V po dobu 30 minut. Objem 2 ml elektrolyzátu byl částečně zneutralizován 0,9 ml 0,2M- NaOH , odpařen v proudu dusíku na cca 1 ml a extrahován 1 ml ethylacetátu. Bylo odebráno 750 μl ethylacetátové fáze, která byla odpařena v proudu dusíku do sucha. Vzorek byl derivatizován dle postupu uvedeného výše.

4.2.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N (Agilent, USA) a kapilární kolonou OPTIMA-5MS, 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (Macherey-Nagel, Německo). Teplotní program: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 320 °C (20 min); nástřik 2 μl (300 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. MS/MS

experimenty byly prováděny na Agilent 7890B s hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem Agilent 7010 (Agilent, USA). Separace probíhala na dvou kapilárních kolonách HP-5MS UI spojených v sérii (15 m × 0,25 mm × 0,25 μm každá z nich) s konstantní průtokovou rychlostí 1,2 respektive 1,4 ml/min. Teplotní program: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 320 °C (20 min); nástřik 1 μl (300 °C), dávkovací puls 206,8 kPa, 18 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC a v režimu MRM, kdy byl sledován vznik iontu m/z 266 z m/z 518. Fragmentace m/z 266 byla provedena při kolizní energii 30 eV.

4.3 Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS

4.3.1 Modelové a historické vzorky nástěnných maleb

Pro přípravu modelových vzorků byly použity pigmenty – viz obr. 1. Olejové pojivo bylo připraveno ze směsi polymerizovaného lněného oleje a čištěného lněného oleje. Čerstvé slepičí vejce bylo zakoupeno v místním obchodě. Byly připraveny dvě identické cihličky z vápenné omítky na základě historických postupů [72]. Jednotlivé práškové pigmenty byly na podložních sklíčkách smíchány za pomoci špachtle s pojivy (vejce/olej) a naneseny na suchý povrch vápenné omítky (obr. 1). Pár dní po zaschnutí byly z jedné cihličky odebrány vzorky a označeny jako NA (not aged = nestárnuté). Druhý blok omítky byl podroben umělému stárnutí.



Obr. 1 Blok vápenné omítky se čtverečky (cca 1 cm²) pojiv (lněný olej a vejce) se šesti různými pigmenty

Historické vzorky nástěnných maleb byly: středověké nástěnné malby z Přemyslovského paláce u kostela sv. Václava v Olomouci (OL1037 – OL1189), vzorky z hradní kaple Navštívení Panny Marie v Bečově nad Teplou (DJ14 – DJ21) a pozdě

gotická desková malba ze sbírky Tyrolského zemského muzea v Rakousku (AT2600 a AT2601).

4.3.2 Umělé stárnutí

Umělé stárnutí bylo provedeno v komoře SOLARBOX 3000E RH (CO.FO.ME.GRA., Itálie), vybavené xenonovou lampou. Parametry stárnutí: záření Xe lampy $500 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, teplota $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a relativní vlhkost $\sim 75 \%$. Modelový blok omítky byl za těchto podmínek ponechán 504 hodin (odebrané vzorky označeny jako UV1). Blok byl poté vrácen do komory a stárnutí pokračovalo dalších 1008 hodin, přičemž vždy po 504 hodinách byly vzorky odebrány (UV2, respektive UV3).

4.3.3 Zpracování vzorků před GC-MS analýzou

Ke kouskům referenčních vzorků (cca $0,1 - 0,2 \text{ mg}$) bylo přidáno $20 \mu\text{l}$ derivatizační směsi (jeden díl $5\% \text{ w/v}$ methanolického roztoku MethPrep II a dva díly směsi rozpouštědel (methanol:toluen v poměru $1:2, \text{ v/v}$)). Směs byla 30 s vortexována, 10 min sonifikována v ultrazvukové lázni a zahřívána 1 hodinu na $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly vzorky centrifugovány 5 min při 4400 rpm, supernatanty byly přeneseny do insertů a analyzovány GC-MS. Historické vzorky nástěnných maleb byly připravovány stejným způsobem, pouze s tím rozdílem, že bylo použito menší množství vzorku (cca $< 0,1 \text{ mg}$).

4.3.4 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Chromatografické analýzy byly prováděny na dvou GC-MS přístrojích - GC-MS 1 v Olomouci a GC-MS 2 ve Vídni. Jednalo se o stejný typ – plynový chromatograf Agilent 6890 spojený s hmotnostním detektorem (MSD) Agilent 5973N (Agilent, USA) s kapilárními kolonami – OPTIMA-5MS, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Německo), která byla použita v Olomouci a J&W DB-5MS UI, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ (Agilent, USA) ve Vídni. Teplotní program: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) – $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ – $320 \text{ }^\circ\text{C}$ (12 min); nástřík $2 \mu\text{l}$ ($300 \text{ }^\circ\text{C}$), dávkovací puls $206,8 \text{ kPa}$, 18 s.

4.3.5 Statistická analýza dat

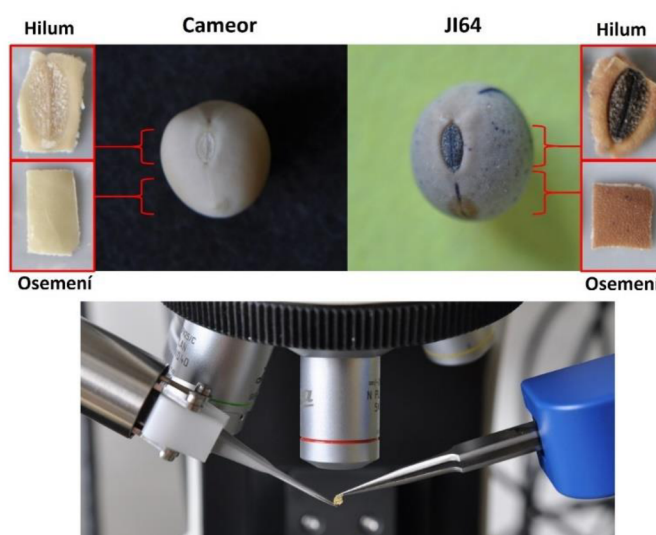
Byl použit statistický software QC.Expert 3.2 (TriloByte Ltd., ČR) pro ověření normality dat (vizuálně pomocí histogramu a Q-Q grafu a pomocí momentového a Kolmogorova-Smyrnova testu) a pro porovnání získaných výsledků vaječného a olejového pojiva, které bylo provedeno nepárovým dvouvýběrovým Studentovým t -testem. Tento t -test byl použit k porovnání výsledků z GC-MS 1 a GC-MS 2. Získaná data

z GC-MS byla dále podrobena analýze hlavních komponent (PCA) zahrnující jednorozměrné škálování (univariate scaling). Výsledná transformovaná datová matice byla poté přenesena do R Statistical Software (verze 4.1.2, R Core Team 2021, Rakousko).

4.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS

4.4.1 Použité vzorky

Vzorky semen hrachu setého (*Pisum sativum*) byly obdrženy z Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Jednalo se o dva různé genotypy – dormantní genotyp označovaný JI64 a nedormantní Cameor. Před analýzou byla semena mechanicky narušena tak, aby bylo možné oddělit od sebe jednotlivé části obalu semen – osemení a hilum. Tvar a okraje oddělených kusů byly upraveny za pomoci nástrojů mikromanipulátoru pod mikroskopickou kontrolou tak, aby měly čtvercový tvar a podobný povrch (obr. 2).



Obr. 2 Úprava vzorků hrachu setého genotypu Cameor a JI64. Malé kousky osemení a hila byly připraveny za pomoci mikronástrojů – mikronůžky a mikropinzeta

4.4.2 Příprava vzorků

Kousky osemení hrachu genotypů JI64 a Cameor byly hydrolyzovány 100 μ l 1M-KOH v 70 % ethanolu. Směs byla vortexována 30 s a následně zahřívána 60 minut ve vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla reakční směs okyselená 20 μ l 6M-HCl a bylo přidáno 100 μ l deionizované vody. Uvolněné mastné kyseliny byly extrahovány do 100 μ l *n*-hexanu. Po jeho přidání byla výsledná směs vortexována 30 s, sonifikována 15 minut v ultrazvukové lázni a následně centrifugována 5 minut při 4400 rpm. Supernatanty byly převedeny do insertových vialek a postup extrakce se 100 μ l *n*-hexanu

byl opakován. Příslušné extrakty byly spojeny a následně odpařeny proudem dusíku při 40 °C do sucha. Poté byly derivatizovány 30 µl činidla MSTFA po dobu 30 minut při 80 °C. Methanolýza/methylace vzorků osemení probíhala s 40 µl toluenu, 150 µl methanolu a 30 µl 1,2 % (w/v) HCl v methanolu. Směs byla 30 s vortexována a poté zahřívána 1 hodinu na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 50 µl deionizované vody a 100 µl *n*-hexanu, vortexováno 30 s, sonifikováno 15 min v ultrazvukové lázni a poté centrifugováno 5 minut při 4400 rpm. Supernatant byl odebrán do kónické insertové vialky a extrakce 100 µl *n*-hexanu byla opakována. Supernatanty byly poté spojeny, odpařeny v proudu dusíku do sucha a následně byl objem rekonstituován 30 µl *n*-hexanu.

Polární látky byly ze vzorků osemení extrahovány 100 µl methanolu, kdy byly nejprve 30 s vortexovány, 20 minut zahřívány ve vodní lázni při 70 °C a poté 30 minut sonifikovány v ultrazvukové lázni. Následně bylo přidáno 100 µl deionizované vody a směs byla 15 minut sonifikována v ultrazvukové lázni. Po skončení sonifikace byly vzorky centrifugovány 5 min při 4400 rpm. Do insertových vialek byla odebrána kapalná fáze a odpařena proudem dusíku při 40 °C do sucha. K odparkům bylo přidáno 30 µl hydrochloridu *O*-methylhydroxylaminu rozpuštěného v pyridinu (20 mg · ml⁻¹) a směs byla zahřívána 90 minut při 40 °C. Následovala derivatizace 50 µl MSTFA po dobu 30 minut při 50 °C.

4.4.3 Přístrojové vybavení a podmínky měření

Mikrovzorky osemení byly připraveny pomocí elektronicky řízeného mikromanipulátoru Quick Pro (MicroSupport, Shizuoka, Japonsko) pod mikroskopickou kontrolou (DM2700 M, Leica, Wetzlar, Německo). Pravé rameno mikromanipulátoru bylo vybaveno mikropinzetou pro uchycení vzorku a levé rameno elektronicky řízenými mikronůžkami, které byly ovládány softwarově (MicroSupport, Shizuoka, Japonsko). GC-MS analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním detektorem (MSD) 5973N a kapilární kolonou OPTIMA-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. Teplotní program: 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 320 °C (12 min); nástřik 2 µl (280 °C), dávkovací puls 275,8 kPa, 24 s.

5 Výsledky a diskuze

5.1 GC-MS metoda pro současnou analýzu cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléce [73]

5.1.1 Optimalizace metody

Prvním krokem optimalizace metody byl výběr vhodného extrakčního činidla a počet extrakčních kroků tak, aby bylo dosaženo co největších výtěžků cholesterolu (CHOL) a 7-dehydrocholesterolu (7-DHC). Optimálních výtěžků bylo dosaženo po čtyřikrát opakované extrakci, přičemž extrakční výtěžky pro CHOL byly v rozmezí 97–99 % a pro 7-DHC 92–99 % v závislosti na použitém rozpouštědle. Čtyři opakované extrakce byly nezbytné pro kvantitativní extrakci obou steroidů, neboť byla použita velká navážka mléka (2,5 g) z důvodu řádově nižšího obsahu 7-DHC oproti CHOL. Nejnižších výtěžků bylo dosaženo při extrakci chloroformem, naopak nejvyšší byly zaznamenány u *n*-hexanu a *n*-heptanu. Pro výběr ideálního extrakčního činidla byly však brány v potaz i další jeho vlastnosti jako je mísitelnost s methanolem, který se používá pro srážení mléčných proteinů nebo ovlivnění složkami matrice, v případě mléka vysokým obsahem vody, dále pak těkavost a toxicita rozpouštědla. S ohledem na tyto vlastnosti byl jako rozpouštědlo pro extrakci CHOL a 7-DHC ze vzorků mléka použit *n*-heptan.

Steroidy je nutné uvolnit z vázaných forem dané matrice [20], k čemuž slouží obecně dva mechanismy - alkalická hydrolýza [74,75] nebo extrakce lipidů následovaná hydrolýzou nebo jinou, podobnou reakcí, např. alkoholýzou [76,77]. Oba postupy byly vyzkoušeny, nicméně saponifikace vodným roztokem NaOH nepřinášela kýžené výsledky a z toho důvodu byla použita alkoholýza, při které byly nejprve steroidy extrahovány do *n*-heptanu a získané extrakty byly následně podrobeny alkoholýze methanolickým roztokem NaOH. Získané produkty CHOL a 7-DHC po extrakci a alkoholýze byly derivatizovány pomocí silylace. Posledním krokem optimalizace byl výběr vhodné metody kvantifikace obou steroidů, které se ve vzorku mléka nacházely v řádově odlišných koncentracích. Byla vyzkoušena metoda standardního přídatku, metody vnitřního standardu a metody absolutní kalibrace. V práci byla nakonec použita metoda vnitřního standardu z důvodu jednoduchosti a rychlosti přípravy vzorků. Ta byla během optimalizace realizována ve dvou modifikacích – metoda vnitřního standardu s relativním odezvoým faktorem (IS RRF) a s kalibrací (IS kalibrace). Zároveň byly zkoumány dva různé vnitřní standardy (IS) - epicoprostanol (EPI) a izotopově značený standard cholesterol-D7 (CHOL-D7).

RRF byly stanoveny z opakovaných nástřiků tří vzorků vážených standardů s definovaným přídatkem váženého IS a byly přibližně rovny jedné v případě CHOL (1,055 s EPI a 1,078 s CHOL-D7). Naopak u 7-DHC se hodnoty RRF významně lišily od jedné a činily 3,101 při použití EPI a 0,622 pro CHOL-D7. Koncentrace všech standardů byla $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V případě IS kalibrace byly výsledky získány z kalibrační závislosti vytvořené vynesemím poměru plochy píku analytu a IS proti koncentraci analytu. Rozmezí koncentrace bylo 200–600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro CHOL a 0,4–4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro 7-DHC.

Obě metody kvantifikace poskytovaly téměř shodné výsledky neohledě na použitý IS. Průměrný obsah CHOL a 7-DHC činil 9,8 mg/100 g, respektive 0,035 mg/100 g v komerčním vzorku mléka. Výsledky byly porovnány statisticky za pomoci nepárového Studentova *t*-testu. Jak obě metody kvantifikace, tak oba IS poskytovaly statisticky ekvivalentní výsledky na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, a dokonce i na $\alpha = 0,01$. U vzorků mléka byla nakonec použita metoda IS kalibrace, neboť dle [78] přináší výhody v podobě korekce ztrát analytu během přípravy vzorku a také vysoké přesnosti kvantifikace. Pro analýzu reálných vzorků byl jako vnitřní standard použit EPI z důvodu nižší ceny, lepší dostupnosti, absence v mléčných produktech nebo jiných potravinách [79] a podobnosti jeho struktury s cholesterolem [80].

5.1.2 Analýza cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu ve vzorcích mléka

Navržená metoda byla aplikována na deset různých vzorků mléka se známým ustájením – vnitřní nebo venkovní. Devět regionálních vzorků kravského mléka bylo pořízeno na moravských farmách a jeden vzorek s označením „Bio” byl zakoupen v místním obchodním řetězci. Samotný obsah 7-DHC se nejevil jako vhodný ukazatel pro rozlišení mezi vnitřním a venkovním ustájením z důvodu významných rozdílů v hustotě mléka. Proto byl obsah 7-DHC normalizován na obsah cholesterolu v příslušném vzorku. Výsledné poměry jsou uvedeny v tabulce I. Obsah cholesterolu se pohyboval přibližně v rozmezí od 12 mg/100 g (mléko z obchodního řetězce) do téměř 21 mg/100 g (Kokory A). 7-dehydrocholesterol byl v rozmezí cca od 0,006 mg/100 g (Červenka) do 0,053 mg/100 g (Kokory C).

Tabulka I Obsah cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu a jejich poměr v analyzovaných vzorcích mléka

Původ vzorku	Typ ustájení/mléka	Obsah analytu (mg/100 g)		
		CHOL ± SD	7-DHC ± SD	(7- DHC/CHOL)* 1000
Místní obchod	OUT/P	12,1 ± 0,3	0,012 ± 0,001	0,99
Červenka	OUT/UN	17,2 ± 0,4	0,006 ± 0,001	0,35
Vrbátky	OUT/UN	17,4 ± 0,3	0,008 ± 0,003	0,46
Rožnov p. Radhoštěm	OUT/UN	20,3 ± 1,4	0,027 ± 0,007	1,33
Poruba A	IN/P	15,3 ± 0,5	0,035 ± 0,006	2,29
Poruba B	IN/UN	16,8 ± 0,3	0,044 ± 0,010	2,62
Valašská Bystřice	IN/UN	18,0 ± 0,5	0,047 ± 0,009	2,61
Kokory A	IN/UN	20,6 ± 1,5	0,048 ± 0,006	2,33
Kokory B	IN/UN	20,1 ± 1,4	0,043 ± 0,003	2,14
Kokory C	IN/UN	18,6 ± 1,2	0,053 ± 0,005	2,85

7-DHC – 7-dehydrocholesterol, CHOL – cholesterol, IN – vnitřní ustájení, OUT – venkovní ustájení, P – pasterizováno, UN – nepasterizováno, SD – směrodatná odchylka

Získané hodnoty parametru (7-DHC/CHOL)*1000 pro vnitřní a venkovní chov byly porovnány statisticky. Grafická analýza ukázala přibližně normální rozdělení dat v obou souborech kolem jejich středních hodnot μ_1 a μ_2 , a proto byl použit nepárový Studentův t -test. Nulová hypotéza $H_0: \mu_1 = \mu_2$ byla testována proti alternativní hypotéze $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$. Kritické hodnoty pro t na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a $0,01$, s počtem stupňů volnosti $v = 8$ ($v = n_1 + n_2 - 2$) byly 2,306 a 3,356. Vypočtená hodnota (7,416) byla větší než kritické hodnoty a nulová hypotéza byla tím pádem zamítnuta. To znamená, že mezi hodnotami parametru (7-DHC/CHOL)*1000 pro krávy chované uvnitř a venku na pastvě je statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$.

5.2 Analýza produktů chemické dehydratace a elektrochemické oxidace chenodeoxycholové kyseliny pomocí GC-MS [81,82]

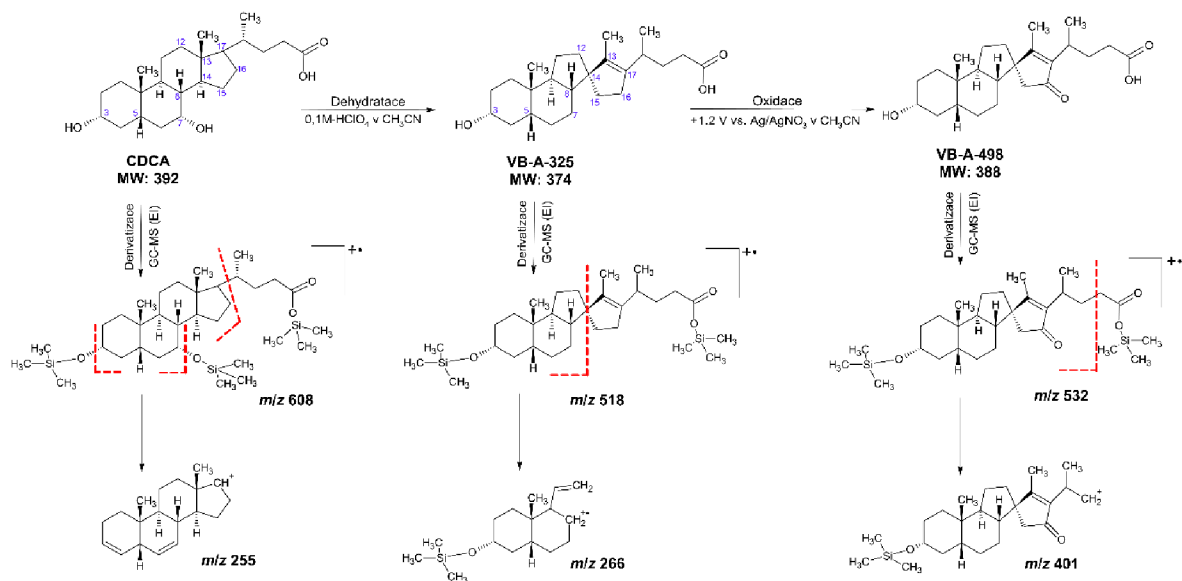
5.2.1 Dehydratace chenodeoxycholové kyseliny

Žlučové kyseliny nejsou pro elektrochemii ideálními látkami, neboť nejsou elektrochemicky aktivní. Nicméně je lze chemicky aktivovat *in situ* použitím 0,1M-HClO₄ v acetonitrilu, což má za následek jejich dehydrataci a dehydratační produkty jsou už elektrochemicky aktivní. CDCA byla dehydratována a byla navržena struktura dehydratačního produktu, která byla později upravena, neboť NMR experimenty prokázaly, že po dehydrataci na uhlíku C7 dochází k migraci dvojné vazby, která se tak nachází mezi uhlíky C13-C17 [81]. Dehydratační produkt byl synteticky připraven (VB-A-325) a analyzován GC-MS. Bylo provedeno srovnání tohoto produktu se silylovaným ethylacetátovým extraktem získaným po dehydrataci CDCA a bylo potvrzeno, že VB-A-325 je majoritním produktem dehydratace CDCA. V MS spektru byl dominantní ion m/z 266, jehož struktura i struktura té části molekuly, která z molekulárního iontu odpadá, byla v počátcích práce záhadou, neboť fragmentace probíhala zcela jinak, než je u primárních (i sekundárních) žlučových kyselin běžné. Proto byly provedeny MS/MS experimenty, které ukázaly, že ion m/z 266 je skutečně fragment vznikající z molekulárního iontu dehydratačního produktu CDCA, a navíc ve formě kation-radikálu. Skutečná struktura produktu dehydratace CDCA byla zjištěna až s pomocí rozsáhlých NMR experimentů. Během dehydratace v silné anorganické kyselině dochází jednak k migraci dvojné vazby, ale také k tzv. Wagner-Meerweinovu přesmyku [83], který má za následek přeskupení C a D steroidního kruhu v molekule CDCA. Výsledkem těchto přeměn byl tedy vznik produktu dehydratace CDCA se stejnou molekulovou hmotností, jakou měl předběžně navrhovaný, nicméně fragmentace tohoto produktu po elektronové ionizaci probíhá zcela odlišně (viz obr. 3).

5.2.2 Elektrochemická oxidace chenodeoxycholové kyseliny

Synteticky připravený produkt dehydratace VB-A-325 byl elektrochemicky oxidován na platinové elektrodě a byl identifikován majoritní oxidační produkt – spirocyklický C(16) enon, který byl následně také synteticky připraven (VB-A-498). Poté byla na platinové elektrodě oxidována CDCA, jejímž produktem byl tentýž spirocyklický C(16) enon. Jeho struktura byla potvrzena na základě srovnání retenčních časů a MS spekter CDCA a VB-A-

325 po elektrochemické oxidaci a VB-A-498. Struktura oxidačního produktu je rovněž na obrázku 3.



Obr. 3 Schéma elektrochemické oxidace CDCA s dehydratačním mezikrokem spolu se strukturami silylovaných molekul CDCA, jejího dehydratačního (VB-A-325) a oxidačního produktu (VB-A-498) a struktury nejintenzivnějších iontů vzniklých fragmentací příslušných molekul po elektronové ionizaci

5.3 Analýza organických pojiv na bázi lipidů v nástěnných malbách pomocí GC-MS [84]

5.3.1 Změny diagnostických poměrů mastných kyselin a dalších parametrů

Analýza lipidových pojiv je založena na GC-MS analýze mastných kyselin, které ale musí být nejprve uvolněny z příslušných triacylglycerolů [85]. Uvolněné mastné kyseliny jsou následně převedeny na vhodnou formu pro analýzu – FAME. Diagnostické poměry mastných kyselin jsou již od 60.let minulého století používány k rozlišení mezi různými druhy lipidových pojiv, která jsou analyzována pomocí GC-MS. Dříve se věřilo, že dané poměry jsou pro určitý typ lipidového pojiva konstantní, nicméně v literatuře lze nalézt významné rozdíly mezi hodnotami. Větší variabilita hodnot je u vaječného pojiva s ohledem na to, která část vaječné složky byla použita (bílek, žloutek, nebo celé vejce). Důležité jsou i parametry hardwarového vybavení, použitého k analýze, kterým se předchozí studie příliš nezabývaly, a proto byly modelové vzorky nástěnných maleb analyzovány stejnou metodou ve dvou laboratořích v Olomouci (GC-MS 1) a ve Vídni (GC-MS 2) na dvou téměř identických GC-MS přístrojích. Referenční vzorky nástěnných maleb byly podrobeny umělému stárnutí. Diagnostické poměry mastných kyselin a suma relativního zastoupení vybraných dikarboxylových kyselin - ΣD (azelaová, sebaková a suberová) byly sledovány napříč jednotlivými kroky stárnutí, od čerstvě připravených vzorků (NA) až po ty nejvíce zestárlé (UV3). Tabulka II ukazuje rozdíly mezi jednotlivými parametry ve vzorcích s obsahem olejového a vaječného pojiva.

Tabulka II Změny poměrů mastných kyselin a parametru ΣD při umělém stárnutí. Rozdíly jsou pozorovány mezi referenčními vzorky s obsahem lněného oleje a vejce a mezi přístroji GC-MS 1 a GC-MS 2. Průměrné hodnoty a standardní odchylky těchto parametrů byly vypočteny ze sedmi vzorků s různými pigmenty, z nichž každý byl nastříknut třikrát ($n = 21$ analýz)

Olej	GC-MS 1				GC-MS 2			
	NA	UV1	UV2	UV3	NA	UV1	UV2	UV3
P/S	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
A/P	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
O/S	1,8 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,3	2,2 ± 0,5	0,3 ± 0,1	0,19 ± 0,06	0,11 ± 0,07
A/Su	3,8 ± 1,1	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,3	4,2 ± 1,3	2,1 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,1 ± 0,4
ΣD	9,0 ± 3,5	13,4 ± 3,2	22,5 ± 3,3	25,7 ± 4,8	6,0 ± 2,6	29,5 ± 4,7	31,3 ± 7,3	35,4 ± 4,0
Vejce	NA	UV1	UV2	UV3	NA	UV1	UV2	UV3
P/S	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,8 ± 0,4	2,9 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2
A/P	0,07 ± 0,01	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,1	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,1 ± 0,04	0,13 ± 0,03
O/S	2,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,1	4,0 ± 0,8	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02
A/Su	3,1 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	4,4 ± 0,6	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,3
ΣD	2,0 ± 0,8	7,4 ± 3,1	7,9 ± 2,7	9,3 ± 2,1	0,9 ± 0,7	12,2 ± 1,9	13,5 ± 1,7	13,5 ± 3,1

5.3.2 Poměry mastných kyselin a další diagnostické parametry

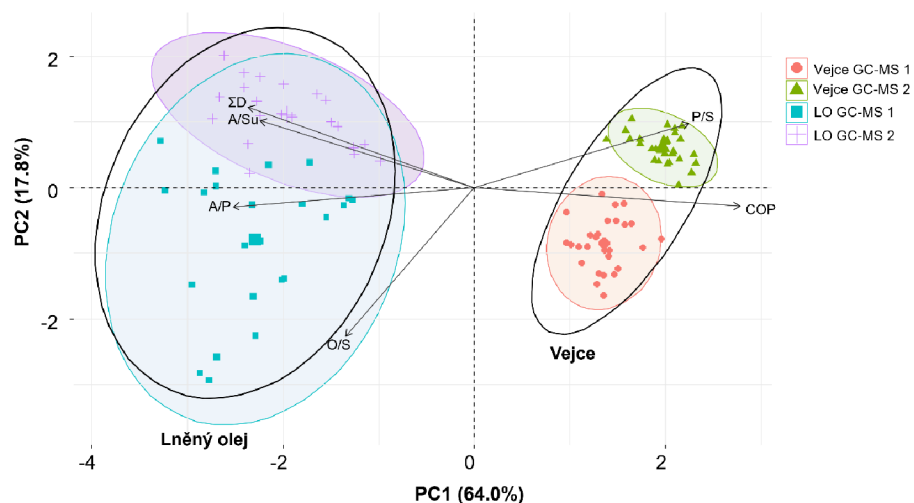
Jak lze vidět v tabulce II, poměr P/S (palmitová/stearová kyselina) byl téměř konstantní ve vzorcích vaječného i olejového pojiva během jednotlivých kroků stárnutí. Pro lněný olej byly průměrné hodnoty poměrů P/S 1,32 a 1,48 (GC-MS 1 a GC-MS 2), naopak poměry P/S pro vaječné pojivo nabývaly hodnot 1,80 (GC-MS 1) a 2,85 (GC-MS 2). V literatuře je uváděna průměrná hodnota poměru P/S pro vejce okolo 3 [86,87]. Poměr A/P (azelaová/palmitová kyselina) udává stupeň oxidace a vysychání, které probíhají během stárnutí, a proto se tento poměr časem zvyšuje [88,89]. Průměrné hodnoty A/P vzrostly u všech vzorků během umělého stárnutí více než dvojnásobně. Poměr O/S (olejová/stearová kyselina) je významný zejména pro oleje, neboť charakterizuje stupeň jejich zralosti [90,91]. Během umělého stárnutí došlo k významnému poklesu poměru O/S v důsledku úbytku kyseliny olejové. Posledním sledovaným poměrem byl A/Su (azelaová/suberová kyselina), který je nepostradatelný pro zhodnocení tepelných úprav, které mohly nastat při zpracování lněného oleje. Během umělého stárnutí došlo k poklesu průměrných hodnot A/Su. Lněné oleje za studena lisované (tzv. raw) mívají hodnoty A/Su obvykle větší než šest, naopak u tepelně zpracovaných olejů nabývá poměr hodnot 2-3 [88]. Vzhledem k tomu, že na přípravu modelových vzorků byla použita směs polymerovaného a čištěného lněného oleje, jsou výsledky v souladu s hodnotami z literatury. Dále byl sledován i parametr ΣD , neboť dikarboxylové kyseliny jsou hlavními oxidačními produkty C_{18} nenasycených mastných kyselin [52,85]. Parametr ΣD rostl během umělého stárnutí, a to zejména u lněného oleje, ve kterém je obsaženo více nenasycených mastných kyselin ve srovnání s vejcem. Kromě mastných kyselin byly hledány i jiné specifické markery, konkrétně steroly. Ve všech stařených vzorcích vaječného pojiva bylo identifikováno pět oxidačních produktů cholesterolu (COP) s majoritním cholesta-3,5-dien-7-onem.

Získané výsledky byly rovněž porovnány statisticky. Byly porovnávány výsledky poměrů mastných kyselin a parametru ΣD z každého kroku umělého stárnutí mezi olejovým a vaječným pojivem (vždy v rámci jednoho instrumentu – GC-MS 1 nebo GC-MS 2) pomocí dvouvýběrového (nepárového) Studentova t -testu. Nulová hypotéza ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) byla testována proti alternativní hypotéze ($H_1: \mu_1 \neq \mu_2$). Vypočtené t hodnoty byly porovnány s kritickými t hodnotami na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a počtem stupňů volnosti v ($v = n_1 + n_2 - 2$). Vypočtené hodnoty pro všechny vzorky a všechny parametry s výjimkou jednoho byly větší než kritické hodnoty, a proto byla nulová hypotéza zamítnuta. Tento test tak prokázal statisticky významný rozdíl mezi vaječným a olejovým pojivem.

Dvouvýběrový t -test byl dále použit k porovnání výsledků získaných měření na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2. Na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými dvěma GC-MS přístroji kromě sedmi hodnot. Rozdíly v naměřených hodnotách dvěma GC-MS přístroji byly pravděpodobně způsobeny heterogenitou olejového a zejména vaječného pojiva společně s malým počtem fyzických replik pro každý vzorek.

5.3.3 PCA analýza

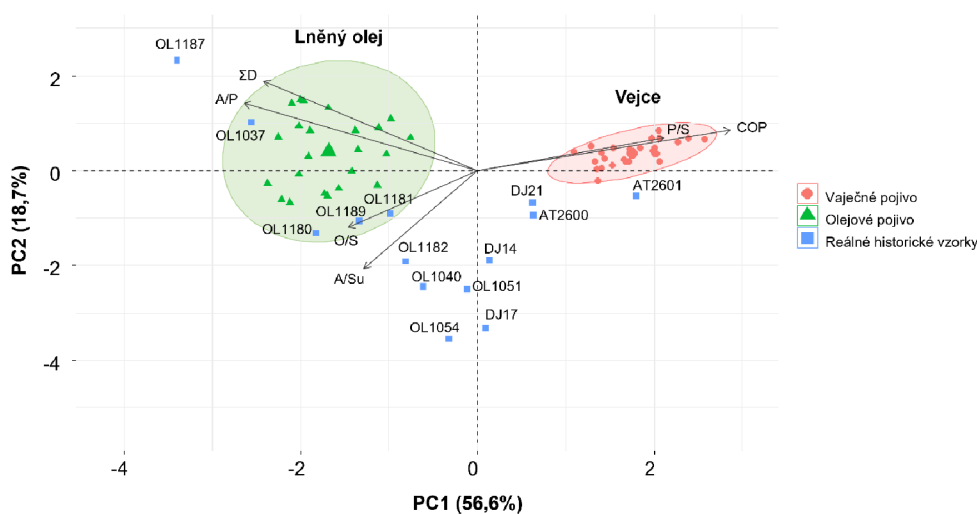
Pro správnou interpretaci získaných dat může být vhodným nástrojem PCA. Pro tvorbu PCA grafu bylo využito dat získaných měření referenčních vzorků olejového a vaječného pojiva na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2 po konečném kroku umělého stárnutí (UV3): poměry P/S, A/P, O/S, A/Su, parametr ΣD a přítomnost/absence COP. Biplot na obrázku 4 vizuálně oddělil vaječná a olejová pojiva (černé elipsy) a dále jsou vidět i dva shluky náležící vaječnému pojivu měřenému na GC-MS 1 a GC-MS 2 (červené a zelené elipsy). Toto prostorové oddělení je pravděpodobně způsobeno nízkou homogenitou vzorků vajec a v důsledku toho i rozdílnými poměry P/S a O/S. Naopak u vzorků lněného oleje je pozorován překryv shluků, což reflektuje pouze drobné rozdíly v proměnných získaných analýzou na přístrojích GC-MS 1 a GC-MS 2.



Obr. 4 PCA biplot referenčních vzorků vaječného a olejového pojiva (LO) po umělém stárnutí (UV3) získaných měření na GC-MS 1 a GC-MS 2. Elipsy představují oblasti s 95 % intervalem spolehlivosti, které zahrnují těžiště každého shluku dat. Černé vektory představují zátěže šesti proměnných

5.3.4 Aplikace PCA na reálné historické vzorky

Čtrnáct vzorků historických nástěnných maleb bylo analyzováno pomocí GC-MS 1 a následně podrobena PCA analýze. K sestavení PCA biplotu (obr. 5) byly použity referenční vzorky nástěnných maleb měřené na GC-MS 1 po konečném kroku stárnutí (UV3). Uvažovány byly stejné proměnné jako v předchozí PCA analýze. Na obrázku 5 je vidět rozdělení vaječného a olejového pojiva (červená a zelená elipsa) společně s 14 body (modře zbarveno) náležícími historickým vzorkům. Pouze u čtyř z nich se podařilo jednoznačně určit, že byl použit lněný olej jako pojivo, a to konkrétně u vzorků: OL1037, OL1180, OL1181 a OL1189.



Obr. 5 PCA biplot zkonstruovaný z hodnot získaných měření referenčních vzorků vaječného a olejového pojiva po umělém stárnutí (UV3) a reálných historických vzorků nástěnných maleb. Vzorky byly měřeny pomocí GC-MS 1. Elipsy představují oblasti s 95 % intervalem spolehlivosti, které zahrnují těžiště každého shluku dat. Černé vektory představují zátěže šesti proměnných

Vzorky OL1182 a OL1187 jsou sice mimo elipsu příslušející vzorkům se lněným olejem, nicméně se nachází velice blízko ní a lze tedy předpokládat, že se v těchto vzorcích budou nacházet stopy vysychavých olejů. Vzorky z Rakouska (AT2600 a AT2601) a jeden vzorek z Bečova nad Teplou (DJ21) jsou na druhou stranu v blízkosti shluku náležícímu vaječnému pojivu. Poměrně nízké hodnoty poměru A/P a parametru ΣD skutečně poukazují na možnou přítomnost vaječného pojiva, nicméně hodnoty P/S byly v rozmezí 1,23 - 1,75, což odpovídá spíše hodnotám pro lněný olej. Pravděpodobně se tedy bude jednat o směs vaječného a olejového pojiva (známé jako „tempera grassa“), ve které převažuje vaječná složka. Zbytek vzorků (DJ14, DJ17, OL1040, OL1051 a OL1054) se nachází v oblasti mezi oběma pojivy a je zde vidět silná korelace s poměrem A/Su. U vzorků OL1040, OL1051, OL1054 a DJ14 byly zaznamenány nízké hodnoty poměru P/S a O/S,

kteře jsou typické pro olejová pojiva, nicméně hodnoty poměru A/P byly u těchto vzorků $\leq 0,3$ spolu s hodnotami parametru $\Sigma D < 5 \%$, což jsou hodnoty typické pro vaječné pojivo. U těchto vzorků lze tedy usuzovat na přítomnost vaječného pojiva s příměsí vysychavého oleje.

5.4 Profilování metabolitů osemení hrachu pomocí metody GC-MS [92,93]

5.4.1 Optimalizace extrakčního postupu pro nepolární látky

Vzhledem k limitovanému množství rostlinného materiálu při analýze osemení a snaze nalézt efektivní postup, jak z co nejmenšího kousku osemení získat maximální informaci o zastoupených látkách, byly hledány možné způsoby extrakce. Obecně se jedná o dva přístupy, kdy prvním z nich je extrakce rozpouštědlem z povrchu rostlinného materiálu a druhou možností je pak chemické narušení (např. hydrolýza) povrchu s následnou extrakcí uvolněných látek. Extrakce hexanem s následnou silanizací BSTFA dovolila u obou genotypů detegovat pouze některé mastné kyseliny. Extrakce acetonem byla o poznání horší a detegovány byly pouze tři mastné kyseliny. Nízká účinnost extrakce rozpouštědlem vedla k hledání jiných postupů, a proto byl adaptován postup ze zpracování vzorků nástěnných maleb (trans)esterifikačním činidlem MethPrep II. U genotypu JI64 se podařilo detegovat pouze šest mastných kyselin: kyselina jantarová, pelargonová, laurová, myristová, palmitová a stearová. Stejně kyseliny byly detegovány i v genotypu Cameor, ve kterém byly oproti JI64 navíc přítomny ještě kyseliny kaprinová, tridecylová, pentadecylová a lignocerová.

Extrakce acetonem (hexanem) následovaná silanizací ani methylace činidlem MethPrep II neposkytovaly kýžené výsledky a těmito postupy bylo detegováno pouze omezené množství mastných kyselin. Proto byla použita hydrolýza (zmýdelnění). U obou genotypů bylo detegováno velké množství mastných kyselin (C9 – C28) včetně několika jejich (hydroxy)derivátů a mastných alkoholů (C12 – C28), dále pentacyklické triterpenoidy α - a β -amyrin a kyseliny oleanolová, betulinová a ursolová, které se vyskytovaly pouze v hilu Cameoru. Méně početnou skupinou byly fytosteroly, konkrétně kampesterol, isofukosterol a β -sitosterol, který byl ve větší míře zastoupen v hilu JI64. Zajímavostí bylo, že pouze v hilu Cameoru byly detegovány dikarboxylové kyseliny (C4, C5, C9, C16 a C18), zatímco v hilu JI64 byly detegovány dlouhé mastné kyseliny s 26 a 28 uhlíky (hexakosanová a oktakosanová kyselina), které jsou dle literatury charakteristickými markery právě tohoto dormantního genotypu [94,95].

V rámci optimalizace metody byla vyzkoušena jednokroková methanolýza/methylace využívající běžně dostupných chemikálií, jako je koncentrovaná HCl, methanol a toluen. Methanolýza/methylace byla prováděna za zrychlených podmínek, kdy jsou vzorky inkubovány pouze hodinu při 90 °C. Detegovány byly podobné skupiny látek jako v případě zmýdelnění, a to mastné kyseliny (C15 – C26), (hydroxy)deriváty mastných kyselin, mastné alkoholy, fytosteroly (kampesterol, ergostanol, fukosterol, stigmasterol atd.), α - a β -amyrin. V porovnání se zmýdelněním nebyly v *n*-hexanovém extraktu po methanolýze/methylaci detegovány žádné dikarboxylové kyseliny s výjimkou kyseliny hexadekandiové (C16), ani dlouhé mastné kyseliny s 26 a 28 uhlíky. Detegováno bylo i menší množství mastných alkoholů. Naopak však bylo v *n*-hexanovém extraktu po methanolýze/methylaci detegováno mnohem větší množství hydroxyderivátů mastných kyselin a více fytosterolů než po zmýdelnění.

5.4.2 Analýza polárních látek v mikrovzorcích osemení

Sacharidy jsou jednou z hlavních chemických složek hrachu a tvoří až 60 % sušiny jeho semen [96], a proto jim byla rovněž věnována pozornost. Úprava vzorků spočívala nejprve v extrakci polárních látek do methanolu a poté v převedení sacharidů na příslušné oximy reakcí s hydrochloridem methoxyaminu. Vzhledem k povaze látek (vysoce polární, obsahující mnoho hydroxylových skupin, respektive mnoho aktivních atomů vodíku) byly vzorky před GC-MS analýzou silylovány. Identifikováno bylo zhruba padesát sloučenin, převážně cukrů, cukerných alkoholů a cukerných kyselin u obou genotypů. Jednalo se zejména o monosacharidy s šesti uhlíkovými atomy a disacharidy složené rovněž z šestiuhlíkatých monosacharidů. Výjimkou byla pouze D-arabiosa. Mezi genotypy navíc nebyly zaznamenány žádné rozdíly, co se zastoupení jednotlivých cukerných sloučenin týče. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou [94], kdy v osemení dormantních i nedormantních semen hrachu převažovaly mono a oligosacharidy složené právě z hexosových jednotek. Kromě sacharidů byly identifikovány i aminokyseliny, organické kyseliny a fenolické sloučeniny, které se více vyskytovaly u genotypu JI64, což má spojitost s dormancí těchto semen [94,97].

5.4.3 Společná analýza polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení

Nejprve byly polární látky extrahovány do methanolu a po odebrání kapalné fáze byl zbylý pevný materiál zmýdelněn 70% KOH v ethanolu s následnou extrakcí látek do *n*-hexanu. Polární frakce obsahovala až na pět výjimek stejné látky, které byly u obou genotypů

identifikovány již v předchozích experimentech. Při zmýdelnění došlo při tomto společném stanovení k drobným změnám oproti samotnému zmýdelnění (viz kapitola 5.4.1) V nepolární frakci získané z hila genotypu JI64 byly detegovány nasycené mastné kyseliny v rozmezí C14 – C26 a dvě nenasycené mastné kyseliny (olejová a linolenová). Největší rozdíl byl zaznamenán v případě mastných alkoholů, kdy byly detegovány pouze dva, a to dodekanol a oktadekanol. Látky steroidní povahy byly detegovány také jenom dvě – β -sitosterol a kampesterol. Podobné změny byly pozorovány i u genotypu Cameor. Detegovány byly nasycené mastné kyseliny C15 – C24, pouze jedna hydroxykyselina (3-hydroxymyristová) a tři dikarboxylové kyseliny. Z mastných alkoholů se podařilo detegovat hexadekanol, heptadekanol, oktadekanol, eikosanol a dokosanol. Nebyly detegovány žádné nenasycené mastné kyseliny ani steroidní látky.

Z těchto výsledků vyplývá, že obě metody (pro nepolární i polární látky) byly velmi účinné a podařilo se pomocí nich identifikovat téměř srovnatelné množství látek, jako když byly metody použity zvláště na větších kusech osemení hrachu. Absence některých látek v nepolární frakci mohla být způsobena menším množstvím vzorku, neboť i v případě většího množství se detekce výše zmíněných látek pohybovala takřka na hranici limitu detekce dané metody. U polárních látek byly pozorovány jen zanedbatelné změny v jejich zastoupení, což mohlo být způsobeno jednoduše tím, že cukry jsou narozdíl od lipidů majoritními látkami, ze kterých je osemení tvořeno.

6 Závěr

V předložené disertační práci byly studovány možnosti stanovení látek převážně nepolární povahy pomocí GC-MS s využitím derivatizačních postupů. První část práce je věnována vývoji jednoduché GC-MS metody pro odlišení kravského mléka pocházejícího z venkovního nebo vnitřního chovu. K tomuto odlišení nelze využít jediného markeru, neboť tyto hodnoty mohou být ovlivněny krmivem, celkovým rozsahem metabolismu, fyzickou kondicí a řadou dalších faktorů. Použitím relativního poměru mezi analyty (7-DHC/CHOL) byla podstatně zesílena rozlišovací schopnost metody, což dokazují i výsledky měření deseti vzorků mléka, kdy čtyři z nich pocházely z venkovního chovu a zbylých šest z chovu vnitřního. Hodnota parametru $(7\text{-DHC/CHOL}) \cdot 1000$ se pohybovala v rozmezí 0,35 – 1,34 pro venkovně chované krávy a naopak hodnoty parametru pro vnitřní chov byly v rozmezí 2,14 – 2,85. Navržená GC-MS metoda kvantifikace 7-dehydrocholesterolu a normalizace na množství cholesterolu přítomného v mléce by tak mohla najít uplatnění při rozlišení mezi venkovním a vnitřním chovem krav, a navíc by se mohla stát účinným nástrojem pro ověřování životních podmínek hospodářských zvířat a ověřování potenciálních ekologických tvrzení výrobců mléčných produktů.

Dále byla GC-MS použita k analýzám produktů vzniklých elektrochemickou přeměnou chenodeoxycholové kyseliny (CDCA). Jelikož je CDCA elektrochemicky neaktivní, musel elektrochemické oxidaci předcházet krok navíc v podobě dehydratace kyselinou chloristou. Tento krok však vedl k neočekávanému přesmyku C a D kruhu steroidního skeletu a celkové změně struktury molekuly. Dehydratační produkt byl synteticky připraven a spolu s dehydratovanou CDCA elektrochemicky oxidován za vzniku oxidačního produktu, který byl poté také synteticky připraven. GC-MS analýzy potvrdily přítomnost dehydratačního i oxidačního produktu v extraktech CDCA po dehydrataci, respektive po oxidaci na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter synteticky připravených standardů se získanými extrakty a elektrolyzáty CDCA.

Jako zavedená rutinní metoda byla GC-MS použita k identifikaci typu pojiva v nástěnných malbách. V případě pojiv na bázi lipidů je identifikace založena na GC-MS analýze methylesterů mastných kyselin, respektive jejich charakteristických poměrů. V rámci této studie byly analyzovány referenční vzorky nástěnných maleb obsahující lněný olej a vejce s šesti různými pigmenty. Analýzy byly prováděny na dvou GC-MS přístrojích s téměř identickým hardwarovým uspořádáním za účelem posouzení možné variability

daných poměrů mastných kyselin. Dále byl zkoumán vliv umělého stárnutí na složení modelových vzorků. Zatímco se většina parametrů během stárnutí měnila dle očekávání, poměr P/S zůstal po celou dobu téměř konstantní. Stárnutí mělo větší vliv na nenasycené mastné kyseliny, kdy byl zaznamenán jejich výrazný pokles. Naopak dikarboxylové kyseliny (azelaová, sebaková a suberová) zaznamenaly prudký nárůst, neboť vznikají v důsledku oxidace nenasycených kyselin. Značný rozdíl v hodnotách P/S u zestárnutého vaječného pojiva mezi přístroji GC-MS 1 ($1,76 \pm 0,31$) a GC-MS 2 ($2,93 \pm 0,24$) vedl ke zkoumání dalších vhodných markerů, kterými se jeví produkty oxidace cholesterolu, zejména pak cholesta-3,5-dien-7-on. Identifikace takových markerů je však náročná z hlediska množství vzorku, poměru pojiva k pigmentu a zejména počátečního množství cholesterolu, ze kterého se tyto produkty následně vytvářejí. Proto byla použita PCA analýza, která kombinuje více parametrů, a která se ukázala jako velmi účinná při rozlišení mezi olejovým a vaječným pojivem. PCA analýza byla následně použita na reálné vzorky historických nástěnných maleb, kdy se podařilo u čtyř vzorků jednoznačně prokázat přítomnost lněného oleje jako pojiva. U ostatních vzorků se jednalo pravděpodobně o směs vaječného a olejového pojiva.

Poslední studovanou oblastí byl vývoj GC-MS metody pro současnou analýzu polárních a nepolárních látek z jednoho mikrovzorku osemení hrachu setého, který spočíval především v optimalizaci postupu pro analýzu nepolárních látek. Nejvhodnějším postupem z hlediska množství detegovaných látek bylo zmýdelnění v alkoholickém roztoku hydroxidu draselného s následnou extrakcí látek do *n*-hexanu. Takto došlo k efektivnímu narušení povrchu vzorku a uvolnění hledaných analytů. Při společné analýze byly vzorky nejprve extrahovány směsí methanol/voda – tím došlo k uvolnění polárních látek, které byly dále zpracovány a zbylý pevný podíl byl podroben zmýdelnění za účelem stanovení nepolárních látek.

7 Seznam použité literatury

- [1] C.F. Poole, I.D. Wilson, M. Cooke, *Encyclopedia of Separation Science*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000.
- [2] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic gas chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.
- [3] I.D. Wilson, C.F. Poole, eds., *Handbook of methods and instrumentation in separation science*, Elsevier/Academic Press, London; Burlington, MA, 2009.
- [4] C.F. Poole, A. Townshend, P. Worsfold, *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2005.
- [5] R.L. Grob, E.F. Barry, eds., *Modern practice of gas chromatography*, 4th ed, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2004.
- [6] J. Drozd, J. Drozd, J. Novák, *Chemical derivatization in gas chromatography*, Elsevier Scientific Pub. Co. Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North-Holland, Amsterdam New York, 1981.
- [7] L.-K. Ng, M. Hupé, Simple gas chromatographic method for the assay of salts of carboxylic acids as their trimethylsilyl derivatives, *Journal of Chromatography A* 637 (1993) 104–108. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83105-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83105-2).
- [8] S. C. Moldoveanu, V. David, Derivatization Methods in GC and GC/MS, in: P. Kusch (Ed.), *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*, IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81954>.
- [9] D.R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reaction*, Wiley & Sons, New York, USA, 1979.
- [10] J. Pawliszyn, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2012.
- [11] D.W. Smith, L.M.D. Lemli, J.M. Opitz, A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies, *The Journal of Pediatrics* 64 (1964) 210–217. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(64\)80264-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(64)80264-X).
- [12] A.F. Hofmann, L.R. Hagey, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2461–2483. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7568-6>.
- [13] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones, *Endocrine Reviews* 25 (2004) 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>.
- [14] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature* 407 (2000) 233–241. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- [15] Council of Europe, *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, European Pharmacopoeia*, 5th Edition (2004) 1279–1280.
- [16] G. Stewart, C. Gosselin, S. Pandian, Selected ion monitoring of tert-butyl dimethylsilyl cholesterol ethers for determination of total cholesterol content in foods, *Food Chemistry* 44 (1992) 377–380. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90271-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90271-3).
- [17] A. Adachi, T. Kobayashi, Identification of vitamin D₃ and 7-dehydrocholesterol in cow's milk by gas chromatography-mass spectrometry and their quantitation by high-

- performance liquid chromatography, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 25 (1979) 67–78. <https://doi.org/10.3177/jnsv.25.67>.
- [18] R.I. Kelley, Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts, *Clinica Chimica Acta* 236 (1995) 45–58. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06038-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06038-4).
- [19] L. Pizzoferrato, S. Nicoli, C. Lintas, GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products, *Chromatographia* 35 (1993) 269–274. <https://doi.org/10.1007/BF02277508>.
- [20] H.L.J. Makin, D.B. Gower, eds., *Steroid Analysis*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9775-1>.
- [21] T.T.N. Dinh, L.D. Thompson, M.L. Galyean, J.C.L. Brooks, M.L. Boylan, Determination of Total Cholesterol in Meat and Poultry by Gas Chromatography: Single-Laboratory Validation, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 95 (2012) 472–488. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-224>.
- [22] A.S. Kollmeier, M.K. Parr, Mass spectral fragmentation analyses of isotopically labelled hydroxy steroids using gas chromatography/electron ionization low-resolution mass spectrometry: A practical approach, *Rapid Comm Mass Spectrometry* 34 (2020) e8769. <https://doi.org/10.1002/rcm.8769>.
- [23] R. Ryhage, E. Stenhagen, Mass spectrometry in lipid research, *Journal of Lipid Research* 1 (1960) 361–90.
- [24] J. Diekman, C. Djerassi, Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl esters, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 1005–1012. <https://doi.org/10.1021/jo01279a033>.
- [25] A.K. Batta, G. Salen, Bile acids, in: *Encyclopedia of Separation Science*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000: pp. 2124–2130.
- [26] P.B. Hylemon, H. Zhou, W.M. Pandak, S. Ren, G. Gil, P. Dent, Bile acids as regulatory molecules, *Journal of Lipid Research* 50 (2009) 1509–1520. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900007-JLR200>.
- [27] A.F. Hofmann, The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease, *Arch Intern Med* 159 (1999) 2647. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.22.2647>.
- [28] Frédéric.M. Vaz, S. Ferdinandusse, Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine* 56 (2017) 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.003>.
- [29] W.J. Griffiths, J. Sjövall, Bile acids: analysis in biological fluids and tissues, *Journal of Lipid Research* 51 (2010) 23–41. <https://doi.org/10.1194/jlr.R001941>.
- [30] Y. Liu, Z. Rong, D. Xiang, C. Zhang, D. Liu, Detection technologies and metabolic profiling of bile acids: a comprehensive review, *Lipids Health Dis* 17 (2018) 121. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0774-9>.
- [31] M. Dutta, J. Cai, W. Gui, A.D. Patterson, A review of analytical platforms for accurate bile acid measurement, *Anal Bioanal Chem* 411 (2019) 4541–4549. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01890-3>.

- [32] J.M. Street, D.J. Trafford, H.L. Makin, The quantitative estimation of bile acids and their conjugates in human biological fluids., *Journal of Lipid Research* 24 (1983) 491–511. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37955-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37955-4).
- [33] G. Kakiyama, A. Muto, H. Takei, H. Nittono, T. Murai, T. Kurosawa, A.F. Hofmann, W.M. Pandak, J.S. Bajaj, A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS, *Journal of Lipid Research* 55 (2014) 978–990. <https://doi.org/10.1194/jlr.D047506>.
- [34] J. Klouda, J. Barek, P. Kočovský, T. Herl, F.-M. Matysik, K. Nesměrák, K. Schwarzová-Pecková, Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration, *Electrochemistry Communications* 86 (2018) 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.11.024>.
- [35] J. Klouda, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Barek, K. Schwarzová-Pecková, A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples, *Bioelectrochemistry* 134 (2020) 107539. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107539>.
- [36] V.G. Zaikin, J.M. Halket, *A handbook of derivatives for mass spectrometry*, 1st ed., IM Publications, Chichester, UK, 2009.
- [37] A.K. Batta, G. Salen, K.R. Rapole, M. Batta, P. Batta, D. Alberts, D. Earnest, Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool, *Journal of Lipid Research* 40 (1999) 1148–1154. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33519-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33519-7).
- [38] X. Zhao, Z. Liu, F. Sun, L. Yao, G. Yang, K. Wang, Bile Acid Detection Techniques and Bile Acid-Related Diseases, *Front. Physiol.* 13 (2022) 826740. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.826740>.
- [39] C. Tsaconas, P. Padiou, G. Maume, M. Chessebeuf, N. Hussein, N. Pitoizet, Gas chromatography-mass spectrometry of isobutyl ester trimethylsilyl ether derivatives of bile acids and application to the study of bile sterol and bile acid biosynthesis in rat liver epithelial cell lines, *Analytical Biochemistry* 157 (1986) 300–315. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90631-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90631-7).
- [40] B.C. Musial, C.N. Williams, Quantitative assay of conjugated and free bile acids as heptafluorobutyrate derivatives by gas-liquid chromatography., *Journal of Lipid Research* 20 (1979) 78–85. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40653-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40653-4).
- [41] R. Edenharter, J. Slemr, Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of bile acids as trifluoroacetyl-hexafluoroisopropyl and heptafluorobutyryl derivatives, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 222 (1981) 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)81027-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)81027-0).
- [42] J.P. Thenot, E.C. Horning, MO-TMS Derivatives of Human Urinary Steroids for GC and GC-MS Studies, *Analytical Letters* 5 (1972) 21–33. <https://doi.org/10.1080/00032717208066084>.
- [43] S. Petrovic, A. Arsic, Fatty Acids: Fatty Acids, in: *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 2016: pp. 623–631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00277-4>.
- [44] G.C. Burdge, P.C. Calder, Introduction to Fatty Acids and Lipids, in: P.C. Calder, D.L. Waitzberg, B. Koletzko (Eds.), *World Review of Nutrition and Dietetics*, S. Karger AG, 2015: pp. 1–16. <https://doi.org/10.1159/000365423>.

- [45] P.C. Calder, Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health, *J Parenter Enteral Nutr* 39 (2015). <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>.
- [46] C. De Carvalho, M. Caramujo, The Various Roles of Fatty Acids, *Molecules* 23 (2018) 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>.
- [47] C.F. Poole, *Gas chromatography*, 1st ed, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2012.
- [48] N.C. Shantha, E. Napolitano, Review Gas chromatography of fatty acids, *Journal of Chromatography* (1992) 37–51. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85673-h](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85673-h).
- [49] H.-H. Chiu, C.-H. Kuo, Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples, *Journal of Food and Drug Analysis* 28 (2020) 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.003>.
- [50] J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *Journal of Biological Chemistry* 226 (1957) 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- [51] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (1959) 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [52] M.P. Colombini, F. Modugno, *Organic mass spectrometry in art and archaeology*, 1st pub., Wiley, Chichester, UK, 2009.
- [53] Hermann. Schlenk, J.L. Gellerman, Esterification of Fatty Acids with Diazomethane on a Small Scale, *Anal. Chem.* 32 (1960) 1412–1414. <https://doi.org/10.1021/ac60167a011>.
- [54] S. Bauer, M. Neupert, G. Spiteller, Characterization of artefacts produced by treatment of organic acids with diazomethane, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 309 (1984) 243–259. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(84\)80032-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(84)80032-8).
- [55] K. Ichihara, Y. Fukubayashi, Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography, *Journal of Lipid Research* 51 (2010) 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>.
- [56] A.I. Carrapiso, C. García, Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and *in situ* transesterification, *Lipids* 35 (2000) 1167–1177. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0633-8>.
- [57] S. Meier, S.A. Mjøs, H. Joensen, O. Grahl-Nielsen, Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues, *Journal of Chromatography A* 1104 (2006) 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.045>.
- [58] P. Hušek, Derivatization, in: *Encyclopedia of Separation Science*, 1st ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000: pp. 434–443.
- [59] L.D. Metcalffe, C.N. Wang, Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters Using Organic Base-Catalyzed Transesterification, *Journal of Chromatographic Science* 19 (1981) 530–535. <https://doi.org/10.1093/chromsci/19.10.530>.
- [60] M. Černý, T. Trnka, M. Buděšínský, *Sacharidy*, 1. vyd., Česká společnost chemická, Praha, ČR, 2010.

- [61] A. Blanco, G. Blanco, Chapter 4 - Carbohydrates, in: *Medical Biochemistry*, Academic Press, 2017: pp. 73–97.
- [62] L. Cole, P.R. Kramer, Macronutrients, in: *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*, Elsevier, 2016: pp. 157–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00005-0>.
- [63] M. Sinnott, *Carbohydrate chemistry and biochemistry : structure and mechanism*, 2nd ed., RSC Publishing, Cambridge, UK, 2013.
- [64] K. Blau, J.M. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 1993.
- [65] M. Becker, T. Zweckmair, A. Forneck, T. Rosenau, A. Potthast, F. Liebner, Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin, *Journal of Chromatography A* 1281 (2013) 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.053>.
- [66] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro, Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 1226–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>.
- [67] Md.A. Islam, J. Lee, S.-H. Yoo, Effect of oximation reagents on gas chromatographic separation of eight different kinds of mono- and di-saccharides, *Food Chemistry* 386 (2022) 132797. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132797>.
- [68] Z. Lai, O. Fiehn, Mass spectral fragmentation of trimethylsilylated small molecules, *Mass Spectrometry Reviews* 37 (2018) 245–257. <https://doi.org/10.1002/mas.21518>.
- [69] P. Finch, Z. Merchant, The structures of D-arabinose and D-glucose oximes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1975) 1682. <https://doi.org/10.1039/p19750001682>.
- [70] M. Meloun, J. Militký, *Statistical Data Analysis: A practical guide*, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd., New Delhi, India, 2011.
- [71] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure and Applied Chemistry* 67 (1995) 1699–1723. <https://doi.org/10.1351/pac199567101699>.
- [72] d’Andrea C. Cennini, D.V. Thompson, *The Craftman’s Handbook: The Italian “Il Libro Dell’Arte,”* Dover Publications, Inc., New York, NY, 1954.
- [73] J. Nádvořníková, J. Skopalová, P. Krejčí, P. Bednář, P. Barták, GC–MS determination of 7-dehydrocholesterol and cholesterol in milk to verify eco-friendly conditions in cow housing, *Journal of Food Composition and Analysis* 122 (2023) 105471. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105471>.
- [74] T.T.N. Dinh, L.D. Thompson, M.L. Galyean, J.C. Brooks, K.Y. Patterson, L.M. Boylan, Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10 (2011) 269–289. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00158.x>.
- [75] M. Fenton, Chromatographic separation of cholesterol in foods, *Journal of Chromatography A* 624 (1992) 369–388. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85689-Q](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85689-Q).

- [76] R.L. Glass, Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters, *Lipids* 6 (1971) 919–925. <https://doi.org/10.1007/BF02531175>.
- [77] E. Karrar, I.A.M. Ahmed, M.F. Manzoor, W. Wei, F. Sarpong, X. Wang, Lipid-soluble vitamins from dairy products: Extraction, purification, and analytical techniques, *Food Chemistry* 373 (2022) 131436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131436>.
- [78] I.G. Zenkevich, E.D. Makarov, Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation, *Journal of Chromatography A* 1150 (2007) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.083>.
- [79] P.H. Laakso, Collaborators:, A. Sheridan, A.M. Lampi, F. Lacoste, H.G. Janssen, J. Idar Hilde, P. Van Beek, S. Wretling, T. Kuechler, Determination of Plant Stanols and Plant Sterols in Phytosterol Enriched Foods with a Gas Chromatographic-Flame Ionization Detection Method: NMKL Collaborative Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 97 (2014) 1097–1108. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-011>.
- [80] E.B. Hoving, Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 671 (1995) 341–362. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00223-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00223-6).
- [81] J. Veselý, J. Skopalová, V. Bhosale, P. Kočovský, M. Májek, J. Klouda, K. Jelšíková, K. Nesměrák, J. Nádvorníková, M. Zajacová Cechová, V. Chromý, R. Jerga, P. Barták, P. Bednář, M. Kuzma, J. Zápal, S. Petřelová, K. Schwarzová-Pecková, Acid-Induced Back-Bone Rearrangement and Electrochemical Oxidation of Chenodeoxycholic Acid Leads to the Formation of Spirocyclic Enone, *Journal of the American Chemical Society* Under review (2024).
- [82] J. Nádvorníková, P. Barták, J. Skopalová, GC-MS Analýza Oxidačních Produktů Chenodeoxycholové kyseliny, in: *Slovenská chemická spoločnosť a Česká společnost chemická, Vysoké Tatry, Horní Smokovec, 2021: pp. 170–171*.
- [83] K. Orito, M. Ohto, H. Suginome, A wagner–meerwein rearrangement of the cholestane skeleton induced by a long-range intramolecular hydrogen abstraction by alkoxy radicals; the first example of long-range intramolecular addition of an alkoxy radical to a carbon–carbon double bond, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1990) 1076–1078. <https://doi.org/10.1039/C39900001076>.
- [84] J. Nádvorníková, V. Pitthard, O. Kurka, L. Kučera, P. Barták, Egg vs. Oil in the Cookbook of Plasters: Differentiation of Lipid Binders in Wall Paintings Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Principal Component Analysis, *Molecules* 29 (2024) 1520. <https://doi.org/10.3390/molecules29071520>.
- [85] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, England, n.d.
- [86] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli, GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts, *Microchemical Journal* 67 (2000) 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00075-8).
- [87] M.P. Colombini, F. Modugno, M. Giacomelli, S. Francesconi, Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 846 (1999) 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00344-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00344-1).

- [88] F.C. Izzo, 20th Century Artist's Oil Paints: A Chemical-Physical Survey, Dissertation thesis, Ca' Foscari University, 2011.
- [89] I. Bonaduce, L. Carlyle, M.P. Colombini, C. Duce, C. Ferrari, E. Ribechini, P. Selleri, M.R. Tiné, New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study, *PLoS ONE* 7 (2012) e49333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049333>.
- [90] S. Wei, A Study of Natural Organic Binding Media Used in Artworks and of Their Ageing Behaviour by GC/FID and GC/MS, PhD Thesis, Vienna University of Technology, 2007.
- [91] V. Pitthard, M. Griesser, S. Stanek, T. Bayerova, Study of Complex Organic Binding Media Systems on Artworks Applying GC-MS Analysis: Selected Examples from the Kunsthistorisches Museum, Vienna, *Macromolecular Symposia* 238 (2006) 37–45. <https://doi.org/10.1002/masy.200650606>.
- [92] J. Nádvořníková, P. Krejčí, P. Bednář, P. Barták, Pea seed coat metabolite profiling by GC/MS, in: *Book of Abstracts and Program, Department of Analytical Chemistry Faculty of Science Palacký University Olomouc, Olomouc, ČR, 2022*: p.148-149.
- [93] J. Nádvořníková, P. Krejčí, Z. Žingor, Š. Dostál, D. Vysloužilová, P. Bednář, P. Barták, Pea Seed Metabolite Profiling Using Combined GC/MS and PyGC-MS Analysis, in: *Hungarian Society for Separation Sciences, Budapest, Hungary, 2022*: p. 135.
- [94] P. Krejčí, M.Z. Cechová, J. Nádvořníková, P. Barták, L. Kobrlová, J. Balarynová, P. Smýkal, P. Bednář, Combination of electronically driven micromanipulation with laser desorption ionization mass spectrometry – The unique tool for analysis of seed coat layers and revealing the mystery of seed dormancy, *Talanta* 242 (2022) 123303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123303>.
- [95] M. Cechová, M. Válková, I. Hradilová, A. Janská, A. Soukup, P. Smýkal, P. Bednář, Towards Better Understanding of Pea Seed Dormancy Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *IJMS* 18 (2017) 2196. <https://doi.org/10.3390/ijms18102196>.
- [96] D.-T. Wu, W.-X. Li, J.-J. Wan, Y.-C. Hu, R.-Y. Gan, L. Zou, A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications, *Foods* 12 (2023) 2527. <https://doi.org/10.3390/foods12132527>.
- [97] I. Hradilová, O. Trněný, M. Válková, M. Cechová, A. Janská, L. Prokešová, K. Aamir, N. Krezdorn, B. Rotter, P. Winter, R.K. Varshney, A. Soukup, P. Bednář, P. Hanáček, P. Smýkal, A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.), *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>.

8 Životopis

Osobní údaje

Jméno: Jana Nádvořníková
Adresa: Ve Dvoře 8, 783 72 Velký Týnec 1
Email: JNadvornikova@centrum.cz

Dosažené vzdělání

2014–2017 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
Studijní obor: Aplikovaná chemie
Téma bakalářské práce: Analýza derivátů kyseliny kávové v rostlinném materiálu plynovou chromatografií

2017–2019 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
Studijní obor: Analytická chemie
Téma diplomové práce: Analýza biologicky aktivních látek v rostlinném materiálu plynovou chromatografií

2019 – nyní Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
Studijní obor: Analytická chemie
Téma disertační práce: Analytická derivatizace látek

Stáže

2016 Ostravské vodárny a kanalizace a.s.
rozbory pitných a odpadních vod v hydroanalytické laboratoři

2022 Uměleckohistorické muzeum Vídeň
Tříměsíční stáž pod vedením pana doktora Václava Pittharda, odběr a příprava historických vzorků, měření a vyhodnocování výsledků z GC-MS analýz, základy vyhodnocování dat XRF měření

Projekty

2019–2022 Grantová agentura ČR, 19-11268S, Elektrochemické metody: Nové přístupy pro charakterizaci a analýzu steroidů, člen řešitelského týmu

2020–2022 Grantová agentura ČR, 20-07350S, Elektrochemické a analytické aspekty transportu návykových a psychotropních látek přes modelové biologické bariery, člen řešitelského týmu

2021 Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA_PrF_2021_021, Nové trendy v analýze komplexních vzorků, člen řešitelského týmu

2022 DSGS projekt (Igráček), DSGC-2021-0102, Multimodal analysis of plant metabolites and their degradation products in microsamples, člen řešitelského týmu

2022 Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA_PrF_2022_023, Moderní metody zpracování komplexních vzorků, člen řešitelského týmu

- 2023 Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA_PrF_2023_027,
Aplikace instrumentálních metod při analýze látek obsažených ve
složitéch materiálech, člen řešitelského týmu
- 2024 Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA_PrF_2024_026,
Moderní metody analýzy komplexních vzorků, člen řešitelského týmu

Pedagogická činnost

LS 2019/2020	Cvičení z analytické chemie (cvičení 6 hod/týd)
LS 2022/2023	Cvičení z analytické chemie (cvičení 6 hod/týd)

Publikační činnost

-
- L. Benešová, J. Klouda, E. Bláhová, K. Nesměrák, P. Kočovský, **J. Nádvořníková**, P. Barták, J. Skopalová, K. Schwarzová-Pecková, Non-enzymatic electrochemical determination of cholesterol in dairy products on boron-doped diamond electrode, *Food Chemistry* 393 (2022) 133278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133278>.
 - K. Jagošová, M. Moník, J. Kapusta, R. Pechancová, **J. Nádvořníková**, P. Fojtík, O. Kurka, T. Závodná, P. Bednář, L. Richtera, L. Kučera, *Secret Recipe Revealed: Chemical Evaluation of Raw Colouring Mixtures from Early 19th Century Moravia*, *Molecules* 27 (2022) 5205. <https://doi.org/10.3390/molecules27165205>.
 - P. Krejčí, M.Z. Cechová, **J. Nádvořníková**, P. Barták, L. Koblíková, J. Balarýnová, P. Smýkal, P. Bednář, *Combination of electronically driven micromanipulation with laser desorption ionization mass spectrometry – The unique tool for analysis of seed coat layers and revealing the mystery of seed dormancy*, *Talanta* 242 (2022) 123303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123303>.
 - **J. Nádvořníková**, J. Skopalová, P. Krejčí, P. Bednář, P. Barták, *GC–MS determination of 7-dehydrocholesterol and cholesterol in milk to verify eco-friendly conditions in cow housing*, *Journal of Food Composition and Analysis* 122 (2023) 105471. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105471>.
 - **J. Nádvořníková**, V. Pitthard, O. Kurka, L. Kučera, P. Barták, *Egg vs. Oil in the Cookbook of Plasters: Differentiation of Lipid Binders in Wall Paintings Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Principal Component Analysis*, *Molecules* 29 (2024) 1520. <https://doi.org/10.3390/molecules29071520>.
 - J. Veselý, J. Skopalová, V. Bhosale, P. Kočovský, M. Májek, J. Klouda, K. Jelšíková, K. Nesměrák, **J. Nádvořníková**, M. Zajacová Cechová, V. Chromý, R. Jerga, P. Barták, P. Bednář, M. Kuzma, J. Zápál, S. Petrželová, K. Schwarzová-Pecková, *Acid-Induced Back-Bone Rearrangement and Electrochemical Oxidation of Chenodeoxycholic Acid Leads to the Formation of Spirocyclic Enone*, *Journal of the American Chemical Society*, Under review (2024).
 - P. Krejčí, J. Balarýnová, **J. Nádvořníková**, L. Kučera, M. Tesárek, P. Smýkal, P. Bednář, *Application of modified ASAP-MS technique for direct analysis of plant microsamples and its potential for single pollen grain chemical characterization*, *Microchemical Journal*, Under review (2024).

Účast na konferencích a odborných seminářích

- 20. Škola hmotnostní spektrometrie, Špindlerův Mlýn, 9. – 13. září 2019
- 71. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, 9. – 13. září 2019. Spoluautor posteru: T. Sulovský, P. Barták, **J. Nádvorníková**, J. Skopalová, *Stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v mléku*
- 73. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, 6. – 10. září 2021. Prezentující autor posteru: **J. Nádvorníková**, P. Barták, J. Skopalová, *GC/MS analýza oxidačních produktů chenodeoxycholové kyseliny*
- Czech Mass Spectrometry Conference, Praha, 11. – 13. října 2021. Prezentující autor posteru: **J. Nádvorníková**, P. Barták, J. Skopalová, *GC/MS Analysis of Chenodeoxycholic Acid Oxidation Products*
- Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal, Olomouc, 13. – 16. června 2022. Prezentující autor posteru: **J. Nádvorníková**, P. Krejčí, P. Barták, P. Bednář, *Pea Seed Coat Metabolite Profiling by GC/MS*
- 23. Škola hmotnostní spektrometrie, Milovy, 4. – 9. září 2022, Spoluautor přednášky: P. Krejčí, **J. Nádvorníková**, Z. Žingor, Š. Dostál, D. Vysloužilová, L. Koblíková, P. Smýkal, P. Bednář, *Aplikace Hmotnostní Spektrometrie v Multimodální Analýze Metabolomu Rostlinných Mikrovzorků*
- 33rd International Symposium on Chromatography, Budapešť, 18. – 22. září 2022. Prezentující autor posteru: **J. Nádvorníková**, P. Krejčí, Z. Žingor, Š. Dostál, D. Vysloužilová, P. Barták, P. Bednář, *Pea Seed Metabolite Profiling Using Combined GC/MS and PyGC-MS Analysis*
- Czech Mass Spectrometry Conference, Praha, 29. září–1. října 2022. Prezentující autor posteru: **J. Nádvorníková**, P. Krejčí, Z. Žingor, Š. Dostál, D. Vysloužilová, P. Barták, P. Bednář, *Pea Seed Metabolite Profiling Using Combined GC/MS and PyGC-MS Analysis*

Další aktivity

- Popularizace UP na akcích: Noc vědců, Olomoucká Muzejní noc, Den otevřených dveří, Dětská univerzita, Science camp
- Aktivní zapojení při exkurzích středních škol
- Oponentura bakalářských prací Veroniky Seidlerové a Jakuba Slačálka
- Spolupráce při řešení zakázek smluvního výzkumu: Kučera L., Nádvorníková J., Vývoj a aplikace FTIR metod pro analýzu kontaminantů součástí z automobilového průmyslu; Nádvorníková J., Kučera L., Analýza vzorků omítky z dvorany hradu Loket pomocí Pyr-GC/MS; Nádvorníková J., Barták P., GC-MS analýza nečistot ve vzorku AMP piperidinu