

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu  
nízkomolekulárních organických látek v paleontologii a v biologické  
antropologii**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce: Veronika Seidlerová  
Studijní obor: Aplikovaná chemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

**Olomouc 2020**

# BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

<b>Autor:</b>	Veronika Seidlerová
<b>Název práce:</b>	Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu nízkomolekulárních organických látek v paleontologii a v biologické antropologii
<b>Typ práce:</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště:</b>	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UP
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
<b>Konzultant práce:</b>	Mgr. Monika Cechová
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2020
<b>Anotace:</b>	<p>Analýza kosterních pozůstatků přináší mnohé informace jako například nemoci zkoumaného jedince, jeho průběh a délku života, stresové markery, nebo i stravovací režim. Cílem této práce je vyvinutí metody pro celkovou analýzu nízkomolekulárních látek v archeologických i paleontologických kostech se zaměřením na lipidy (mastné kyseliny), steroly (cholesterol), peptidy a aminokyseliny. Tyto látky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a hmotnostní spektrometrie s využitím laserové desorpce/ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI). Metoda byla úspěšně vyvinuta na lidské stehenní kosti (11. století) a poté byla dále testována na paleontologických kostech.</p>
<b>Klíčová slova:</b>	kost, nízkomolekulární organické látky, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, laserová desorpce/ionizace
<b>Počet stran:</b>	66
<b>Počet příloh:</b>	4
<b>Jazyk:</b>	Český

## BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

<b>Author:</b>	Veronika Seidlerová
<b>Title:</b>	Utilization of mass spectrometry for analysis of low-molecular organic compounds in palaeontology and biological anthropology
<b>Type of thesis:</b>	bachelor's
<b>Department:</b>	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
<b>Supervisor:</b>	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
<b>Consultant:</b>	Mgr. Monika Cechová
<b>The year of presentation:</b>	2020
<b>Annotation:</b>	<p>Analysis of skeletal remains brings plenty of information, e.g. diseases of the individual examined, the length and course of life, stress markers, and diet. The aim of the thesis is to develop methods for comprehensive analysis of low molecular weight substances both in archaeological and paleontological bones with focus on lipids (fatty acids), sterols (cholesterol), and amino acid peptides. The substances were analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI). The method was successfully developed on human femur (11<sup>th</sup> century) and then tested on paleontological bones.</p>
<b>Keywords:</b>	bone, low-molecular organic compounds, gas chromatography, mass spectrometry, laser desorption / ionization
<b>Number of pages:</b>	66
<b>Number of appendices:</b>	4
<b>Language:</b>	Czech

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu citované literatury.

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

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis studentky

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Děkuji mému vedoucímu závěrečné práce RNDr. Lukáši Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení během konzultací i práce v laboratoři, za jeho trpělivost, čas, ochotu a mnoho užitečných rad, které mi poskytl při psaní bakalářské práce. Dále chci poděkovat mé konzultantce Mgr. Monice Cechové za ochotnou pomoc v laboratoři a vstřícný přístup.*

*V neposlední řadě chci velmi poděkovat mé rodině za trpělivost, vstřícnost, pochopení a podporu během celého studia.*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	13
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	14
2.1	Stavba kostní tkáně .....	14
2.2	Chemické složení organické hmoty kostní tkáně.....	16
2.3	Chemická analýza kostí.....	18
2.3.1	Techniky analýzy kostí.....	18
2.3.1.1	Infračervená a Ramanova spektroskopie .....	19
2.3.1.2	Elektroforéza.....	21
2.3.1.3	Kapalinová chromatografie .....	22
2.3.1.4	Plynová chromatografie.....	24
2.3.1.5	Hmotnostní spektrometrie .....	27
2.3.2	Analýza archeologicko-antropologických a paleontologických kosterních pozůstatků .....	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
3.1	Chemikálie .....	34
3.2	Přístroje .....	35
3.2.1	Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem.....	35
3.2.2	Vysokorozlišovací tandemový hmotnostní spektrometr s laserovou desorpčí/ionizací .....	36
3.3	Postup.....	36
3.3.1	Proces demineralizace kosti, extrakce kolagenu a derivatizace .....	36
3.3.2	Optimalizace postupu extrakce kolagenu .....	40
3.3.3	Finální postup pro celkovou analýzu kosti pomocí GC-MS .....	42
3.3.4	Analýza kosti <i>in situ</i> pomocí techniky MALDI .....	45
3.4	Výsledky a diskuze .....	48

3.4.1	Optimalizace jednotlivých postupů pro analýzu nízkomolekulárních látek.....	48
3.4.2	Analýza reálných paleontologických vzorků pomocí GC/MS.....	56
3.4.3	MALDI technika .....	58
3.5	Závěr .....	63
3.6	Summary .....	65

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyselina/aminokyseliny
AFM	mikroskop atomárních sil
3-AQ	3-aminochinolin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CE-ESI-MS	kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
CF-IRMS	izotopová poměrová hmotnostní spektrometrie s kontinuálním průtokem
CG-C-IRMS	plynová chromatografie kombinovaná s izotopovou poměrovou hmotnostní spektrometrií
CHCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxybenzoová
CMBT	5-chloro-2-merkaptobenzothiazol
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem
FFPE	tkáň fixovaná formalínem, zalitá do parafinu
FMOC-Cl	9-fluorenylmethylchlormravenčan
HABA	kyselina 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoová
HPA	kyselina 3-hydroxypikolinová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSRI	hyperspektrální Ramanovo zobrazování
IEX-HPLC	ionexová vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie



MALDI-MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpce/ionizací za spoluúčasti matrice
MALDI-MSI	zobrazovací hmotnostní spektrometrie (tzv. MALDI imaging)
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBSTFA	N-methyl-N-(tercbutyldimethylsilyl)trifluoracetamid
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních fázích
SA	kyselina sinapová
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SELDI	povrchem zesílená laserová desorpce/ionizace
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
TERS	hrotem zesílený Ramanův rozptyl
TOF	detektor doby letu
TOF-SIMS	technika hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s detektorem doby letu
THAP	2,4,6-trihydroxyacetofenon

**Seznam zkratk zmíněných aminokyselin:**

Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	aspartát
Glu	glutamát
Gly	glycin
His	histidin
Hyp	4-hydroxyprolin
Lys	lysin
Pro	prolin

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Struktura řezu vrstevnaté kosti ([4]) .....	15
<b>Obrázek 2:</b> Struktura kolagenního vlákna ([8]) .....	16
<b>Obrázek 3:</b> Kolagenní fibrily typu I zobrazené pomocí AFM. ([31]) .....	20
<b>Obrázek 4:</b> Schéma GC-MS systému .....	25
<b>Obrázek 5:</b> Schéma hmotnostního spektrometru .....	27
<b>Obrázek 6:</b> Demineralizace kortikální kosti odhalující přítomnost měkkých struktur.....	33
<b>Obrázek 7:</b> Referentní kost .....	34
<b>Obrázek 8:</b> Schéma postupu 1 .....	38
<b>Obrázek 9:</b> Schéma postupu 2 .....	40
<b>Obrázek 10:</b> Příklad zlyofilizovaného kolagenu (extrakce 0,1 M CH <sub>3</sub> COOH)...	41
<b>Obrázek 11:</b> Schéma postupu 3 .....	42
<b>Obrázek 12:</b> Schéma finálního postupu – vyvinutí metody.....	43
<b>Obrázek 13:</b> Reálné paleontologické vzorky testované metodou GC-MS .....	44
<b>Obrázek 14:</b> Kostra německého vojáka, naleziště Mírov .....	45
<b>Obrázek 15:</b> Levá pažní kost z kostry muže před demineralizací .....	47
<b>Obrázek 16:</b> MALDI destička s výbrusy pažní kostí.....	47
<b>Obrázek 17:</b> Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém 3 M HCl .....	59
<b>Obrázek 18:</b> Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém roztokem trypsinu .....	60
<b>Obrázek 19:</b> Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém roztokem trypsinu a výbrusu překrytém 3 M HCl.....	61
<b>Obrázek 20:</b> Snímky MALDI zobrazování, detekované aminokyseliny .....	62

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka I:</b> Přehled nejčastěji používaných matric v MALDI-MS analýze a jejich použití [51].....	29
<b>Tabulka II:</b> Soubor detekovaných aminokyselin ve vzorku hydrolyzovaném HCl s fenolem a derivatizovaném pomocí činidla MTBSTFA .....	49
<b>Tabulka III:</b> Soubor detekovaných aminokyselin v kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	50
<b>Tabulka IV:</b> Soubor detekovaných aminokyselin v kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH <sub>3</sub> COOH.....	51
<b>Tabulka V:</b> Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 0,1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	53
<b>Tabulka VI:</b> Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	54
<b>Tabulka VII:</b> Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 10 M CH <sub>3</sub> COOH.....	55
<b>Tabulka VIII:</b> Hodnoty výtěžku kolagenů ze všech paleontologických reálných vzorků .....	56
<b>Tabulka IX:</b> Detekované aminokyseliny v paleontologických reálných vzorcích .....	57
<b>Tabulka X:</b> Poměr Gly:Ala vypočítaný z výšky píků v paleontologických vzorcích .....	57

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase vzorku hydrolyzovaném HCl s fenolem, činidlo MTBSTFA.....	49
<b>Graf 2:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	51
<b>Graf 3:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH <sub>3</sub> COOH.....	52
<b>Graf 4:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 0,1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	53
<b>Graf 5:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 1 M CH <sub>3</sub> COOH.....	55
<b>Graf 6:</b> Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 10 M CH <sub>3</sub> COOH.....	56

# 1 ÚVOD

Kostní tkáň je nezbytným opěrným pojivem všech obratlovců a je tedy možné nalézt velké množství technik pro analýzu této tkáně napříč různými odvětvími. Kostní tkáň, ať už recentní či archeologická, poskytuje svým složením cenné informace (např. nemoci zkoumaného jedince, jeho průběh života – stresové markery, délka života) pro řadu výzkumných oborů, jako např. archeologii, antropologii, nebo paleontologii. Mezi základní analytické techniky, které můžeme využít při celkové analýze kosti, řadíme např. hmotnostní spektrometrii spojenou s plynovou chromatografií (GC-MS) nebo hmotnostní spektrometrii s využitím laserové desorpce/ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI).

Cílem práce je vyvinutí metody pro celkovou analýzu nízkomolekulárních látek v archeologických i paleontologických kostech se zaměřením na lipidy (mastné kyseliny), steroly (např. cholesterol), peptidy a aminokyseliny. V rámci detekce aminokyselin se metoda ubírá směrem ke zjištění procentuálního zastoupení aminokyselin v kostech.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

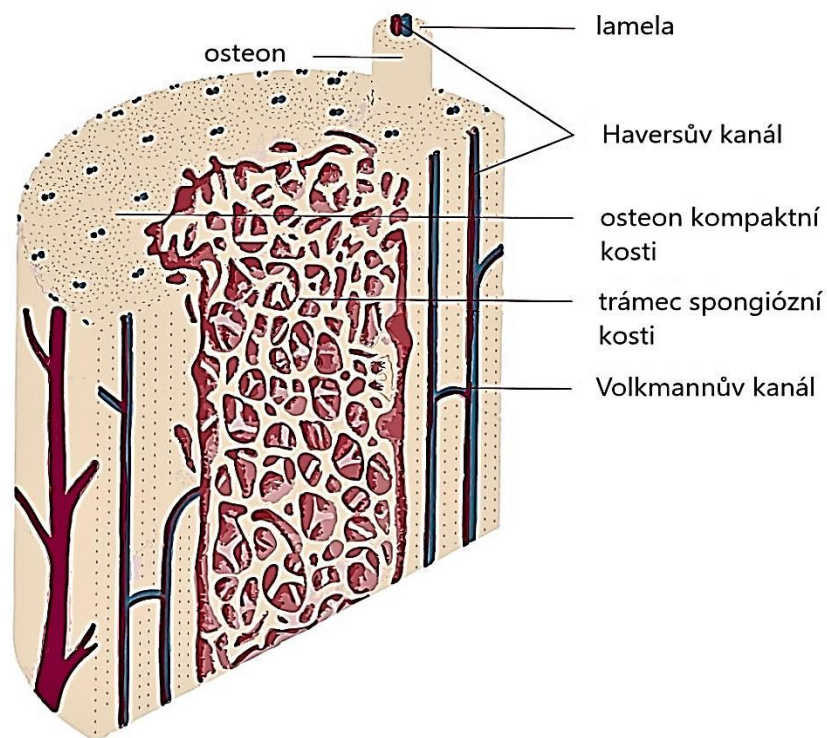
### 2.1 Stavba kostní tkáně

Kostní tkáň je vysoce mineralizovaná, nejpevnější a nejtvrdší pojivová tkáň lidského těla. Tato tkáň zastupuje dvě hlavní funkce, funkci mechanickou a fyziologickou. Z hlediska funkce mechanické je oporou pro svaly a chrání kostní dřev, naopak z pohledu fyziologického se podílí na rovnováze minerálních látek, je zásobárnou kalciových iontů, a na krvetvorbě. Kostní tkáň je obecně tvořena kostními buňkami a intercelulární matrix. Tyto kostní buňky nazýváme *osteoblasty*, *osteocyty*, *osteoklasty* a všechny mají svoji specifickou funkci. Osteoblasty jsou nezralé kostní buňky, které plní funkci syntézy a mineralizace mezibuněčné hmoty, vyskytují se tedy v místě růstu kosti. Osteocyty jsou zralé kostní buňky, které mimo syntézu a obnovu mezibuněčné hmoty plní funkci mechanoreceptorů (čidla tlaku a tahu, reakce na míru zátěže kosti) a vznikají z osteoblastů zalitím do matrix. Posledním typem jsou mnohojaderné osteoklasty zajišťující resorpci (vstřebání) kostní hmoty, tedy odbourávají mineralizovanou složku v matrix [1].

Pevnost a pružnost kostní tkáně je určena uspořádáním složek, převážně vláken, tzv. fibrilů, její matrix. V této souvislosti existují dva typy organizace kostí:

- *Kost vláknitá* (primární) – vyskytuje se především za ontogeneze, v dospělosti se může vyskytovat v místě rychle hojených fraktur. V tomto typu kosti existuje nepravidelné uspořádání kolagenních fibrilů a minerálních krystalů mezi vlákny, přičemž se tloušťka vláken střídá.
- *Kost vrstevnatá* (sekundární, Haversova) – jedná se o dospělý skelet, který postupně nahrazuje kost primární a vyskytuje se ve dvou základních formách. První formou je kompakta, která tvoří plášť kosti, zajišťuje pevnost i pružnost kosti a druhou je spongióza, která tvoří vnitřní část zralé kosti, zajišťuje maximální pevnost při minimu hmoty, směr jejích kostních trámců vytváří síť vyplněnou kostní dřeví. Základní stavební jednotkou sekundární kosti je osteon, tzv. Haversův systém. Každý osteon je tvořen lamelami, které jsou uspořádány do tvaru válce, a je prostoupen kanálky svých osteocytů. Příčné propojení Haversových kanálků zajišťují Volkmannovy kanálky obsahující cévy (Obrázek 1) [1,2].

Veškerý povrch kosti (mimo kloubní konce) je lemován kolagenním vazivem. Vnější vazivová vrstva se nazývá periost (okostice) a vnitřní vrstva kosti se nazývá endost. Periost je tvořen kolagenními vlákny a fibroblasty, obsahuje tzv. Sharpeyova vlákna, kterými se upíná na kost. Jelikož je periost bohatě prokrvený, podílí se na výživě kosti (Sharpeyovými vlákny) a je i příčinou kostní bolesti po úrazu. Endost je tenčí než periost, je tvořen jednou vrstvou osteoprogenitorových buněk a je významný z hlediska výživy kosti (reparace a růstu) [2,3].



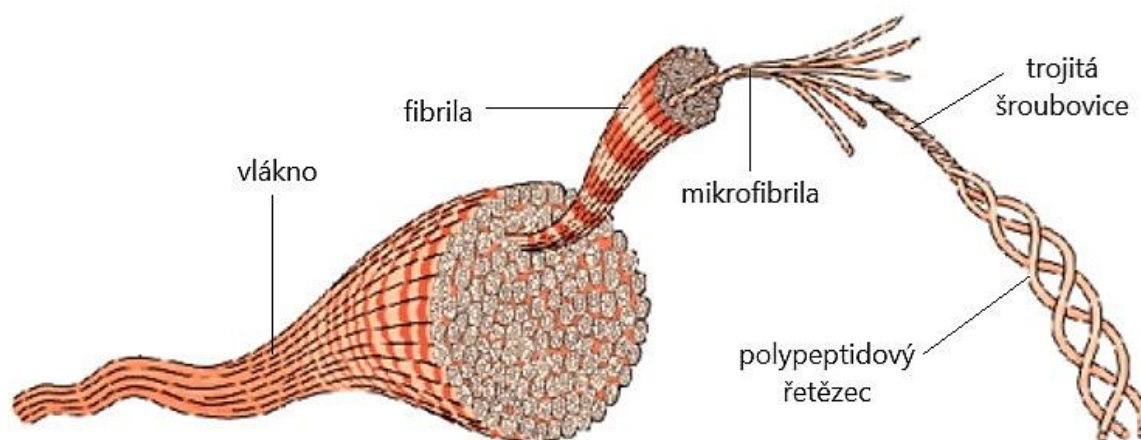
**Obrázek 1:** Struktura řezu vrstevnaté kosti (převzato z cit. [4])

Další důležitou, již zmiňovanou tkání, je kostní dřeň neboli morek, která je zdrojem všech druhů krevních elementů. Z mezenchymových buněk kostní dřeně se tvoří i osteoblasty. Během ontogeneze převládá červená (hematogenní) kostní dřeň produkující všechna krevní tělíska, ukládá železo z odbouraného hemoglobinu a účastní se odbourávání červených krvinek. Dalším typem kostní dřeně je tuková (žlutá) vznikající přeměnou hematogenní dřeně v průběhu pozdější ontogeneze. V dospělosti se červená hematogenní kostní dřeň vyskytuje v plochých, krátkých kostech, např. v hrudní, klíční, pánevní kosti, nebo lebečních kostech. Naopak žlutá tuková dřeň se vyskytuje ve středových částech dlouhých kostí, např. stehenní nebo lýtkové kosti [5].

## 2.2 Chemické složení organické hmoty kostní tkáně

Mineralizovaná forma matrix obsahuje zhruba 25 % organické hmoty, tzv. ossein, 5 % vody a 70 % anorganických látek, např. hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [1]. Ossein neboli organická hmota obecně obsahuje 95 % kolagenu typu I a zbylých 5 % tvoří nekolagenní proteiny. Hlavní složkou nekolagenních proteinů jsou glykoproteiny, např. sialoproteiny nebo osteokalcin, což je bílkovina důležitá pro osifikaci (kostnatění) s vazebnou schopností pro vápník. Kolagen je jedním z nejvíce bohatých proteinů v těle, řadíme ho ke skleroproteinům (proteiny vláknitého tvaru). Je nerozpustný ve vodě, poskytuje pružnost vazů a šlach [6,7]. Najdeme jej ve všech pojivových tkáních, ve šlachách, chrupavkách, vazech, cévách, kůži, ve vazivu parenchymových orgánů, v kostech a je i hlavní složkou dentinu a cementu v zubech [7].

Kolagen vzniká v polyribosomech, je následně hydroxylován a glykosylován v Golgiho komplexu. Základem kolagenního vlákna (fibrily) je tropokolagen, tzv. kolagenový monomer, který vzniká z prokolagenu a má tvar trojitě šroubovice (triple helix). Triple helix se skládá ze 3 polypeptidových řetězců, které jsou složeny z aminokyselin (AMK). Každou třetí aminokyselinou je glycin, každou čtvrtou je prolin a část prolinu je přeměněna na 4-hydroxyprolin. Další vyskytující se AMK je lysin, který je částečně přeměněn na 5-hydroxylysin. Po polymeraci tropokolagenu vzniká kolagenní mikrofibrila. Mikrofibrily se poté skládají do kolagenních fibril, které se následně skládají do mikroskopicky pozorovatelných kolagenních vláken (Obrázek 2) o tloušťce 20-200  $\mu\text{m}$ . Další aminokyseliny jako cystein, methionin, leucin a isoleucin se v kolagenu objevují v menším množství [7].



**Obrázek 2:** Struktura kolagenního vlákna (převzato z cit. [8])



Klasické kolageny tvořící fibrily zahrnují kolageny typu I, II, III, V a XI. Pro lidský organismus je nejdůležitější kolagen typu I, II, III a IV:

- Kolagen typu I – je nejrozšířenější, tvoří 90% všech kolagenů v těle; jeho kolagenní vlákna mají strukturu trojitě šroubovice; je přítomen v kostech, šlachách, kůži, rohovce, zubech a cementu; je pružný a vstřebatelný; ve většině orgánů, zejména ve šlachách a fasciích (vazivových obalech svalů), poskytuje kolagen typu I pevnost v tahu; v kostech definuje značné biomechanické vlastnosti týkající se nosnosti a pevnosti v tahu (hlavně po kalcifikaci) [9], používá se v potravinových doplňcích, přípravcích proti stárnutí pokožky, nebo k výrobě chirurgických nití [10].
- Kolagen typu II – tento typ kolagenu je nejvíce zastoupen v extracelulární matrix chrupavčitých tkání (podpůrná funkce), tvoří tenké fibrily o průměru 15-50 nm; ve srovnání s kolagenem typu I obsahuje více hydroxylysinu, a také glukosylových a galaktosylových zbytků, které zprostředkovávají interakci s proteoglykany, což je další typická složka vysoce hydratované matrice hyalinní chrupavky (proto je spolu s kolagenem typu I z hlediska funkce pohybového aparátu nejdůležitější) [9].
- Kolagen typu III – podobný stavbou kolagenu typu I, avšak obsahuje více proteoglykanů a glykoproteinů; fibrily tohoto kolagenu tvoří retikulární síť, které jsou oporou měkkých tkání, např. hladkých svalových buněk, nervových vláken, cévních stěn, nebo adipocytů (tukových buňkách), v pozdější ontogenezi tohoto kolagenu ubývá, nalezneme jej v mladších tkáních [9].
- Kolagen typu IV – nazývá se kolagen bazálních membrán, netvoří fibrily ani vlákna; přestože jako předchozí typy tvoří helikální strukturu, váží se na něj struktury nehelikální a jeho strukturu narušují; k jeho izolaci se využívá štěpení pomocí pepsinu [10].

Převážně z kolagenu je složena jedna z nejdůležitější tkáně, tkáň pojivová, která je obecně tvořena buňkami zalitými v mezibuněčné hmotě. Pojivová tkáň je mezenchymálního původu a v těle se dělí na 3 formy – vazivo, chrupavku a kost. V minulosti se předpokládalo, že pojivová tkáň plní funkci pouze mechanickou, ale nyní je známo, že se podílí na imunitních pochodech, na zánětlivých dějích, nebo na patologických pochodech (v pojivové tkáni se vyskytuje např. i ateroskleróza a revmatické choroby) [7].

Za regulační molekuly důležité pro zdraví kostí jsou považovány lipidy. Lipidy jsou v kostní tkáni přítomny převážně v kostní dřeni, ale i mineralizovaná tkáň obsahuje malé množství lipidů. Obecně adipocyty (tukové buňky) jsou spolu s kostními buňkami (osteoblasty, osteoklasty) důležité při udržování rovnováhy mezi tvorbou a resorpcí kosti. Tyto buňky jsou velmi variabilní, protože zralé adipocyty se mohou přeměnit na osteoblasty, a naopak i zralé osteoblasty mohou podstoupit proces adipogeneze. Lipidové složení kostní dřene se liší v závislosti na druhu, umístění tkáně, stravě a věku jedince. Kostní dřeň obecně vykazuje velké množství lipidů, například v lidském žeburu je 37 g lipidů na 100 g kostní dřene, u stehenní kosti je obsah lipidů 57 g a nejvíce je jich obsaženo v holenní kosti 91 g/100 g dřene [11].

V předešlé kapitole je zmíněna přeměna červené kostní dřene na žlutou, která je vyvolána procesem stárnutí organismu. Z tohoto důvodu dochází postupně ke zvýšené koncentraci lipidů v kostní dřeni. Lipidové extrakty z kostní dřene jsou nejvíce tvořeny triglyceridy, které se nachází v adipocytech a plní funkci zásobárny energie. V menším množství jsou extrakty dále tvořeny volnými mastnými kyselinami (např. kyselina palmitová, stearová), fosfolipidy (např. fosfatidylcholin) a významnou složkou je i skupina steroidních hormonů – cholesterolu a pohlavních hormonů jako estrogen a testosteron, které jsou hlavními regulátory kostního obratu a remodelace kosti u obou pohlaví. Ovšem profil mastných kyselin se odvíjí od složení mastných kyselin ve stravě, a právě mastné kyseliny mohou ovlivnit rovnováhu mezi tvorbou a resorpcí kosti tím, že ovlivňují přežití a funkci kostních buněk. Obdobnou funkci má i cholesterol, jehož hladina dokáže ovlivnit životaschopnost kostních buněk. Obecně látky jako mastné kyseliny, cholesterol a fosfolipidy ovlivňují homeostázu kostí, v případě zvýšené adipozity dřene roste riziko zhoršení nebo vzniku onemocnění osteoporózy [11].

## **2.3 Chemická analýza kostí**

### **2.3.1 Techniky analýzy kostí**

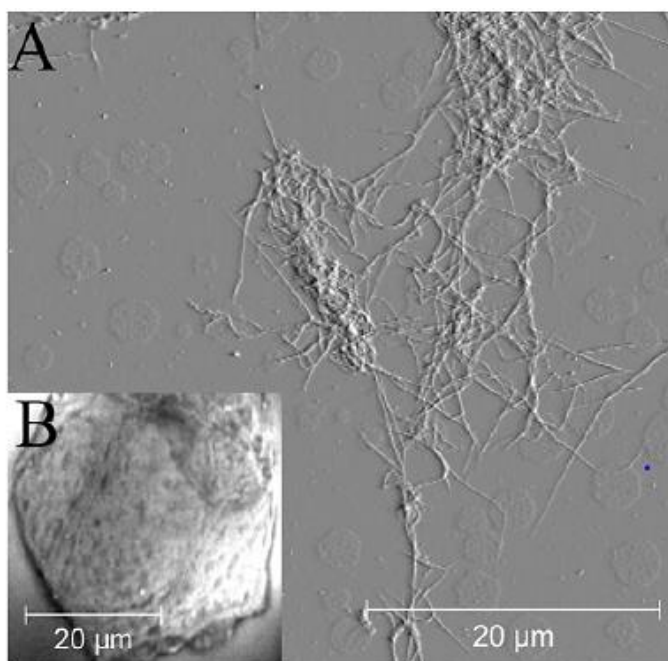
Detailní analýza kostní tkáně nám může pomoci pochopit její stavbu [12], zhodnotit kvalitu [13], identifikovat určitou nemoc [14], odhadnout dožitý věk, pohlaví [15] nebo i oblast původu jedince [16]. V této kapitole budou převážně popsány techniky spektroskopické (infračervená a Ramanova spektroskopie), separační (kapalinová a plynová chromatografie, elektroforéza) a hmotnostní spektrometrie.

### 2.3.1.1 Infračervená a Ramanova spektroskopie

Infračervená spektroskopie poskytuje informace o vlastnostech kostního materiálu a je považována za výkonnou techniku pro stanovení důležitých materiálových vlastností přispívajících k pevnosti kosti. Její mikrospektroskopické verze poskytují odpovědi týkající se informací o poměru minerál ku matrici, minerální zralosti anebo zesílení kolagenu, [17] dále našly velké uplatnění v archeologii ke stanovení změn složení kostní tkáně (obsah a kvalita kolagenu, krystaličnost fosfátu, obsah uhličitanu) [18,19]. U onemocnění kosti (zejména osteoporózy) je tato technika schopna identifikovat například chemickou změnu kostního materiálu [17], kde převážně dochází ke změně množství anorganických složek kosti, jako například vápníku, fosfátu, nebo uhličitanu [20]. S touto změnou souvisí i změna hustoty kostní tkáně (bone mineral density – BMD), kterou tato technika stanovuje také [21]. Z komplexního hlediska se infračervená spektroskopie a její metody využívají převážně k analýzám mineralizované části kostní tkáně [22,23].

Další stále častěji používaná technika, úzce související s infračervenou spektroskopií, je Ramanova spektroskopie. Tato technika, obdobně jako infračervená spektroskopie, se stala důležitým nástrojem při hodnocení kvality kosti [13] (např. tvrdost kostí, která je spojena s krystaličností minerálů), nebo při detekci osteoporózy [24]. Je využívána k pochopení toho, jak změny ve složení a struktuře kosti ovlivňují mechanické vlastnosti kosti na tkáňové úrovni. Ramanova spektroskopie se ve větší části případů zaměřuje na mineralizované části kostní tkáně (pohyb minerálů, množství, krystaličnost atd.) [13, 24–26]. Ramanova spektroskopie poskytuje informace o struktuře kostní tkáně na ultrastrukturální úrovni (ultrastruktura je viditelná pouze pod elektronovým mikroskopem) a je cenná při stanovení sekundární struktury bílkovin [27]. Těchto atributů využili autoři publikované práce A. Carden a kol. (2002) k prozkoumání vlivu mechanického zatížení na ultrastrukturu kosti (hovězí kortikální kost), konkrétně na změnu organické a minerální části kostní tkáně. Ultrastrukturu v deformovaných oblastech zkoumali pomocí hyperspektrálního Ramanova zobrazování (HSRI) spojeného s technikami vícerozměrné analýzy a pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Informace o minerální a organické složce kosti se získávají současně, čímž vzniká úplný obraz složení kostí ve zkoumané oblasti a autoři pozorovali strukturální přechod kostních minerálů v kosti [28].

Mimo analýzu anorganického složení kostní tkáně je Ramanova spektroskopie využívána pro analýzu organických látek v kostech, například kolagenu [29,30]. Ke studiu fyzikálně-chemických vlastností povrchu kolagenních fibril využili autoři L. Kreplak a kol. (2011) povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) a hrotem zesílený Ramanův rozptyl (TERS). Sušené fibrily kolagenu typu I (extrahované z krysí kostní tkáně) byly překryty nanočásticemi stříbra (měření při 532 nm) nebo zlata (měření při 660 nm), pro zesílení Ramanova signálu. Fibrily kolagenu typu I, které byly adsorbovány na skle, byly zobrazeny mikroskopem atomárních sil (AFM) na vzduchu. Autoři pozorovali dva typy struktury, husté sítě fibril (Obrázek 3 A) a vrstvy fibril o tloušťce několika mikronů (Obrázek 3 B).



**Obrázek 3:** Kolagenní fibrily typu I zobrazené pomocí AFM. (A) Husté sítě fibril. (B) Optický obraz vrstvy kolagenních fibril. (převzato z cit. [31])

V této studii autoři prokázali schopnost získat prostorově lokalizovaná povrchová spektra kolagenních fibril sestavených *in vitro* pomocí Ramanových technik v nanoměřítku. U metody SERS při měření kolagenních fibril překrytých polydisperzními nanočásticemi stříbra byl faktor zesílení řádově 10<sup>4</sup>, naopak u překrytí nanočásticemi zlata byla hodnota faktoru zesílení 10<sup>5</sup>. U metody TERS byl hrot s mikroskopickou skenovací sondou potažený pouze nanočásticemi stříbra, hodnota faktoru zesílení byla 8000 a tato metoda byla oproti metodě SERS (s Ag) kvalitativně horší, avšak dostačující. Techniky SERS i TERS lze použít i na vzorky odebrané z tkání

k prozkoumání přirozených změn ve struktuře a chemickém složení kolagenových fibril [31]. Závěrem lze říct, že z těchto dvou technik je pro analýzu organické části kostní tkáně rozšířenější Ramanova spektroskopie, ale lze využít i metod infračervené spektroskopie.

### 2.3.1.2 Elektroforéza

U analýzy kostní tkáně jsou elektroforetické metody jsou oproti jiným analytickým a elektrochemickým metodám využívány okrajově. Příkladem využívaných elektroforetických metod je kapilární zónová elektroforéza, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, nebo elektroforéza v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Kapilární zónová elektroforéza je vhodná především pro kvalitativní analýzu kolagenu. Naopak pro charakterizaci typu kolagenu se často využívá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), která dokáže stanovit molekulovou hmotnost podjednotek kolagenu [32]. Další metodou je kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií s detekcí po ionizaci elektrosprejem (CE-ESI-MS), která je vhodnou alternativou k jiným separačním technikám pro analýzu aminokyselin z důvodu jejich možnosti přímé analýzy bez nutnosti derivatizace. Tato metoda vykazuje vysokou spolehlivost identifikace vzorku a oproti kapalinové elektroforéze s nepřímou UV detekcí vykazuje stonásobně vyšší citlivost. Při srovnání s HPLC metodou s předkolonovou derivatizací pomocí činidla *o*-ftalaldehyd, nebo u fluorescenční detekce s derivatizací *o*-ftalaldehydu, je citlivost výrazně nižší. Výsledky této rozsáhlé studie poukázaly na hlavní rozdíly v citlivosti mezi bazickými (Arg, His a Lys) a kyselými aminokyselinami (Glu, Asp) a nižší citlivost vykazovaly aminokyseliny s nižší molekulovou hmotností (Gly, Ala). Obecně tedy můžeme říct, že největší výhodou této metody je příprava vzorků bez jejich předchozí derivatizace a že metoda bude efektivní i u fyziologických aminokyselin a při analýzách hydrolyzovaných proteinů [6]. U analýzy archeologických vzorků je elektroforéza využívána spíše pro analýzu vysokomolekulárních látek, které bývají v kosti lépe a častěji uchovány. Příkladem takových látek je DNA (deoxyribonukleová kyselina), nebo proteoglykany a jejich řetězce glykosaminoglykanů, které se úzce váží na hydroxyapatit, který by mohl tyto molekuly potenciálně chránit před degradací [33].

### 2.3.1.3 Kapalinová chromatografie

Oproti výše uvedeným spektroskopickým technikám se kapalinová chromatografie (LC) zaměřuje na analýzu specifitějších látek v kostní tkáni, například citrátu [34,35], léčiv [36], enzymů (biologických markerů) [37] nebo aminokyselin [38]. LC se obvykle používá pro separaci polárních sloučenin, jako například sacharidů nebo aminokyselin. Preparativní kapalinová chromatografie poskytuje purifikované frakce kolagenních sloučenin, které mohou být dále izotopicky izolovány. Právě izolace aminokyselin z kolagenu může poskytnout více informací o skutečném věku kosti [39].

Izolaci aminokyselin z kolagenu archeologických kostí zkoumali autoři O'Connell a kol. (2001) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na nepolárních fázích (RP-HPLC). Vzorby byly odebírány z dlouhých částí kostí, jednalo se o kosti z pozdní doby římské (zhruba 3-4 st. n.l.) nalezené na území jihozápadní Anglie (Dorset). Odebrané vzorky byly demineralizovány pomocí 0,5 M HCl (2-3 dny) a poté následoval proces želatinizace v roztoku blíže nespecifikované kyseliny (pH = 3) po dobu 24 h. Odebraný supernatant byl lyofilizován a zlyofilizovaný kolagen byl následně hydrolyzován pomocí 6 M HCl v atmosféře dusíku po dobu 24 hodin při 105 °C, čímž se uvolňují volné aminokyseliny. Po hydrolyze byl zbytek přefiltrován, lyofilizován a následně derivatizován v přebytku činidla 9-fluorenylmethylchloromravenčanu (FMOC-Cl). Aby se snížil objem výsledného roztoku (kvůli nástřiku do systému HPLC), byl roztok vysušen ve vakuu a rozpuštěn v methanolu na požadovaný objem. Získané roztoky byly následně analyzovány pomocí izotopové analýzy – poměrová hmotnostní spektrometrie s kontinuálním průtokem (CF-IRMS). Pomocí tohoto postupu bylo vyizolováno šest frakcí z archeologického kolagenu, které obsahovaly celkem 10 aminokyselin – glycin, alanin, arginin, aspartát, glutamát, serin, threonin, leucin, prolin a hydroxyprolin, které byly následně zanalyzovány. Tato metoda umožňuje izolaci jednotlivých aminokyselin z kostního hydrolyzátu a může být využita pro metodu radiokarbonového datování, kterou se zjišťuje stáří kosterních pozůstatků. V porovnání s ionexovou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (IEX-HPLC) je přesnější a lze tuto metodu porovnat i s plynovou chromatografií kombinovanou s poměrovou hmotnostní spektrometrií (CG-C-IRMS). Nevýhodou oproti GC-C-IRMS je nižší přesnost a omezení počtu separovatelných aminokyselin, naopak je výhodnější v současném měření obou izotopů  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$ , nedochází k žádnému zkreslení

izotopových hodnot uhlíku derivatizačními činidly a dovoluje separovat větší množství vzorku [40].

Obecně může být chromatografie na reverzní (obrácené) fázi považována za užitečnou metodu pro separaci peptidů, které lze získat enzymatickým štěpením kolagenu (pomocí proteáz, nejčastěji pomocí trypsinu nebo chymotrypsinu). Tímto štěpením nám vznikají krátké peptidy v kombinaci aminokyselin glycin, alanin, prolin a hydroxyprolin [39]. Vysokoúčinná kapalinná chromatografie (HPLC) může být dále využita pro studium zesílení kolagenu z kostního hydrolyzátu. Autoři S. Viguier-Carrin a kol. (2008) touto metodou analyzovali nedemineralizovanou i demineralizovanou kost, kde demineralizace byla provedena pomocí ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), EDTA s roztokem guanidinu nebo pomocí kyseliny mravenčí. Autoři v kosti detekovali látky pyridinolin, deoxypyridinolin a pentosidin, které v metabolismu kolagenu hrají důležitou roli. Z výsledků vyplývá, že ke kvantifikaci výše zmíněných látek není proces demineralizace nutný, neboť množství výše zmíněných detekovaných látek je podobné u nedemineralizované kosti a demineralizované pomocí EDTA. Naopak výsledky s demineralizací pomocí EDTA s guanidinem nebo kyselinou mravenčí ukázaly špatnou reprodukovatelnost pro kvantifikaci deoxypyridinolinu [41].

Významnými sloučeninami v archeologických kosterních vzorcích, které podléhají určité degradaci, jsou proteiny. Během stárnutí jsou proteiny vystaveny různým typům poškození ve formě neenzymatických proteinových modifikací. Tyto modifikace zahrnují trvalé kovalentní změny, které ovlivňují strukturu a funkci proteinů, jedná se o oxidaci, nitraci, glykaci a racemizaci. Nejlépe prostudovaným typem neenzymatické post-translační modifikace je právě racemizace. Racemizace je proces, při kterém se aminokyseliny spontánně přeměňují z nativní L-formy na D-formu, a protože je rychlost racemizace s časem lineární, je považována za jednu z metod pro analýzu stáří vzorku. Nejčastěji bývá sledována racemizace aminokyselin v zubech, ale lze ji sledovat tam, kde se vyskytují proteiny s dlouhou dobou životnosti, tedy i v kosti a chrupavce. Dále bylo zjištěno, že u recentních kostí může být racemizace aminokyselin užitečná v diagnostice muskuloskeletálních onemocnění [38]. U archeologických kostních vzorků se k určení stáří vzorku sleduje racemizace kyseliny asparagové, jejíž D-forma se hromadí v tkáni nejvíce a nejrychleji ze všech aminokyselin. Obecně se vyskytuje větší poměr D/L aminokyselin u mužů, naopak u vzorků žen je tento poměr D/L aminokyselin nižší z důvodu zvýšené přestavby kostí v období menopauzy a vyššího rizika onemocnění

osteoporózou. Většina analytických metod pro separaci D- a L-aminokyselin používá chromatografické postupy, nejčastěji se jedná o HPLC analýzu, ale lze použít i plynovou rozdělovací chromatografii. Metoda HPLC má několik výhod, jako je vysoká citlivost, kratší doba analýzy, jednoduchý postup, vysoká reprodukovatelnost, nižší náklady, naopak u plynové rozdělovací chromatografie bývají vyšší náklady a složitější postup přípravy vzorků [42].

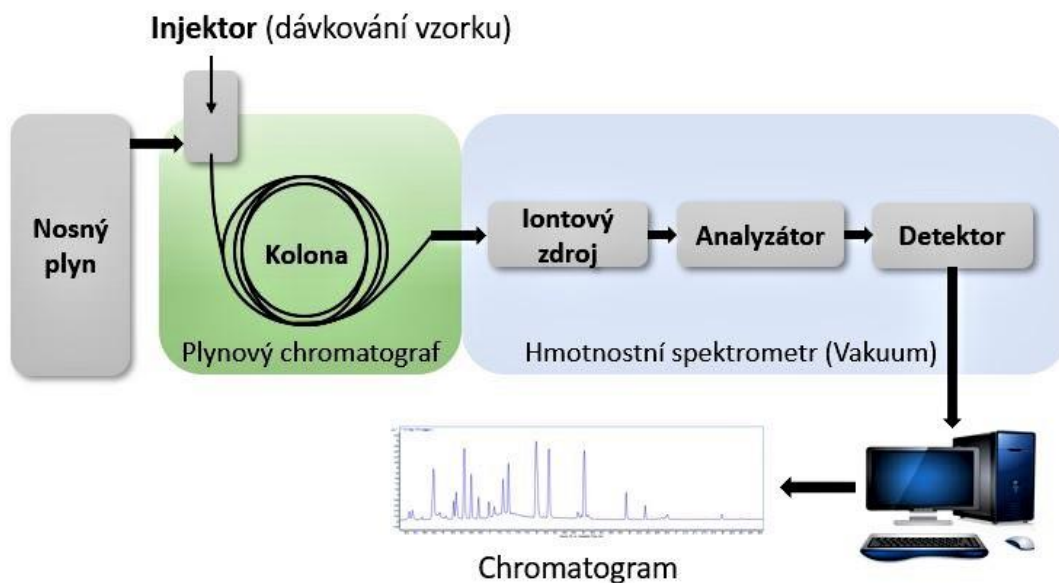
V neposlední řadě lze HPLC využít ke zjištění koncentrace citrátu v kosti za účelem určení pohlaví daného jedince [34], separaci léčiv, které penetrují do kostní tkáně (např. zolednonát, klindamycin atd.) [35,36], nebo identifikaci enzymů jako kostní alkalická fosfatáza (např. identifikaci izomerů pomocí ionexové-HPLC) patřící k biochemickým markerům kostního obratu (remodelaci) [37,43].

#### **2.3.1.4 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie je v případě analýzy kostní tkáně vždy kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Protože jednou z hlavních technik využívaných v této bakalářské práci je plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, je této technice věnován větší prostor.

GC-MS je kombinovaná analytická technika, díky níž je možné separovat jednotlivé složky ve složitých organických a biochemických matricích. Jednotlivé části plynového chromatografu je možné rozdělit na zplynění vzorku, unášení nosným plynem přes kolonu se stacionární fází, kde dochází k separaci jednotlivých komponent ve vzorku, a detekci analytů hmotnostním spektrometrem. Výstupem systému GC-MS (Obrázek 4) je chromatogram charakterizovaný příslušnými retenčními časy (min) analyzovaných látek a relativní intenzitou [44].





**Obrázek 4:** Schéma GC-MS systému

Příkladem využití GC-MS techniky při analýze kosti je studie aminokyseliny 4-hydroxyprolinu (Hyp) v krysí stehenní kosti. Tato aminokyselina vzniká post-translační hydroxylací prolinu (zhruba 50 % z celkového množství prolinu v kolagenu). Během rozpadu kolagenu se Hyp uvolňuje z kosti a díky tomu, že se z něj nevzniká nový kolagen a ukládá se do jiných částí těla, je močový Hyp považován za marker osteoklastické kostní resorpce. Malá frakce Hyp (10–20 %) se vylučuje močí, zbytek se transaminuje v játrech a díky dalším faktorům ovlivňujících množství močového kolagenu není specifický pro rozpad kostního kolagenu. Hladina Hyp měřená v kosti může tedy odrážet tvorbu kosti, a tím i osteoblastickou aktivitu. Jednou z možných analýz Hyp je kolorimetrická metoda zahrnující oxidaci hydrolyzovaného Hyp sodnou solí N-chlor-para-toluensulfonamidu (chloramin-T) za vzniku pyrrolu, který se následně extrahuje do toluenu a reaguje s Elrichovým činidlem za vzniku červeného chromoforu ( $A = 560 \text{ nm}$ ). Tato metoda je velmi specifická pro Hyp, je časově náročná a obtížnost spočívá také v řízení oxidačních a barevných reakcí kyselé hydrolyzy. Z těchto důvodů je vhodnější analýza pomocí GC-MS, která zahrnuje hydrolyzu kosti kyselinou chlorovodíkovou, následnou extrakci tuhou fází a derivatizaci. Obecně je u analýz pomocí GC-MS finálním krokem v přípravě polárnějších vzorků proces derivatizace ke zvýšení těkavosti látek (snížení polarit). Ve studii M. Delpont a kol. (2004) jsou zmiňovány různé typy derivatizačních činidel, např. ethylchlorformiát, 4-(5,6-dimethoxy-2-ftalimidinyl)-2-methoxyfenylsulfonylchlorid, nebo N-methyl-N-

(tercbutyldimethylsilyl)trifluoracetamid (MTBSTFA). Výhoda činidla MTBSTFA oproti jiným silylovým derivátům spočívá ve zvýšené reaktivitě vůči funkčním skupinám, kratšímu reakčnímu času a zvýšenou odolností vůči hydrolyze MTBSTFA a z těchto důvodů bylo toto činidlo použito v analýze. Tato metoda analýzy Hyp byla validována a limit detekce kostního hydrolyzátu byl stanoven na hodnotu 0,233 mol/l [45].

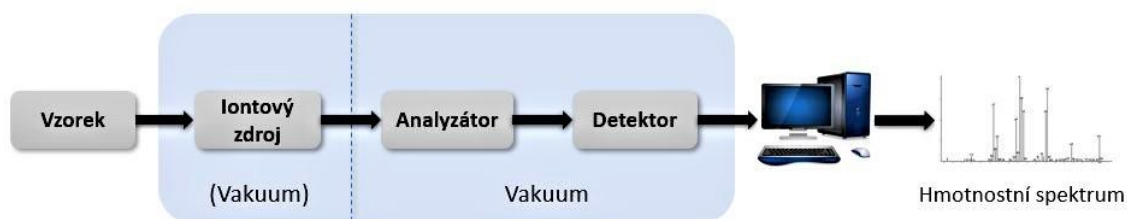
Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí je typická především pro analýzu látek nepolárního charakteru. Látky, které pro archeology nesou důležité informace o stravování a jsou chráněny v kostních lamelách, jsou lipidy. Tyto látky jsou méně náchylnější ke kontaminaci půdními lipidy, a proto jsou pro paleodietární studie slibnější, je ovšem složitější je klasicky vyextrahovat [46]. Metoda, která se typicky používá pro analýzu nepolárních látek jako mastných kyselin a lipidů po rozštěpení na menší molekuly (např. ze střepů keramiky) se nazývá GC-C-IRMS a je v archeologických studiích jednou z nejvyužívanějších metod analýzy izotopů. GC-C-IRMS může být využita obdobně jako kapalinová chromatografie u analýzy polárních látek (aminokyselin, sacharidů) [39].

C. Colonese a kol. (2015) porovnali dva postupy extrakce lipidů z kosti (lidských i zvířecích) a zkoumali analýzu těchto látek pomocí GC-MS a GC-C-IRMS. V prvním, jednodušším postupu je k nadrcené kosti přidán methanol a vzorek je ultrasonifikován po dobu 15 min. Poté se vzorek zahřívá s kyselinou sírovou na 70 °C, je centrifugován a odebraný supernatant se extrahuje hexanem a neutralizuje se uhličitánem draselným. Takto připravený vzorek se suší proudem dusíku (postup 1). Druhý postup je po počátečním nadrcení kosti rozšířen o extrakci směsí rozpouštědel dichlormethanu/methanolu (2:1 v/v), po které následuje ultrasonifikace, centrifugace a supernatant je odebrán. Kostní prášek je vysušen proudem dusíku a následuje provedení výše uvedeného postupu 1 (postup 2). Lipidové extrakty (lidské i zvířecí kosti) vzorků připravené oběma postupy vykazovaly při porovnání podobné složení. Obsahovaly hlavně nasycené mastné kyseliny se sudými čísly uhlíku, deriváty cholesterolu, mononenasycené mastné kyseliny a kyselinu linolovou, ovšem extrakty připravené postupem 2 vykazovaly daleko nižší nebo nulový obsah ftalátů (kontaminace změkčovadel). Výsledky GC-MS ukazují, že lze pomocí postupu 2 odstranit kontaminanty ze vzorků archeologické kosti, naopak celková koncentrace lipidů je nižší než u výsledků z postupu 1. Podstatnou informací je rozdělení kostních lipidů na endogenní a exogenní, které bývají odstraněny v kroku extrakce organickými

rozpouštědly. Endogenní lipidy jsou přítomny v osteocytech nebo jsou vázány na minerální matici, z tohoto důvodu jsou odolnější vůči extrakci rozpouštědlem a dá se předpokládat, že jsou přímo odvozené od typu stravování zkoumaného organismu – typ mořský, suchozemský C<sub>3</sub>, suchozemský C<sub>3</sub>/mořský, nebo suchozemský C<sub>4</sub>. Tyto informace poskytuje analýza izotopů  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$  (vyjádřeno v ‰) lipidových extraktů pomocí GC-C-IRMS a výsledné hodnoty mastných kyselin je možné porovnat i z izotopové analýzy kolagenu. V porovnání s kolagenem ze stejných vzorků jsou mastné kyseliny trvale ochuzeny o <sup>13</sup>C a tento úbytek vysvětlují základní rozdíly mezi biosyntézou kolagenu a mastných kyselin. Proto je toto porovnání s kolagenem a s jednotlivými aminokyselinami vhodné za účelem identifikace zdroje potravních bílkovin, lipidů a sacharidů s větší přesností. Navíc díky faktu, že přeměna (vznik/zánik) jednotlivých lipidů v kostech probíhá mnohem rychlejší než v kolagenu můžeme tyto informace využít při hlubším studiu a identifikaci stravovacích návyků daného jedince [46].

### 2.3.1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je základní analytická technika, která se využívá k identifikaci neznámých látek, ke kvantifikaci známých materiálů, k objasnění struktury a chemických vlastností různých látek. Základním principem analýzy je ionizace jednotlivých látek ve vzorku pomocí vhodného iontového zdroje. V případě měkké ionizační techniky je vzorek „pouze“ ionizován, zatímco u tvrdé již dochází k vysoké (cílené) fragmentaci. Hmotnostní spektrometr (Obrázek 5) generuje ionty ze zkoumaného vzorku, které jsou charakterizovány jejich poměrem hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a relativní intenzitou a výsledná spektra bývají porovnávána s referenčními spektry v počítačové knihovně [47].



**Obrázek 5:** Schéma hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometrie se nejčastěji používá v souvislosti s analýzou kostní tkáně pro analýzu vysokomolekulárních látek – např. proteinů. Tato technika je klíčová v proteomických experimentech, které se zabývají komplexním studiem proteinů, a umožňuje přesné stanovení molekulární hmotnosti peptidů a jejich sekvencí. Tyto informace lze velmi dobře využít pro identifikaci proteinů, de novo sekvenování a identifikaci posttranslačních modifikací [47].

Pro stanovení typu jednotlivých proteinů v kostech je také nezbytná analýza jednotlivých nízkomolekulárních látek – aminokyselin nebo peptidů, ze kterých je protein/peptid složen. Stanovení složení aminokyselin v peptidech se skládá ze dvou kroků: 1) hydrolýzou vzorku a 2) kvantifikací uvolněných aminokyselin. Samotná hydrolýza může být provedena v kapalně, nebo v plynné fázi, při které je riziko kontaminací činidlem hydrolýzy výrazně potlačeno (6 M HCl, nebo merkaptoethansulfonová kyselina). Kapalnou hydrolýzu můžeme dále dělit na kyselou a bazickou. Kyselá hydrolýza se nejčastěji provádí pomocí HCl, je ovšem časově náročná – k dosažení kvantitativního štěpení peptidových vazeb potřebujeme desítky hodin. Bazická hydrolýza se používá ke stanovení fosfo-aminokyselin pomocí KOH, nebo NaOH [48]. Pokud štěpení na jednotlivé aminokyseliny není optimální metodou, může být zvolena enzymatická hydrolýza pomocí proteáz (peptidáz). Nejznámější jsou trávicí enzymy trypsin, chymotrypsin a žaludeční enzym pepsin. Trypsin a chymotrypsin jsou serinové proteázy, jsou využívány pro studium primární struktury polypeptidového řetězce a jsou považovány za vysoce specifické, neboť štěpí přesně dané peptidové vazby. Trypsin štěpí protein/polypeptid na karboxylovém konci aminokyselin argininu a lysinu, chymotrypsin jej štěpí na karboxylovém konci aromatických aminokyselin tyrozinu a fenylalaninu. Naopak pepsin štěpí protein/polypeptid v oblasti kyselého pH a je zde vybrán jako příklad nespecifického enzymu, neboť štěpí řetězec na libovolném místě [7].

Mezi nejčastěji používané ionizační techniky používané v hmotnostní spektrometrii organických (biologických) molekul patří ionizace elektrosprejem (ESI-MS) a hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za spoluúčasti matrice (MALDI-MS). Obě metody jsou porovnatelné v kvantitativní analýze nízkomolekulárních látek [49]. Hlavním rozdílem je však stav, ve kterém je vzorek zaveden do iontového zdroje. ESI-MS využívá solvatované vzorky a z toho důvodu bývá často v kombinaci s kapalinovou chromatografií, naopak MALDI-MS je vhodná

pro měření vzorků v pevném stavu. Aplikace MALDI a ESI jsou zdrojem inspirace pro novější typy ionizace, např. povrchem zesílená laserovou desorpce/ionizace (SELDI), která kombinuje sílu MALDI se selektivitou techniky proteinových čipů [50].

Obecně je u MALDI technik použit obdobný postup přípravy vzorků jako u ESI. Nejprve jsou proteiny (peptidy) buď kyselí (HCl) nebo enzymaticky (štěpení trypsinem) hydrolyzovány a poté jsou zředěny destilovanou vodou na požadovanou koncentraci. Následně jsou napipetovány (tzv. spotting) na kovovou vzorkovací destičku a nechají se zaschnout. V závěru jsou takto nachystané vzorky překryty vhodnou maticí. Volba vhodné matrice je klíčovým krokem pro správnou analýzu a existuje několik nejčastěji využívaných matic (Tabulka I). Takto připravené vyschlé vzorky jsou připraveny na měření [49].

**Tabulka I:** Přehled nejčastěji používaných matic v MALDI-MS analýze a jejich použití [51]

Chemická látka	Používaná chemická zkratka	Aplikace
kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxybenzoová	CHCA	peptidy, polymery
kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	DHB	peptidy, proteiny, polymery
kyselina sinapová	SA	proteiny, peptidy, polymery
2,4,6-trihydroxyacetofenon	THAP	oligonukleotidy
kyselina 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoová	HABA	glykolipidy, peptidy, proteiny
kyselina 3-hydroxypikolinová	HPA	oligonukleotidy, peptidy, glykoproteiny
5-chloro-2-merkaptobenzothiazol	CMBT	proteiny, peptidy
3-aminochinolin	3-AQ	peptidy, sacharidy, nukleotidy, polymery

MALDI-MS obecně umožňuje analyzovat velký počet vzorků při jednom měření, doporučena je ovšem opakovatelnost měření a je kladen důraz na čistoty vzorků a jejich nanášení (přesné pipetování na kovovou destičku) [6]. Pro kvalitativní analýzu aminokyselin a organických látek je vhodnější použít MALDI-MS/MS, která v některých případech umožňuje rozlišit izobarické a izomerní sloučeniny (s výjimkou leucinu

a isoleucinu). Pro oddělení tohoto typu sloučenin je výhodnější použít MALDI-MS/MS v kombinaci s iontovou mobilitou [53]. Další možností je distribuci nízkomolekulárních látek (léčiva, lipidy, peptidy) v kostních tkáních pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MALDI-MSI), tzv. imaging. Identifikace, která je prováděna přímo na kostní tkáni po štěpení proteinů (nejčastěji enzymatickém), je velmi výhodným typem analýzy. Ovšem pro důkladnou analýzu kosti, která by vykazovala vysokou citlivost, lze MALDI-MSI použít opět s kombinovanou metodou, buď s hmotnostním detektorem doby letu iontů (TOF), nebo využít kombinaci s iontovou mobilitou. Právě MALDI-MSI s iontovou mobilitou, která má schopnost oddělit izobarické ionty, lze také použít pro identifikaci peptidů, umožňuje detekovat jejich větší množství a zapříčiňuje vyšší spolehlivost jejich identifikace [53].

Jak již bylo zmíněno, u metody MALDI imaging se analyzují pevné vzorky, které musí být před analýzou připraveny. V určitých případech lze analyzovat čerstvě zmrazený řez kosti. Jedním z příkladů může být studie A. Svirikova a kol. (2018), ve které se vzorek kosti (kuřecí pařát) zalije do hydrogelu obsahujícího karboxymethylcelulózu a želatinu (5:20 %, w/v), poté dochází k jeho zmrazení při  $-557\text{ }^{\circ}\text{C}$  a uchycení na speciální držák vzorku pomocí 10% tragantu (typ pryskyřice, w/v). Jednotlivé řezy (o tloušťce  $12\text{ }\mu\text{m}$ ) byly vytvořeny pomocí jednorázového nože z karbidu wolframu při  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vzorky se dosušily v exsikátoru a byly připevněny k destičce lepicí páskou [54]. Další studie Y. Fujino a kol. (2016) zkoumající stehenní krysí kost porovnávala různé typy fixace kosti a účinnost MALDI-MSI u klasické a odvápněné kosti. Tato studie ukázala, že fixace a odvápnění kostí usnadňuje přípravu řezů a odstranění minerálů je nutným krokem k detekci organických složek v kosti. Jednou z možných metod fixace je tkáň fixovaná formalínem a zalitá do parafinu (FFPE) a může být použita, aby nedošlo k degradaci a znehodnocení vzorků. Dochází ovšem k zesítnění mezi formalínem a primárními aminy, které tedy nemohou být ionizovány. FFPE je tedy vhodnou volbou pro výzkum zaměřený na analýzu nukleotidů, lipidů nebo peptidů bez primárních aminů. Další možností jsou organická rozpouštědla (např. ethanol), která mohou také fixovat tkáň koagulací a srážením proteinů. Fixace organickými rozpouštědly má menší dopad na analýzu MALDI-MSI, ale rozpouští lipidy z tkání. Z výše uvedených informací vyplývá, že u MALDI analýz bývá klíčovým krokem výběr vhodně zvolené matrice, nebo typ fixace kosti [55].

### 2.3.2 Analýza archeologicko-antropologických a paleontologických kosterních pozůstatků

Analýza kolagenu má velké využití v oblasti archeologických výzkumů, neboť z analýzy kolagenu můžeme získat přehled o životních podmínkách obratlovců (tedy i člověka), pomocí analýzy stabilních izotopů uhlíku a dusíku. Stabilní izotopové poměry z archeologického kostního kolagenu se považují za dobré indikátory, ovšem záleží na dostatečném zachování kostí a jejich kvality. Za kritérium kvality kolagenu se nejčastěji používá molární (nebo hmotnostní) poměr  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$ , který zjistíme analýzou pomocí MS s CHN analyzátozem. Pomocí tohoto poměru izotopů v kolagenu typu I se dají zjistit informace o stravovacích návycích daného jedince. Degradace kostního proteinu po smrti je připisována hlavně aktivitě mikroorganismů a v důsledku tohoto procesu bývá aminokyselinový profil kolagenu změněn, protože mikroorganismy přednostně metabolizují aminokyseliny s vyšším počtem atomů uhlíku jako zdroj energie [56].

Vzorek kolagenu z kostní tkáně se pro chemickou analýzu získává z kostní tkáně různými postupy, nejčastěji extrakcí. Tento krok bývá přítomen u většiny analýz archeologických kostí a je velmi důležitým krokem, neboť zvyšuje pravděpodobnost vyšší kvalifikace a kvantifikace aminokyselin, nebo izotopů. Z různých výzkumů existují kolagenové extrakční protokoly, v některých používají nadrcený kostní prášek, v jiných je přidán do postupu krok „želatinizace“, někdy je následován krok filtrace (ultrafiltrace). Vědci z univerzity v Kapském Městě používají ke kolagenové extrakci vyříznutý kousek kosti (drobivá, křehčí část kosti, asi 0,5 g, očištěná brusným papírem), který je ponořen do 0,2 M HCl při pokojové teplotě. Kyselina se mění každý druhý den, dokud zbytky kostí nevykazují známky pseudomorfózy (tj. odvápněné, na první pohled průsvitné, trvá do 10 dnů). Poté se vzorek promyje destilovanou vodou, ponoří se do roztoku 0,1 M NaOH (k odstranění kontaminujících látek) a po 24 hodinách se vzorek ponoří do destilované vody po dobu jednoho týdne. V posledním kroku byly vzorky kolagenu lyofilizovány. Druhý postup extrakce kolagenu, který využívá Max Planckův Institut pro Evoluční Antropologii, používá rozdrčenou kost, která se udržuje 48 hodin v 1 M HCl. Vzorek kosti se poté uchovává 6-20 dní ve studené 0,5 M HCl (výsledkem jsou opět průsvitné a pružné vzorky). Po odvápnění nastává proces želatinizace při 70 °C, následuje ultrafiltrace a centrifugace, při které se odstraní frakce menší než 30 kDa.

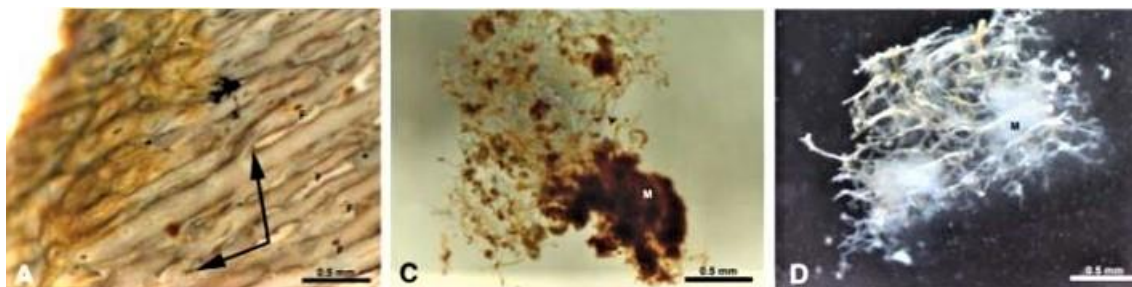
Před krokem centrifugace vzorků byly centrifugační zkumavky s filtrem promyty 0,5 M NaOH a poté deionizovanou vodou. Poté následuje odpipetování samotného želatinového kolagenu, zmrazení přes noc (při  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a posledním krokem je následná lyofilizace. Kolagen se dále spaluje na dusík a oxid uhličitý v automatizovaném uhlíkovém a dusíkovém analyzáru se spojitým prouděním izotopového hmotnostního spektrometru. Z porovnání výsledků těchto dvou postupů vyplývá, že se výrazně neliší, ovšem v druhém postupu se hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  díky použití 0,5 M NaOH zvýšily v průměru o 0.3 ‰ [57].

Ovšem aby byl získán čistý kolagen z kosti, využili autoři M. C. Hüls a kol. (2007) jiného postupu. Kost se promyje acetonem, nadrtí a nechá se demineralizovat při pokojové teplotě pomocí 1% roztoku HCl k odstranění minerální části kosti (kontroluje se  $\text{pH} < 1$ ). Následuje šetrná extrakce huminových kyselin z kosti, které ji mohou z půdy kontaminovat. Tato extrakce se provádí při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny promýváním kosti v 1% roztoku NaOH, poté vodou, opět 1% roztoku HCl, a nakonec se kost opět promyje vodou. Organický zbytek se pak zahřívá na  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  v ultračisté vodě o  $\text{pH} = 3$ , kde dochází k želatinizaci a rozpuštění kolagenových proteinů. Rozpuštěná želatina se poté filtruje přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr s póry Ag, aby se odstranil nerozpuštěný organický materiál, a takto se připravený kolagen nechá lyofilizovat [58]. V této práci je uvedeno pouze několik možných postupů k extrakci kolagenu, ovšem všechny výše zmíněné postupy spojuje proces demineralizace kosti a lyofilizace kolagenu.

Dalším typem vzorků, se kterými se archeologové setkávají, jsou fosilní vzorky. Dlouhou dobu se předpokládalo, že proces fosilizace má za následek destrukci prakticky všech původních organických složek v organismu. Dalším předpokladem bylo, že původní molekuly budou ztraceny nebo degradovány v relativně krátkém časovém rozpětí (vzorky starší méně než milion let). Dnes je ale známo, že určitých podmínek mohou zbytky organických složek v geologickém čase přetrvat. M. H. Schweitzer a kol. (2005, 2007) publikovali práce o zachovaných kostech *Tyranosaura Rexe* pohřbených ve středně zrnitém pískovci. Demineralizace fragmentů (Obrázek 6) stehenní a holenní kosti odhalila uchování vláknitých, pružných a zjevně původních tkání. K analýze takového vzorku byly využity zobrazovací techniky jako AFM, transmisní elektronová mikroskopie a analytická technika hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s detektorem doby letu (TOF-SIMS). Přítomnost 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylyzinu



v extraktech organického materiálu je považována za přímý důkaz přítomnosti kolagenu. Kolagen byl analyzován pomocí TOF-SIMS a nejhojněji zastoupenou aminokyselinou je glycin, druhou detekovanou aminokyselinou je alanin a tyto dvě aminokyseliny Gly:Ala vystupují v poměru 2,6:1. Při porovnání s pštrosí kostí vykazuje kost Tyransaura stejný proces demineralizace v kosti a stejné štěpení cév, navíc byl porovnán poměr Gly:Ala kuřecího kolagenu, jehož hodnota činila 2,5:1, a je téměř totožný s poměrem aminokyselin v kolagenu Tyransaura [59,60].



**Obrázek 6:** Demineralizace kortikální kosti odhalující přítomnost měkkých struktur. (A) Částečná demineralizace fragmentu kortikální kosti T. Rexe ukazuje vznikající síť vaskulárních kanálů, z nichž některé jsou rozdvojené (šipky). Všechny jsou v souladu s Haversovými kanály (C) Úplná demineralizace odhalující průhledné pružné cévy ve zbytcích kortikální kostní matrice, představované hnědou amorfni látkou (označenou M). (D) Pštrosí céva po demineralizaci kortikální kosti a následném štěpení vláknité kolagenní matrice. Průhledné cévy se rozvětvují a zůstávají spojeny s malými oblastmi nestrávené kostní matrice, zde viděné jako amorfni bílý vláknitý materiál (označený M); přiblížení 0,5 mm [59].

U vzorků fosilií starších 1 milion let je již velmi obtížné detekovat původní organické látky z důvodu jejich celkového rozkladu. Nicméně, pokud jsou v okolním sedimentu obsaženy vyšší koncentrace sloučenin železa, může dojít ke „konzervaci“ sledovaných organických látek. Jedná se o nestabilními kovové ionty, které vytvoří volné radikály reagující s organickými molekulami za vzniku polymerů. Předpokládá se, že nestabilní kovové ionty pocházejí z postmortální degradace biomolekul dinosaurů obsahujících železo, jako je např. hemoglobin, myoglobin a případně cytochrom. Tedy v určitých kostních částech došlo k nenávratnému zesítnění původních proteinových molekul, které se propojily s podobnými molekulami, minerálními, nebo exogenními organickými složkami [60].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K vyvinutí metody pro analýzu nízkomolekulárních látek byla použita lidská stehenní kost (Obrázek 7) z 11. století (raný středověk) nalezená během archeologického průzkumu na Vídeňské ulici v Brně a v této práci bude dále nazývána jako referentní. Metoda byla otestována na paleontologických kostech, které jsou zařazeny do doby staršího pliocénu (stáří zhruba 2 mil. let).



**Obrázek 7:** Referentní kost

#### 3.1 Chemikálie

V této práci bylo pro vyvinutí metody použito několik chemikálií:

- Kyseliny: kyselina chlorovodíková, kyselina octová, kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxybenzoátová, kyselina trifluoroctová;
- Rozpouštědla: methanol, ethanol, hexan, aceton, chloroform, acetonitril;
- Derivatizační činidla: Met-Prep II, N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA), hexamethyldisilazan;

- Další chemikálie: hydroxid sodný, pyridin, hydrochlorpyridin, fenol, samopolymerující methylmetakrylátová adhezivní pryskyřice SpofaDental (Spofacryl), trypsin, destilovaná voda.

## 3.2 Přístroje

Seznam přístrojového vybavení a laboratorních pomůcek:

- Analytické váhy: Mettler Toledo XSE205 (Mettler Toledo, Columbus, USA)
- Frézka: PROXXON 28515 MICROMOT 50/E
- pH-metr: inoLab (WTW, Německo)
- Magnetická míchačka s ohřevem: Heidolph Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Digitální blokový ohřívač: Stuart SBH130D (Cole Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA)
- Lyofilizátor ALPHA 1-2/ LD plus (Christ GmbH, Německo)
- Sprejovací přístroj SunCollect (SunChrom, Friedrichsdorf, Německo)
- Stříkačkové nylonové filtry: LUT syringe, průměr 25 mm a pórovitost 0,45  $\mu\text{m}$  (LABICOM, Olomouc, ČR)
- Brusné papíry o hrubostech 360, 800 a 1000: Hermes Abrasives Ltd (Colchester, Velká Británie)
- Automatické mikropipety
- Laboratorní sklo, vialky se septem, plastová zkumavka s víčkem

### 3.2.1 Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

Pro analýzu látek v kosti byl použit plynový chromatograf Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C (Agilent Technologies). V této práci je nastavení GC-MS systému dvojího typu – metoda s automatickým dávkováním a metoda s manuálním nástřikem. U metody s automatickým dávkováním byly nastaveny následující parametry: doba analýzy 38 min; počáteční teplota kolony byla 70 °C; teplotní gradient: 0-1 min 70 °C, poté se teplota zvyšovala rychlostí 10 °C/min až do teploty 300 °C udržované 12 min, následně se teplota zvyšovala rychlostí 20 °C/min do teploty 320 °C udržované 1 min; objem nástřiku byl 1  $\mu\text{l}$ ; použitá kolona Agilent 19091S-431UI (Agilent Technologies); nosným plynem byl dusík; MS skenovací rozsah byl 40-800 Da.

Druhým typem analýzy je metoda s manuálním nástřikem na stejném přístroji, u které byly nastaveny následující parametry: doba analýzy 47 min; počáteční teplota kolony byla 70 °C; teplotní gradient: 0-1 min 70 °C, poté se teplota zvyšovala rychlostí 10 °C/min až do teploty 300 °C udržované 12 min, následně se teplota zvyšovala rychlostí 20 °C/min do teploty 320 °C udržované 10 min; objem nástřiku byl také 1 µl, jako nosný plyn byl použit dusík a MS skenovací rozsah byl 40-800 Da

### **3.2.2 Vysokorozlišovací tandemový hmotnostní spektrometr s laserovou desorpcí/ionizací**

Pro analýzu látek *in situ* byl použit vysokorozlišovací tandemový hmotnostní spektrometr s laserovou desorpcí/ionizací Synapt G2-S (Waters, MA, USA), měření proběhlo v pozitivním módu, skenovací rozsah byl 100-1500 Da, energie laseru byla 250 (v arbitrárních jednotkách) a jeho frekvence byla 1000 Hz. Kolizní energie byla nastavená v první cele na 4 eV a v druhé kolizní cele na 2 eV, skenovací čas byl nastaven na 1 s a velikost pixelu byla nastavena na 50x50 µm.

## **3.3 Postup**

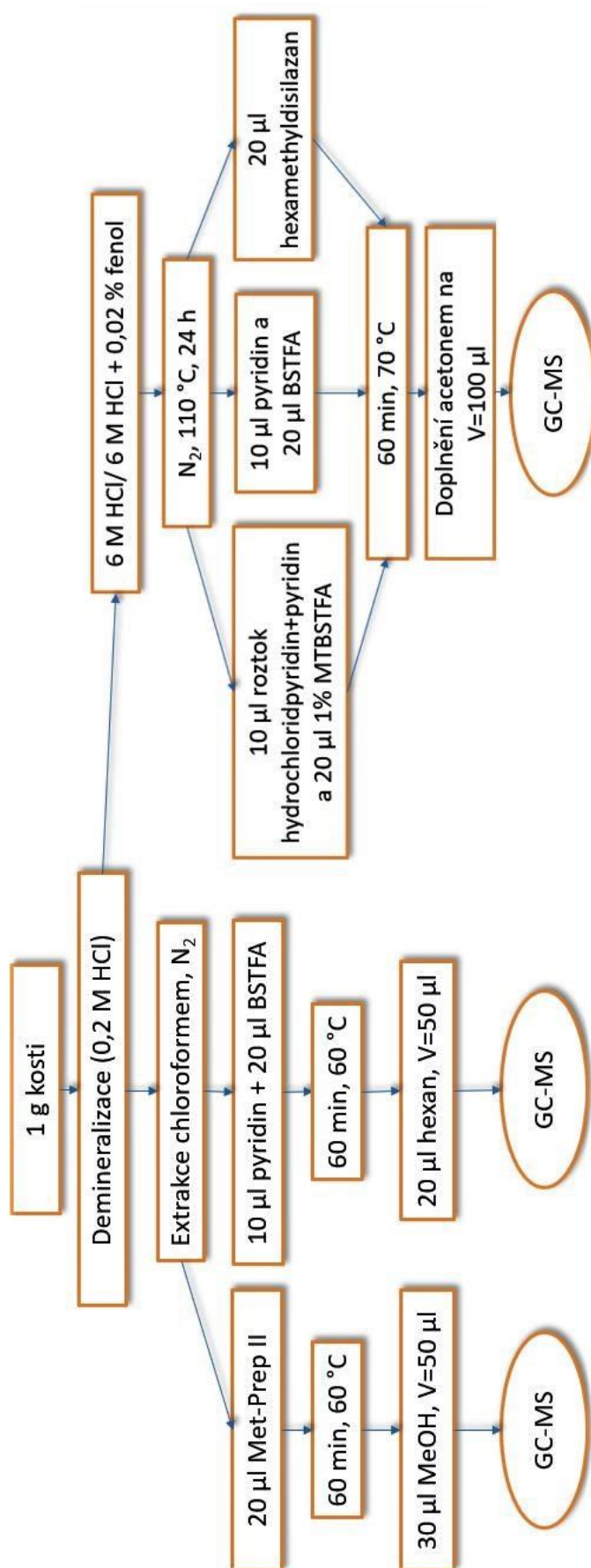
### **3.3.1 Proces demineralizace kosti, extrakce kolagenu a derivatizace**

Všechny vzorky analyzovaných kostí byla v prvním kroku demineralizovány. Z referentní kosti byly vyřezány 2 čtverečky (každý o hmotnosti 0,5 g), které byly demineralizovány ponořením do 0,2 M HCl (každý kousek zvlášť). Kyselina byla vyměňována u obou vzorků kosti každý druhý den po 10 ml až do celkového objemu 100 ml (tj. 20 dnů). Po procesu demineralizace byly kosti nechány v destilované vodě po dobu 24 h, poté byly promyty ethanolem a vysušené na vzduchu. pH roztoku HCl bylo po demineralizaci upraveno na pH 7 pomocí NaOH a celý objem se 3x extrahoval chloroformem v dělicí nálevce (na každou extrakci bylo použito 10 ml CHCl<sub>3</sub>). Chloroformový extrakt byl stejnoměrně rozdělen do 2 vialek a po od foukání dusíkem do sucha byl připraven k procesu derivatizace. Do vialky č. 1 bylo napipetováno 20 µl derivatizačního činidla Met-Prep II, do vialky č. 2 bylo přidáno 10 µl pyridinu a 20 µl silylačního činidla BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) a obě vialky byly zahřívány na teplotu 60 °C po dobu 60 min [61]. Po vychladnutí vialek bylo do vialky č. 1 přidáno 30 µl methanolu a do vialky č. 2 přidáno 20 µl hexanu. Celkový objem 50 µl

obou vzorků byl přepipetován do inzertu a tímto postupem byly vzorky připraveny pro analýzu GC-MS.

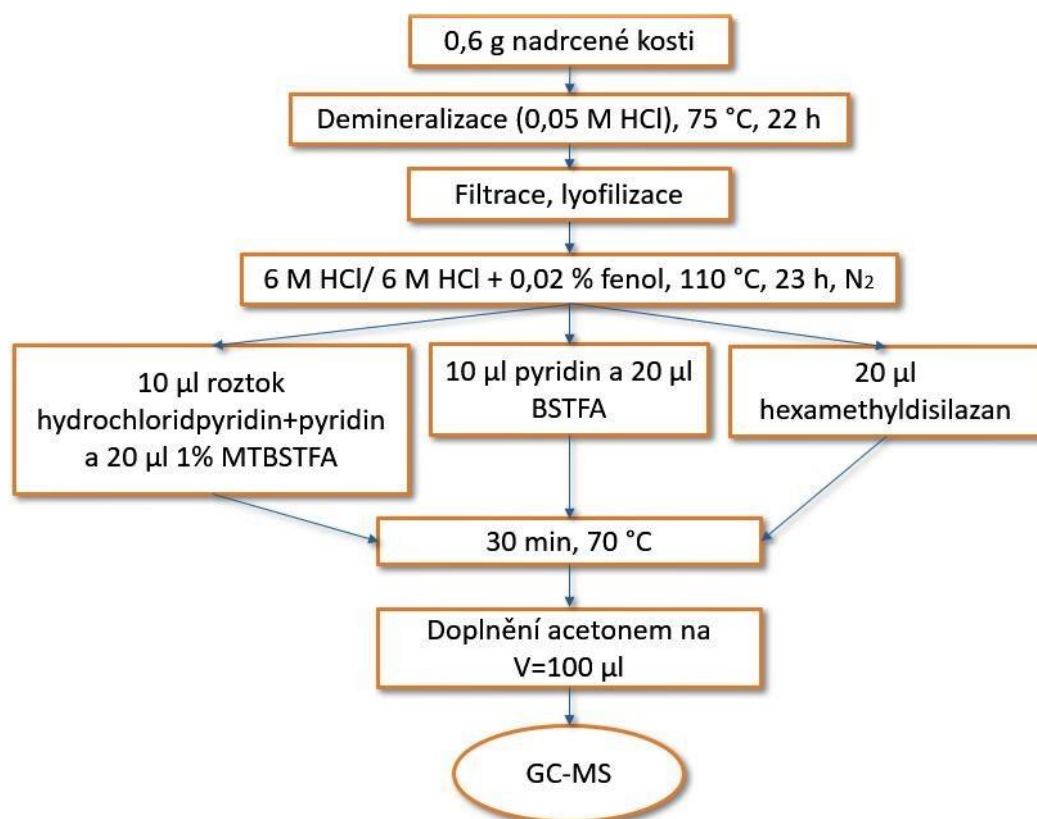
Demineralizovaná kost byla použita pro analýzu aminokyselin z kosti. Po demineralizaci a vysušení byly čtverečky kostí rozděleny do 18 vialek (navážky kostí byly v rozmezí 2,19 až 3,6 mg kosti). K devíti vzorkům byla přidána 6 M HCl a ke zbylým devíti 6 M HCl s přidavkem fenolu (obsah 0,02 % ve finálním roztoku). Přítomnost fenolu během hydrolyzy pomáhá udržet stabilní některé aminokyseliny, např. tyrozin, fenylyalanin a histidin (chrání před oxidací/celkovou hydrolyzou) [48]. Poměr mezi navážkou kosti a objemem kyseliny je 1 mg kosti na 100  $\mu$ l roztoku HCl. Po přidání kyseliny byly vialky naplněny dusíkem a hydrolyzovány po dobu 24 h při teplotě 110 °C. Po vychladnutí vialek byly vzorky odfoukány dusíkem do sucha a následně derivatizovány. Vzorky hydrolyzovány pomocí 6 M HCl byly poté rozděleny na tři samostatné skupiny. Stejně rozdělení bylo provedeno také u vzorků hydrolyzovaných pomocí 6 M HCl s fenolem. Do první skupiny vialek bylo přidáno 10  $\mu$ l hydrochlorpyridinu s pyridinem (40 mg hydrochlorpyridinu bylo rozpuštěno v 1 ml pyridinu) a 20  $\mu$ l derivatizačního činidla MTBSTFA (N-methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid). Do druhé skupiny bylo přidáno 20  $\mu$ l činidla BSTFA a 10  $\mu$ l pyridinu a do třetí skupiny bylo přidáno 20  $\mu$ l činidla hexamethyldisilazan. Všechny vzorky byly silanizovány po dobu 60 min při teplotě 70 °C. Po zchladnutí byly vzorky doplněny na finální objem 100  $\mu$ l acetonem, přepipetovány do inzertu a analyzovány pomocí GC-MS.

Pro lepší orientaci je na obrázku 8 zobrazeno schéma výše zmíněného postupu pro detekci tuků a aminokyselin z referentní kosti a pro přehlednost práce bude tento postup dále zmiňován jako **postup 1**.



Obrázek 8: Schéma postupu 1

Další možností, jak úspěšně detekovat aminokyseliny v kosti, je využití postupu s vyextrahováním kolagenu z kosti. Současně je v tomto postupu doba procesu demineralizace kratší než v postupu 1. Z referentní kosti byly odřezány bruskou malé kousky, které byly nadrceny v třecí misce. Nadrcené množství 611,41 mg kosti bylo zalito 5 ml 0,05 M HCl, zahřáto na teplotu 75 °C a celý proces demineralizace trval 22 h. Po zchladnutí byl roztok přefiltrován přes stříkačkový nylonový filtr, filtrát byl vložen do mrazáku a následně byl lyofilizován. Do dvou vialek bylo odváženo vždy 10 mg zlyofilizovaného kolagenu, do první vialky bylo přidáno 500 µl 6 M HCl a do druhé bylo napipetováno 500 µl 6 M HCl s přídavkem fenolu (obsah 0,02 % ve finálním roztoku). Poměr 1 mg pevného vzorku na 100 µl hydrolyzačního roztoku byl upraven (zmenšen) pro rychlejší odfoukání vzorku po hydrolyze při teplotě 110 °C po dobu 23 h. Vzorek hydrolyzovaný pomocí 6 M HCl byl rozdělen do třech vialek po 150 µl (opět do třech skupin jako v prvním postupu), kde byl do sucha odfoukán dusíkem. Stejný postup byl opakován i u vzorku hydrolyzovaného pomocí 6 M HCl s přídavkem fenolu. Do první skupiny bylo přidáno 10 µl hydrochlorpyridinu s pyridinem a 20 µl derivatizačního činidla MTBSTFA, do druhé skupiny bylo přidáno 20 µl činidla BSTFA a 10 µl pyridinu. Do třetí skupiny bylo přidáno 20 µl činidla hexamethyldisilazan. Všechny vzorky byly silanizovány po dobu 30 min při teplotě 70 °C. Po zchladnutí byly vzorky byly doplněny na objem 100 µl acetonem, přepipetovány do inzertu a analyzovány pomocí GC-MS. Tento postup bude dále označován jako **postup 2** a jeho schéma je zobrazeno na obrázku 9.



**Obrázek 9:** Schéma postupu 2

### 3.3.2 Optimalizace postupu extrakce kolagenu

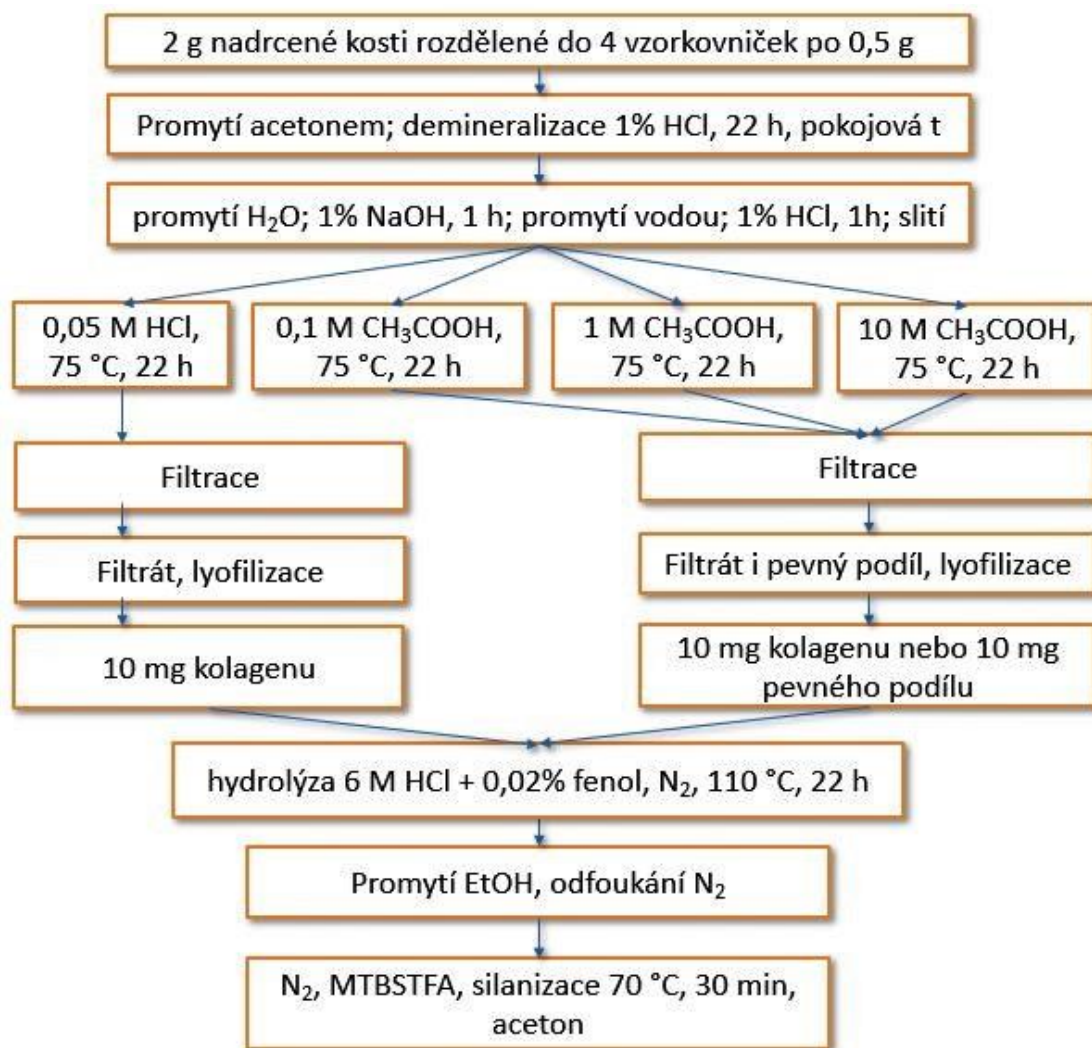
V této podkapitole bude popsán vliv různých kyselin pro kvalitní vyextrahování kolagenu. Z referentní kosti byly odřezány a nadrceny 2 g kosti, které byly rozděleny po 0,5 g do čtyř vzorkovniček. Nadrcené vzorky byly promyty acetonem a pomocí 10 ml 1% (0,27 M) roztoku HCl byla provedena demineralizace kosti – roztok s kostí byl nechán za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 22 h a kyselina byla během této doby vyměněna minimálně 3x (3x10 ml), neboť v průběhu demineralizace dochází k neutralizaci demineralizačního roztoku. Po demineralizaci byly vzorky s nadrcenou kostí promyty vodou, následně bylo do každé vialky přidáno 5 ml 1% (0,17 M) roztoku NaOH a vzorky se nechaly hodinu při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opět promyty vodou, přidalo se 5 ml 1% roztoku HCl a vzorky se opět nechaly hodinu při pokojové teplotě (proces k odstranění huminových kyselin z kosti) [58]. Po tomto odstranění byla provedena extrakce čtyřmi různými kyselinami. K prvnímu vzorku bylo přidáno 5 ml 0,05 M HCl, k druhému bylo přidáno 5 ml 0,1 M kyseliny octové, do třetího vzorku bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a do posledního vzorku bylo přidáno stejné množství



10 M kyseliny octové a všechny vzorky byly udržovány při teplotě 75 °C po dobu 22 h. Po zchladnutí byly vzorky zfiltrány přes stříkačkový nylonový filtr a pro klasickou analýzu aminokyselin byla využívána část filtrátu (každého vzorku). Po jejich lyofilizaci byl získán pevný vyextrahovaný podíl (Obrázek 10), ze kterého bylo vždy odváženo 10 mg. Do vialek se septem s odváženým podílem bylo přidáno optimalizované množství 100 µl 6 M HCl s přídatkem fenolu (0,02 %), vialky byly odvakovány, napuštěny dusíkem a byla provedena hydrolyza při teplotě 110 °C po dobu 22 h. Po zchladnutí byly vzorky odfoukány do sucha dusíkem, poté k nim bylo přidáno 40 µl ethanolu, vzorky byly znovu odfoukány dusíkem a proces s ethanolem a vysušením byl zopakován ještě jednou. Do dokonale vysušených vzorků bylo vždy přidáno 10 µl roztoku hydrochlorpyridinu s pyridinem (stejně připraven jako v předešlých postupech) a 20 µl derivatizačního činidla MTBSTFA. Vzorky byly silanizovány po dobu 30 min při teplotě 70 °C. Po zchladnutí byly roztoky doplněny acetonem na objem 100 µl, přepipetovány do inzertu a analyzovány pomocí GC-MS. Aby byla zjištěna míra extrahovatelnosti kolagenu, ze vzorků extrahovaných pomocí 0,1, 1 a 10 M CH<sub>3</sub>COOH bylo odebráno vždy 10 mg lyofilizovaného pevného podílu neboli kosti (odděleného filtrací), byla provedena příprava vzorků na analýzu aminokyselin. Jedná se o stejný postup hydrolyzy a silanizace jako je uvedeno výše. Na obrázku 11 je zobrazeno schéma výše zmíněného postupu – **postupu 3**.



**Obrázek 10:** Příklad zlyofilizovaného kolagenu (extrakce 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH)



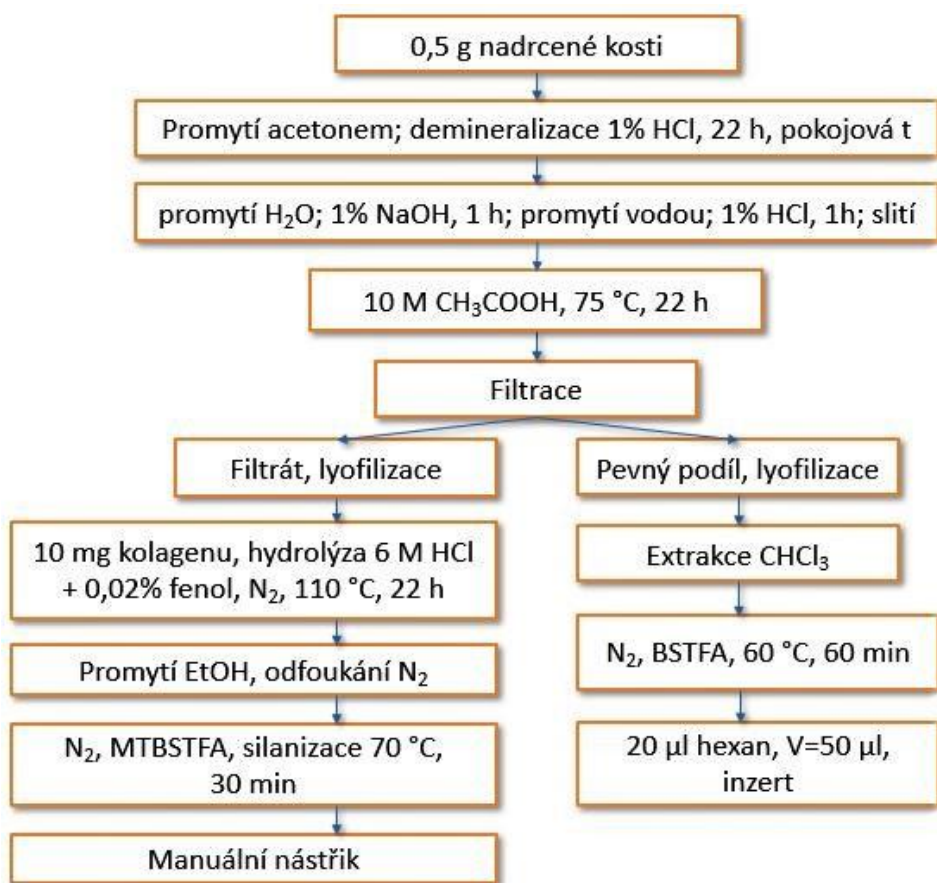
**Obrázek 11:** Schéma postupu 3

### 3.3.3 Finální postup pro celkovou analýzu kosti pomocí GC-MS

Z referentní kosti bylo odřezáno a nadrceno 0,5 g kosti, vzorek byl promytý acetonem a demineralizován pomocí 10 ml 1% roztoku HCl a po demineralizaci následoval proces k odstranění huminových kyselin z kosti (podrobnější popis v podkapitole optimalizace postupu extrakce kolagenu). Poté bylo ke vzorku přidáno 5 ml **10 M CH<sub>3</sub>COOH** k extrakci kolagenu a vzorek byl zahříván po dobu 22 h na teplotu 75 °C. Po zchladnutí byl vzorek přefiltrován přes nylonový stříkačkový filtr a obě části (filtrát i pevný podíl kosti) byly zlyofilizovány. Po procesu lyofilizace byl postup rozdělen na dvě části, část filtrátu byla připravena na analýzu aminokyselin a pevný podíl byl připraven na analýzu tuků a cholesterolu.

Část filtrátu: Po lyofilizaci bylo odváženo 10 mg kolagenu a byla provedena hydrolyza pomocí **6 M HCl s přídavkem fenolu**. Po hydrolyze následovalo odふうání dusíkem do sucha a proces silanizace pomocí činidla **MTBSTFA**. Tato část postupu probíhá stejně jako v postupu 3. Po procesu silanizace jsou vzorky manuálně nastříknuty do GC-MS systému.

Část pevného podílu: Po lyofilizaci byla provedena extrakce pomocí 4,5 ml chloroformu, extrakce proběhla třikrát po 1,5 ml a chloroformový extrakt byl odふうán dusíkem. Do vysušeného vzorku bylo přidáno 10 µl pyridinu a 20 µl činidla BSTFA a vzorek byl silanizován po dobu 60 min při teplotě 60 °C. Po zchlazení bylo přidáno 20 µl, vzorek byl přepitován do inzertu a analyzován GC-MS. Schéma tohoto postupu je zobrazeno na obrázku 12 a tento postup bude dále označován jako **finální postup**.



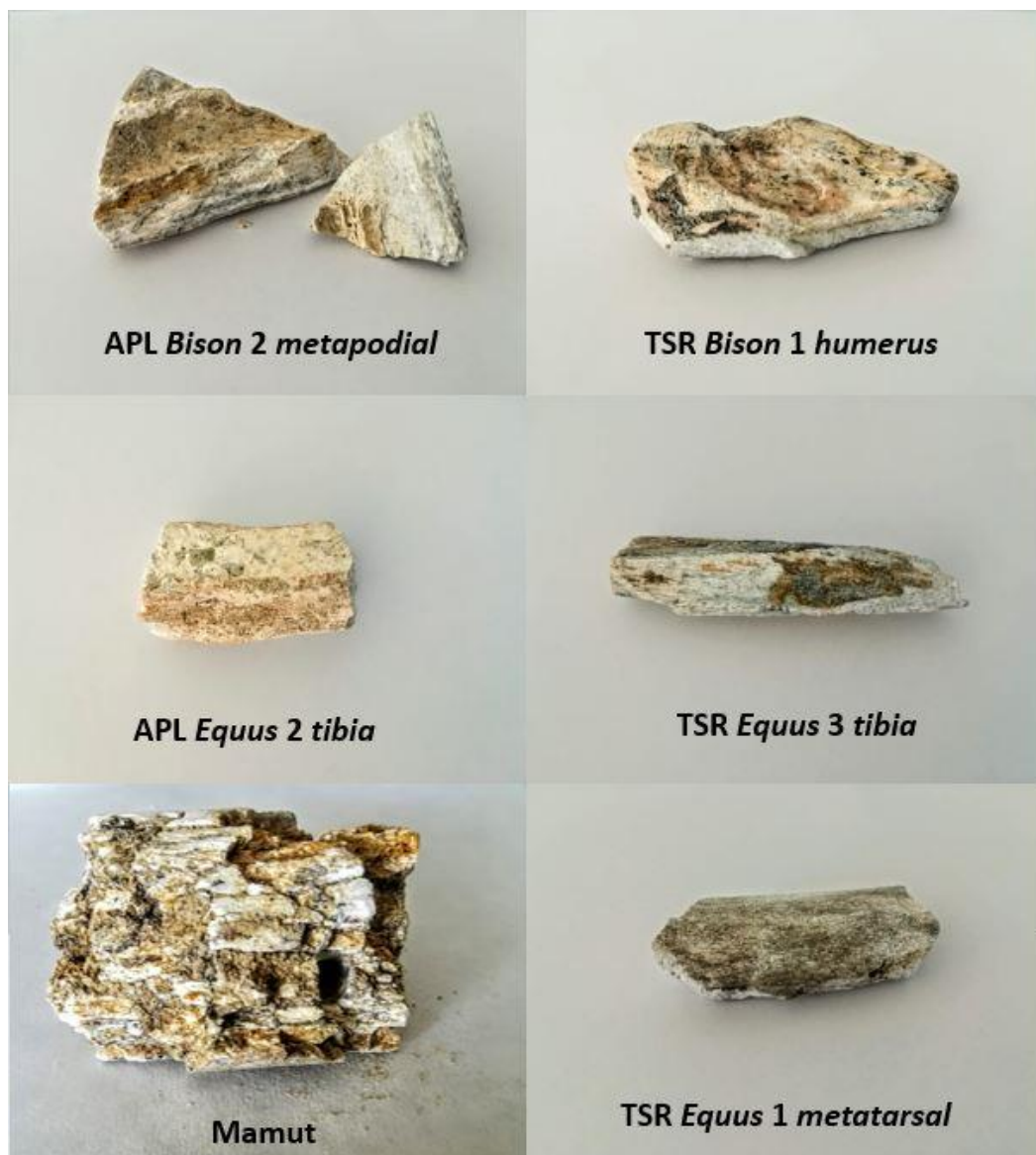
**Obrázek 12:** Schéma finálního postupu – vyvinutí metody

Pomocí této metody bylo analyzováno 5 reálných paleontologických vzorků (Obrázek 13) zvířecího původu (bizon a kůň). Vzorky pocházejí ze 2 raných pleistocénových nalezišť z oblasti Mygdonie, poblíž Soluně. Stáří TSR vzorků bylo

určeno na 1,8 až 1,6 milionů let a APL vzorky jsou zhruba 1,2 miliony let staré. Vzorky byly z různých částí skeletu – dvě kosti holenní (*tibia*), jedna nártní (*metatarsal*), jedna pažní (*humerus*) a jedna blíže nespecifikovaná kost nohy (*metapodial*):

- APL *Equus 2 tibia*
- TSR *Equus 3 tibia*
- TSR *Equus 1 metatarsal*
- TSR *Bison 1 humerus*
- APL *Bison 2 metapodial*

Dále byl pomocí této metody analyzován vzorek mamuta z oblasti Řecka, u kterého nebyl doložen odhad stáří vzorku (Obrázek 13)



**Obrázek 13:** Reálné paleontologické vzorky testované metodou GC-MS

### 3.3.4 Analýza kosti *in situ* pomocí techniky MALDI

Kromě GC-MS metody byla kostní tkáň analyzována *in situ* pomocí analytické techniky MALDI. Touto technikou byly analyzovány lidské kosti německého vojáka z 2. světové války, který byl zavražděn průstřelem do hlavy (Obrázek 14) nalezené v obci Mírov 35/17 a jeho tělo bylo ukryto do dutiny starého stromu. Pro analýzu byla použita levá pažní kost s přítomností kůže.



**Obrázek 14:** Kostra německého vojáka, naleziště Mírov

Pro analýzu byly vybrány 2 kousky levé pažní kosti s kůží. Větší kousek pažní kosti (Obrázek 15) byl ponořen do 1% HCl a byla nechán při pokojové teplotě po dobu 22 h, kde kyselina byla vyměněna minimálně 3x. Po procesu demineralizace byl vzorek kosti opatrně ponořen do vody, následně dán do mrazáku a po hodině byl vzorek kosti lyofilizován. Po lyofilizaci byl vzorek přendán do plastové vzorkovničky a druhý menší vzorek pažní kosti bez demineralizace byl vložen do plastové zkumavky s víčkem (stejně jako u holenní kosti). Poté bylo připraveno 45 ml samopolymerující methylnetakrylátová adhezivní pryskyřice, která byla opět smíchána v poměru 10:8 (prášek:roztok) a důkladně promíchána v plastové kádince. Oba vzorky byly zality pryskyřicí po okraj kosti, nechaly se zaschnout a byly vyndány z plastových nádob. Pomocí brusky byly odřezány pláty u obou vzorků a pláty s kostí byly zbrušeny brusným papírem o hrubostech 360, 800 a 1000 na stejnou tloušťku. Bruskou byly poté zřezány krajní části pryskyřice, vzorky byly očištěny acetonem, rozmístěny na MALDI destičku a byly k ní přilepeny oboustrannou lepicí páskou (Obrázek 16). Kosti 1, 2 a 3 jsou kosti většího vzorku a jsou demineralizované, naopak u kostí 4, 5 a 6 byl proces demineralizace vynechán. Pro následný proces hydrolýzy byla zvolena 3 M HCl a roztok trypsinu o koncentraci 50 µg/ml. Kost 1 a 6 zůstaly čisté a byly brány jako referentní, kost 2 byla překryta 2 µl 3 M HCl a kost 3 byla překryta 4 µl trypsinu. Kost čtvrtá byla překryta 2 µl 3 M HCl a na kost pátou bylo nanášeno 6 µl trypsinu. Po zaschnutí všech vzorků byla přes všechny vzorky nanášena matrice  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina pomocí sprejovacího přístroje SunCollect (10 mg/ml, směs 0,1% roztoku TFA a acetonitrilu v poměru 1:1). Po zaschnutí byly vzorky měřeny technikou MALDI-IMS.



**Obrázek 15:** Levá pažní kost z kostry muže před demineralizací, A: strana kosti bez kůže, B: strana kosti s kůží



**Obrázek 16:** MALDI destička s výbrusy pažní kostí; 1: demineralizovaná, čistá kost; 2: demineralizace, překrytí 3 M HCl; 3: demineralizace, překrytí trypsinem; 4: kost bez demineralizace, překrytí 3 M HCl; 5: bez d., překrytí trypsinem; 6: bez d., čistá kost

### 3.4 Výsledky a diskuze

#### 3.4.1 Optimalizace jednotlivých postupů pro analýzu nízkomolekulárních látek

Postup 1 byl rozdělen na dvě základní části, na detekci tuků a cholesterolu a na detekci aminokyselin. V postupu se testovalo několik derivatizačních činidel. V případě detekce tuků byly pro analýzu zvoleny dvě činidla, Met-Prep II a BSTFA. Naopak v případě detekce aminokyselin byly zvoleny derivatizační činidla tři – BSTFA, MTBSTFA a hexamethyldisilazan.

U chloroformového extraktu s činidlem Met-Prep II bylo detekováno a identifikováno zhruba 40 látek (Příloha 1) včetně cholesterolu, u chloroformového extraktu derivatizovaného pomocí BSTFA bylo detekováno zhruba 80 látek (Příloha 2), detekovány byly i silanizované mastné kyseliny a cholesterol. Kontrolou, zda jsou tyto detekované látky správně identifikovány pomocí knihovny NIST, byl do grafu vynesena retenční index látek a jejich retenční čas (Příloha 3 a 4), kde správným výsledkem je lineární závislost. Z důvodu většího počtu detekovaných látek bude pro další postupy používáno derivatizační činidlo **BSTFA**. U hydrolyzovaných vzorků pro detekci AMK byly aminokyseliny detekovány pouze ve vzorku s největší navázkou kosti 3,60 mg, který byl hydrolyzován pomocí 6 M HCl a derivatizován pomocí činidla hexamethyldisilazan. V tomto vzorku byly detekovány čtyři AMK, L-valin (2 TMS derivát), L-leucin (2 TMS derivát), L-prolin (2 TMS derivát), L-threonin (3 TMS derivát).

Postup 2 byl vyzkoušen z důvodu získání čistější frakce kolagenu z kosti (organická hmota v kosti je zhruba 25 %, v níž je kolagen zastoupen z 95 %) a dá se tedy předpokládat detekce vyššího množství aminokyselin než z kosti. Z původní navázky 611,41 mg kosti bylo vyextrahováno 157,09 mg vysušeného kolagenu. Výtěžek kolagenu tedy činil 25,69 %, což je tedy ve shodě s předchozím předpokladem obsahu organické hmoty v kosti, avšak aminokyseliny byly detekovány pouze ve vzorcích derivatizovaných pomocí činidla MTBSTFA. Ve vzorku hydrolyzovaném pomocí 6 M HCl bylo detekováno 5 AMK – glycin, alanin, valin, prolin, aspartát, naopak ve vzorku hydrolyzovaném pomocí 6 M HCl s přídavkem fenolu bylo detekováno 9 AMK – glycin, alanin, valin, prolin, hydroxyprolin, aspartát, glutamát, leucin, serin (Tabulka II, Graf 1). Tímto postupem bylo zvoleno pro detekci AMK derivatizační činidlo MTBSTFA a způsob hydrolyzy pomocí 6 M HCl s přídavkem fenolu o obsahu 0,02 % ve finálním

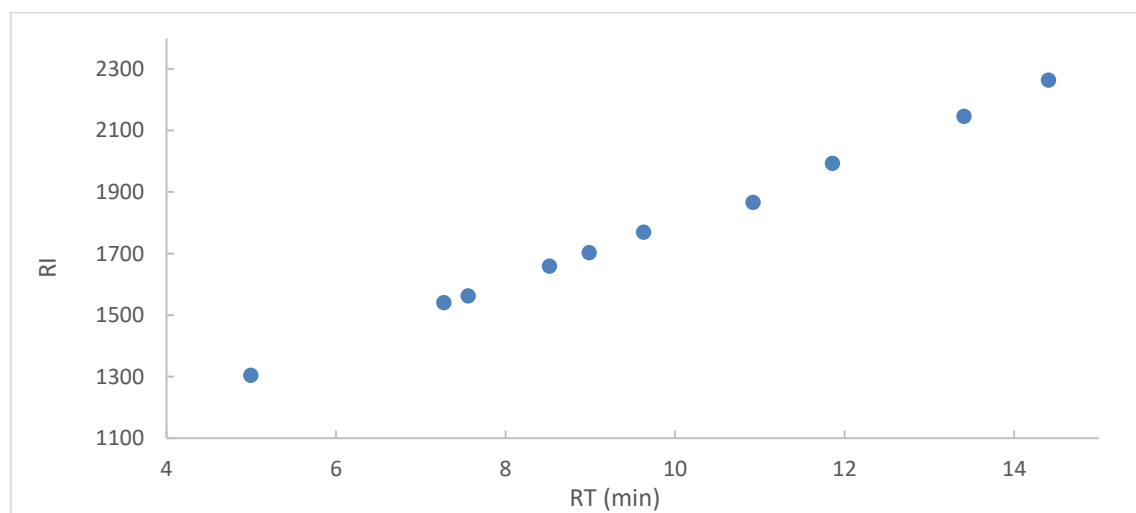


roztoku pro následující analýzy zahrnuté v této práci. Ve zbylých čtyřech vzorcích silanizovaných pomocí derivatizačních činidel BSTFA a hexamethyldisilazan nebyly detekovány žádné aminokyseliny.

**Tabulka II:** Soubor detekovaných aminokyselin ve vzorku hydrolyzovaném HCl s fenolem a derivatizovaném pomocí činidla MTBSTFA

RT (min)	RI	Název
4.993	1304	L-valin, TBDMS d.
7.271	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
7.559	1562	Glycin, 2TBDMS d.
8.519	1659	L-valin, 2TBDMS d.
8.988	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
9.627	1769	L-prolin, 2TBDMS d.
10.920	1866	L-aspartát, 2TBDMS d.
11.130	—	L-hydroxyprolin, 2TBDMS d.
11.856	1993	L-serin, 3TBDMS d.
13.407	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.
14.407	2264	L-glutamát, 3TBDMS d.

**Graf 1:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase vzorku hydrolyzovaném HCl s fenolem, činidlo MTBSTFA



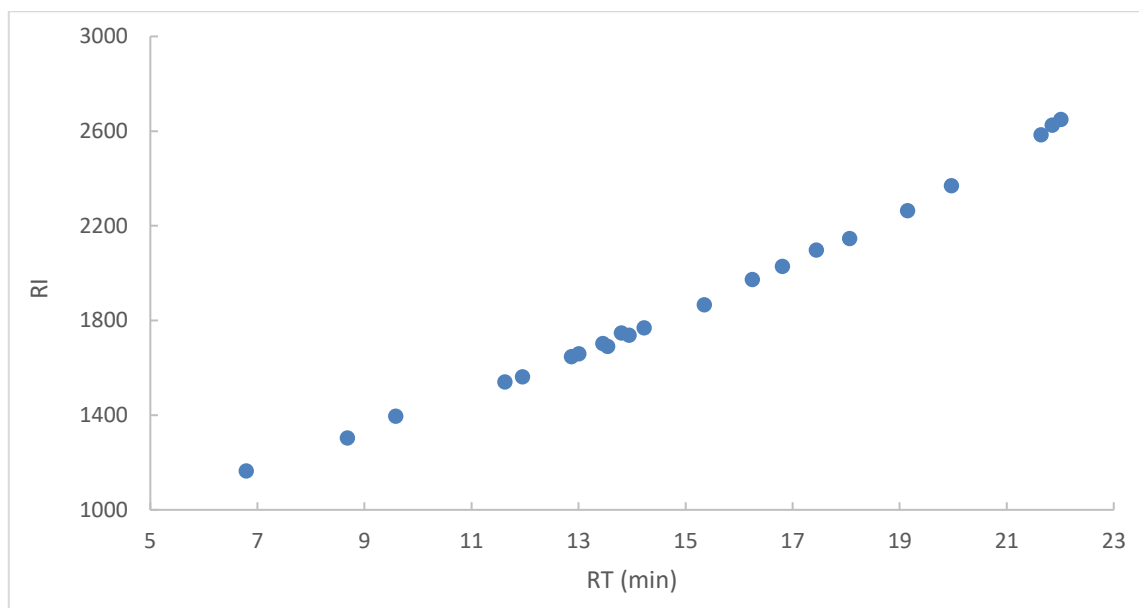
V chromatogramech kolagenů extrahovaných pomocí 0,05 M HCl a 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH (Postup 3) nebyly detekované žádné aminokyseliny, což mohlo být zapříčiněno nedostatečnou extrakcí kolagenu z kosti.

V chromatogramu kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH bylo detekováno 17 aminokyselin (Tabulka III, Graf 2). V chromatogramu kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH byl detekován stejný počet aminokyselin (Tabulka IV, Graf 3). Z tohoto důvodu byly vybrány tři nejzastoupenější aminokyseliny – Gly, Ala a Pro v kolagenech extrahovaných pomocí 1 M a 10 M CH<sub>3</sub>COOH. Na základě zjištěných výšek píku bylo vypočítáno procentuální zastoupení těchto AMK v kolagenech a ve všech případech byl obsah AMK vyšší v kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH. Obsah glycinu byla výška píku (intenzita) větší o 7,9 %, u alaninu byl větší o 6,2 % a obsah prolinu byl větší o 18,1 % než v kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH při zachování stejné výchozí navážky a nastříkovaného objemu.

**Tabulka III:** Soubor detekovaných aminokyselin v kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH

RT (min)	RI	Název
6.791	1164	L-alanin, TBDMS d.
8.684	1304	L-valin, TBDMS d.
9.585	1396	L-izoleucin, TBDMS d.
11.623	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
11.952	1562	Glycin, 2TBDMS d.
12.869	1647	L-methionin, TBDMS d.
13.003	1659	L-valin, 2TBDMS d.
13.456	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
13.544	1691	L-serin, 2TBDMS d.
13.801	1748	Izoleucin, 2TBDMS d.
13.947	1738	L-threonin, 2TBDMS d.
14.225	1769	L-prolin, 2TBDMS d.
15.348	1866	L-aspartát, 2TBDMS d.
15.889	—	L-hydroxyprolin, 2TBDMS d.
16.246	1973	L-methionin, 2TBDMS d.
16.809	2029	L-threonin, 3TBDMS d.
17.440	2098	L-fenylalanin, 2TBDMS d.
18.065	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.
18.374	—	L-hydroxyprolin, 3TBDMS d.
19.147	2264	L-glutamát, 3TBDMS d.
19.966	2370	L-lysin, 3TBDMS d.
21.642	2584	Histidin, triTBDMS
22.014	2650	L-tyrosin, 3TBDMS d.
22.397	2645	5-hydroxylysin, 4TBDMS d.

**Graf 2:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kolagenu extrahovaném pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH

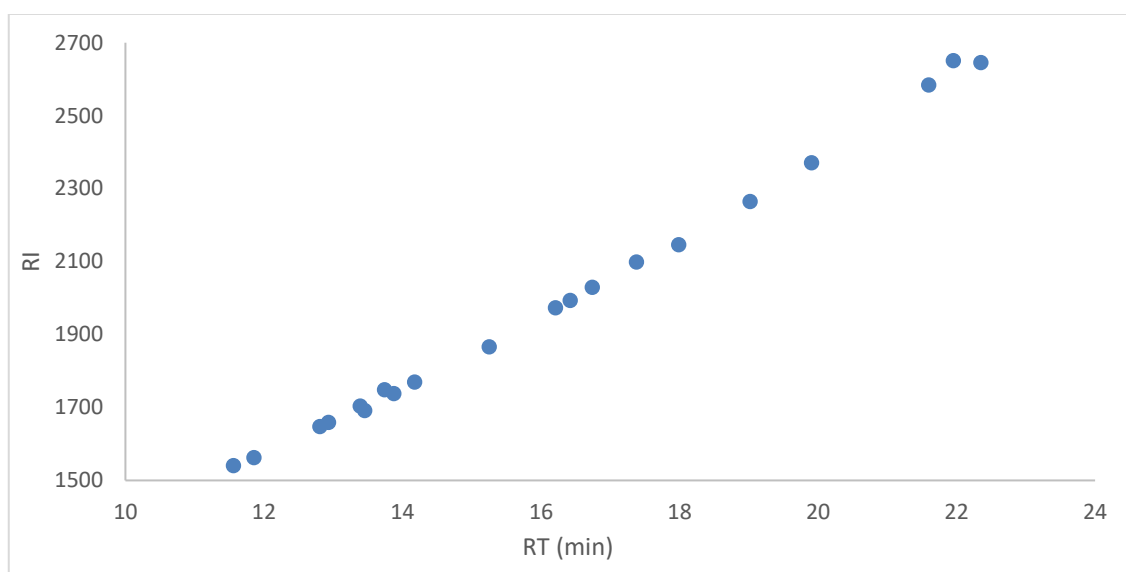


**Tabulka IV:** Soubor detekovaných aminokyselin v kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH

RT (min)	RI	Název
6.589	1164	L-alanin, TBDMS d.
11.559	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
11.857	1562	Glycin, 2TBDMS d.
12.808	1647	L-methionin, TBDMS d.
12.932	1659	L-valin, 2TBDMS d.
13.390	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
13.454	1691	L-serin, 2TBDMS d.
13.740	1748	Izoleucin, 2TBDMS d.
13.873	1738	L-threonin, 2TBDMS d.
14.176	1769	L-prolin 2TBDMS d.
15.251	1866	L-aspartát, 2TBDMS d.
16.052	—	D-pyroglutmová kyselina, 2TBDMS d.
16.143	—	L-hydroxyprolin, 2TBDMS d.
16.207	1973	L-methionin, 2TBDMS d.
16.421	1993	L-serin, 3TBDMS d.
16.741	2029	L-threonin, 3TBDMS d.
17.377	2098	L-fenylalanin, 2TBDMS d.

17.987	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.
18.149	—	L-hydroxyprolin, 3TBDMS d.
19.017	2264	L-glutamát, 3TBDMS d.
19.908	2370	L-lysin, 3TBDMS d.
21.596	2584	L-histidin, 3TBDMS d.
21.951	2650	L-tyrosin, 3TBDMS d.
22.349	2645	5-hydroxylysin, 4TBDMS d.

**Graf 3:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kolagenu extrahovaném pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH

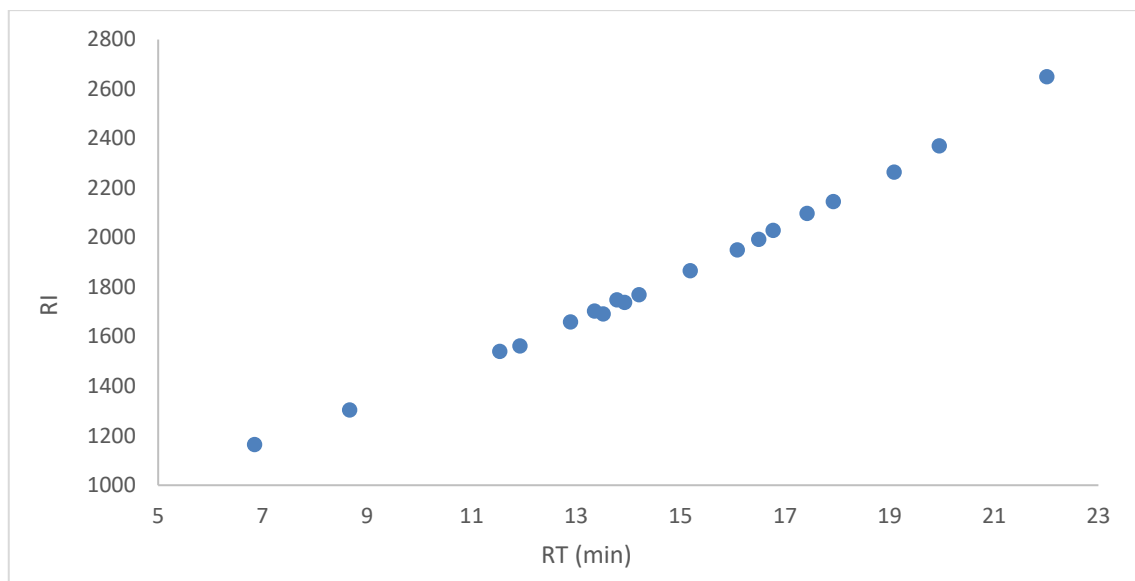


Pro kontrolu účinnosti extrakce byly také analyzovány pevné podíly (dále označovány jako kost) po extrakci pomocí 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH, 1 M CH<sub>3</sub>COOH a 10 M CH<sub>3</sub>COOH za účelem detekce AMK. V chromatogramu kosti extrahovaného pomocí 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH bylo detekováno 14 aminokyselin – Tabulka V (Graf 4). Naopak v chromatogramu kosti extrahovaného pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH bylo detekováno pouze 7 aminokyselin (Tabulka VI, Graf 5). U chromatogramu kosti extrahovaného pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH stoupl počet detekovaných aminokyselin na počet 14 (Tabulka VII, Graf 6). Navzdory většímu počtu AMK v kosti extrahované pomocí 10M CH<sub>3</sub>COOH, byla v dalších analýzách právě tato koncentrace z důvodu vyšší intenzity sledovaných AMK ve vyextrahovaném kolagenu.

**Tabulka V:** Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH

RT (min)	RI	Název
6.847	1164	L-alanin, TBDMS d.
8.665	1304	L-valin, TBDMS d.
11.541	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
11.927	1562	Glycin, 2TBDMS d.
12.892	1659	L-valin, 2TBDMS d.
13.352	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
13.521	1691	L-serin, 2TBDMS d.
13.785	1748	Izoleucin, 2TBDMS d.
13.928	1738	L-threonin, 2TBDMS d.
14.207	1769	L-prolin, 2TBDMS d.
15.186	1866	L-aspartát, 2TBDMS d.
16.084	1950	L-pyroglutamová kyselina, 2TBDMS d.
16.179	—	L-hydroxyprolin, 2TBDMS d.
16.499	1993	L-serin, 3TBDMS d.
16.775	2029	L-threonin, 3TBDMS d.
17.423	2098	L-fenylalanin, 2TBDMS d.
17.923	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.
18.319	—	L-hydroxyprolin, 3TBDMS d.
19.088	2264	L-glutamát, 3TBDMS d.
19.951	2370	L-lysin, 3TBDMS d.
22.014	2650	L-tyrosin, 3TBDMS d.

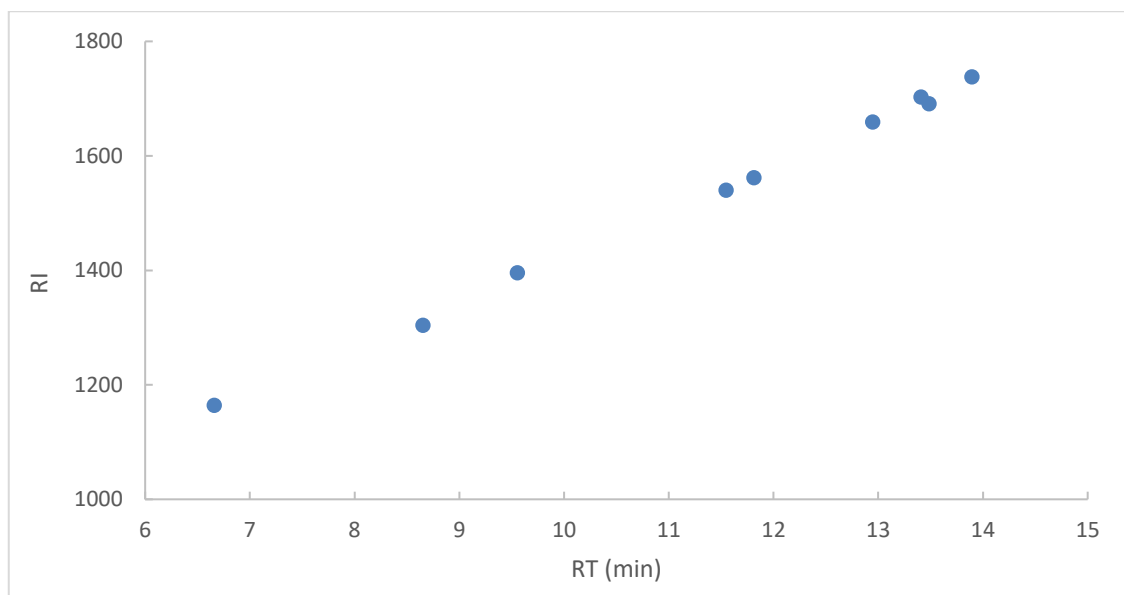
**Graf 4:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH



**Tabulka VI:** Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH

RT (min)	RI	Název
6.660	1164	L-alanin, TBDMS d.
8.653	1304	L-valin, TBDMS d.
9.554	1396	L-izoleucin, TBDMS d.
11.547	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
11.814	1562	Glycin, 2TBDMS d.
12.948	1659	L-valin, 2TBDMS d.
13.408	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
13.485	1691	L-serin, 2TBDMS d.
13.895	1738	L-threonin, 2TBDMS d.

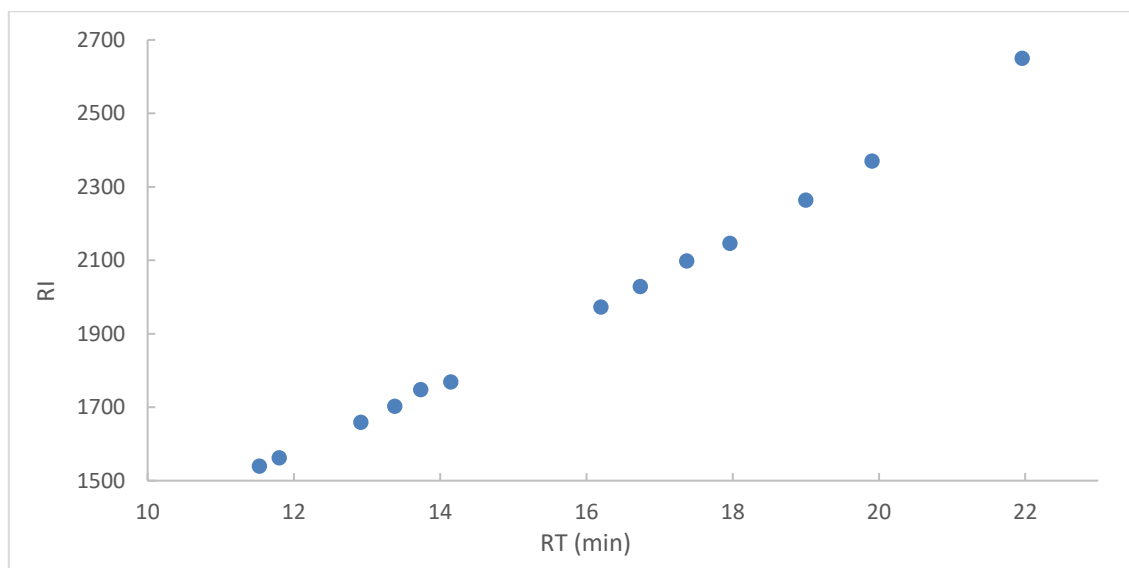
**Graf 5:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 1 M CH<sub>3</sub>COOH



**Tabulka VII:** Soubor detekovaných aminokyselin v kosti, extrakce pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH

RT (min)	RI	Název
11.528	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
11.798	1562	Glycine, 2TBDMS d.
12.916	1659	L-valin, 2TBDMS d.
13.378	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
13.734	1748	Izoleucin, 2TBDMS d.
14.144	1769	L-prolin, 2TBDMS d.
16.039	—	D-pyroglutmová kyselina, 2TBDMS d.
16.198	1973	L-methionin, 2TBDMS d.
16.735	2029	L-threonin, 3TBDMS d.
17.371	2098	L-fenylalanin, 2TBDMS d.
17.962	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.
18.241	—	L-hydroxyprolin, 3TBDMS d.
18.999	2264	L-glutamát, 3TBDMS d.
19.905	2370	L-lysin, 3TBDMS d.
21.958	2650	L-tyrosin, 3TBDMS d.

**Graf 6:** Závislost retenčního indexu aminokyselin na retenčním čase kosti, extrakce pomocí 10 M CH<sub>3</sub>COOH



### 3.4.2 Analýza reálných paleontologických vzorků pomocí GC/MS

Finální metodou bylo analyzováno 5 paleontologických vzorků zvířecího původu (bizon a kůň) – byly analyzovány dvě kosti holenní (*tibia*), jedna nártní (*metatarsal*), jedna pažní (*humerus*) a jedna blíže nespecifikovaná kost nohy (*metapodial*). Dále byla analyzovaná kost mamuta, která neukázala žádné výsledky, jak v oblasti detekce tuků, tak aminokyselin. Výsledky analýzy tuků a cholesterolu u 5 paleontologických vzorků neprokázaly žádné látky. Před samotnou analýzou aminokyselin z 5 vzorků byly nejprve zjištěny výtěžky kolagenů ze všech vzorků – Tabulka VIII. Aminokyseliny byly detekované v chromatogramech čtyř kolagenů (Tabulka IX), v kolagenu vzorku TSR *Bison 1 humerus* nebyla nalezena žádná aminokyselina.

**Tabulka VIII:** Hodnoty výtěžku kolagenů ze všech paleontologických reálných vzorků

Vzorek	Navážka kosti (mg)	Extrahovaný kolagen (mg)	Výtěžek (%)
APL Equus 2 tibia	480.05	41.3	8.6
TSR Equus 3 tibia	476.22	19.9	4.2
TSR Equus 1 metatarsal	479.80	18.3	3.8
TSR Bison 1 humerus	478.37	20.6	4.3
APL Bison 2 metapodial	476.25	28.6	6.0



**Tabulka IX:** Detekované aminokyseliny v paleontologických reálných vzorcích

<b>APL Equus 2 tibia</b>		
<b>RT (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Název</b>
13.124	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
13.305	1562	Glycin, 2TBDMS d.
14.411	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
16.483	1993	L-serin, 3 TBDMS d.
<b>APL Bison 2 metapodial</b>		
<b>RT (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Název</b>
13.132	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
13.308	1562	Glycin, 2TBDMS d.
<b>TSR Equus 3 tibia</b>		
<b>RT (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Název</b>
13.093	1562	Glycin, 2TBDMS d.
<b>TSR Equus 1 metatarsal</b>		
<b>RT (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Název</b>
13.127	1540	L-alanin, 2TBDMS d.
13.305	1562	Glycin, 2TBDMS d.
14.094	1659	L-valin, 2TBDMS d.
14.407	1703	L-leucin, 2TBDMS d.
14.640	1748	Izoleucin, 2TBDMS d.
16.473	1993	L-serin, 3 TBDMS d.
17.725	2146	L-aspartát, 3TBDMS d.

V teoretické části práce je zmíněna studie M. H. Schweitzer a kol. (2005, 2007), která zkoumala nejzachovalejší aminokyseliny (Gly a Ala) u *Tyranosaura Rexe* pomocí techniky TOF-SIMS. Autoři stanovili poměr Gly:Ala v kosti T-Rexe 2,6:1 a téměř se shodoval s kuřecím kolagenem (poměr 2,5:1) [60]. V této práci se podařilo detekovat aminokyseliny Gly u všech 4 vzorků a Ala u třech. U těchto 3 vzorků byl tedy spočítán poměr mezi Gly:Ala (Tabulka X).

**Tabulka X:** Poměr Gly:Ala vypočítaný z výšky píků v paleontologických vzorcích

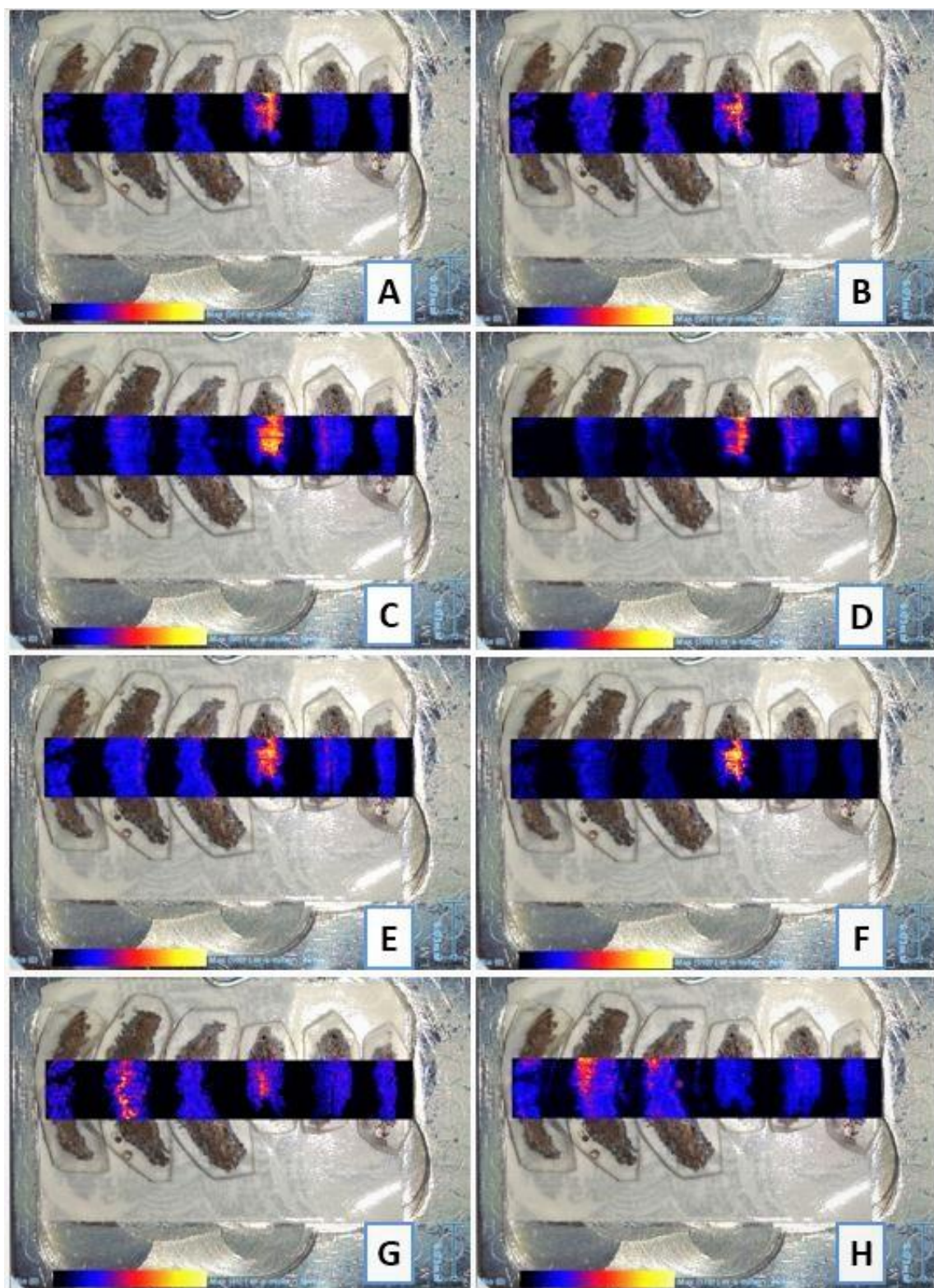
<b>Vzorek</b>	<b>Poměr Gly:Ala</b>
APL Equus 2 tibia	2.0 : 1
APL Bison 2 metapodial	1.6 : 1
TSR Equus 1 metatarsal	1.2 : 1

Podobně jako M. H. Schweitzer a kol. (2005, 2007) je i tato práce částečně zaměřena na sledování poměru Gly:Ala. Tato práce je chápána jako pilotní experiment v této zkoumané oblasti. Dalším výzkumem (nad rámec této práce) bude záměr na detailní analýzu jednotlivých druhů živočichů (savci, plazi, ptáci) z důvodu zjištění poměru těchto dvou aminokyselin v kolagenech.

### 3.4.3 MALDI technika

MALDI zobrazovací technikou byla analyzována kost vojáka ze 2. světové války. Kost byla v prvních třech výbrusech demineralizovaná, zatímco u zbylých třech výbrusů byl proces demineralizace vynechán (Obrázek 16). Na dvě kosti byla nanášena 3 M HCl – kyselá hydrolyza (druhý a čtvrtý výbrus). Na další dvě roztok trypsinu – enzymatická hydrolyza (třetí a pátý výbrus) a dvě kosti zůstaly nepřekryté (první a poslední). Touto technikou bylo detekováno velké množství látek. Obrázky 17-20 zobrazují distribuci 18 nejvýznamnějších (detekovány byly látky jak s lichou, tak se sudou hmotou což poukazuje na lichý počet dusíku v molekule).

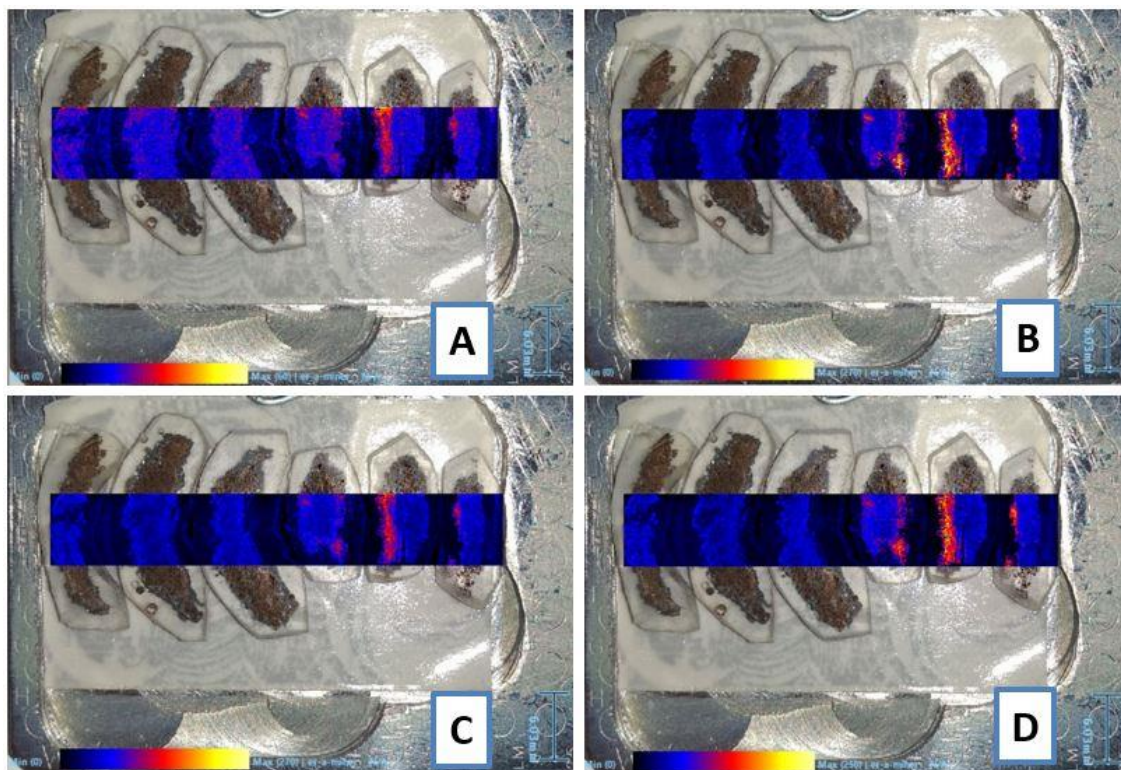
Hmoty látek detekovaných ve výbrusu kosti překrytém 3 M HCl byly následující: m/z 683,1193 (Obrázek 17 A); m/z 633,0807 (Obrázek 17 B); m/z 557,1654 (Obrázek 17 C); m/z 521,1732 (Obrázek 17 D); m/z 473,0992 (Obrázek 17 E), m/z 471,1099 (Obrázek 17 F) – všechny tyto látky byly přítomny v kosti bez demineralizace; hmota m/z 570,0667 (Obrázek 17 G) je přítomna v obou kostech překrytých 3 M HCl, ovšem u demineralizovaného vzorku je signál intenzivnější; poslední hmota m/z 395,1256 (Obrázek 12 H) je přítomna u dvou výbrusů demineralizované kosti, větší intenzita je ve výbrusu s 3 M HCl, ale malé množství látky je přítomno i ve výbrusu překrytém roztokem trypsinu.



**Obrázek 17:** Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém 3 M HCl

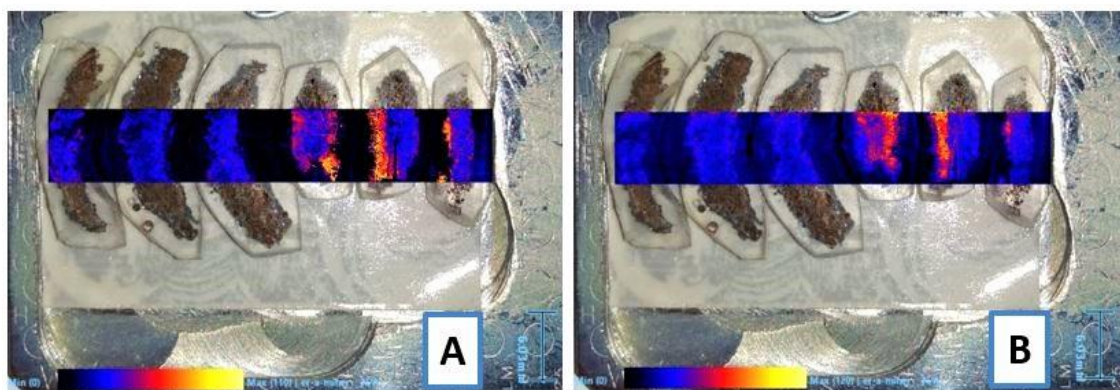
Dále byly detekovány hmoty látek, které byly přítomny ve výbrusu překrytém roztokem trypsinu:  $m/z$  398,1175 (Obrázek 18 A);  $m/z$  325,0977 (Obrázek 18 B);  $m/z$

311,0819 (Obrázek 18 C);  $m/z$  225,0443 (Obrázek 18 D) – všechny tyto látky jsou v největší míře zastoupeny ve výbrusu překrytém roztokem trypsinu, v malé míře je vidíme i na okrajové části kosti překryté 3 M HCl a čisté kosti:



**Obrázek 18:** Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém roztokem trypsinu

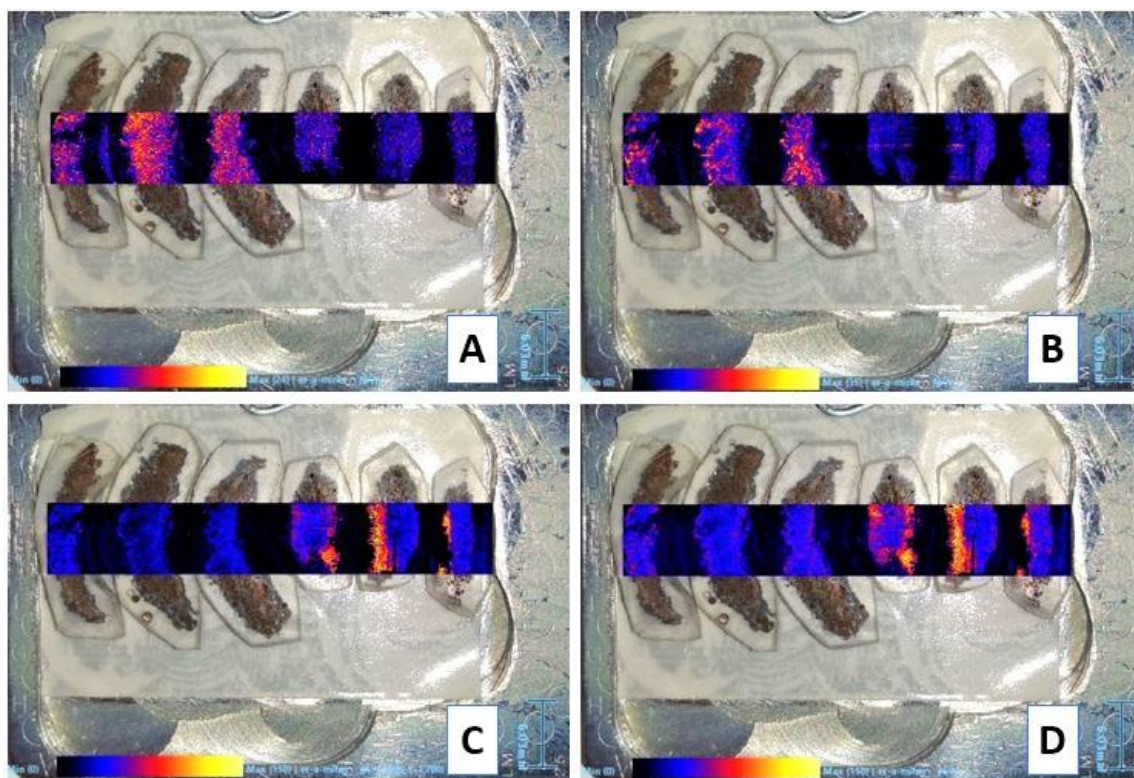
Následně byly detekovány dvě hmoty látek, které jsou intenzivní a vyskytují se ve vzorcích bez demineralizace, a jsou lokalizovány v levé části kosti překryté trypsinem, dále v okrajových částech kosti překryté 3 M HCl:  $m/z$  190,0148 (Obrázek 19 A) a  $m/z$  410,1218 (Obrázek 19 B):



**Obrázek 19:** Snímky MALDI zobrazování, látky detekované na výbrusu překrytém roztokem trypsinu a výbrusu překrytém 3 M HCl

V nábrusu bylo detekováno i několik hmot, které byly předběžně na základě měření přesné hmoty identifikovány jako aminokyseliny ve formě sodného nebo draselného aduktu. Pro potvrzení správnosti identifikace bude nutné provést MS/MS experimenty, které z časových důvodů nebyly v rámci této práce provedeny.

- $m/z$  169,0999 (Obrázek 20 A) – sodný adukt lysinu (odchylka od přesné hmoty: 4,5 mDa), látka lokalizovaná ve všech výbrusech demineralizované kosti rovnoměrně
- $m/z$  171,0258 (Obrázek 20 B) – draselný adukt asparaginu (odchylka od přesné hmoty: 8,6 mDa), látku lze vidět opět ve všech výbrusech demineralizované kosti, nejhojněji je ovšem zastoupená v kosti překryté 3 M HCl
- $m/z$  172,0048 (Obrázek 20 C) – draselný adukt aspartátu (odchylka od přesné hmoty: 3,6 mDa), látka se vyskytuje pouze v okrajových částech výbrusů kosti bez demineralizace, nejvíce ji vidíme ve výbrusu překrytém trypsinem, méně poté ve výbrusu překrytém 3 M HCl
- $m/z$  243,0538 (Obrázek 20 D) – draselný adukt tryptofanu (odchylka od přesné hmoty: 0,2 mDa), látka se vyskytuje pouze v okrajových částech výbrusů kosti bez demineralizace, je stejně lokalizována jako draselný adukt aspartátu, ovšem ve výbrusu překrytém 3 M HCl je tato aminokyselina hojněji zastoupena.



**Obrázek 20:** Snímky MALDI zobrazování, detekované aminokyseliny

Z výše zobrazených snímků a uvedených popisů vyplývá, že nelze jednoznačně určit, zda je pro detekci látek v kosti touto technikou nutný proces demineralizace. Převážná část hmot byla ovšem lokalizována v nedemineralizované kosti. Subjektivně hodnoceno, 10 hmot bylo detekováno ve výbrusu překrytém 3 M HCl (Obrázky 17 A-F, 19 A, 19 B, 20 A, a 20 B) a 8 hmot bylo lokalizováno ve výbrusu překrytém roztokem trypsinu (Obrázky 18 A-D, 19 A, 19 B, 20 A a 20 B). Většina hmot nebyla identifikovaná z časových důvodů, ale podařilo se identifikovat čtyři hmoty látek, pravděpodobně jako adukty aminokyselin (Obrázky 20 A-D).

### 3.5 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout optimalizovanou metodu k analýze archeologických a paleontologických kosterních pozůstatků se zaměřením na detekci nízkomolekulárních organických látek. K vyvinutí postupu metody byla používána lidská stehenní kost z 11. století (raný středověk) a metoda byla rozdělena na dvě základní části – na detekci lipidů a sterolů (deriváty mastných kyselin a cholesterolu) a na detekci aminokyselin. Během vyvíjení metody byly optimalizovány tři důležité kroky úpravy vzorků referentní kosti:

1. Demineralizace kosti: doba odstranění nepotřebných anorganických sloučenin byla zkrácena z původních 14 dnů (viz postup 1) na 22 h (pomocí 1% roztoku HCl).
2. Extrakce kolagenu z kosti: v této části postupu bylo vyzkoušeno několik kyselin. Aby byla podpořena míra extrahovatelnosti kolagenu z kosti, byla použita koncentrovanější kyselina 10 M kyselina octová, pomocí které bylo ve vzorku kolagenu z referentní kosti detekováno celkem 17 aminokyselin (Tabulka IV).
3. Proces derivatizace: V této finální části postupu bylo analyzováno několik derivatizačních činidel. Pro detekci tuků bylo na základě většího počtu detekovaných mastných kyselin vybráno derivatizační činidlo BSTFA (viz postup 1, Příloha 3). Ze stejného důvodu většího detekovaného počtu aminokyselin bylo vybráno i druhé derivatizační činidlo MTBSTFA (viz postup 2).

Po optimalizaci těchto kroků byly vzorky recentní kosti analyzovány pomocí GC-MS systému, extrakty připravované pro detekci tuků byly nastříknuty do systému automaticky a extrakty připravované pro detekci aminokyselin byly do systému nastříknuty vždy manuálně. Následně byla metoda otestována na pěti reálných paleontologických vzorcích (stáří zhruba 2 mil. let), u kterých nebyly detekovány žádné mastné kyseliny. Ovšem ve čtyřech vzorcích byl detekován různý počet AMK (Tabulka XIV). Z těchto čtyřech vzorků byl u třech určen poměr dvou nejvíce zastoupených aminokyselin, Gly a Ala (Tabulka XV). Zároveň se jedná o AMK, které by měly podléhat nejmenší degradaci. V této zkoumané oblasti se jedná o pilotní experiment, u kterého je nutné rozšířit analýzu kolagenu u různých druhů živočichů, aby mohly být výsledky porovnány. V dalším pokračování výzkumu této problematiky je finálním cílem vytvoření „knihovny“ kolagenů různých živočišných druhů s poměrem Gly:Ala, která by

pomohla určit původ neznámého kosterního pozůstatku (na základě srovnání změřeného poměru Gly:Ala s knihovnou).

Kromě techniky GC-MS byla vyzkoušena analýza kosti *in situ* pomocí techniky MALDI. Vzorek kosti byl v postupu přípravy rozdělen na kost, která byla vystavena procesu demineralizace a na nedemineralizovanou kost. Připravené výbrusy byly poté překryty HCl ke kyselé hydrolyze vzorku anebo trypsinem k jeho enzymatické hydrolyze. Z prvotního experimentu vyplývá, že proces demineralizace není klíčový k detekci nízkomolekulárních organických látek v kosti, neboť hmoty látek ( $m/z$ ) byly detekovány v obou vzorcích kosti. Touto technikou bylo detekováno 18 látek, z toho čtyři byly předběžně identifikovány jako aminokyseliny (sodný adukt lysinu, draselný adukt asparaginu, aspartátu a tryptofanu – Obrázek 20). Zbylé látky (hodnoty  $m/z$ ) nebylo z časových důvodů možné identifikovat. Pokračování ve studiu této techniky může přinést optimalizovaný postup časově nenáročné přípravy vzorku kosti k analýze.



### 3.6 Summary

The aim of this thesis was to development and optimization of method for the analysis of archaeological and paleontological skeletal remains with the focus on the detection of low molecular substances. Human femur from the 11<sup>th</sup> century (Early Middle Ages) was used for development of the procedure and the method was divided into two main parts – 1) detection of lipids and sterols (fatty acid and cholesterol derivatives); 2) detection of amino acids. Throughout the method development process, three main steps were optimized on reference sample bone:

1. Bone demineralization: the time needed for the removal of unnecessary inorganic substances was shortened from the original 14 days (see procedure 1) to 22 hours (using 1 % solution of HCl).
2. Collagen extraction from the bone: in this part of the procedure, several acids were tested. To increase the bone collagen extraction ability, a more concentrated 10 M acetic acid was used, that allowed the detection of 17 amino acids from the reference bone sample (Chart IV).
3. Derivatization process: in this final step, several derivatization agents were tested. The BSTFA derivatization agent was used for analysis of non-polar compound (see procedure 1, Appendix 3) and MTBSTFA for amino acids for analysis of amino acids (see procedure 2), based on the detection of higher number of targeted compounds.

After optimization of those steps, the reference bone samples were analysed by GC-MS system, the prepared extracts for the lipid detection were injected into the system automatically; extracts prepared for the amino acid detection were injected manually. Subsequently, the method was tested on five paleontological samples (approximately 2 million years old). However, no amino acids were detected. Nevertheless, in four samples varying number of amino acids was detected. In three of those samples a ratio of the most highly represented amino acids, glycine (Gly) and alanine (Ala), was calculated. Note, that they are the amino acids, which should be subject to the lowest degradation. In this research area, this is a pilot project, where it is necessary to analyse collagen from various animal species and compared results each other. Following research will be focused to creating a library of collagen with Gly:Ala ratio from various

animal species that would help to identify skeletal remains origin (comparison of the measured Gly:Ala ratio with the library).

Besides the GC-MS technique, the MALDI technique was applied to in situ bone analysis. The bone sample was divided in two parts, i.e. bone exposed to the demineralization process and non-demineralized bone. After this step, prepared cuts were covered by HCl for acid hydrolysis or trypsin for enzymatic hydrolysis. The results shown that the demineralization process was not crucial step for the small organic compound analysis in cross-sections due to the fact that compounds (m/z) were detected in both bone samples. Eighteen compounds were detected by this technique and four of them were determined as amino acids (sodium adduct of lysine, potassium adduct of asparagine, aspartate and tryptophan –Figure 20). The remaining compounds (m/z values) were not identified due to time reasons. Further research into this area may provide a new, optimized and less time-consuming method for for bone sample analysis.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] “Biomechanika - studijní materiály,” *Katedra mechaniky, Západočeská univerzita v Plzni*. [Online]; <https://www.kme.zcu.cz/kmet/bio/kosti.php>; staženo 20. července 2019
- [2] L. Nedorost, V. Tomanová, L. Eberlová, O. Moztarzadeh, V. Adlerová, H. Hecová, J. Kočová, P. Fiala, J. Slípka, Z. Tonar, *Atlas histologie tvrdých tkání*. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, Výukový portál MEFANET <http://mefanet.lfp.cuni.cz>, 2009.
- [3] L. Nováková, M. Šajdíková, “Funkce buněk a lidského těla, multimediální skripta.” [Online]; <http://fbt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/1-funkcni-morfologie-kosti-a-chrupavky/>; staženo 4. srpna 2019
- [4] “Bone anatomy - Translational Orthopaedic Biomaterials Interest Group” [Online]. <https://www.tobig.eu/bone-101/bone-101/bone-anatomy/>; staženo 12. srpna 2019
- [5] “Stavba kostní dřene - červená a tuková kostní dřeň.” [Online]; [https://www2.med.muni.cz/histology/MedAtlas\\_2/OH\\_txt8-2-1.htm](https://www2.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt8-2-1.htm); staženo 8. července 2019
- [6] T. Soga, D. N. Neiger, “Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1236–1241
- [7] M. Ledvina, A. Stoklasová, J. Cerman, *Biochemie pro studující medicíny, I.+II. díl*, Karolinum. 2009, str. 438
- [8] “Živost tropokolagenu.” [Online]; <https://www.tropokolagen.cz/2017/11/zivost-tropokolagenu.html>; staženo 10. července 2019
- [9] K. Gelse, E. Po, T. Aigner, “Collagens — structure , function , and biosynthesis,” *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1531– 1546
- [10] “Kolagen–pevnost–integrita–struktura.” [Online]; <https://www.orling.cz/cs/kolagen/kolagen-1571127384/kolagen-pevnost-integrita-struktura.html?page=3>; staženo 15. srpna 2019

- [11] A. During, G. Penel, P. Hardouin, "Understanding the local actions of lipids in bone physiology," *Prog. Lipid Res.*, 59 (2015) 126–146
- [12] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, "The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction , X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis," *Thermochim. Acta*, 361 (2000) 131–138
- [13] D. Chappard, M. F. Baslé, E. Legrand, M. Audran, "New laboratory tools in the assessment of bone quality," *Osteoporos Int*, 22 (2011) 2225–2240
- [14] L. L. Xiao, Z. Jing, Y. G. Wen, M. X. Wen, X. Y. Zhou, X. Y. Ying, Z. W. Ya, F.W. Guo, "Association between Osteoporosis , Bone Mineral Density Levels and Alzheimer ' s Disease : A Systematic Review and Meta-analysis," *Int. J. Gerontol.*, 12 (2018) 76–83
- [15] C. F. Speller, D. Y. Yang, "Identifying the sex of archaeological turkey remains using ancient DNA techniques," *J. Archaeol. Sci.*, 10 (2016) 520–525
- [16] D. Gaudio, D. M. Fernandes, R. Schmidt, O. Cheronet, D. Mazzei, M. Mattia, T. O'Keeffe, R. N. M. Feeney, C. Cattaneo, R. Pinhasi, "Genome-Wide DNA from Degraded Petrous Bones and the Assessment of Sex and Probable Geographic Origins of Forensic Cases," *Sci. Rep.*, 9 (2019) 1–11
- [17] E. P. Paschalis, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, "Infrared Assessment of Bone Quality A Review," *Clin Orthop Relat Res*, 469 (2011) 2170–2178
- [18] G. F. Monnier, "A review of infrared spectroscopy in microarchaeology : Methods, applications , and recent trends," *J. Archaeol. Sci. Reports*, 18 (2018) 806–823
- [19] I. Reiche, M. Lebon, C. Chadafaux, K. Müller, A. S. Le Hô, M. Gensch, U. Schade, "Microscale imaging of the preservation state of 5 , 000-year-old archaeological bones by synchrotron infrared microspectroscopy," *Anal Bioanal Chem*, 397 (2010) 2491–2499
- [20] R. Y. Huang, L. M. Miller, C. S. Carlson, M. R. Chance, "In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy," *Bone*, 33 (2003) 514–521
- [21] P. Choudhari, P. Shewale, S. Ambrose, R. Patta, V. Aglawe, U. Mhapankar, "Near Infrared Spectrometry for Assessment of Bone Mineral Density," *Procedia*

- [22] M. Daudon, D. Bazin, C. Chappard, G. Andr, “Analysis of hydroxyapatite crystallites in subchondral bone by Fourier transform infrared spectroscopy and powder neutron diffraction methods,” *Comptes Rendus Chim.*, 19 (2016) 1625–1630
- [23] L. M. Miller, V. Vairavamurthy, M. R. Chance, R. Mendelsohn, E. P. Paschalis, F. Betts, A. L. Boskey, “In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the X 4 PO 3 4 vibration,” *Biochim. Biophys. Acta*, 1527 (2001) 11–19
- [24] G. S. Mandair, M. D. Morris, “Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength,” *Bonekey Rep.*, 4 (2015) 1–8
- [25] E. Gatin, P. Nagy, I. Paun, O. Dubok, V. Bucur, P. Windisch, “Raman Spectroscopy : Application in Periodontal and Oral Regenerative Surgery for Bone Evaluation,” *IRBM*, 40 (2019) 279–285
- [26] G. Dal, I. Angelini, L. Maritan, G. Artioli, “Raman hyperspectral imaging as an effective and highly informative tool to study the diagenetic alteration of fossil bones,” *Talanta*, 179 (2018) 167–176
- [27] O. Kane, J. Biochemistry, B. M. Bussian, C. Sander, “How To Determine Protein Secondary Structure in Solution by Raman Spectroscopy : Practical Guide and Test Case DNase I,” *Biochemistry*, 28 (1989) 4271–4277
- [28] A. Carden, R. M. Rajachar, M. D. Morris, D. H. Kohn, “Ultrastructural Changes Accompanying the Mechanical Deformation of Bone Tissue : A Raman Imaging Study,” *Calcif. Tissue Int.*, 72 (2003) 166–175
- [29] O. Madden, D. Man, W. Chan, M. Dundon, C. A. M. France, “Quantifying collagen quality in archaeological bone : Improving data accuracy with benchtop and handheld Raman spectrometers,” *J. Archaeol. Sci. Reports*, 18 (2018) 596–605
- [30] C. A. M. France, D. B. Thomas, C. R. Doney, O. Madden, “FT-Raman spectroscopy as a method for screening collagen diagenesis in bone,” *J. Archaeol. Sci.*, 42 (2014) 346–355

- [31] C. Gullekson, L. Lucas, K. Hewitt, L. Kreplak, "Surface-Sensitive Raman Spectroscopy of Collagen I Fibrils Tip preparation," *Biophys. J.*, 100 (2011) 1837–1845
- [32] L. Jansa, "Charakteristika kolagenů používaných v léčbě kloubních onemocnění - Diplomová práce," Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016
- [33] Y. M. Coulson-Thomas, V. J. Coulson-thomas, A. L. Norton, "The Identification of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Archaeological Human Bones and Teeth," *PLoS One*, 10 (2015) 1–21
- [34] M. K. Pysh, "Analysis of Citrate Content in Bone Using High Performance Liquid Chromatography," Clemson University, 2015
- [35] P. Banditt and J. Martens-Lobenhoffer, "Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – mass spectrometry," 755 (2001) 143–149
- [36] A. Fabrizio, R. Giorgetti, F. P. Busardò, G. Lodi, V. Martini, A. Pispero, M. Iriti, E. M. Varoni, "Development and validation of a method using ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for determination of zoledronic acid concentration in human bone," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 162 (2019) 286–290
- [37] C. A. Sharp, C. Linder, P. Magnusson, "Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms : Comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography," *Clin. Chim. Acta*, 379 (2007) 105–112
- [38] C. R. Mccudden, V. B. Kraus, "Biochemistry of amino acid racemization and clinical application to musculoskeletal disease," *Clin. Biochem.*, 39 (2006) 1112–1130
- [39] J. A. Tripp, R. E. M. Hedges, "Isotopic Analysis of Organic Materials in Archaeology," *LC-GC Eur.*, 17 (2004) 2–7
- [40] T. C. O. Connell, R. E. M. Hedges, "Isolation and isotopic analysis of individual amino acids from archaeological bone collagen: A new method using RP-HPLC" *Archaeometry*, 43 (2001) 421–438

- [41] E. Gineyts, C. Bertholon, P. D. Delmas, "Simple and sensitive method for quantification of fluorescent enzymatic mature and senescent crosslinks of collagen in bone hydrolysate using single-column high performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 1–7
- [42] T. Gumpangseth, P. Mahakkanukrauh, "Aspartic Acid Racemization Method for Age Estimation in Human Tissues : A Review," *Med Heal. Dec*, 12 (2017) 156–169
- [43] R. Swaminathan, "Biochemical markers of bone turnover," *Clin. Chim. Acta*, 313 (2001) 95–105
- [44] S. Z. Hussain, K. Maqbool, "GC-MS : Principle , Technique and its application in Food Science," *INT J CURR SCI*, 13 (2014) 116–126
- [45] M. Delpont, S. Maas, S. W. Van Der Merwe, J. B. Laurens, "Quantitation of hydroxyproline in bone by gas chromatography – mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 345–351
- [46] A. C. Colonese, T. Farrell, A. Lucquin, D. Firth, S. Charlton, H. K. Robson, M. Alexander, O. E. Cragin "Archaeological bone lipids as palaeodietary markers," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 29 (2015) 611–618
- [47] "Mass spectrometry." [Online]; [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html); staženo 3. listopadu 2020
- [48] M. Fountoulakis, H. W. Lahm, "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins," *J. Chromatogr. A*, 826 (1998) 109–134
- [49] Natalia V. Gogichaeva, Michail A. Alterman, "Amino Acid Analysis by Means of MALDI TOF Mass Spectrometry or MALDI TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry," *Methods in Molecular Biology*, 828 (2012) 1–15
- [50] A. El-Aneed, A. M. Cohen, J. Banoub, "Mass Spectrometry , Review of the Basics: Electrospray , MALDI , and Commonly Used Mass Analyzers," *Appl. Spectrosc. Rev.*, 44 (2009) 210–230
- [51] *Waters MALDI SYNAPT G2 MS, System Overview and Maintenance Guide, Revision B*, Waters Corporation 2010

- [52] F. Hillenkamp, J. P. Katalinic, *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley-Blackwell, New York 2013
- [53] J. Stauber, L. MacAleese, J. Franck, E. Claude, M. Snel, “On-Tissue Protein Identification and Imaging by MALDI-Ion Mobility Mass Spectrometry,” *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21 (2010) 338–347
- [54] A. Svirikova, A. Turyanskaya, L. Perneczky, C. Strel, M. Marchetti-Deschmann, “Multimodal imaging of undecalcified tissue sections by MALDI MS and  $\mu$ XRF,” *R. Soc. Chem.*, 143 (2018) 2587–2595
- [55] Y. Fujino, T. Minamizaki, H. Yoshioka, M. Okada, Y. Yoshiko, “Imaging and mapping of mouse bone using MALDI-imaging mass spectrometry,” *Bone Reports*, 5 (2016) 280–285
- [56] M. Harbeck, G. Grupe, “Experimental chemical degradation compared to natural diagenetic alteration of collagen: Implications for collagen quality indicators for stable isotope analysis,” *Archaeol. Anthropol. Sci.*, 1 (2009) 43–57
- [57] J. Sealy, M. Johnson, M. Richards, O. Nehlich, “Comparison of two methods of extracting bone collagen for stable carbon and nitrogen isotope analysis: comparing whole bone demineralization with gelatinization and ultrafiltration,” *J. Archaeol. Sci.*, 47 (2014) 64–69
- [58] M. Hüls, P. M. Grootes, M.-J. Nadeau, “How Clean is Ultrafiltration Cleaning of Bone Collagen ?,” *Radiocarbon*, 49 (2007) 193–200
- [59] M. H. Schweitzer, “Soft-Tissue Vessels and Cellular Preservation in *Tyrannosaurus rex*,” *Science*, 307 (2005) 195–1955
- [60] M. H. Schweitzer, “Analyses of Soft Tissue from *Tyrannosaurus rex* Suggest the Presence of Protein,” *Science*, 316 (2007) 277–280
- [61] C. Plet, K. Grice, A. Pagès, M. Verrall, M. J. L. Coolen, W. Ruebsam, W. D. A. Rickard, L. Schwark, “Palaeobiology of red and white blood cell-like structures, collagen and cholesterol in an ichthyosaur bone,” *Sci. Rep.*, 7 (2017) 1–10



## PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Tabulka s detekovanými látkami ze vzorku chloroformového extraktu silanizovaného pomocí Met-Prep, postup 1

RT (min)	RI	Název
11.758	1409	dodekanal
11.939	1428	methylester kyseliny undekanové
12.101	1436	methylester kyseliny 9-oxononanové
12.187	—	6-ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylchinolin
12.959	1519	N,N-dimethyl-1-dodekanamin
13.248	1526	methylester kyseliny laurové
13.505	1547	dimethylester kyseliny dinonanové
14.022	—	3-methyl-3H-benzothiazol-2-on
14.380	1624	methylester kyseliny tridekanové
15.626	1725	methylester kyseliny myristové
16.208	1779	methylester kyseliny 13-methyltetradekanové
16.453	1808	1-methylundekylbenzen
16.613	1820	methylester kyseliny pentadekanové
16.665	1819	(1-butylonyl)-1-pentyllokylbenzen
16.742	1826	(1-butylonyl)benzen
16.870	1840	(1-propyldeky)benzen
17.926	1926	methylester kyseliny palmitové
17.976	1923	di-tert-butyl-1-oxaspiro(č,5)deka-6,9-dien-2,8-dion
18.114	1943	methyl ester kyseliny 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenopropanové
18.307	2028	methylester kyseliny heptadekanové
18.362	1993	ethylester kyseliny palmitové
18.639	2028	methylester kyseliny palmitové
19.778	2128	methylester kyseliny stearové
20.000	2173	ethylester kyseliny oleové
20.185	2195	ethylester kyseliny stearové
20.450	2228	methylester kyseliny nonadekanové
21.141	—	ethylester kyseliny mono 9-epoxystearové
21.306	2329	methylester kyseliny arachidové
21.735	2386	Oleamid
22.309	2498	ethylester kyseliny 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)palmitové
22.867	2498	ethylester kyseliny 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)palmitové
22.919	2528	methylester kyseliny behenové

23.279	—	1-methyl-5-oxo-L-prolyl-N,1-dimethyl-L-histidyl-N,1-L-tryptofyl-N,N,N2-o-tetramethyl-L-serin
23.870	—	anhydrid kyseliny stearové
24.368	—	propylester kyseliny 2,3-hydroxystearové
24.449	—	4-ethenylhexadekyloxybenzen
27.288	3126	methylester kyseliny stearové
27.419	3087	cholesterol
33.739	3582	Tris(2,4-di-tert-butylfenyl)fosfát

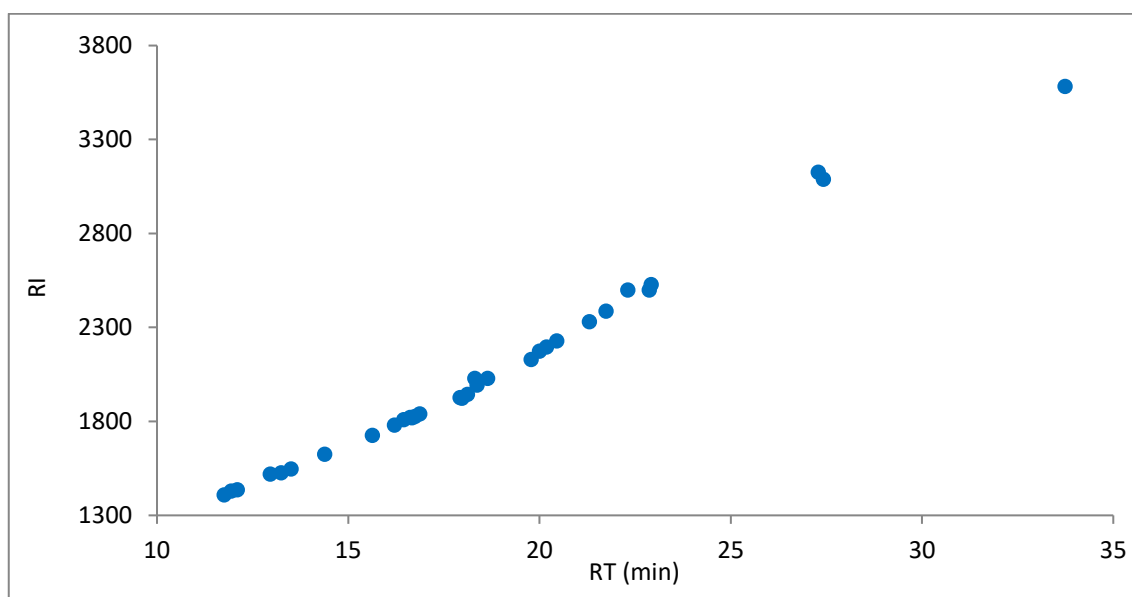
**Příloha 2:** Tabulka s detekovanými látkami ze vzorku chloroformového extraktu silanizovaného pomocí BSTFA, postup 1

RT (min)	RI	Název
4.293	1010	kyselina boritá, 3TMS derivát
5.211	1066	kyselina mléčná, 2TMS d.
5.313	1074	kyselina kapronová, TMS d.
5.730	1104	Nonanal
6.004	1126	methylester kyseliny kaprylové
6.581	1169	kyselina heptanová, TMS d.
6.758	1183	1-oktanol, TMS d.
7.087	1206	dekanal
7.406	1233	fenylethylalkohol, TMS d.
7.878	1266	kyselina kaprylová, TMS d.
8.150	1289	glycerol, 3TMS d.
8.669	1325	methylester kyseliny dekanové
9.044	—	kyselina p-toluová, TMS d.
9.163	1355	kyselina nonanová, TMS d.
9.237	1270	fenoxyethanol, TMS d.
9.585	1390	ethylester kyseliny kaprinové
9.652	1400	Tetradekan
9.861	1385	kyselina 3-chlorbenzoová, TMS d.
10.088	1436	methylester kyseliny 9-oxononanové
10.259	—	2-butyloktanol, TMS d.
10.400	1450	kyselina kaprinová, TMS d.
10.584	1471	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyklohexadien-1,4-dion
10.953	1519	N,N-dimethyl-1-dodekanamin
11.218	1526	methylester kyseliny laurové
11.542	—	kyselina 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyfenylpropanová
11.761	1558	1-dodekanol, TMS d.
11.840	1553	hexadecamethylheptasiloxan
12.021	1595	ethylester kyseliny laurové

12.104	1600	Hexadekan
12.369	1624	methylester kyseliny tridekanové
12.543	1635	Benzofenon
12.719	1655	kyselina laurová, TMS d.
12.879	1659	Tridekanol, TMS d.
13.294	—	Stearyltrimethylamonium chlorid
13.637	1726	1-(pentylheptyl)benzen
13.672	1730	1-(butyloktyl)benzen
13.956	1756	Tetradekanol, TMS d.
14.037	1766	(1-ethyldecyl)benzen
14.192	1779	Methyl 13methyltetradsadecanoate
14.252	1794	ethylester kyseliny myristové
14.442	1808	(1-methylundecyl)benzen
14.592	1820	methylester kyseliny pentadekanové
14.652	1819	(1-pentyloktyl)benzen
14.726	1826	(1-butylnonyl)benzen
14.862	1850	kyselina myristová, TMS d.
15.422	1904	Methyl hexadec-9-enoate
15.510	1914	(1-methyldodecyl)benzene
15.751	1926	methylester kyseliny palmitové
15.884	1943	methylester kyseliny 3,5-bis-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenpropanové
16.060	1965	dibuthylftalát
16.301	1993	ethylester kyseliny palmitové
16.840	2050	kyselina palmitová, TMS d.
17.157	—	Oleanitrl
17.397	2110	methylester kyseliny stearové
17.600	2128	methylstearát
17.860	2152	stearylalkohol, TMS d.
17.938	2173	ethyl olet
18.138	2195	ethylester kyseliny stearové
18.372	2211	kyselina petroselinová, TMS d.
18.608	2246	kyselina stearová, TMS d.
19.042	—	heptadecylesther kyseliny 3-chlorpropionové
19.635	2386	9-octadekenamid
19.961	2418	1-monomyristin, 2TMS d.
20.042	—	oleamid, TMS d.
21.079	2572	di(2-propylpentyl)ester kyseliny ftalové
21.208	2558	2-palmitoylglycerol, 2 TMS d.
21.62	2607	1-monopalmitin, 2TMS d.
22.180	2709	glycerin-1-monoester kyseliny bis-o-trimethylsilylheptadekanové
22.628	2772	2-monostearin, 2TMS d.

22.990	2806	glycerol monostearát, 2TMS d.
24.203	2998	2,3-dihydroxypropylkisanoid, 2TMS d.
24.310	—	3,3,4,4-tetrahydrospirilloxanthin
25.717	3150	Cholesterol, TMS d.
28.526	3397	Tris(2,4-di-tert-butylfenyl)fosfát
31.560	3582	Tris(2,4-di-tert-butylphenyl)fosfát

**Příloha 3:** Graf závislosti retenčního indexu na čase u vzorku chloroformového extraktu silanizovaného pomocí Met-Prep II



**Příloha 4:** Graf závislosti retenčního indexu na čase u vzorku chloroformového extraktu silanizovaného pomocí BSTFA

