

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Michaela Matušková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Fyziologické účinky rozvětvených aminokyselin a jejich analytické stanovení

Michaela Matušková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Matušková**  
Osobní číslo: **C16066**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Fyziologické účinky rozvětvených aminokyselin a jejich analytické stanovení**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na fyziologické účinky aminokyselin, zejména rozvětvených (BCAA), které jsou obsažené v doplňcích stravy pro sportovce. Dále se zabývejte možnostmi analytického stanovení aminokyselin s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie a jejího spojení s hmotnostní spektrometrií.
3. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle vedoucí práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**Ing. Jitka Klikarová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

## **Prohlášení autora práce**

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 1.7.2019

Michaela Matušková

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. (roz. Kolářové) za odborné vedení v průběhu celé diplomové práce, za její čas, obětavost a hlavně trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za umožnění studia na Univerzitě Pardubice a celé rodině a přátelům za jejich podporu nejen při studiu.

## **Anotace:**

Tato bakalářská práce je psána formou literární rešerše se zaměřením na stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Nejprve je popsána struktura, vlastnosti a dělení aminokyselin. Poté jsou diskutovány fyziologické účinky rozvětvených aminokyselin nejen ve sportu a je popsán jejich metabolismus. Dále se bakalářská práce věnuje analytickému stanovení aminokyselin pomocí HPLC v systémech s obrácenými fázemi a derivatizačním činidlům, které si při jejich stanovení používají. V rámci práce jsou diskutovány jejich výhody i nevýhody.

## **Klíčová slova:**

aminokyseliny, aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, derivatizace, RP-HPLC

## **Title:**

Physiological effects of branched-chain amino acids and their analytical determination.

## **Annotation:**

This bachelor thesis is written as a literature research with focusing on the determination of branched-chain amino acids. First, the structure, properties and division of amino acids are described. Then, the physiological effects of branched-chain amino acids are discussed not only in sport and their metabolism is described. Further, the bachelor thesis is devoted to the analytical determination of amino acids by reversed-phase HPLC and to different derivatizing agents which are frequently used during their determination. Their advantages and disadvantages are discussed.

## **Key words:**

amino acids, branched-chain amino acids, derivatization, RP-HPLC

## Obsah

ÚVOD.....	10
1 Aminokyseliny .....	11
1.1 Fyzikální vlastnosti .....	12
1.2 Organoleptické vlastnosti.....	12
1.3 Reakce aminokyselin .....	13
1.4 Tvorba bílkovin.....	15
1.5 Dělení .....	16
2 Rozvětvené aminokyseliny.....	19
2.1 L-leucin .....	19
2.2 L-izoleucin .....	20
2.3 L-valin .....	21
2.4 Fyziologické účinky rozvětvených aminokyselin.....	21
2.5 Metabolismus rozvětvených aminokyselin .....	23
2.6 Nemoci způsobené narušením metabolismu rozvětveným aminokyselin .....	24
3 Stanovení aminokyselin.....	25
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	26
4 ZÁVĚR.....	32
5 POUŽITÁ LITERATURA .....	33



## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Základní vzorec aminokyselin .....	11
<b>Obrázek 2:</b> L a D forma alaninu .....	12
<b>Obrázek 3:</b> Schéma dekarboxylace aminokyselin [15] .....	13
<b>Obrázek 4:</b> Schéma deaminace aminokyselin [71] .....	13
<b>Obrázek 5:</b> Schéma transaminace aminokyselin [15] .....	14
<b>Obrázek 6:</b> Schéma kondenzace aminokyselin [15].....	14
<b>Obrázek 7:</b> Schéma hydrolýzy dipeptidů [19].....	15
<b>Obrázek 8:</b> Leucin [15].....	20
<b>Obrázek 9:</b> Isoleucin [15].....	20
<b>Obrázek 10:</b> Valin [15].....	21
<b>Obrázek 11:</b> Metabolismus BCAA .....	24
<b>Obrázek 12:</b> Reakce ninhydrinu s AMK .....	28
<b>Obrázek 13:</b> Reakce OPA (vlevo) s AMK za účasti MCE.....	28
<b>Obrázek 14:</b> Reakce PITC (vlevo) s AMK.....	29
<b>Obrázek 15:</b> Reakce FMOC-Cl (vlevo nahoře) s AMK.....	30
<b>Obrázek 16:</b> Příklad typické separace aminokyselin pomocí RP-HPLC s derivatizačním čínidlem FMOC-Cl [20] .....	30
<b>Obrázek 17:</b> Struktury dalších derivatizačních činidel .....	31

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Zdroje esenciálních aminokyselin [9] .....	18
--	----

## Seznam zkratek

<b>AMK</b>	aminokyseliny/aminokyselina
<b>AQC</b>	6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidylkarbamát
<b>ATP</b>	adenotrifosfát
<b>BCAA</b>	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
<b>BCAT</b>	transamináza aminokyselin
<b>BCKA</b>	ketokyseliny s rozvětveným řetězcem
<b>BCKDH</b>	komplex dehydrogenázy ketokyselin s rozvětveným řetězcem
<b>CoA</b>	koenzym A
<b>DABS-Cl</b>	4-dimethylaminoazobenzen-4-sulfonylchlorid
<b>DEEMM</b>	dietyl-2 propandioát
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>Dns-Cl</b>	5-N,N-dimethylamino-naftalen-1-sulfonylchlorid
<b>FMOC-Cl</b>	fluorenylmethylchlorformiát
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GDM</b>	glutamát dehydrogenáza
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IVD</b>	izovaleryl-koenzym A dehydrogenáza
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>mRNA</b>	„messengerová“ RNA
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nikotinamidadenindinukleotid
<b>OPA</b>	<i>o</i> -ftaldialdehyd
<b>PITC</b>	fenylisothiokyanát

**RNA**      deoxyribonukleová kyselina

**TCA**      citrátový cyklus

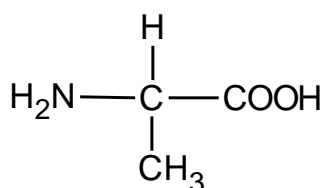
## ÚVOD

Aminokyseliny jsou základními stavebními složkami lidského těla, které jsou potřebné pro životně důležité procesy. Zvláště důležité jsou aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA). Mají mnoho fyziologických funkcí, mimo jiné jsou prekurzory syntézy proteinů, mohou být ukazateli neurologických onemocnění a patří mezi důležité nutriční sloučeniny. Z těchto důvodů jsou často využívány vrcholovými sportovci za účelem zlepšení fyzického výkonu. Nemusí ale napomáhat pouze fyzicky aktivním jedincům, napomáhají také ke snížení únavy, hmotnosti nebo hladiny cukru v krvi. Na druhou stranu může při jejich metabolické poruše dojít k vážným onemocněním.

Aminokyseliny ovlivňují senzorické vlastnosti potravin, jako je chuť, barva a vůně. V posledních letech stoupá zájem o udávání nutričních hodnot potravin, což je často spojováno s jejich falšováním. Z toho důvodu se provádí jejich stanovení, především pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie či dalších moderních analytických technik. Z důvodu absence chromoforu či fluoroforu je pro detekci aminokyselin nutná nejprve jejich derivatizace, a to pomocí různých derivatizačních činidel.

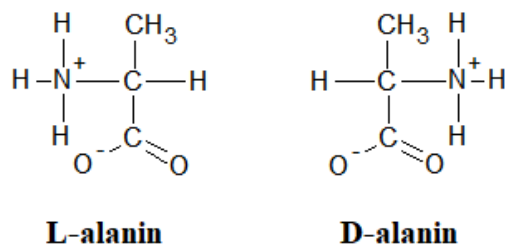
# 1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou substituční deriváty karboxylových kyselin. Jsou známé jako stavební kameny bílkovin, peptidů a dalších látek, ve kterých jsou jejich jednotlivé AMK propojeny peptidovou vazbou [1]. Ze strukturního hlediska to jsou organické kyseliny, ve kterých je jeden nebo více atomů vodíku nahrazen aminoskupinou [2]. Tato skupina se obvykle nachází na  $\alpha$ -uhlíku bezprostředně vedle karboxylové skupiny (obrázek 1), a to zejména u přirozeně se vyskytujících aminokyselin vázaných v proteinech [3,4]. Proteinogenních aminokyselin je však pouze 20 z celkových 300 [5,6]. Kromě 20 kódovaných se v lidském organismu vyskytují i další aminokyseliny, které mohou být součástí některých biologicky významných peptidů nebo výchozími látkami pro biosyntézu různých neproteinových dusíkatých látek, případně produkty jejich metabolismu [2].



**Obrázek 1:** Základní vzorec aminokyselin

Aminokyseliny s výjimkou glycinu obsahují jeden asymetrický uhlík, tudíž mohou mít dvě různé prostorové modifikace, D-formu a L-formu viz obrázek 2 [3,4]. Tyto formy jsou zrcadlovým obrazem, ale zároveň jsou neztotožnitelné, stejně jako pravá a levá ruka. Liší se ve směru, jakým otáčí rovinu polarizovaného světla, což je měřitelné za pomoci polarimetru [8]. V přírodě se vyskytují většinou pouze L-formy, D-formy se vyskytují jen zřídka v některých peptidech [2]. Aminokyselinám odvozeným od D-glyceraldehydu říkáme biogenní D-aminokyseliny a jejichž přítomnost mívá často mikrobiální původ. Vyskytují se převážně v čerstvých, tepelně neopracovaných potravinách, jako jsou jogurty, které vznikají na principu mléčného kvašení. Také existují abiogenní D-aminokyseliny, které jsou součástí proteinů, z nichž se uvolní až hydrolyzou a vznikají neenzymovou izomerací L-aminokyselin při tepelném zpracování potravin, především izomerací v zásaditém prostředí [9].



**Obrázek 2:** L a D forma alaninu

## 1.1 Fyzikální vlastnosti

Na pohled jsou aminokyseliny krystalické, bezbarvé látky, které se většinou dobře rozpouští ve vodě [10]. Také mají vysoký bod tání z důvodu vysoké energie, jenž je potřeba vydat, aby mohlo dojít k narušení iontových vazeb, které jsou zodpovědné za stabilizaci jejich krystalové mřížky [11]. Dále díky tvorbě vnitřních solí mají AMK i vyšší teplotu rozkladu, která se pohybuje nad hranicí 200 °C [12].

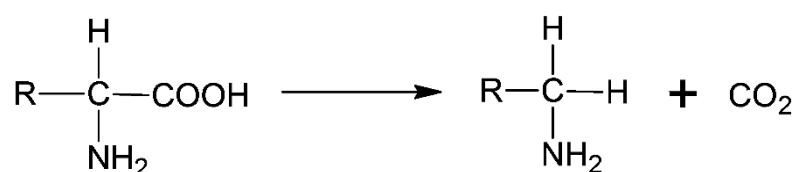
Především díky schopnosti karboxylové skupiny odštěpovat ionty nebo naopak schopnosti aminoskupiny ionty přijímat, mají aminokyseliny amfoterní charakter. V závislosti na pH prostředí, ve kterém se aminokyselina nachází, se může chovat jako kyselina i jako zásada. Při určitém pH dokáže mít aminokyselina neutrální formu, takovému pH říkáme izoelektrický bod. Díky nízké polaritě AMK v tomto neutrálním stavu u nich dochází ke zvýšení rozpustnosti ve vodě [2,13].

## 1.2 Organoleptické vlastnosti

Společně s peptidy obsahují některé volné aminokyseliny sensoricky aktivní látky, díky kterým mohou ovlivnit organoleptické vlastnosti potravin. Používají se převážně u potravin, u kterých probíhá při výrobě silnější proteolýza, například u ryb nebo některých sýrů. Podle organoleptických vlastností se rozdělují na sladké, slané, hořké a indiferentní. Mezi ty sladké patří alanin, prolin, threonin, hydroxyprolin a glycin, jehož název je odvozen od řeckého *glykys* = sladký. Kyselé AMK tvoří kyselina asparagová společně s kyselinou glutamovou. Mezi hořké patří AMK s hydrofobními postranními řetězci, jako je leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan. Jako indiferentní se označují ostatní aminokyseliny. Aminokyselinou, která svými organoleptickými vlastnostmi převyšuje ostatní je kyselina glutamová, přesněji řečeno její sodná sůl, která se díky její specifické chuti používá jako aditivum do kořenících směsí [9].

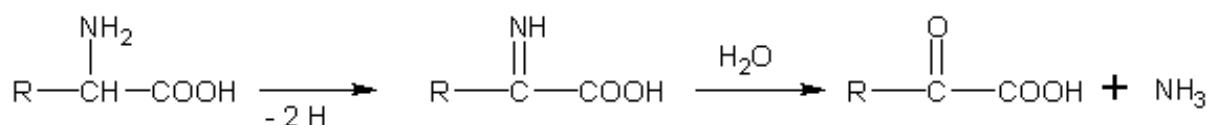
### 1.3 Reakce aminokyselin

Aminokyseliny mohou podléhat různým biochemickým reakcím. Jednou ze základních je dekarboxylace, při které se uvolňuje oxid uhličitý a z aminokyseliny se stává amin, jak je znázorněno na obrázku 3. Mnohé aminy mají biologický význam jako složky fosfolipidů, koenzymů, hormonů nebo také jako samostatné látky. Například etanolamin ze serinu a jeho trimethylderivát cholin jsou složkami glycerolfosfátů, cysteamin je složkou koenzymu A a histamin patří společně s tryptaminem mezi tkáňové hormony [14].



**Obrázek 3:** Schéma dekarboxylace aminokyselin [15]

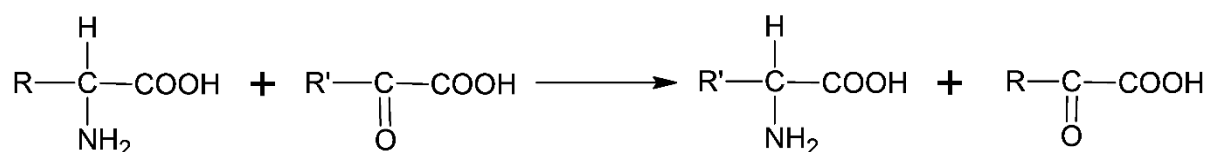
Další reakcí je oxidační deaminace aminokyseliny, kde vzniká jako první iminokyselina, která se hydrolyzuje na oxokyselinu a amoniak (obrázek 4). Reakci katalyzuje oxidáza L-aminokyselin a glutamátdehydrogenáza. Druhá zmíněná se vyskytuje v mitochondriích všech buněk. Tento velmi aktivní enzym deaminuje kyselinu glutamátovou na kyselinu 2-oxoglutarátovou, která vstupuje pro procesu transaminace [14].



**Obrázek 4:** Schéma deaminace aminokyselin [71]

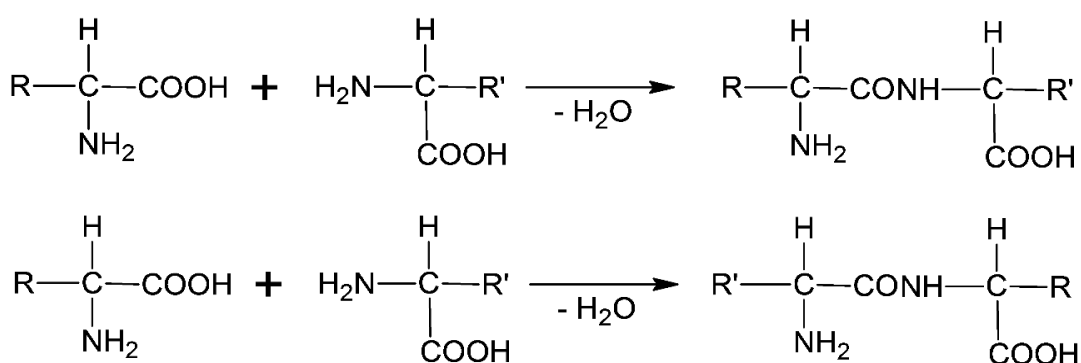
Při transaminaci nastává výměna funkčních skupin mezi aminokyselinou a oxokyselinou, přičemž při výměně vzniká nová aminokyselina a oxokyselina. Reakce je znázorněna na obrázku 5. Transaminaci zabezpečují aminotransferázy, jejichž koenzymem je pyridoxalfosfát vyměňující aminoskupiny prostřednictvím tvorby Schiffovy báze, analogicky jako u aminokyselinové dekarboxylace.

Ústřední funkci v reakcích transaminace má kyselina glutamátová a kyselina 2-oxoglutarová, které zabezpečují deaminaci aminokyselin a aminaci oxokyselin, což má význam při biosyntéze aminokyselin. Oxokyseliny vznikající degradací aminokyselin jsou využity při metabolismu, například v citrátovém cyklu. V případě, že se amoniak nevyužije na aminaci oxokyselin, dochází k jeho vyloučení v závislosti na druhu organismu. U organismů, které žijí ve vodném prostředí se amoniak rozpustí a zředí, čímž ztratí svou toxicitu. Naopak u organismů žijících v prostředí s menším obsahem vody se amoniak metabolizuje až na kyselinu močovou, která je málo rozpustná, a proto i málo toxická [14].



**Obrázek 5:** Schéma transaminace aminokyselin [15]

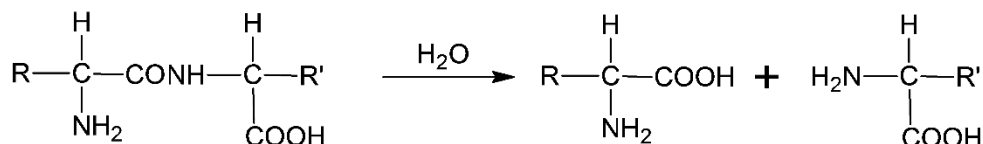
Mezi jedny z nejdůležitějších reakcí aminokyselin patří kondenzace, při které dochází ke tvorbě peptidové vazby. Tato vazba vzniká reakcí  $\alpha$ -aminoskupiny jedné AMK s  $\alpha$ -karboxylovou skupinou druhé AMK za odštěpení molekuly vody (obrázek 6). Aby ke vzniku peptidové vazby došlo, musí být aktivována karboxylová skupina. Pořadí AMK v polypeptidovém řetězci pak určuje primární strukturu proteinu [11].



**Obrázek 6:** Schéma kondenzace aminokyselin [15]



Opačnou reakcí je hydrolýza peptidu (obrázek 7), kdy působením roztoků kyselin, zásad či enzymů dochází ke štěpení peptidu na jednotlivé aminokyseliny [15].



**Obrázek 7:** Schéma hydrolýzy dipeptidů [19]

## 1.4 Tvorba bílkovin

Proteosyntéza je složitý proces, na kterém se podílí různé buňkové organely, enzymy i další látky. Jeho výsledkem je produkce potřebného množství proteinů pro buňku, a to z hlediska kvality i množství.

Proteosyntéza se skládá ze dvou procesů, transkripce a translace. Transkripci se přepíše potřebná část informací o složení konkrétního proteinu z archivované kopie DNA do pracovní kopie, kterou představuje RNA. Při translaci se genetický kód mRNA přenesou do pořadí AMK v polypeptidovém řetězci. Prvním krokem translace je uvolňování AMK do aminokyselinového poolu, kde se navazují na tRNA. Ta je ihned doručí na místo syntézy polypeptidového řetězce. Další fází je iniciace, při které se vytváří vhodné podmínky pro začátek polymerace. Následuje elongace, při které se podle předlohy přinesené mRNA postupně skládá polymer, přesněji řečeno polypeptidový řetězec. Poslední etapou, která celý proces ukončuje je terminace, při které se uvolňují látky, které se procesu nezúčastnily [14].

Proteosyntézy se účastní více než 20 molekul tRNA, při čemž každá nese jednu z 20 aminokyselin a je podle ní i označována. Příslušná AMK se před vstupem do ribozomu naváže na 3'-konec molekuly tRNA, a to ve formě aminoacylu. Také je k navázání potřebná chemická energie, která je získávána štěpením adenosintrifosfátu (ATP). Aminoacyl vzniká odštěpením hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny dané aminokyseliny. Molekula tRNA společně s navázanou molekulou aminokyseliny dále přechází do složitěho nukleoproteinového útvaru, který se skládá z malé a velké podjednotky, ribozomu. Podjednotky se při navázání mRNA k menší podjednotce před zahájením translace spojují, následně dochází ke kontaktu mRNA s tRNA a konečnému připojení AMK

do polypeptidového řetězce. I to je důvodem, proč má ribozom více vazebných míst, ale každé s jinou funkcí.

Jedním z nich je aminoacylové místo (A-místo), do kterého vstupuje molekula tRNA společně s navázanou AMK. Antikodon tRNA se přitom páruje s kodonem mRNA. Peptidové místo (P-místo) je dalším vazebným místem. Obsahuje předchozí molekulu tRNA, na níž je navázán již vzniklý peptidový řetězec. Posledním významným vazebným místem je peptidyltransferázové místo, kde se nová aminokyselina připojuje ke stávajícímu polypeptidovému řetězci. tRNA, ke které byl původně navázán polypeptidový řetězec a je nyní „prázdná“, opouští ribozom a může být po připojení další aminokyseliny opět využita k syntéze bílkovin.

Při translaci mRNA jsou k jejím kodonům přiřazovány jednotlivé molekuly tRNA s danými aminokyselinami a sekvence mRNA je čtena po tripletech nukleotidů. Sekvence pak udává pořadí AMK v polypeptidovém řetězci. Vzniklý polypeptid dále podléhá ještě dalším, tzv. posttraslačním úpravám, probíhajícím u eukaryot, a to především v endoplazmatickém retikulu či v Golgiho aparátu [16].

## 1.5 Dělení

Aminokyseliny můžeme rozdělit podle různých hledisek, jako je charakter postranního řetězce, postradatelnost a další.

Podle chemického charakteru postranních řetězců proteinogenních aminokyselin, které se ve velké míře podílí na chemických vlastnostech aminokyseliny, je lze rozřadit do 7 skupin. První z nich tvoří **nepolární aminokyseliny** (glycin, alanin, fenylalanin, leucin, izoleucin, prolin, valin, a methionin), které peptidu dodávají hydrofobní vlastnosti, tím se jednotlivé řetězce shlukují a tvoří nepolární mikrokapičky na molekule peptidu, což má za následek schopnost vázat nízkomolekulární nepolární látky. Další skupinou jsou **polární aminokyseliny** (serin, aspargin, threonin, tryptofan a glutamin), které mají ve své struktuře obsaženy polární funkční skupiny, zejména vodíkové atomy vázající se na vysoce elektronegativní atomy. Snadno se tedy vytvářejí polární interakce, především vodíkové vazby, a to s molekulami vody nebo s jinými nízkomolekulárními polárními látkami. Jejich vysoká solvatace zvyšuje bílkovinou rozpustnost ve vodě a prostorovým rozložením dipólů umožňují specifickou vazbu větších polárních látek. **Aromatické** aminokyseliny polární a nepolární (alanin, tyrozin a tryptofan) se pojí pomocí van der Waalových vazeb s jinými

aromatickými sloučeninami. Jejich využití můžeme najít ve stanovení bílkovin nedestruktivními metodami, zejména u tyrozinu a tryptofanu. **Kyselé aminokyseliny** jako je kyselina asparagová a glutamová při fyziologickém pH obsahují záporně nabitou funkční skupinu, díky které mohou elektrostaticky vázat kationty. Také mohou kovalentně vázat i alkoholy, aminy nebo oxid uhličitý. Naopak **bazické aminokyseliny** (lyzin a arginin), které obsahují aminové a guanidinové skupiny nesou při fyziologickém pH kladný náboj. Jsou také známé pro svou schopnost kovalentně vázat karbonylové skupiny, a to formou Schiffových bází [14,17].

Dalším hlediskem pro dělení aminokyselin je jejich postradatelnost. Některé aminokyseliny si totiž tělo nedokáže syntetizovat samo a jelikož jsou pro organismus nepostradatelné, musí je přijmout z potravy [18]. Takovým aminokyselinám říkáme **esenciální**. Patří mezi ně valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tryptofan, methionin, threonin a lyzin. Ve stravě je většina esenciálních aminokyselin zastoupena v dostatečném množství, jak je patrné z tabulky 1, kde jsou uvedeny potravinové zdroje jednotlivých esenciálních aminokyselin. Aminokyselina, které bývá zpravidla nejméně, se označuje jako limitující aminokyselina. Některé potraviny a krmiva se tedy mohou těmito limitujícími aminokyselinami obohacovat [9]. Naproti tomu **neesenciální** aminokyseliny jsou organismem syntetizovány v dostačujícím množství, pro optimální růst, vývoj a zdraví. Jejich uhlíková kostra vzniká z běžných metabolitů, jako je pyruvát, oxalacetát a další. Tyrozin a cystein se řadí mezi takzvaně **podmíněně postradatelné**, ale pouze tehdy, když je dostatek esenciálních aminokyselin, ze kterých se tyto dvě AMK tvoří. Základem pro vznik tyrozinu je fenylalanin a cystein vzniká syntézou z methioninu. Potom existují zvláštní případy **poloesenciálních** aminokyselin, kdy je aminokyselina postradatelná pouze v dětském věku, v dospělosti už je esenciální [17,19].

**Tabulka 1:** Zdroje esenciálních aminokyselin [9]

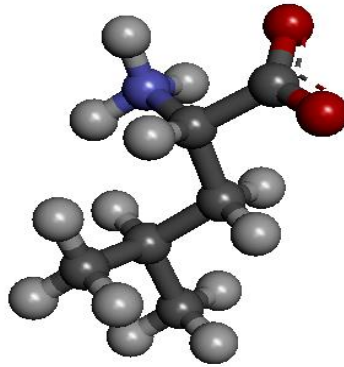
<b>Aminokyselina</b>	<b>Zdroj</b>	<b>Procentuální zastoupení</b>	<b>Zajímavosti</b>
Valin	Maso, obilovina Mléko, vejce	5-7 % 7-8%	Obsahují až 16% elastinu
Leucin	Obiloviny	Až 10%	Díky činnosti bakterií vznik u zrajících sýrů
Izoleucin	Mléčné a vaječné bílkoviny Maso, obiloviny	6-7% 4-5%	
Threonin	Maso a pivovarské kvasnice Živočišné bílkoviny	5%	Limitující aminokyselina
Methionin	Živočišné bílkoviny Rostlinné bílkoviny	2-4% 1-2%	Limitující aminokyselina v luštěninách Společně s cysteinem chybí v protaminech
Lysin	Živočišné bílkoviny Bílkoviny ryb a koryšů Cereální výrobky	7-9% 10-11% 2-4%	Limitující aminokyselina v cereálních výrobcích
Fenylalanin	Běžné bílkoviny potravin	4-5%	Jeho přítomnost v potravě může vyvolat ketonurii
Tryptofan	Živočišné bílkoviny (bez histonů a kolagenů) Obiloviny	1-2% <1%	Biosyntéza nikotinové kyseliny Může způsobit plicní edém

## 2 Rozvětvené aminokyseliny

Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, jmenovitě leucin, izoleucin a valin, patří mezi esenciální AMK [20]. Primární rozdíl mezi BCAA a ostatními aminokyselinami je v místě rozkladu, protože BCAA se rozkládají spíše ve svalech než v játrech. Z tohoto důvodu se předpokládá, že hrají roli při výrobě energie během cvičení a využívají se často ve formě proteinových doplňků pro zlepšení fyzického výkonu [21]. V posledních letech bylo však zaznamenáno mnoho nových funkcí těchto tří rozvětvených aminokyselin [22].

### 2.1 L-leucin

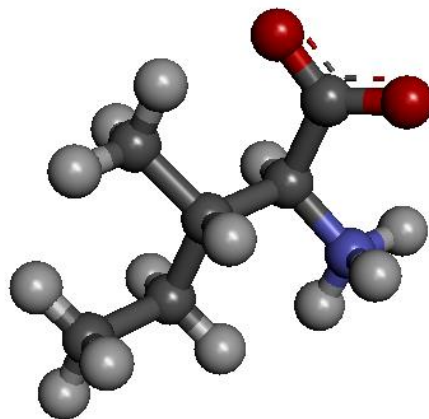
Mezi hlavní funkce L-leucinu (obrázek 8) patří syntéza proteinů a řada metabolických funkcí. Přispívá také k regulaci hladiny cukru v krvi, růstu a opravě svalové a kostní tkáně, produkci růstových hormonů a hojení ran. Také zabraňuje rozpadu svalových proteinů po traumatu nebo silném stresu. Účastní se alaninového cyklu, kterým je zajištěna recyklace glukózy ve svalech. Když svaly obsahují glukózu, mají energetický zdroj a k získání energie nemusí katabolizovat. Může být prospěšný i pro osoby s fenylketonurií [23,24]. Ze všech tří aminokyselin se největší částí podílí na regulaci mnoha klíčových signalizačních drah, z nichž jedna z nejdůležitějších je aktivace signální dráhy mTOR. Tato signalizační dráha spojuje nespočet fyziologických či metabolických funkcí [20,22]. Sice je ze tří BCAA nejdůležitější aminokyselinou, ale je dokázáno, že při jeho zvýšené spotřebě dochází v krevní plazmě ke snížení zbylých dvou BCAA (valinu a izoleucinu), jedná se tedy o synergické fungování. To je důvodem, proč se v suplementech objevují všechny tři tyto aminokyseliny s rozvětveným řetězcem společně. I tak je téměř vždy leucin zastoupen nejvíce [23]. Leucin můžeme najít v potravinách, jako je třeba mléko, sója, fazole nebo luštěniny [25]. Využívá se i jako přísada do nemléčných a mléčných náhrad jídla, sportovních a izotonických nápojů či do vod obohacených na vitamíny. Při nadbytečném příjmu leucinu může dojít ke komplikacím a symptomům, které jsou typické pro hypoglykémii. Také může vést k nahromadění čpavku v těle, což způsobuje nemoc pelagru [24]. Denní spotřeba leucinu je ze všech tří aminokyselin nejvyšší a u sportovců se pohybuje kolem 60 mg/kg/den. Je schopný nastartovat syntézu bílkovin rychleji než ostatní aminokyseliny, dá se aplikovat i jako samostatný doplněk. Jeho využití závisí na hladině inzulínu v krvi, tudíž je nutné jeho suplementaci doplnit jednoduchými sacharidy [26].



**Obrázek 8:** Leucin [15]

## 2.2 L-izoleucin

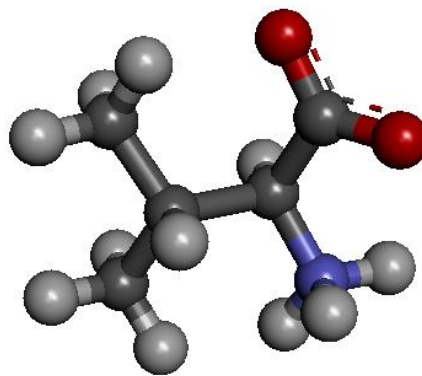
L-izoleucin (obrázek 9) má také velký význam pro lidský organismus. Napomáhá při hojení ran, imunitě, regulaci hladiny cukru v krvi a produkci hormonů. Je primárně přítomen ve svalové tkáni a reguluje energetické hladiny. S přibývajícím věkem mohou být lidé náchylnější k jeho nedostatku, což způsobuje ztrátu svalů a třes. Díky jeho schopnosti přeměnit se rychle na glukózu šetří zásoby svalového glykogenu a mimo to také podporuje tvorbu hemoglobinu [23,25]. U izoleucinu se díky problematickému měření jeho štěpení organismem denní potřeba odhaduje těžko. Odhadovaný doporučený příjem je 20 mg/kg/den [26].



**Obrázek 9:** Izoleucin [15]

### 2.3 L-valin

L-valin (obrázek 10) je nezbytný pro duševní zdraví, svalovou koordinaci a emocionální klid. Lidé jeho doplňky mohou využívat pro růst svalů, opravu tkání a energii. Jeho nedostatek může způsobit nespavost a sníženou duševní funkci. Je jedním z důležitých komponentů elastických vláken živočichů, ovlivňuje absorpci melaninu, tryptofanu, fenylalaninu a jiných nervových přenašečů [23,25]. Denní spotřeba valinu je pro trénující jedince 50 mg/kg/den [26].



Obrázek 10: Valin [15]

### 2.4 Fyziologické účinky rozvětvených aminokyselin

Je dokázáno, že BCAA mohou pomoci zmenšit únavu, kterou sportovci pociťují během cvičení [27]. Doplněním BCAA ve stravě se dá totiž zabránit jejich poklesu v séru, ke kterému během cvičení dochází. Sérový pokles by normálně způsobil příliv tryptofanu do mozku, následovaný produkcí serotoninu, který způsobuje únavu [28]. Některé studie dokázaly, že lidé, kteří dostávali BCAA během cvičení, pociťovali o 15 % nižší únavu v porovnání s těmi, kterým bylo podáváno placebo [29]. V jiné studii zase BCAA napomohly skupině dosáhnout vyčerpání až o 17 % času později ve srovnání se skupinou s placebem [30]. Ne všechny studie však ukázaly, že by snížená únavu způsobila zlepšení fyzického výkonu [29]. Kromě toho může být snižování únavy pomocí BCAA účinnější při cvičení netrénovaných sportovců ve srovnání s trénovanými jedinci [31].

Také bylo dokázáno, že BCAA mají anabolické účinky na metabolismus proteinů, a to zvýšením rychlosti syntézy proteinů a snížením rychlosti jejich degradace v klidovém lidském

svalstvu. Je však důležité, aby všechny esenciálních aminokyseliny i neesenciální aminokyseliny byly přítomny v odpovídajícím množství [32]. Jelikož se BCAA na rozdíl od nerozvětvených aminokyselin rozpadají v játrech jen minimálně, díky jejich nedostatečnému vychytávání z krevního řečiště mohou dále v poměrně velkém množství pokračovat až do svalů či mozku. Tam jsou využity jako bezprostřední palivo, především díky schopnosti aktivovat enzymy zodpovědné za budování svalů [32]. Také bylo zjištěno, že při zotavování se z vytrvalostního cvičení mají BCAA anabolické účinky na lidské svalstvo [26,27]. Přesněji řečeno ve vybrané studii bylo dokázáno, že 5 g BCAA před cvičením může snížit opožděný nástup bolesti a svalovou únavu až na několik dní po cvičení [21].

Je dokázáno, že hladina glukózy v krvi je rovněž ovlivněna BCAA, protože BCAA silně zvyšují spotřebu a využití glukózy. Předpokládá se, že leucin a izoleucin způsobují zvýšení sekrece inzulínu, což vede k většímu využívání krve svaly, čímž se hladina cukru v krvi snižuje. Při orálním testu tolerance glukózy u zvířat izoleucin a leucin zabránily vzestupu koncentrace glukózy v plazmě. Účinek izoleucinu byl o něco větší než u zbylých dvou BCAA [33]. Jelikož byly mnohé studie provedeny na zvířatech nebo buňkách, jejich výsledky nemusí zcela platit i u člověka. Navíc i lidí se účinky mezi testovanými občas liší. Při jedné nedávné studii bylo podáváno dobrovolníkům 12,5 g BCAA třikrát denně. U 10 z nich byla snížena hladina cukru v krvi na rozdíl od dalších 17 účastníků, u kterých nebyly prokázány žádné účinky [34].

Dále je prezentován vliv BCAA na snížení hmotnosti [35]. Uvádí se, že lidé, kteří konzumují v průměru 15 g BCAA ve stravě, mohou mít až o 30 % nižší riziko nadváhy nebo obezity ve srovnání s těmi, kteří je konzumují v menším množství [35]. V jiné studii byla pozorována ztráta tuku při hubnutí v důsledku podávání BCAA [36]. Studie byla provedena na konkurenčních zápasnících při kaloricky omezené dietě s vysokým obsahem bílkovin po dobu 19 dní. Dobrovolníci se stravou doplněnou o BCAA, ztratili o 3,5 kg více a ztratili o 0,6 % více tělesného tuku než ti, kterým byl podáván doplněk sójového proteinu, a to navzdory tomu, že každý den konzumovali ekvivalentní množství kalorií a o něco méně celkového proteinu.

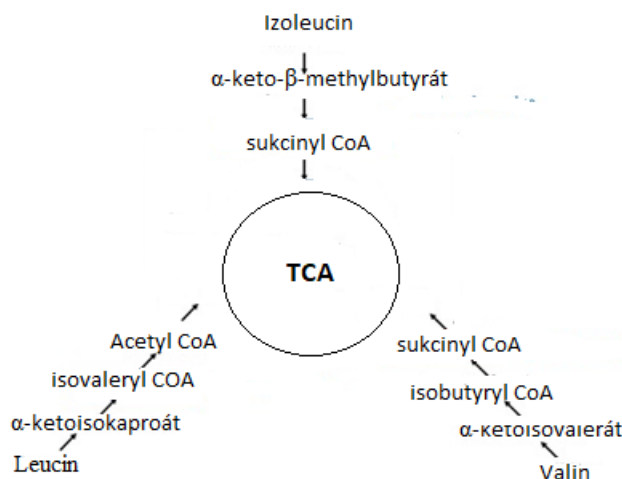
BCAA také mohou zlepšit průběh cirhózy, tedy chronického onemocnění jater. Podle odhadů se u poloviny lidí, kteří cirhózu mají, vyvine jaterní encefalopie, což je nemoc, u které může dojít ke ztrátě mozkové funkce. Dochází k ní v případech, kdy játra nejsou schopna odstranit nežádoucí toxiny z krve [37]. Nedávný přehled [38] naznačuje, že u pacientů s onemocněním jater, mohou být doplňky BCAA výhodnější než jiné doplňky



stravy používané při snižování závažnosti tohoto onemocnění. Při užívání BCAA však nedochází ke zlepšení celkové míry přežití ani ke snížení rizika jiných komplikací, jako jsou infekce a krvácení do žaludku. U jedinců s onemocněním jater však mohou být účinné při snižování únavy a zmírnění slabosti, zlepšení kvality spánku a svalových křečí [39].

## 2.5 Metabolismus rozvětvených aminokyselin

Všechny kroky katabolické dráhy BCAA se uskutečňují v mitochondriích. První dva kroky této degradační dráhy jsou společné pro všechny tři BCAA. První reakce, katalyzována aminotrasferázou s rozvětveným řetězcem (BCAT), je transaminace, při které probíhá přenos aminoskupiny na  $\alpha$ -ketoglutarát za vzniku  $\alpha$ -ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCKA). Přesněji řečeno leucin se přemění na  $\alpha$ -ketoisokaproát, valin na  $\alpha$ -ketoisovalerát a izoleucin na  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerát, při čemž ještě dojde k uvolnění glutamátu. Následující reakce, která je katalyzována komplexem dehydrogenázy  $\alpha$ -ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCKDH), je nevratný děj oxidační dekarboxylace, kdy se karboxylové skupiny BCKA dekarboxylují za vzniku odpovídajících rozvětvených acyl-CoA esterů. Nakonec jsou tyto BCAA metabolity katabolizovány řadou enzymatických reakcí na konečné produkty. Z leucinu vzniká acetyl-CoA, z valinu vzniká sukcinyl-CoA a i izoleucinu vznikají oba, jak acetyl-CoA, tak sukcinyl-CoA. Tyto produkty pak vstupují do citrátového cyklu (TCA) [22,40-42]. Celé schéma metabolismu je znázorněno na obrázku 11. Klíčovou roli v metabolismu BCAA hraje především kosterní sval, jakožto počáteční místo katabolismu BCAA. Dále aktivita jaterního komplexu BCKDH a v neposlední řadě je jednou z důležitých reakcí také aminace BCKA na BCAA [43].



**Obrázek 11:** Metabolismus BCAA

## 2.6 Nemoci způsobené narušením metabolismu rozvětveným aminokyselin

Jelikož mají aminokyseliny nespočet důležitých funkcí v těle, je za potřebí, aby i jejich degradace v těle probíhala, jak má. Pokud ale aminokyseliny, zejména ty s rozvětveným řetězcem, nejsou správně metabolizovány, jejich toxické vedlejší produkty se mohou nahromadit v krvi či moči a dokážou způsobit řadu metabolických poruch vyvolávajících různá dědičná onemocnění [44].

Asi neznámějším onemocněním vyvolaným poruchou metabolismu AMK je onemocnění javorového sirupu. Je to dědičná choroba, která je způsobena narušením aktivity BCKDH, čímž dojde k nahromadění BCAA v plazmě, α-ketokyselin v moči a produkci markeru patognomonického onemocnění aloisoleucinu. Příznaky nemoci se objevují kolem konce prvního týdnu po narození dítěte. Kromě hlavního rysu této nemoci, kterým je typický zápach moči připomínající javorový sirup či pálený cukr, je u novorozenců zvýšená obtížnost výživy, letargie nebo zvracení. Jediným možným způsobem diagnózy je enzymová analýza, a to ke konci prvního týdne po narození dítěte. U přežívajících dětí se pravděpodobně začne postupem času vyvíjet extenzivní poškození mozku. Neléčení novorozenci většinou podlehnou nemoci již před svými prvními narozeninami, naopak při včasné zahájené léčbě se dají tragické následky odvrátit. Léčba spočívá v omezení BCAA a v pečlivém sledování metabolismu. Až když se hladina těchto tří BCAA v plazmě sníží na obvyklou normu, můžeme je začít zařazovat do stravy například ve formě mléka, případně jiných potravin v daných množstvích, které by však neměly přesáhnout metabolickou potřebu [11,45].

Dalším možným onemocněním je isovalerická acidemie, což je autosomálně recesivní vrozená chyba metabolismu leucinu způsobená nedostatkem mitochondriálního enzymu isovaleryl-CoA dehydrogenázy, který je potřebný k rozpadu leucinu. Nahromaděný isovaleryl-CoA se hydrolyzou přemění na isovalerát, který se pak vyloučí močí, případně i potem. Tato nemoc, projevující se sýrovitým zápachem dechu a tělních tekutin či zvracením. Isovalerická acidemie je také známá jako syndrom zpocených nohou, jelikož nahromaděná kyselina isovalerová vydává zápach, který smrdí jako pot. U těžce postižených jedinců je při včasné diagnóze a dietě s omezeným obsahem proteinů společně s doplněním karnitinu a glycinu léčba účinná a podporuje normální vývoj jedince [11,44,46].

Propionová acidemie je způsobena chybějící propionyl-CoA-karboxylázou a následným zvýšením hladiny propionátu v séru. Metabolická dekompenzace se může projevit letargií, zvracením, bezvědomím, ale bohužel v nejhorších případech i smrtí, pokud není léčba zahájena včas. K úspěšné léčbě je základem nízkoproteinová dieta s korekcí metabolické acidózy. Děti, které tuto poruchu přežijí, mohou mít v budoucnu problémy s ledvinami či srdcem a mohou být mentálně postiženi.

Typů acidémie je mnohem víc, například methylmalonová, která je úzce spjata s nedostatkem vitamínu B12 a příznaky či léčbou je podobná právě propionové acidemii [11,44,47].

### **3 Stanovení aminokyselin**

Aminokyseliny jsou analyzovány v mnoha odvětvích, jednou z nejdůležitějších je stanovení nutriční hodnoty potravinářských a nápojových výrobků, které jsou aminokyselinami obohacovány. Analýza může být nápomocná i při detekci potenciálně toxických aminokyselin či peptidů produkovaných novými technologiemi zpracování potravin [48,49]. Moderní metody separace a kvantifikace volných aminokyselin využívají převážně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), často v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS). Dále se dají AMK stanovit iontově výměnnou chromatografií (IEX), plynovou chromatografií (GC) nebo elektroforézou (CE) s použitím polyakrylamidového gelu [11,42].

### 3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysoká účinnost chromatografického separačního procesu je způsobena především použitím kolon, které jsou vyrobeny z ocelové nebo skleněné trubice, jejíž vnitřní průměr bývá 2-5 mm s délkou 30-300 mm. Kolony jsou naplněny příslušnou stacionární fází, obvykle jí bývá chemicky modifikovaný silikagel s vhodnou zrnitostí. Typickými vlastnostmi pro HPLC kolony je jejich vysoká hustota, homogenita náplně stacionární fáze, a tedy i velký hydrodynamický odpor. Mobilní fáze, obvykle tvořená směsí dvou nebo více složek, je čerpána vysokotlakým pístovým čerpadlem. Do proudu mobilní fáze, se nastříkne vzorek o přesně definovaném objemu pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou. Vzorek je poté unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci.

Samotná separace probíhá na principu distribuce vzorku mezi mobilní a stacionární fází, které jsou vzájemně nemísitelné. Postupně jsou z kolony eluovány všechny složky směsi, v čase odpovídající afinitě dané látky ke stacionární fázi. Jednotlivé látky opouštějící kolonu jsou detekovány pomocí různých detektorů. Nejčastěji se používá spektrofotometrický detektor, který je schopen sledovat absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Základem detektoru je průtočná měrná cela z křemenného materiálu. Detektor je především využíván hlavně díky jeho univerzálnosti při práci v ultrafialové a viditelné oblasti, nízké mezi detekce a širokému lineárnímu dynamického rozsahu. Pro fluoreskující látky se využívá fluorimetrický detektor, kde je zdrojem záření miniaturní vysokotlaká xenonová výbojka či laser. Stále častěji se v HPLC používá hmotnostní spektrometr, který dokáže jednotlivé látky vycházející z kolony na základě získaných hmotnostních spekter identifikovat [50-52].

Nejčastěji používaným chromatografickým systémem pro analýzu látek nepolárních, polárních i iontových je chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC). U tohoto systému se používají nepolární stacionární fáze, nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel pomocí oktylového či oktadecylového řetězce. Mobilní fáze je polární a nejčastěji ji tvoří směs vody a organického rozpouštědla, jako je methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Pokud vzorek obsahuje látky s kyselými nebo bazickými skupinami jako jsou aminokyseliny, je nutná úprava pH mobilní fáze pomocí kyseliny, zásady nebo pufru. K separaci látek lišící se polaritou, a tedy afinitou ke stacionární fázi ve velkém rozsahu je nutné využít gradientovou eluci, kdy se během separace mění složení mobilní fáze s časem [48,53].

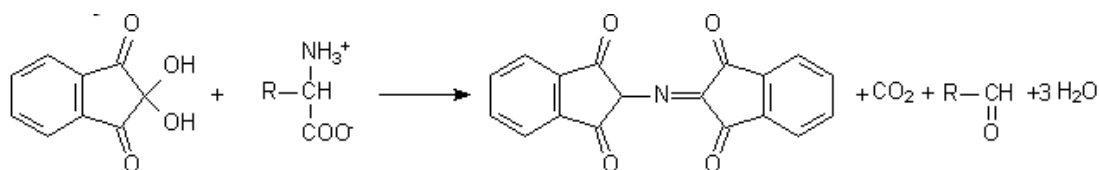
Hlavním problémem stanovení aminokyselin je, že neobsahují ve své molekule chromofor nebo fluorofor. Při jejich spektrofotometrické detekci by se proto musela využívat

absorbance v rozsahu 190-210 nm kde však absorbují složky mobilní fáze i matrice. Proto se při stanovení aminokyselin provádí derivatizace, tzn. že aminokyseliny reagují s vhodným činidlem pro zavedení chromoforní či flouroformní skupiny do molekuly, čímž dochází ke zvýšení selektivity a citlivosti detekce [55,56].

Pro derivatizaci AMK v RP-HPLC bylo navrženo několik derivatizačních činidel, a to buď v režimu před, nebo za kolonou. Derivatizace za kolonou je do značné míry založena na separaci AMK pomocí iontově výměnné chromatografie. Po separaci jsou aminokyseliny převedeny na barevné ninhydrinové deriváty pro kolorimetrickou detekci nebo pomocí *o*-ftaldialdehydu (OPA) pro fluorescenční detekci [54]. Ve srovnání s iontově výměnou chromatografií je rozlišení AMK na kolonách v systémech s obrácenými fázemi rychlejší a lepší. Pro stanovení AMK se využívá převážně předkolonová derivatizace, a to pro svou jednoduchost, rychlost a finanční nenáročnost [48]. Nejrozšířenějšími činidly pro derivatizaci před kolonou jsou Dabsyl-Cl, *o*-ftaldialdehyd, fenylisothiokyanát či fluorenylmethylchlorformiát. Každé činidlo má své výhody i nevýhody. Převládajícími kritérii, která ovlivní výběr nejvhodnějšího typu derivatizace a chromatografického postupu, je stupeň rozlišení, citlivost, rychlost a cena [54]. Existuje i možnost stanovení aminokyselin bez nutnosti použití derivatizace, a to spojením více technik, jmenovitě spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní tandemové spektrometrie (LC-MS/MS) s ionizací elektrosprejem. LC-MS/MS je i přes svou krátkou dobu analýzy a schopnost stanovení AMK jak s derivatizací či bez využívána méně, a to především kvůli vysokým ekonomickým nákladům. Z tohoto důvodu se využívají jiné typy detekce, jako je spektrometrická či fluorimetrická [57,58].

### **Vybraná derivatizační činidla**

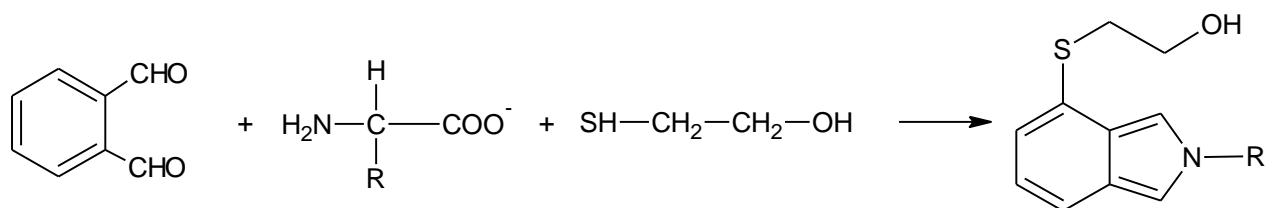
Ninhydrin patří v postkolonové metodě mezi tradiční derivatizační činidla. Dekarboxyluje a deaminuje primární aminokyseliny a tvoří purpurový komplex, který má absorpční maximum při 570 nm. Při reakci ninhydrinu se sekundárními aminokyselinami, prolinem a hydroxyprolinem, se tvoří žlutě zbarvený produkt, který lze sledovat při 440 nm. Je ale nevhodný pro vysoce přesné aplikace z důvodu nízké citlivosti a reprodukovatelnosti jeho reakce s AMK. Dalšími nevýhodami je citlivost vůči světlu, kyslíku, teplotním změnám či pH [54,59,60]. Derivatizace pomocí ninhydrinu je znázorněna na obrázku 12.



**Obrázek 12:** Reakce ninhydrinu s AMK

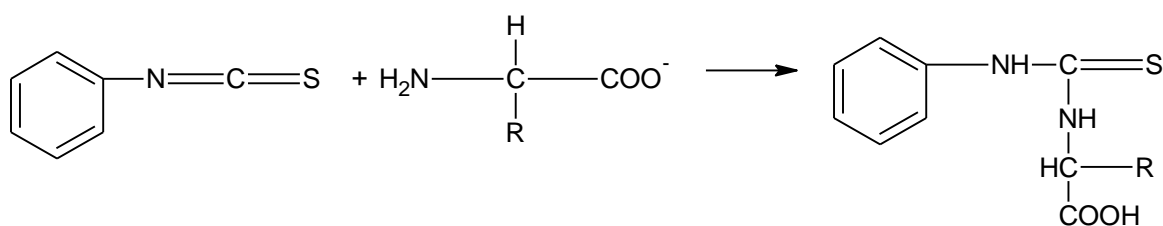
Často vyhledávaným činidlem pro stanovení AMK v tekutých potravinářských matricích je *o*-ftaldialdehyd (OPA). OPA se nikdy nepoužívá samotné, ale společně s kondenzačním činidlem, jehož funkcí je ukončení reakce. Tím je nejčastěji 2-merkptoethanol (MCE) nebo kyselina 3-merkptopropionová [61,62]. OPA nemá přirozenou fluorescenci, ale při reakci s primárními aminokyselinami s výjimkou cysteinu vytváří vysoce fluoreskující produkty, které bývají nestabilní, proto je nutné deriváty stabilizovat okyselením [54]. Později byly OPA-MCE nahrazeny OPA-alkylcysteiny, které se jeví jako výhodnější, a to především kombinace OPA-ET (ethanthiol) díky jejím stabilnějším derivátům a vyšší odezvě při stejné koncentraci. Mobilní fázi pro separaci OPA derivátů bývá směs 0,2M octanu sodného s acetonitrilem nebo methanolem [63]. Derivatizace probíhá ve vodném prostředí se silně alkalickým pH, při pokojové teplotě je plně dokončena během 40-80 minut.

OPA deriváty se monitorují pomocí fluorescenčního detektoru při excitačních a emisních vlnových délkách 340 nm a 455 nm s citlivostí v řádech fmoL. Můžeme jej využít jak v předkolonové, tak i v postkolonové derivatizaci. Nevýhodou OPA je neschopnost reakce se sekundárními aminokyselinami. Stanovení prolinu, hydroxyprolinu a dalších sekundárních aminokyselin lze ale provést jejich oxidací chlornanem sodným za alkalických podmínek, které konvertují sekundární aminokyseliny na primární aminy. Další alternativou je použití OPA s jiným činidlem, které reaguje se sekundárními aminokyselinami, např. OPA-FMOC-Cl [57]. Schéma derivatizace AMK pomocí OPA je ukázáno na obrázku 13.



**Obrázek 13:** Reakce OPA (vlevo) s AMK za účasti MCE

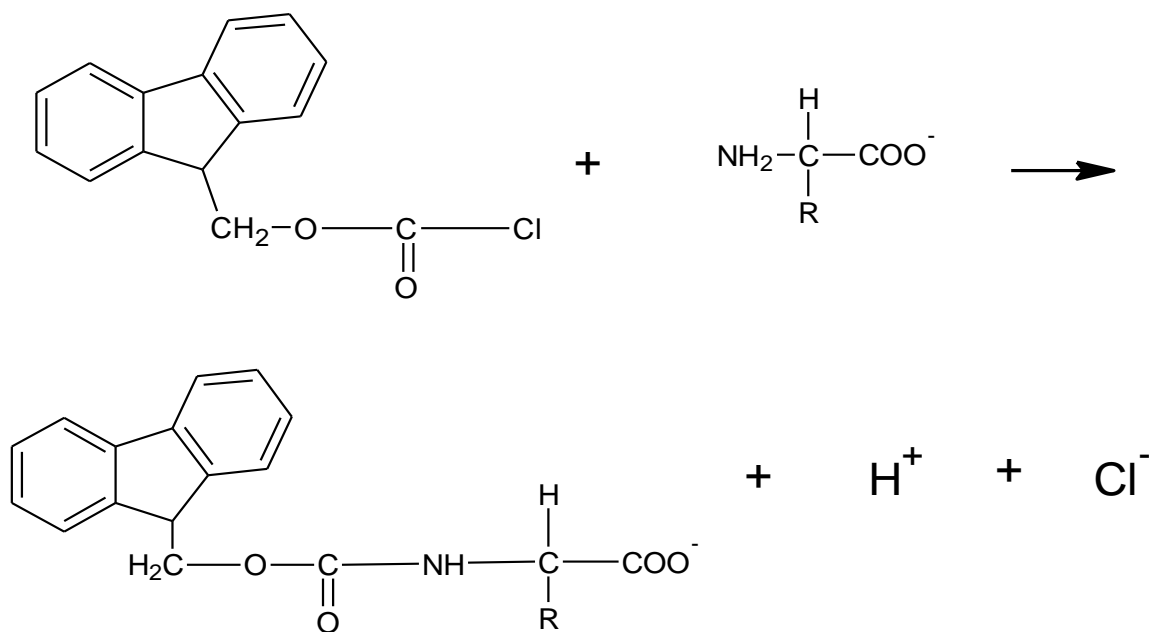
Fenylisothiokyanát (PITC), také známý jako isothiokyanobenzen, reaguje s primárními aminokyselinami za vzniku fenylthiokarbamyl derivátů (PTC, obrázek 14). Fenylthiokarbamylace probíhá většinou zhruba 10-20 minut při pokojové teplotě již před kolonou [54,63], přebytek činidla je možno odstranit vakuovým sušením při 60 °C 30 minut. Jako mobilní fáze se využívá 50mM octan amonný (pH 6,8) nebo je možno použít i octan sodný či 0,05% roztok kyseliny mravenčí [65]. Výhodou toho činidla je, že narušil od jiných derivatizačních činidel, jako je OPA či ninhydrin, PITC reaguje i se sekundárními aminokyselinami hydroxyprolinem a prolinem, a navíc jsou jeho deriváty stabilnější než deriváty jiných činidel. Vzhledem k tomu, že PTC deriváty nefluoreskují, je technika omezena pouze na spektrofotometrickou detekci v UV oblasti, která probíhá při 254 nm. Také prozatím nebyla dokázána tvorba derivátu s tyrosinem nebo histidinem. Naproti tomu cystein je schopný reakce se dvěma molekulami PITC. Derivatizace pomocí PITC činidla je velmi citlivá a deriváty jsou detekovány i při velmi nízké koncentraci aminokyselin (pod 50 pmol) [54,63].



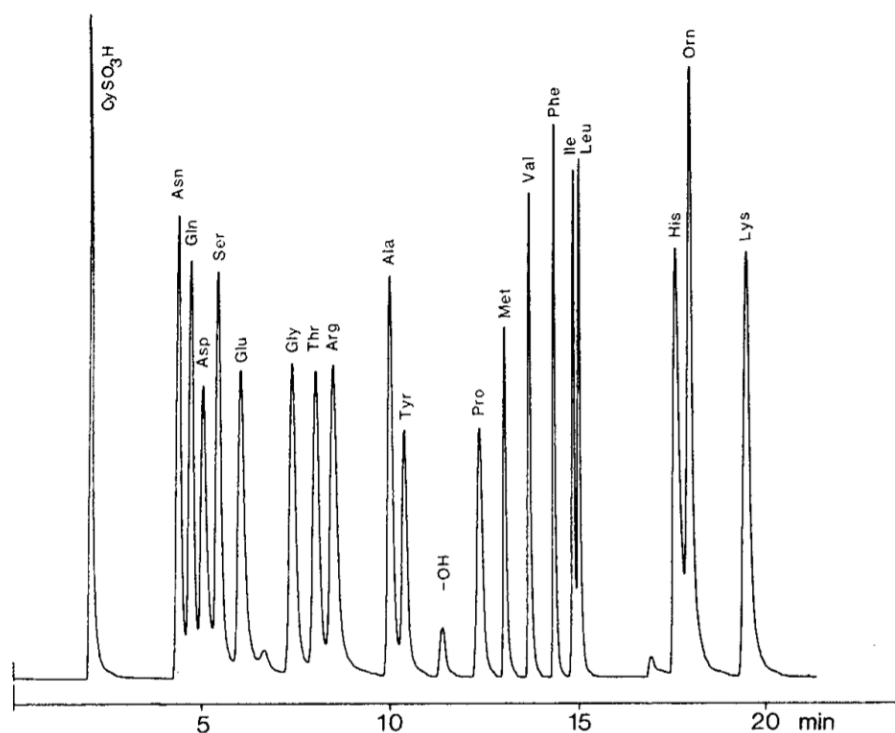
**Obrázek 14:** Reakce PITC (vlevo) s AMK

Fluorenylmethylchlorformiát (FMO-Cl) je využíván pro předkolonovou derivatizaci a s aminokyselinami poskytuje stabilní produkty, které jsou vysoce fluoreskující (obrázek 15). Nevýhodou FMOC-Cl je, že samotné činidlo a jeho produkty hydrolyzy také fluoreskují, což může ztěžovat chromatografickou separaci a kvantifikaci. Tato vlastnost však nemusí být omezujícím faktorem, jelikož se může přebytek činidla a fluorescenční vedlejší produkty eliminovat bez ztráty derivátů aminokyselin, a to extrakcí kapalina-kapalina, kdy přebytek FMOC po derivatizaci reaguje s vodou za vzniku 9-fluorenmethanolu (FMOC-OH) [54]. Proces probíhá v borátovém pufru (pH 11,4) po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Reakci lze ukončit například přidáním histidinu. Výsledné produkty se poté separují v systémech s obrácenými fázemi na oktadecylsilikagelové koloně v rozmezí teplot 25-50 °C. Jako mobilní fáze se využívá směs acetonitrilu a vody, nebo také směs acetonu a vody [57,66,67]. Fluorescenční detekce FMOC-Cl derivátů se provádí při excitačních a emisních

vlnových délkách 340 nm a 455 nm s vysokou citlivostí v řádech fmol [68]. Příklad chromatografické separace Fmoc derivátů 19 aminokyselin je znázorněn na obrázku 16.



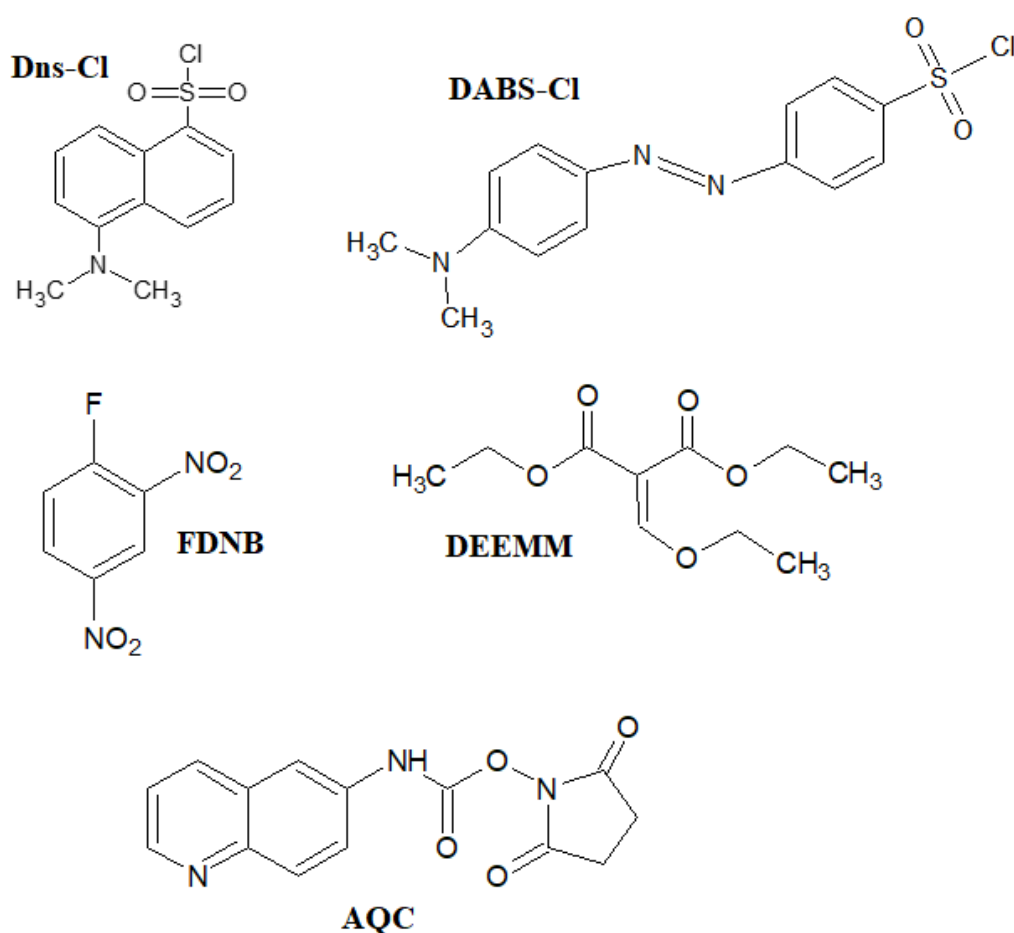
**Obrázek 15:** Reakce Fmoc-Cl (vlevo nahoře) s AMK



**Obrázek 16:** Příklad typické separace aminokyselin pomocí RP-HPLC s derivatizačním činidlem Fmoc-Cl [20]



Dalšími derivatizačními činidly používanými při stanovování aminokyselin jsou již zmíněny 5-N,N-dimethylamino-naftalen-1-sulfonylchlorid (Dns-Cl), který tvoří stabilní deriváty a využívá se převážně ke stanovení volných aminokyselin proteinových hydrolyzátů [54], 4-dimethylaminoazobenzen-4-sulfonylchlorid (DABS-Cl), jehož omezení spočívá v přítomnosti nadměrného množství soli, močoviny, a dalších interferujících látek [59], 1-fluor-2,4-dinitrobenzen (FDNB), který se využívá pro stanovení terminálních aminokyselin peptidových řetězců [54], diethyl-2 propandioát, také známý jako diethyl-ethoxymethylenmalonát (DEEMM), tvořící dokonale stabilní deriváty, a tudíž i možnost stanovení 24 AMK a biogenních aminů najednou [69] a 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC), sloužící především k rychlé analýze a reagující s primárními i sekundárními aminokyselinami, které tvoří vysoce stabilní fluorescenční produkty při 395 nm [54]. Struktury všech zmíněných činidel jsou znázorněny na obrázku 17.



**Obrázek 17:** Struktury dalších derivatizačních činidel

## 4 ZÁVĚR

První část bakalářská práce je věnována obecným charakteristikám aminokyselin. Je diskutována struktura, fyzikální a organoleptické vlastnosti, jejich reakce včetně proteosyntézy a dělení na základě různých hledisek, jako je charakter postranního řetězce aminokyselin či jejich postradatelnost. Dále jsou podrobněji popsány jednotlivé aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, a to leucin, izoleucin a valin. Také jsou prodiskutovány jejich fyziologické účinky jako snižování únavy, ovlivňování glukózy v krvi, udržení svalové hmoty, lepší regenerace po výkonu či snížení hmotnosti. Popsán je i jejich metabolismus a nemoci spojené s jeho narušením, jako je nemoc javorového sirupu či isovalerická acidemie.

Druhá polovina práce je zaměřena na analytické stanovení aminokyselin metodou kapalinové chromatografie se systémem s obrácenými fázemi, kde je podrobně popsána jak derivatizace, tak i jednotlivá derivatizační činidla, která jsou při stanovení potřebná z důvodu absence chromoforu v aminokyselinách. U nejčastěji používaných derivatizačních činidel jsou prodiskutovány jejich výhody a nevýhody. Ninhydrin se využívá pouze v postkolonové derivatizaci a díky jeho nízké citlivosti reakce s aminokyselinami není vhodný pro náročnější aplikace. Často využívaným činidlem je OPA, jehož nevýhoda spočívá v neschopnosti reakce se sekundárními aminokyselinami. Naopak PITC se sekundárními aminokyselinami reaguje, ale jelikož PTC deriváty nefluoreskují, je technika omezena pouze na UV detekci. Opačný problém má FMOC-Cl, který společně s jeho produkty hydrolýzy fluoreskuje, čímž může ztěžovat separaci. Žádné z činidel tedy jasně nepřevyšuje ostatní a jejich použití závisí na typu vzorku, který je analyzován.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: výkladový slovník. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0551-X.
- [2] FERENČÍK, Miroslav a Bohumil ŠKÁRKA. Biochémiá. Bratislava, 2000. ISBN 80-88908-58-2.
- [3] LENNARZ, William J. a M. Daniel LANE. Encyclopedia of biological chemistry. Boston: Elsevier, 2004. ISBN 01-244-3710-9.
- [4] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983.
- [5] ŠTERN, Petr. Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1025-6.
- [6] ZEHNÁLEK, Josef. Biochemie. Dotisk. V Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2000. ISBN 80-715-7366-3.
- [7] AKRAM, Muhammad, Akhtar NAVEED a Muhammad ASIF. Amino acids: A review article [online]. Journal of medicinal plant research, 2011, 5(17), 3997-4000 [cit. 2019-02-27]. *Dostupné z:*  
*[https://www.researchgate.net/publication/260210809\\_Amino\\_acids\\_A\\_review\\_article](https://www.researchgate.net/publication/260210809_Amino_acids_A_review_article)*
- [8] MCMURRY, John. Organická chemie. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [9] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [10] ODSTRČIL, Jaroslav. Biochemie. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. *Učební text* (Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví). ISBN 80-701-3190-X.

- [11] MURRAY, Robert. Harperova Biochemie. Jinočany, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [12] DAVÍDEK, Jiří, *Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983.*
- [13] POUŠEK, Lubomír, *Jan BINDZAR a Jana ZIMOVÁ. Přehled biochemie člověka. V Praze: České vysoké učení technické, 2008. ISBN 978-80-01-03999-1.*
- [14] FERENČÍK, Miroslav a *Bohuslav ŠKÁRKA. Biochémiá. Bratislava, 2000. ISBN 80-88908-58-2.*
- [15] Bílkoviny: Aminokyseliny - základní stavební jednotky. *E-CHEMBOOK.EU: Multimediální učebnice pro gymnázia [online]. b.r. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/bilkoviny>*
- [16] SEDLÁČKOVÁ, Kateřina. *Fyziologické účinky větvených aminokyselin na organismus a jejich stanovení ve vybraných suplementech. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce Prof.Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.*
- [17] ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie. Dotisk. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. ISBN 80-715-7366-3.*
- [18] HOU, Yongqing, *Yulong YIN a Guoyao WU. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. Experimental Biology and Medicine [online]. 2015, 240(8), 997-1007 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.1177/1535370215587913. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370215587913>*
- [19] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0551-X.*
- [20] WU, Guoyao. *Functional amino acids in nutrition and health. Amino Acids [online]. 2013, 45(3), 407-411 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1007/s00726-013-1500-6. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-013-1500-6>*

- [21] SHIMOMURA, Yoshiharu, Yuko YAMAMOTO, Gustavo BAJOTTO, Juichi SATO, Taro MURAKAMI, Noriko SHIMOMURA, Hisamine KOBAYASHI a Kazunori MAWATARI. Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *The Journal of Nutrition* [online]. 2006, **136**(2), 529-532 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1093/jn/136.2.529S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/136/2/529S/4664393>
- [22] ZHANG, Shihai, Xiangfang ZENG, Man REN, Xiangbing MAO a Shiyan QIAO. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2017, **8**(1) [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1186/s40104-016-0139-z. ISSN 2049-1891. Dostupné z: <http://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-016-0139-z>
- [23] BCAA pod drobnohledemBenefity, *správné dávkování a vedlejší účinky*. *Svět fitness* [online]. b.r. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.svetfitness.cz/clanek/bcaa-pod-drobnohledem/>
- [24] L-Leucine. Drugbank [online]. b.r. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00149>
- [25] BERRY, Jennifer. *What to know about essential amino acids*. *Medical New Today* [online]. b.r. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324229.php>
- [26] BCAA - větvené aminokyseliny. *Aktin* [online]. b.r. [cit. 2019-05-27]. Dostupné z: <https://aktin.cz/878-bcaa-vetvene-aminokyseliny>
- [27] BLOMSTRAND, Eva. *A Role for Branched-Chain Amino Acids in Reducing Central Fatigue*. *The Journal of Nutrition* [online]. 2006, 136(2), 544-547 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1093/jn/136.2.544S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/136/2/544S/4664405>
- [28] Branched chain amino acids. *Examine: Nutrition and supplement information based on science* [online]. b.r. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <https://examine.com/supplements/branched-chain-amino-acids/>

- [29] BLOMSTRAND, E., P. HASSMEN, S. EK, B. EKBLÖM a E. NEWSHOLME. *Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on perceived exertion during exercise*. Acta Physiologica Scandinavica [online]. 1997, 159(1), 41-49 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1046/j.1365-201X.1997.547327000.x. ISSN 0001-6772. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-201X.1997.547327000.x>
- [30] GUALANO, A, T BOZZA a P LOPES DE CAMPOS. *Branched-chain amino acids supplementation enhances exercise capacity and lipid oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion*. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness [online]. 2011, 51(1), 82-8 [cit. 2019-03-12]. ISSN 1827-1928. Dostupné z: <https://www.minervamedica.it/en/journals/sports-med-physical-fitness/article.php?cod=R40Y2011N01A0082&acquista=1#>
- [31] BLOMSTRAND, E, P HASSMÉN, B EKBLÖM a E NEWSHOLME. *Administration of branched-chain amino acids during sustained exercise--effects on performance and on plasma concentration of some amino acids*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol [online]. 1991, 63(2), 83-8 [cit. 2019-03-12]. ISSN 0301-5548. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1748109>
- [32] BLOMSTRAND, Eva, Jörgen ELIASSON, Haåkan KARLSSON a Rickard KÖHNKE. *Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise*. The Journal of Nutrition [online]. 2006, 136(1), 269-273 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1093/jn/136.1.269S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/136/1/269S/4664134>
- [33] DOI, Masako, Ippei YAMAOKA, Tetsuya FUKUNAGA a Mitsuo NAKAYAMA. *Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes*. Biochemical and Biophysical Research Communications [online]. 2003, 312(4), 1111-1117 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.039. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03024045>

- [34] TAKESHITA, Yumie, *Toshinari TAKAMURA, Yuki KITA et al. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: Implications for type 2 diabetes.* *Metabolism* [online]. 2012, 61(10), 1388-1394 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.metabol.2012.03.011. ISSN 00260495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049512001138>
- [35] QIN, Li-Qiang, *Pengcheng XUN, Deborah BUJNOWSKI, Martha DAVIGLUS, Linda VAN HORN, Jeremiah STAMLER a Ka HE.* Higher Branched-Chain Amino Acid Intake Is Associated with a Lower Prevalence of Being Overweight or Obese in Middle-Aged East Asian and Western Adults. *The Journal of Nutrition* [online]. 2011, **141**(2), 249-254 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.3945/jn.110.128520. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/141/2/249/4743339>
- [36] MOURIER, A., *A. BIGARD, E. KERVILER, B. ROGER, H. LEGRAND a C. GUEZENNEC.* Combined Effects of Caloric **Restriction** and Branched-Chain Amino Acid Supplementation on Body **Composition** and Exercise Performance in Elite Wrestlers. *International Journal of Sports Medicine* [online]. 1997, 18(01), 47-55 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1055/s-2007-972594. ISSN 0172-4622. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-972594>
- [37] BUSTAMANTE, Javier, *Antoni RIMOLA, Pere-Joan VENTURA, Miquel NAVASA, Isabel CIRERA, Virginia REGGIARDO a Juan RODÉS.* Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* [online]. 1999, 30(5), 890-895 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/S0168-8278(99)80144-5. ISSN 01688278. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827899801445>
- [38] METCALFE, Emma, *Alison AVENELL a Andrew FRASER.* Branched-chain amino acid supplementation in adults with cirrhosis and porto-systemic encephalopathy: Systematic review. *Clinical Nutrition* [online]. 2014, 33(6), **958-965** [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/j.clnu.2014.02.011. ISSN 02615614. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561414000739>

- [39] KAWAGUCHI, Takumi, *Namiki IZUMI, Michael CHARLTON a Michio SATA. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. Hepatology [online]. 2011, 54(3), 1063-1070 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1002/hep.24412. ISSN 02709139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.24412>*
- [40] HARRIS, Robert, *Bei ZHANG, Gary GOODWIN, Martha KUNTZ, Yoshiharu SHIMOMURA a Paul ROUGRAFF. Regulation of the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. Advances in Enzyme Regulation [online]. 1990, 30 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/0065-2571(90)90021-S. ISSN 00652571.*
- [41] HARRIS, Robert, *Mandar JOSHI, Nam JEOUNG a Mariko OBAYASHI. Overview of the Molecular and Biochemical Basis of Branched-Chain Amino Acid Catabolism. The Journal of Nutrition [online]. 2005, 135(6), 1527-1530 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1093/jn/135.6.1527S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/135/6/1527S/4663839>*
- [42] HARPER, A, *R MILLER a K BLOCK. Branched-Chain Amino Acid Metabolism. Annual Review of Nutrition [online]. 1984, 4(1), 409-454 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1146/annurev.nu.04.070184.002205. ISSN 0199-9885. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.04.070184.002205>*
- [43] HOLEČEK, Milan. *Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements [online]. 2018, 15(1) [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1186/s12986-018-0271-1. ISSN 1743-7075. Dostupné z: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-018-0271-1>*
- [44] DEMCZKO, Matt. *Overview of Amino Acid Metabolism Disorders. MDS Manual: The trusted provider of medical information since 1899 [online]. Sidney Kimmel Medical College of Thomas Jefferson University, b.r. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/home/children-s-health-issues/hereditary-metabolic-disorders/overview-of-amino-acid-metabolism-disorders#v37803011>*



- [45] BLACKBURN, Patrick, Jennifer GASS, Filippo PINTO E VAIRO, Kristen FARNHAM, Herjot ATWAL, Sarah MACKLIN, Eric KLEE a Paldeep ATWAL. **Maple** syrup urine disease: mechanisms and management. *The Application of Clinical Genetics* [online]. 2017, 10, 57-66 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.2147/TACG.S125962. ISSN 1178-704X. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/maple-syrup-urine-disease-mechanisms-and-management-peer-reviewed-article-TACG>
- [46] VOCKLEY, Jerry a Regina ENSENAUER. *Isovaleric acidemia: New aspects of genetic and phenotypic heterogeneity*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. 2006, 142(2), 95-103 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1002/ajmg.c.30089. ISSN 1552-4868. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.c.30089>
- [47] CHAPMAN, Kimberly, Andrea GROPMAN, Erin MACLEOD et al. *Acute management of propionic acidemia*. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2012, 105(1), 16-25 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.09.026. ISSN 10967192. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719211003374>
- [48] PEACE, R W a S G GILANI. *Chromatographic determination of amino acids in foods*. *J AOAC Int* [online]. 1992, 88(3), 877-87 [cit. 2019-06-07]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001866>
- [49] ROSS, N. C. *Journal of Applied Electrochemistry*. b.r., 27(1), 51-57. DOI: 10.1023/A:1026414931949. ISSN 0021891X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1026414931949>
- [50] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003*. ISBN 978-808-6369-075.
- [51] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. Praha: Karolinum, 2002*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

- [52] YOU, Jinmao, XingJun FAN, Qingcun ZHU a Yuzhen SU. *Liquid chromatographic determination of amino acids and peptides by pre-column fluorescence derivatization with N-hydroxysuccinimidyl- $\alpha$ -(9-acridine)-acetate*. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1998, **367**(1-3), 69-79 [cit. 2019-06-10]. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00181-0. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267098001810>
- [53] CÁCERES, I, F BARAHONA a C POLO. *El análisis íntegro de los vinos*. 1986.
- [54] CALLEJÓN, R.M., A.M. TRONCOSO a M.L. MORALES. *Determination of amino acids in grape-derived products: A review*. *Talanta* [online]. 2010, 81(4-5), 1143-1152 [cit. 2019-06-07]. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.02.040. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010001372>
- [55] YOU, Jinmao, XingJun FAN, Qingcun ZHU a Yuzhen SU. *Liquid chromatographic determination of amino acids and peptides by pre-column fluorescence derivatization with N-hydroxysuccinimidyl- $\alpha$ -(9-acridine)-acetate*. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1998, 367(1-3), 69-79 [cit. 2019-06-10]. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00181-0. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267098001810>
- [56] MOIDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Derivatization Reactions for Analytes with Various Functional Groups. Sample Preparation in Chromatography* [online]. Elsevier, 2002, , 639-845 [cit. 2019-06-09]. *Journal of Chromatography Library*. DOI: 10.1016/S0301-4770(02)80020-3. ISBN 9780444503947. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301477002800203>
- [57] OLDEKOP, Maarja-Liisa, Koit HERODES a Riin REBANE. *Study of the matrix effects and sample dilution influence on the LC–ESI–MS/MS analysis using four derivatization reagents*. *Journal of Chromatography B* [online]. 2014, 967, 147-155 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.027. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214004929>
- [58] PEREIRA, V., M. PONTES, J.S. CÂMARA a J.C. MARQUES. *Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1189(1-2), 435-443 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.12.014. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307021619>

- [59] ROSS, N. C. *An investigation of the electrochemical reduction of pentachlorophenol with analysis by HPLC*. *Journal of Applied Electrochemistry* [online]. b.r., 27(1), **51-57** [cit. 2019-06-10]. DOI: 10.1023/A:1026414931949. ISSN 0021891X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1026414931949>
- [60] HÉBERGER, Károly, *Elemér CSOMÓS a Livia SIMON-SARKADI*. *Principal Component and Linear Discriminant Analyses of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Hungarian Wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, 51(27), 8055-8060 [cit. 2019-06-17]. DOI: 10.1021/jf034851c. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf034851c>
- [61] HANCZKÓ, R., *A. JÁMBOR, A. PERL a I. MOLNÁR-PERL*. *Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1163(1-2), 25-42 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.06.013. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730701031X>
- [62] DAI, Zhaolai, *Zhenlong WU, Sichao JIA a Guoyao WU*. *Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection*. *Journal of Chromatography B* [online]. 2014, 964, 116-127 [cit. 2019-06-10]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.03.025. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214002153>
- [63] HEINRIKSON, Robert L. *a Stephen C. MEREDITH*. *Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate*. *Analytical Biochemistry* [online]. 1984, 136(1), 65-74 [cit. 2019-06-14]. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90307-5. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269784903075>
- [64] GÓMEZ-ALONSO, Sergio, *Isidro HERMOSÍN-GUTIÉRREZ a Esteban GARCÍA-ROMERO*. *Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(3), 608-613 [cit. 2019-06-17]. DOI: 10.1021/jf062820m. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf062820m>

- [65] ZHENG, Guihua, Wenwen JIN, Pei FAN, Xiaonan FENG, Yun BAI, Tao TAO a Longjiang YU. A novel method for detecting amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2015, 392, 1-6 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1016/j.ijms.2015.08.004. ISSN 13873806. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380615002535>
- [66] BOONCHIANGMA, Suthasinee, Patita RATCHAKRUT, Saksit CHANTHAI a Supalax SRIJARANAI. *Reversed Phase Chromatographic Analysis of 13 Amino Acids in Honey Samples*. *Chromatographia* [online]. 2015, 78(13-14), 923-927 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1007/s10337-015-2894-y. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-015-2894-y>
- [67] BANK, Ruud A., Evelien J. JANSEN, Bob BEEKMAN a Johan M. TE KOPPELE. *Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Improved Derivatization and Detection Conditions with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate*. *Analytical Biochemistry* [online]. 1996, 240(2), 167-176 [cit. 2019-06-17]. DOI: 10.1006/abio.1996.0346. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796903462>
- [68] JÁMBOR, A. a I. MOLNÁR-PERL. *Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(15), 3064-3077 [cit. 2019-06-17]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.068. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309001447>
- [69] HERMOSÍN, Isidro, Rosa M. CHICÓN a M. DOLORES CABEZUDO. *Free amino acid composition and botanical origin of honey*. *Food Chemistry* [online]. 2003, 83(2), 263-268 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00089-X. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460300089X>
- [70] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova* [online]. b.r. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>
- [71] Aminokyseliny. *Biochemie* [online]. b.r. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <http://biochemie.wz.cz/aminokyseliny.html>