

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK –
ANALÝZA LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ A DOPLŇKŮ STRAVY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:
Školitel:
Školitel specialista:

Ing. Michaela Janečková
prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
Ing. Martin Bartoš, CSc.

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**ISOTACHOPHORETIC DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS – ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS AND DIETARY SUPPLEMENTS**

DISSERTATION

Author: Ing. Michaela Janečková
Supervisor: Prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
Supervisor specialist: Ing. Martin Bartoš, CSc.

2020

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Michaela Janečková

Touto cestou bych ráda poděkovala svým dvěma školitelům, prof. Ing. Karlu Venturovi, CSc. a Ing. Martinu Bartošovi, CSc., za vstřícné vedení a cenné rady do života. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům za pomoc a vytvoření příjemného prostředí pro práci v laboratoři i psaní této práce.

Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice děkuji za finanční podporu, díky níž mohly být provedeny všechny potřebné experimenty, a mohla vzniknout tato práce.

Obrovské poděkování patří také mé rodině, která mě podporovala po celou dobu vysokoškolského studia.

ANOTACE

Tato disertační práce je tradičně rozdělena na dvě části – teoretickou a experimentální. V teoretické části práce je uveden stručný přehled vybraných biologicky aktivních látek společně s možnostmi jejich izotachoforetické analýzy získanými z odborné literatury.

Experimentální část práce je zaměřena na vývoj metodik izotachoforetického stanovení několika různých skupin látek (aminokyseliny, vitamíny sk. B, ethanolaminy, biguanidová antidiabetika, formaldehyd) ve vzorcích léčivých přípravků a doplňků stravy. Důležitou součástí vývoje je i následná validace metod zahrnující také analýzu reálných vzorků.

Klíčová slova:

Izotachoforéza, analýza, léčiva, doplňky stravy, biologicky aktivní látky

ANNOTATION

The dissertation is traditionally divided into two parts – theoretical and experimental. The brief summary of chosen bioactive compounds together with possibilities of their isotachophoretic analysis obtained from scientific literature are mentioned in theoretical part of this thesis.

Experimental part is focused on development of isotachophoretic methods, which could be suitable for analyses of various compounds (amino acids, vitamins of B complex, ethanolamines, antidiabetics, formaldehyde) in pharmaceuticals and dietary supplements. Method validation and real sample analyses are very important parts of method development.

Key words:

Isotachopheresis, Analysis, Pharmaceuticals, Dietary Supplements, Biologically Active Compounds

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyselina
AMPD	deficience adenosinmonofosfát-deaminázy
ATP	adenosintrifosfát
BCAA, BCAAs	aminokyseliny s rozvětveným postranním řetězcem
BCKA	ketokyseliny s rozvětveným postranním řetězcem
BPTI	inhibitor hovězího pankreatického hormonu
BTP	bis-tris-propan
BUSI IA	inhibitor býčího semenného trypsinu IA
BUSI IB1	inhibitor býčího semenného trypsinu IB1
BUSI IB2	inhibitor býčího semenného trypsinu IB2
BUSI II	inhibitor býčího semenného trypsinu II
BUSI IIb	inhibitor býčího semenného trypsinu IIb
CNS	centrální nervová soustava
CTI A	inhibitor kravského kolostrálního trypsinu A
CTI B	inhibitor kravského kolostrálního trypsinu B
CTI C	inhibitor kravského kolostrálního trypsinu C
CTP	cytidintrifosfát
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DEA	diethanolamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EACA	kyselina ϵ -aminokapronová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
em.	emisní
exc.	excitační
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	plynová chromatografie
GTP	guanosintrifosfát
HAc	kyselina octová
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
HEC	hydroxyethylcelulóza

HEPES	kys. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HEPPS	kys. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinpropansulfonová
HPC	hydroxypropylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
IGF I, IGF II	inzulinu podobné růstové faktory
IgM, IgG, IgA, IgD, IgE	imunoglobuliny
ISFET	iontově citlivý transistor
ITP	izotachoforéza
KAc	octan draselný
kond.	konduktometrický detektor
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MEA	monoethanolamin
MES	kyselina 2-morpholinoethansulfonová
MESNa ⁺	sodná sůl kyseliny 2-morpholinoethansulfonové
mHEC	methylhydroxyethylcelulóza
miRNA	micro ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NaAc	octan sodný
NAD/NADH	nikotinadenindinukleotid
NADP	nikotinadenindinukleotidfosfát
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NH ₄ Ac	octan amonný
piRNA	ribonukleová kyselina interagující s PIWI proteiny
PVP	polyvinylpyrolidon
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RSH	relativní výška signálu
SBB	barvivo Sudan Black B
siRNA	krátká interferující RNA
SR7B	barvivo Sudan Red 7B
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu

TAPS	kys. [tris(hydroxymethyl)methylamino]propansulfonová
TEA	triethanolamin
tITP	transientní izotachoforéza
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TTP	thymidintrifosfát
UDP	uridindifosfát
UGM	enzym uridindifosfát-galaktopyranóza mutáza
UTP	uridintrifosfát
UV-Vis	ultrafialová a viditelná část spektra záření

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

ILUSTRACE:

- OBRÁZEK 1: STRUKTURY BIOGENNÍCH AMINŮ – histamin (a)^{aa}, serotonin (b)^{ab}, tryptamin (c)^{ac}, dopamin (d)^{ad}, adrenalin (e)^{ae}, noradrenalin (f)^{af}, tyramin (g)^{ag}, 2-fenylethylamin (h)^{ah}, kreatinin (i)^{ai}, putrescin (j)^{aj}, kadaverin (k)^{ak}, spermin (l)^{al}, spermidin (m)^{am}23
- OBRÁZEK 2: STRUKTURY PROTEINOGENNÍCH AMINOKYSELIN – glycin (a)^{an}, alanin (b)^{ao}, valin (c)^{ap}, leucin (d)^{aq}, isoleucin (e)^{ar}, fenylalanin (f)^{as}, tyrosin (g)^{at}, tryptofan (h)^{au}, lysin (i)^{av}, arginin (j)^{aw}, histidin (k)^{ax}, kyselina asparagová (l)^{ay}, kyselina glutamová (m)^{az}, asparagin (n)^{ba}, glutamin (o)^{bb}, cystein (p)^{bc}, methionin (q)^{bd}, serin (r)^{be}, threonin (s)^{bf}, prolin (t)^{bg}25
- OBRÁZEK 3: STRUKTURY NEPROTEINOGENNÍCH AMINOKYSELIN – citrulin (a)^{bh}, ornitin (b)^{bi}, taurin (c)^{bj}, theanin (d)^{bk}, karnitin (e)^{bl}28
- OBRÁZEK 4: STRUKTURY VYBRANÝCH PEPTIDŮ – anserin (a)^{bm}, karnosin (b)^{bn}, glutathion (c)^{bo}, melatonin (d)^{bp}, inzulin – hexamer (e)^{bq}, glukagon (f)^{br}, somatotropin (g)^{bs}, oxytocin (h)^{bt}, vasopresin (i)^{bu}, met-enkefalin (j)^{bv}, IGF I – monomer (k)^{bw}, bacitracin (l)^{bx}, aktinomycin D (m)^{by}; v barevných strukturách jsou modrou barvou znázorněny AMK alanin, isoleucin, leucin, methionin, fenylalanin, tryptofan a valin, zelenou barvou asparagin, glutamin, serin a threonin, červenou arginin a lysin, tyrkysovou histidin a tyrosin, bílou kyselina asparagová, žlutou prolin, oranžovou glycin, růžovou cystein a fialovou kyselina glutamová30
- OBRÁZEK 5: STRUKTURY MASTNÝCH KYSELIN A FOSFOLIPIDŮ – kyselina palmitová (a)^{bz}, kyselina stearová (b)^{ca}, kyselina palmitoolejová (c)^{cb}, kyselina olejová (d)^{cc}, kyselina α -linolenová (e)^{cd}, kyselina eikosapentaenová (f)^{ce}, kyselina dokosaheptaenová (g)^{cf}, kyselina linolová (h)^{cg}, kyselina arachidonová (i)^{ch}, fosfatidylcholin (j)^{ci}, fosfatidylserin (k)^{cj}; R, R¹ označuje uhlovodíkové zbytky35
- OBRÁZEK 6: STRUKTURY SACHARIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ – glukóza (a)^{ck}, fruktóza (b)^{cl}, ribóza (c)^{cm}, deoxyribóza (d)^{cn}, laktóza (e)^{co}, laktulóza (f)^{cp}, glukosamin (g)^{cq}, kyselina pangamová (h)^{cr}, kyselina glukarová (i)^{cs}, glukuronolakton (j)^{ct}, inositol (k)^{cu}, kyselina fytová (l)^{cv}, pinitol (m)^{cw}, guarová guma (n)^{cx}, pektin (o)^{cy}, chitosan (p)^{cz}, chondroitin-sulfát (q)^{da}38
- OBRÁZEK 7: STRUKTURY ORGANICKÝCH KYSELIN PRIMÁRNÍHO METABOLISMU – kyselina orotová (a)^{db}, kyselina α -ketoglutarová (b)^{dc}, kyselina jablečná (c)^{dd}, kyselina pyrohroznová (d)^{de}, kyselina citronová (e)^{df}40
- OBRÁZEK 8: STRUKTURY NUKLEOVÝCH KYSELIN A LÁTEK VZNIKLÝCH JEJICH DEGRADACÍ – DNA (a)^{dg}, RNA (b)^{dh}, ATP (c)^{di}, GTP (d)^{dj}, CTP (e)^{dk}, inosin (f)^{dl}, NAD (g)^{dm}41
- OBRÁZEK 9: STRUKTURY VITAMÍNŮ – A (a)^{dn}, D (b)^{do}, E (c)^{dp}, K (d)^{dq}, B₁ (e)^{dr}, B₂ (f)^{ds}, B₃ (g)^{dt}, B₅ (h)^{du}, B₆ (i)^{dv}, B₇ (j)^{dw}, B₉ (k)^{dx}, C (l)^{dy}, B₁₂ (m)^{dz}43
- OBRÁZEK 10: STRUKTURA KOENZYMU Q₁₀^{ea}45
- OBRÁZEK 11: TESTOVANÉ POTRAVINOVÉ DOPLŇKY S OBSAHEM BCAA^{eb,ec}77

OBRÁZEK 12: IZOTACHOFOREOGRAM STANDARDŮ BCAA PO KONVERZI BEZ PŘÍDAVKU α -CYKLODEXTRINU DO VEDOUcíHO ELEKTROLYTU (VLEVO) A S PŘÍDAVKEM 20 mM α -CYKLODEXTRINU (VPRAVO) – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok po konverzi 200x ředěn (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	78
OBRÁZEK 13: IZOTACHOFOREOGRAM VZORKU KAPSLE (VLEVO) A VZORKU NÁPOJE (VPRAVO) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 20 mM α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	82
OBRÁZEK 14: ANALYZOVANÉ VZORKY OBSAHUJÍCÍ PROLIN ^{ed,ef}	83
OBRÁZEK 15: IZOTACHOFOREOGRAM VZORKU NÁPOJE – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	87
OBRÁZEK 16: ANALYZOVANÉ VZORKY S OBSAHEM THEANINU – zleva: tablety L-theanin ^{eg} , zelený čaj Sencha ^{eh} a zelený čaj Yunnan ^{ei}	88
OBRÁZEK 17: IZOTACHOFOREOGRAMY VZORKU TABLET (VLEVO) A ČAJE YUNNAN (VPRAVO) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	92
OBRÁZEK 18: STRUKTURA TAURINU (VLEVO) ^{ej} A KONJUGOVANÉ ŽLUČOVÉ KYSELINY (VPRAVO) ^{ek}	93
OBRÁZEK 19: ANALYZOVANÉ VZORKY ENERGETICKÝCH NÁPOJŮ A ENERGETICKÉHO GELU ^{el-ep}	94
OBRÁZEK 20: IZOTACHOFOREOGRAMY STANDARDNÍHO ROZTOKU KONVERTOVANÉHO TAURINU (ČERVENÁ KŘIVKA), KYSELINY ISETHIONOVÉ (MODRÁ KŘIVKA) A KYSELINY VINYLSULFONOVÉ (RŮŽOVÁ KŘIVKA) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	94
OBRÁZEK 21: IZOTACHOFOREOGRAM VZORKU ENERGETICKÉHO NÁPOJE TIGER (VLEVO) A ENERGETICKÉHO GELU (VPRAVO) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	99
OBRÁZEK 22: ANALYZOVANÉ VITAMÍNOVÉ DOPLŇKY STRAVY ^{eq-et}	102
OBRÁZEK 23: ZÁZNAM VODIVOSTNÍ A SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKCE PRO ANALÝZU STANDARDNÍCH ROZTOKŮ VITAMÍNŮ SK. B O KONCENTRACI 20 MG/L V ANIONTOVÉM MÓDU – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.....	105
OBRÁZEK 24: ZÁZNAM VODIVOSTNÍ A SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKCE PRO ANALÝZU STANDARDNÍCH ROZTOKŮ VITAMÍNŮ SK. B O KONCENTRACI 20 MG/L V KATIONTOVÉM MÓDU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	106

OBRÁZEK 25: IZOTACHOFOROGRAMY VZORKU VITAMINOVÝCH TABLET B-KOMPLEX FORTE – analýza kationtů (vlevo); vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona; analýza aniontů (vpravo); vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.....	114
OBRÁZEK 26: ANALYZOVANÉ VZORKY FARMACEUTICKÝCH A KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ ^{eu-fd}	118
OBRÁZEK 27: IZOTACHOFOROGRAM SMĚSI 0,5 mM ETHANOLAMINŮ – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová, předseparační kolona.	120
OBRÁZEK 28: IZOTACHOFOROGRAMY VYBRANÝCH IONTŮ – 1 mM standardní roztoky vápenatých iontů, hořečnatých iontů a lithných iontů; vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; předseparační kolona.	120
OBRÁZEK 29: IZOTACHOFOROGRAM VZORKU ALTERMED ANTISECTIN S PŘÍDAVKEM 0,5 % DEA VE SROVNÁNÍ S TEA – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; analytická kolona.	121
OBRÁZEK 30: STRUKTURY METFORMINU (VLEVO) ^{fe} , BUFORMINU (UPROSTŘED) ^{ff} A FENFORMINU (VPRAVO) ^{fg}	125
OBRÁZEK 31: ANALYZOVANÉ VZORKY ANTIDIABETICKÝCH LÉČIV S RŮZNÝM OBSAHEM METFORMINU ^{fh-fl}	126
OBRÁZEK 32: ANALÝZA BIGUANIDŮ – vodivostní a spektrofotometrická detekce; vedoucí iont K ⁺ (1); Mg ²⁺ (2), Na ⁺ (3), metformin (4), buformin (5), fenformin (6), koncový iont H ⁺ (7); vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.....	129
OBRÁZEK 33: IZOTACHOFOROGRAM VZORKU TABLETY SIOFOR 500 – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	133
OBRÁZEK 34: KŮTVIRTOVO KLOKTADLO	135
OBRÁZEK 35: IZOTACHOFOROGRAM VZORKU KLOKTADLA – vedoucí elektrolyt (LE): 10 mM HCl + β-alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt (TE): 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.	139

TABULKY:

TABULKA 1: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ ITP.....	52
TABULKA 2: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ ITP.....	53
TABULKA 3: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ PEPTIDŮ POMOCÍ ITP.....	54
TABULKA 4: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ PROTEINŮ POMOCÍ ITP.....	56
TABULKA 5: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN POMOCÍ ITP.....	58
TABULKA 6: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ ITP.....	59
TABULKA 7: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ NUKLEOTIDŮ POMOCÍ ITP.....	60
TABULKA 8: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ ITP.....	61
TABULKA 9: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ VITAMÍNŮ POMOCÍ ITP.....	62
TABULKA 10: VYBRANÉ METODY PRO STANOVENÍ LÉČIV POMOCÍ ITP.....	63
TABULKA 11: SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	65
TABULKA 12: OBSAH JEDNOTLIVÝCH AMINOKYSELIN VE VZORCÍCH DOPLŇKŮ STRAVY.....	81
TABULKA 13: OBSAH PROLINU V POTRAVINOVÉM DOPLŇKU FLEXIT LIQUID.....	86
TABULKA 14: OBSAH THEANINU V ANALYZOVANÝCH VZORCÍCH.....	92
TABULKA 15: OBSAH TAURINU V ANALYZOVANÝCH VZORCÍCH CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
TABULKA 16: PARAMETRY METODY PRO JEDNOTLIVÉ VITAMÍNY ANIONTOVÉHO CHARAKTERU.....	111
TABULKA 17: PARAMETRY METODY PRO JEDNOTLIVÉ VITAMÍNY KATIONTOVÉHO CHARAKTERU.....	112
TABULKA 18: OBSAH VITAMÍNŮ V ANALYZOVANÝCH VZORCÍCH.....	113
TABULKA 19: ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI ETHANOLAMINŮ [212–215].....	115
TABULKA 20: OBSAH TEA V ANALYZOVANÝCH VZORCÍCH.....	124

GRAFY:

- GRAF 1: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE LEUCINU NA ČASE, TEPLOTĚ A Vlivu MÍCHÁNÍ – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM leucin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.....71
- GRAF 2: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE LEUCINU NA KONCENTRACI DUSITANU V REAKČNÍ SMĚSI – složení reakční směsi: 100 mM kyselina octová a 20 mM leucin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.71
- GRAF 3: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE LEUCINU NA KONCENTRACI KYSELINY V REAKČNÍ SMĚSI – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný a 20 mM leucin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.72
- GRAF 4: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE LEUCINU NA MNOŽSTVÍ KATEXU V REAKČNÍ SMĚSI – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný a 20 mM leucin; vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.....73
- GRAF 5: AMINOKYSELINY POSKYTUJÍCÍ JEDEN PRODUKT KONVERZE – relativní výšky signálů a délky zón; složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok po konverzi 80x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.....75
- GRAF 6: AMINOKYSELINY POSKYTUJÍCÍ VÍCE PRODUKTŮ KONVERZE – relativní výšky signálů a délky zón; složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok po konverzi 80x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.....75
- GRAF 7: ZÁVISLOST ODEZVY VODIVOSTNÍHO DETEKTORU NA KONCENTRACI α -CYKLODEXTRINU VE VEDOUCÍM ELEKTROLYTU – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok po konverzi 200x ředěn (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.78
- GRAF 8: KALIBRAČNÍ KŘIVKY BCAA – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 1 – 21 mM AMK; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....79
- GRAF 9: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE PROLINU NA DOBĚ ZAHŘÍVÁNÍ VE VROUCÍ VODNÍ LÁZNI – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM prolin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.84

- GRAF 10: ZÁVISLOST RELATIVNÍCH VÝŠEK SIGNÁLŮ NA pH VEDOUcíHO ELEKTROLYTU – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM prolin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4; 3,6 a 4,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....84
- GRAF 11: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PROLINU – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 2 – 20 mM prolin; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....85
- GRAF 12: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE THEANINU NA DOBĚ ZAHŘÍVÁNÍ VE VROUCÍ VODNÍ LÁZNI – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 5 mM theanin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....88
- GRAF 13: KALIBRAČNÍ KŘIVKA THEANINU – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 0,5 – 5 mM theanin; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....89
- GRAF 14: VLIV DOBY A TYPU EXTRAKCE ČAJŮ NA DÉLKU ZÓNY THEANINU – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a extrakt z 0,5 g čaje; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....91
- GRAF 15: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE TAURINU NA ČASE, TEPLITĚ A VLIVU MÍCHÁNÍ – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....95
- GRAF 16: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE TAURINU NA KONCENTRACI KYSELINY OCTOVÉ V REAKČNÍ SMĚSI – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 20 – 400 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....96
- GRAF 17: ZÁVISLOST ÚČINNOSTI KONVERZE TAURINU NA KONCENTRACI DUSITANU SODNÉHO V REAKČNÍ SMĚSI – složení reakční směsi: 20 – 400 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok po konverzi 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....96
- GRAF 18: KALIBRAČNÍ KŘIVKA TAURINU – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 0,4 – 20 mM taurin; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....97
- GRAF 19: ZÁVISLOST RELATIVNÍCH VÝŠEK SIGNÁLŮ VITAMÍNŮ NA pH VEDOUcíHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 5,2 – 6,4); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.....103

GRAF 20: ZÁVISLOST RELATIVNÍCH VÝŠEK SIGNÁLŮ VITAMÍNŮ NA pH VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 4,0 – 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.....	104
GRAF 21: KALIBRAČNÍ KŘIVKA KYSELINY NIKOTINOVÉ – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; spektrofotometrická detekce při 259 nm, analytická kolona.....	107
GRAF 22: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PANTOTHENÁTU VÁPENATÉHO – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.....	107
GRAF 23: KALIBRAČNÍ KŘIVKA KYSELINY LISTOVÉ – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; spektrofotometrická detekce při 281 nm, analytická kolona.....	108
GRAF 24: KALIBRAČNÍ KŘIVKA THIAMINU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 250 nm, analytická kolona.	109
GRAF 25: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PYRIDOXINU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 289 nm, analytická kolona.	109
GRAF 26: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PYRIDOXALU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 289 nm, analytická kolona.	110
GRAF 27: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PYRIDOXAMINU – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 324 nm, analytická kolona.	110
GRAF 28: ZÁVISLOST INTENZITY SIGNÁLŮ A DÉLKY ZÓNY TEA NA pH VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztok TEA; předseparační kolona.	119
GRAF 29: ZÁVISLOST INTENZITY SIGNÁLŮ A DÉLKY ZÓNY TEA NA pH ROZTOKU – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztok TEA; předseparační kolona.	119
GRAF 30: KALIBRAČNÍ KŘIVKY ETHANOLAMINŮ – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; analytická kolona.	122
GRAF 31: ZÁVISLOST ROZDÍLŮ INTENZITY SIGNÁLŮ ANALYTŮ A VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU NA pH VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.	127
GRAF 32: ZÁVISLOST DÉLEK ZÓN ANALYTŮ NA pH VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.	128

GRAF 33: ZÁVISLOST PLOCH PÍKŮ ANALYTŮ NA pH VEDOUcíHO ELEKTROLYTU – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; vlnová délka detekce 230 nm; analytická kolona.	128
GRAF 34: KALIBRAČNÍ KŘIVKA BIGUANIDŮ – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; vodivostní detekce; analytická kolona.	130
GRAF 35: KALIBRAČNÍ KŘIVKA BIGUANIDŮ – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; spektrofotometrická detekce (230 nm); analytická kolona.	130
GRAF 36: OBSAH METFORMINU VE VZORCÍCH ANTIDIABETIK	133
GRAF 37: VLIV pH VEDOUcíHO ELEKTROLYTU NA RELATIVNÍ VÝŠKU SIGNÁLU (RSH) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2 a 3,6) a 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 4,5 a 6,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztoky disiřičitanu sodného, hydroxymethylsulfonátu a kyseliny mravenčí; předseparační kolona.	136
GRAF 38: VLIV DOBY REAKCE NA DÉLKU ZÓNY HYDROXYMETHYLSULFONÁTU – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.	136
GRAF 39: KALIBRAČNÍ KŘIVKA FORMALDEHYDU – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.	137

OBSAH

ÚVOD.....	20
1. TEORETICKÁ ČÁST	21
1.1 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY	21
1.1.1 AMINOKYSELINY A JEJICH DERIVÁTY, PEPTIDY, PROTEINY	22
1.1.1.1 Biogenní aminy	22
1.1.1.2 Aminokyseliny	24
1.1.1.3 Peptidy	29
1.1.1.4 Proteiny.....	32
1.1.2 MASTNÉ KYSELINY A JEJICH DERIVÁTY, LIPIDY	34
1.1.3 SACHARIDY A JEJICH DERIVÁTY	37
1.1.4 ORGANICKÉ KYSELINY PRIMÁRNÍHO METABOLISMU	40
1.1.5 NUKLEOVÉ KYSELINY A LÁTKY VZNIKLÉ JEJICH DEGRADACÍ.....	41
1.1.6 BOKATALYZÁTORY	42
1.1.6.1 Vitamíny	42
1.1.6.2 Ubichinony.....	45
1.2 ITP STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK	47
1.2.1 BIOGENNÍ AMINY, AMINOKYSELINY, PEPTIDY A PROTEINY	47
1.2.1.1 Biogenní aminy	47
1.2.1.2 Aminokyseliny	47
1.2.2 MASTNÉ KYSELINY	49
1.2.3 SACHARIDY	49
1.2.4 NUKLEOVÉ KYSELINY A LÁTKY VZNIKLÉ JEJICH DEGRADACÍ.....	50
1.2.5 VITAMÍNY.....	50
1.2.6 LÉČIVA.....	50
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	65
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	65
2.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	67
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	68
3.1 IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ AMINOKYSELIN PO JEJICH KONVERZI NA HYDROXYKYSELINY VE VZORCÍCH NÁPOJŮ A POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ [48, 133–135].....	68
3.1.1 ÚVOD.....	68
3.1.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTACE	69
3.1.3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	70
3.1.3.1 Konverze aminokyselin na hydroxykyseliny	70
3.1.3.2 Izotachoforetická separace.....	73
3.1.4 OPTIMALIZOVANÁ STANOVENÍ.....	76
3.1.4.1 Stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA).....	76
3.1.4.2 Stanovení prolinu	82
3.1.4.3 Stanovení theaninu	87
3.1.4.4 Stanovení taurinu.....	92
3.1.5 ZÁVĚR	99

3.2	IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK. B V DOPLŇCÍCH STRAVY [149, 150]	101
3.2.1	ÚVOD.....	101
3.2.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTACE	101
3.2.3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	102
3.2.3.1	Optimalizace podmínek separace	102
3.2.3.2	Optimalizace spektrofotometrické detekce	104
3.2.3.3	Validace metody	106
3.2.3.4	Příprava a analýza vzorků	112
3.2.4	ZÁVĚR	114
3.3	IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ ETHANOLAMINŮ VE VZORCÍCH KOSMETICKÝCH A FARMACEUTICKÝCH PRODUKTŮ [208–211].....	115
3.3.1	ÚVOD.....	115
3.3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTACE	117
3.3.3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	118
3.3.3.1	Optimalizace podmínek separace	118
3.3.3.2	Validace metody	121
3.3.3.3	Příprava a analýza vzorků	123
3.3.4	ZÁVĚR	124
3.4	IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ BIGUANIDOVÝCH ANTIDIABETIK VE VZORCÍCH LÉČIV OBSAHUJÍCÍCH METFORMIN JAKO ÚČINNOU LÁTKU [248].....	125
3.4.1	ÚVOD.....	125
3.4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTACE	126
3.4.3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	126
3.4.3.1	Optimalizace podmínek separace	126
3.4.3.2	Validace metody	129
3.4.3.3	Příprava a analýza vzorku	131
3.4.4	ZÁVĚR	133
3.5	IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ FORMALDEHYDU VE VZORKU KUTVIRTOVA KLOKTADLA [269]	134
3.5.1	ÚVOD.....	134
3.5.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTACE	135
3.5.3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	135
3.5.3.1	Optimalizace podmínek reakce a separace	135
3.5.3.2	Validace metody	137
3.5.3.3	Příprava a analýza vzorku	138
3.5.4	ZÁVĚR	139
4.	ZÁVĚR.....	140
5.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	141
6.	POUŽITÁ LITERATURA	144
7.	PŘÍLOHY	161

ÚVOD

Kapilární izotachoforéza je jednou z elektromigračních separačních technik, kterou lze úspěšně využít pro analýzu léčivých přípravků a doplňků stravy. Na rozdíl od chromatografických technik je izotachoforéza finančně nenáročná, ať už z hlediska nákladů na instrumentaci, tak na samotný provoz. Je také nenáročná na přípravu a čistotu vzorku, často se jedná pouze o ředění v případě kapalných vzorků, o rozpuštění pevných vzorků, popř. o jednoduchou derivatizaci neiontových analytů na sloučeniny iontové povahy. Ve většině případů není nutné vzorek nijak přečišťovat, v případě vzorků obsahujících pevné nerozpuštěné částice je možné jej v průběhu dávkování přečistit přes diskový filtr, který se zařadí mezi injekční stříkačku a dávkovací kohout. Další výhodou izotachoforézy je absence organických rozpouštědel, což způsobuje menší zdravotní rizika pro analytika a také menší zatížení pro životní prostředí než v případě chromatografických technik.

Naopak nevýhodou izotachoforézy je vyšší detekční limit a nižší separační účinnost oproti chromatografickým technikám. Nicméně v případě analýzy vzorků s poměrně jednoduchou matricí a zároveň s poměrně vysokou koncentrací analytů, což právě léčivé přípravky a doplňky stravy jsou, se tato nevýhoda stává nevýznamnou.

V této práci jsou uvedeny optimalizované metody ke stanovení několika různých analytů v léčivých přípravcích a doplňcích stravy pomocí kapilární izotachoforézy, které byly vyvinuty v rámci celého doktorského studia. Některé z nich bohužel z časových důvodů nebyly doposud publikovány.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biologicky aktivní látky

Zájem o bioaktivní látky v posledních letech nesmírně roste v široké škále různých oborů a aplikací, např. v medicíně, botanice, farmakologii, zemědělství, kosmetice, potravinářství a dalších. Z tohoto důvodu je potřeba určit, které látky je možné do této skupiny zařadit. Definice se od sebe poměrně dost liší. Termín „bioaktivní“ je složenina dvou slov – bio- (pocházející z řeckého *bios*, tj. život) a -aktivní (pocházející z latinského *activus*, tj. účinný, léčivý). Ve vědeckém smyslu se bioaktivní látkou rozumí látka, která má určitou biologickou aktivitu. Látka vykazuje biologickou aktivitu, pokud má přímý efekt na živý organismus. Tento efekt může být pozitivní nebo negativní v závislosti na tom, o jakou látku se jedná, na její dávce, popř. na její biologické dostupnosti. Biologicky aktivní látky mají širokou škálu účinků, od udržování dobrého zdravotního stavu, přes léčivý efekt až po negativní účinky, včetně fatálních. Zda se jedná o pozitivní nebo negativní účinek často záleží na velikosti dávky. V medicínských slovnících je bioaktivní látka definována jako látka účinkující, způsobující reakci nebo vyvolávající odpověď v živých tkáních. Biologicky aktivní látky můžeme dále dle původu rozlišit na bioaktivní látky přírodní (rostlinné, živočišné, bakteriální) a syntetické (částečně, popř. úplně) [1,2].

Ve většině případů, kdy mluvíme o biologicky aktivních látkách, se omezuje pouze na ty, které mají pozitivní vliv na zdraví organismu, tj. na komponenty potravy, které se typicky v potravě vyskytují v poměrně malých množstvích [1,2].

Opletal [3] vytvořil podrobný přehled biologicky aktivních látek, které rozdělil do tří hlavních skupin s několika podskupinami:

- ❖ látky vycházející z primárního metabolismu
 - aminokyseliny a jejich deriváty, peptidy, proteiny
 - mastné kyseliny a jejich deriváty, tuky
 - sacharidy a jejich deriváty
 - organické kyseliny primárního metabolismu
 - nukleotidy a látky vzniklé jejich degradací
 - biokatalyzátory (vitamíny, ubichinony)
- ❖ obsahové látky strukturovaných biologických systémů
 - látky izolované z bakterií (probiotika)
 - látky izolované z řas (spirulina, chlorella)
 - látky izolované z kvasinek (pivovarské kvasnice)

- látky izolované ze symbiózy kvasinek a bakterií (kombucha)
- látky izolované z hub (cordyceps, reishi, hlíva)
- látky izolované z lišejníků (islandský lišejník)
- ❖ látky charakteru sekundárních metabolitů
 - terpeny
 - fenolové sloučeniny
 - látky metabolismu aminokyselin (betalainy, alkaloidy)
 - sírné sloučeniny taxonů rodu *Allium* L.

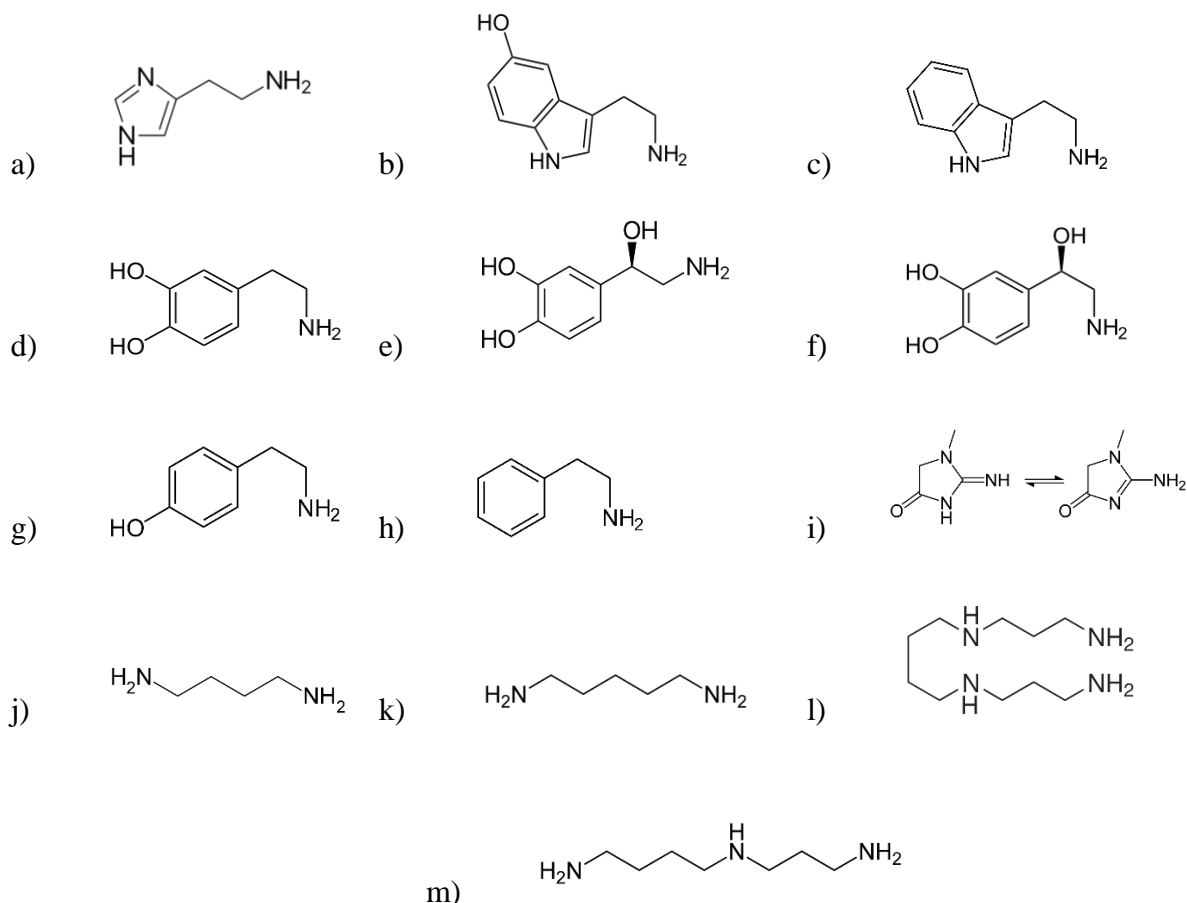
V následujícím textu bude pozornost věnována pouze látkám první skupiny, tj. látkám vycházejícím z primárního metabolismu, a to především z důvodu, že se jedná o látky, které jsou v odborných publikacích v souvislosti s kapilární izotachoforézou zmiňovány nejčastěji.

1.1.1 Aminokyseliny a jejich deriváty, peptidy, proteiny

1.1.1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou dusíkaté látky odvozené od aminokyselin. Mají vysokou biologickou aktivitu a vyskytují se v buňkách rostlin i živočichů, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. Biogenní aminy vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz, jejichž kofaktorem je pyridoxalfosfát (vitamín B₆). V lidském organismu jsou z biogenních aminů nejvíce zastoupeny histamin, serotonin, katecholaminy (dopamin, adrenalin a noradrenalin) a polyaminy (putrescin, spermidin, spermin). V nízkých koncentracích je přítomnost biogenních aminů v lidském těle nezbytná. Jejich funkce je různorodá. Naopak ve vysokých koncentracích jsou biogenní aminy považovány za poměrně nebezpečné a jsou schopné způsobit zdravotní problémy, jako jsou bolesti hlavy, migrény, nevolnost, hypotenzi nebo naopak hypertenzi, zažívací potíže, nebo kožní alergie [4].

Biogenní aminy jsou obsaženy téměř ve všech potravinách, ve vyšších koncentracích vznikají při výrobě a skladování fermentovaných potravin působením mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. V potravinách se nejběžněji vyskytují putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, tyramin, tryptamin a β -fenylethylamin. Tyramin, kadaverin, putrescin a histamin se vyskytují převážně v rybách, mase a masných produktech [4].



Obrázek 1: Struktury biogenních aminů – histamin (a)^{aa}, serotonin (b)^{ab}, tryptamin (c)^{ac}, dopamin (d)^{ad}, adrenalin (e)^{ae}, noradrenalin (f)^{af}, tyramin (g)^{ag}, 2-fenylethylamin (h)^{ah}, kreatinin (i)^{ai}, putrescín (j)^{aj}, kadaverin (k)^{ak}, spermin (l)^{al}, spermidin (m)^{am}

Histamin (Obrázek 1a) je mediátor a neurotransmitter, který je syntetizovaný především v žírných buňkách, bazofilech, krevních destičkách, neuronech a chromafinních buňkách střeva. Je skladován intracelulárně v transportních váčcích, ze kterých se po stimulaci uvolňuje. V lidském těle způsobuje kontrakce buněk hladké svaloviny, rozšíření cév, zvyšuje cévní propustnost, slizniční sekreci, tepovou frekvenci srdce, upravuje krevní tlak a srdeční arytmii, stimuluje tvorbu žaludečních kyselin a má další funkce při přenášení vzruchů v mozku, imunologické odpovědi, tvorbě krevních buněk, hojení ran a vzniku krevních kapilár během růstu nádorů [5].

Serotonin (Obrázek 1b) je biogenní amin, který je syntetizován v krevních destičkách, chromafinních buňkách střeva a v mozku. Serotonin v organismu plní několik funkcí – reguluje shlukování krevních destiček, aktivuje imunitní buňky, zprostředkovává kontrakce hladké svaloviny žaludku a střev a působí také jako neurotransmitter v centrální a periferní nervové soustavě [4,6].

Dopamin (Obrázek 1d) je neuromodulátor ze skupiny katecholaminů, který je přirozeně syntetizován v mozku a působí především v centrálním nervovém systému. Působením dopaminu je ovlivněna hlavně volní motorika, proces učení, emoční rovnováha a regulace tvorby adenohipofyzárních hormonů (obzvláště prolaktinu a růstového hormonu). Porucha funkce dopaminu v mozku má za následek např. vznik Parkinsonovy choroby, schizofrenie nebo bipolární afektivní poruchy [7–9].

Adrenalin (Obrázek 1e) je hormon ze skupiny katecholaminů vylučovaný dřením nadledvin, který hraje důležitou roli při stresové reakci, zvyšuje bdělost, způsobuje neklid až strach a budí člověka k extrémním výkonům. Dále způsobuje zúžení cév, urychluje činnost srdce, zvyšuje krevní tlak a tepovou frekvenci, zvyšuje krevní zásobení kosterních svalů a snižuje krevní zásobení jater, ledvin a kůže. Inhibuje funkci střev a dělohy, a naopak stimuluje dýchání. Díky svým stimulujícím účinkům na srdce bývá intravenózně podáván při resuscitaci [8,9].

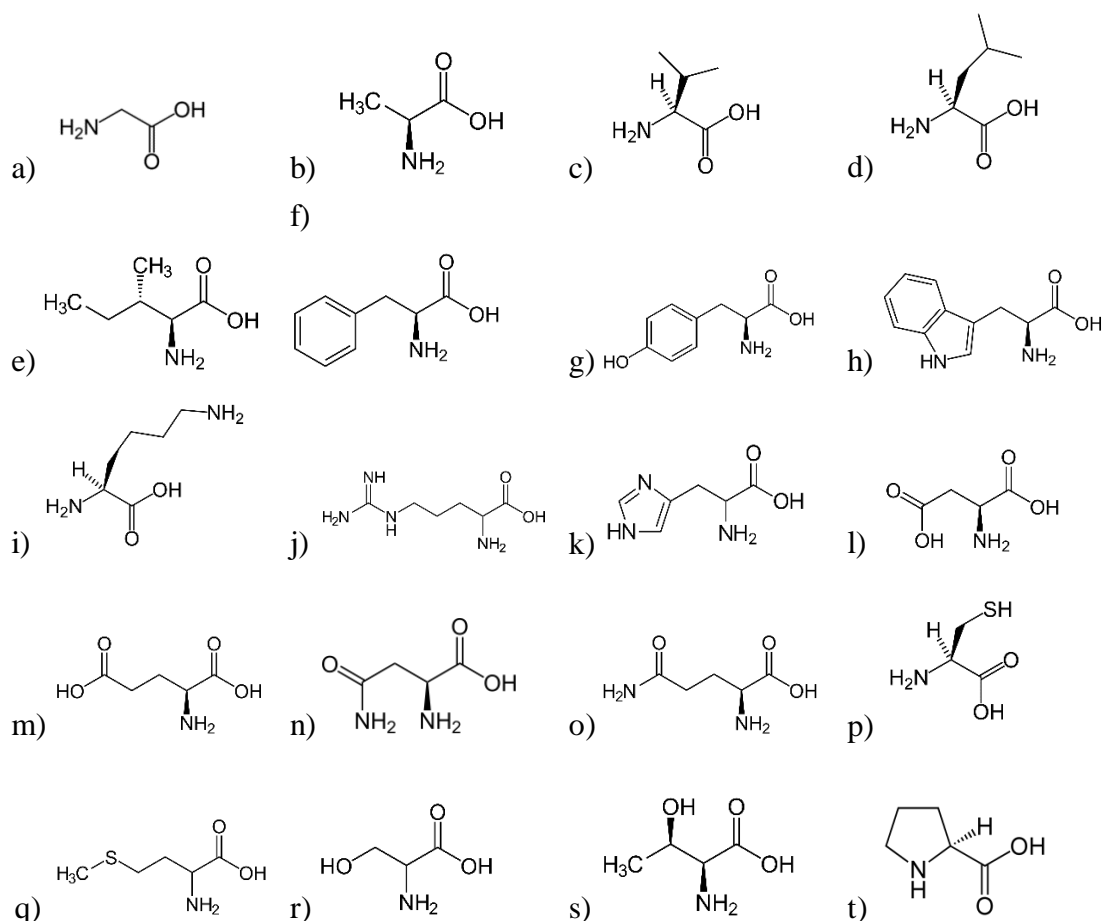
Noradrenalin (Obrázek 1f) je dalším hormonem ze skupiny katecholaminů, který je spolu s adrenalinem vylučován dřením nadledvin. Noradrenalin zvyšuje krevní tlak tím, že jeho působením dochází k zúžení cév. Snižuje krevní zásobení ledvin, jater a kůže. Dále rozšiřuje koronární cévy, zvyšuje krevní zásobení srdce, zvyšuje tepovou frekvenci a zesiluje svalovou kontrakci srdce. Zvyšuje také dechovou frekvenci a hloubku dechu. Noradrenalin hraje důležitou roli při přenosu vzruchu z nervového vlákna do tkáně – působí jako excitační neurotransmitter sympatické části vegetativního nervového systému [8,9].

Polyaminy (*putrescin* (Obrázek 1j), *spermidin* (Obrázek 1m) a *spermin* (Obrázek 1l)) jsou distribuovány po celém organismu, ale jejich velká část je nekovalentně vázána na ribozomy, které jsou pravděpodobně také nejdůležitějším místem jejich působení. Polyaminy specificky reagují s nukleovými kyselinami, stabilizují jejich strukturu a strukturu částic obsahujících nukleové kyseliny, stimuluji metylaci tRNA a hrají určitou roli při syntéze DNA a RNA. Polyaminy mohou také částečně zastoupit hořčičnaté ionty v několika krocích proteosyntézy a mají stabilizační efekt na buněčné membrány. Pro určité mikroorganismy jsou polyaminy esenciálním růstovým faktorem a také stimuluji růst některých buněčných linií savců při pěstování tkáňových kultur [10].

1.1.1.2 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou hlavními stavebními jednotkami bílkovin a peptidů, tudíž jsou důležitými složkami potravy. V přírodě bylo doposud identifikováno více než 700 aminokyselin, ale nejdůležitějších je 20 základních biogenních aminokyselin, které se někdy

označují jako kódované. Některé z těchto aminokyselin po začlenění do bílkovin prochází tzv. postranslačními změnami, které zahrnují např. fosforylace, methylace, acetylace, hydroxylace, glykosylace a další. Aminokyseliny v lidském těle, které nejsou vázány ve struktuře proteinových molekul, vytvářejí tzv. aminokyselinovou hotovost (pool), která je využívána pro syntézu proteinů, hormonů, neuromediátorů, nukleových kyselin, fosfolipidů a dalších biologicky významných látek. Některé aminokyseliny se také účastní regulace translace a transkripce, mají imunomodulační účinky, ovlivňují sekreci hormonů, transport přes buněčné membrány, příjem potravy a další [11,12].



Obrázek 2: Struktury proteinogenních aminokyselin – glycin (a)^{an}, alanin (b)^{ao}, valin (c)^{ap}, leucin (d)^{aq}, isoleucin (e)^{ar}, fenylalanin (f)^{as}, tyrosin (g)^{at}, tryptofan (h)^{au}, lysin (i)^{av}, arginin (j)^{aw}, histidin (k)^{ax}, kyselina asparagová (l)^{ay}, kyselina glutamová (m)^{az}, asparagin (n)^{ba}, glutamin (o)^{bb}, cystein (p)^{bc}, methionin (q)^{bd}, serin (r)^{be}, threonin (s)^{bf}, prolin (t)^{bg}

Glycin (Obrázek 2a) je neesenciální aminokyselina důležitá pro tvorbu proteinů, peptidů, purinů, ATP, nukleových kyselin, porfyrinů, žlučových kyselin, glukózy a dalších pro organismus důležitých látek. Má schopnost tlumit excitační procesy v centrální nervové soustavě a v některých případech může tlumit spasticitu dolních končetin. Má antioxidantní

a protizánětlivou aktivitu a může se podílet na zvýšení imunity. Glycin také vytváří konjugáty se žlučovými kyselinami a některými metabolity léčiv [3,11].

Alanin (Obrázek 2b) je neesenciální aminokyselina zodpovídající za udržování hladiny glukózy v průběhu fyzické zátěže. Je běžnou součástí proteinů (4 – 5 %) a v poměrně vysokých koncentracích se vyskytuje v tělních tekutinách. Je důležitý pro metabolismus – tvoří spojovací krok mezi tvorbou laktátu a metabolizací glukózy, uplatňuje se v energetickém metabolismu centrální nervové soustavy a periferních nervů, podílí se na retenci dusíkatých látek v pozátěžovém stavu, stimuluje imunitní systém a stabilizuje činnost prostaty [3,11].

Valin (Obrázek 2c), **leucin** (Obrázek 2d) a **isoleucin** (Obrázek 2e) patří do skupiny aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAAs). Tyto aminokyseliny jsou pro člověka esenciální a jsou mimořádně důležité, protože představují zdroj energie, jsou významným regulátorem metabolismu bílkovin a také tvoří součást svaloviny. BCAAs mají výrazný antikatabolický účinek v průběhu rekonvalescence, omezují negativní vliv metabolického stresu a spolu s dalšími látkami se výrazně podílejí na nárůstu kosterní svaloviny [3,11].

Fenylalanin (Obrázek 2f) je esenciální aminokyselina, která je prekurzorem tyrosinu. Má antidepressivní aktivitu, zvyšuje duševní výkonnost, působí jako afrodiziakum a má anorektický efekt. V případě blokace konverze fenylalaninu na tyrozin, tj. při fenylketonurii, se fenylalanin hromadí v krvi a metabolizuje se na fenylpyruvát. [3,11].

Tyrosin (Obrázek 2g) je neesenciální aminokyselina, která je prekurzorem pro syntézu katecholaminů, hormonů štítné žlázy a melaninu. Jediné významné použití jako doplněk stravy je u osob s fenylketonurií, protože tyrosin se kvůli dietě s minimálním příjmem fenylalaninu tvoří velmi obtížně [3,11].

Tryptofan (Obrázek 2h) je esenciální aminokyselina, která je nezbytná pro syntézu proteinů, serotoninu, melatoninu a niacinu. Tryptofan ve formě volné aminokyseliny se občas nepovoleně užívá ve formě doplňků stravy jako analgetikum a pro zlepšení spánku. Oficiálně se používá pouze jako součást parenterální výživy [3,11].

Lysin (Obrázek 2i) je esenciální aminokyselina bazického charakteru, která se podílí na tvorbě kolagenu a elastinu. Je také nezbytný pro syntézu karnitinu, spolu s argininem zlepšuje tvorbu svalové hmoty, zlepšuje využitelnost vápníku a používá se jako prevence proti virovým onemocněním, především infekci *Herpes simplex* [3,11].

Arginin (Obrázek 2j) je esenciální aminokyselina, která je zásadní pro proteosyntézu a detoxikaci amoniaku, je prekurzorem kreatinu, polyaminů, glutamátu, prolinu, agmatinu a oxidu dusnatého. Stimuluje sekreci některých hormonů, zvyšuje nárůst svaloviny, snižuje obsah tělesného tuku, má antiaterogenní, antioxidantní a imunostimulační aktivitu. Arginin

je považován za esenciální aminokyselinu při spermatogenezi a také zlepšuje erektilní schopnost.

Histidin (Obrázek 2k) je esenciální aminokyselina, která se ve vysoké koncentraci nachází v hemoglobinu a je prekurzorem histaminu, karnosinu a anserinu. Je výborným chelatačním činidlem pro některé kovy a je častou součástí aktivních center enzymů. Je doporučován jako doplněk stravy při revmatoidní artritidě [3,11].

Kyselina asparagová (Obrázek 2l) je neesenciální aminokyselina kyselého charakteru, která je prekurzorem pro biosyntézu proteinů, purinů, pyrimidinů, nukleových kyselin a argininu. Jedná se o glukogenní aminokyselinu, která je spolu s fenylalaninem součástí umělého sladidla aspartamu. Má excitační neurotransmisní funkci v mozku, používá se pro zlepšení mozkové činnosti, snižuje syndrom chronické únavy a působí regeneračně na kosterní svalstvo [3,11].

Kyselina glutamová (Obrázek 2m) je neesenciální aminokyselina kyselého charakteru, která je hlavním excitačním neurotransmiterem v mozku. Její dekarboxylací v CNS vzniká kyselina γ -aminomáselná (GABA), která působí jako hlavní inhibiční neurotransmiter. Kyselina glutamová se podílí na syntéze DNA, glutathionu a glutaminu, slouží jako přenašeč draslíku z krve do mozku, má hyperglykemický účinek a také stabilizuje činnost prostaty. Pro své chuťové vlastnosti je její sodná sůl používána k dochucování potravin, především instantních polévek a omáček [3,11].

Asparagin (Obrázek 2n) je polární neesenciální aminokyselina, která snadno vytváří vodíkové můstky a zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Z hlediska doplňkové výživy není asparagin příliš významný [3,11].

Glutamin (Obrázek 2o) je nejrozšířenější aminokyselinou přítomnou v tělních tekutinách. Jedná se o semiesenciální aminokyselinu, která je součástí proteinů, významným substrátem pro buňky střevní sliznice a hojně se vyskytuje především v kosterním svalstvu. Glutamin je důležitý pro regulaci acidobazické rovnováhy, chrání organismus před acidózou a toxicitou amoniaku (ve formě amidové skupiny glutaminu je amoniak transportován z kosterního svalstva do jater a ledvin). Působí také imunomodulačně, hraje důležitou roli v integritě střev (napomáhá stabilizovat střevní mukózu) a příznivě působí v průběhu katabolických procesů (podává se jako doplněk stravy při různých chirurgických zákrocích, při chemoterapii a radioterapii) [3,11].

Cystein (Obrázek 2p) je neesenciální aminokyselina, která je prekurzorem pro biosyntézu proteinů a koenzymu A. Katabolickými produkty cysteinu jsou taurin, pyruvát a sulfát.

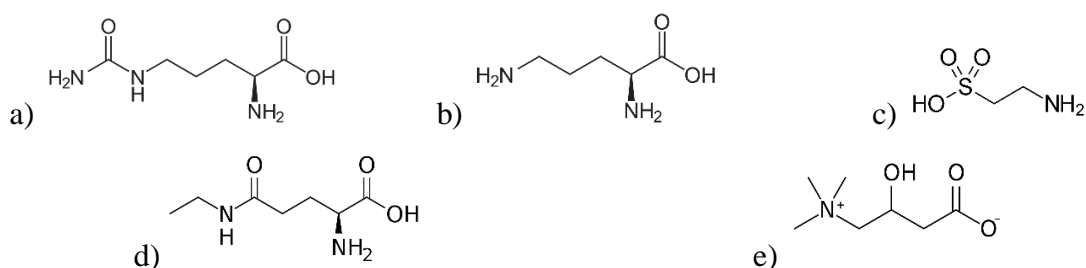
Cystein působí antiskleroticky, má protizánětlivý účinek, zlepšuje kvalitu vlasů a nehtů a má antioxidační účinky [3,11].

Methionin (Obrázek 2q) je esenciální aminokyselina, která slouží jako významný donor methylových skupin. Jedná se o prekurzor při syntéze cysteinu, glutathionu, taurinu, glukózy a glykogenu. Tato aminokyselina působí chemoprotektivně, chrání játra před steatózou a má antioxidační efekt [3,11].

Serin (Obrázek 2r) je neesenciální aminokyselina přítomná prakticky ve všech proteinech, protože hraje významnou roli ve stabilizaci trojrozměrné struktury proteinů tvorbou vodíkových můstků. Serin je důležitý pro metabolismus tuků, růst svalů a zvýšení imunity, je přítomný v aktivních centrech proteáz a má specifické funkce v metabolismu nervové tkáně [3,11].

Threonin (Obrázek 2s) je esenciální aminokyselina, která prostřednictvím vodíkových vazeb interaguje s mnoha látkami a společně se serinem zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Slouží k tvorbě kolagenu a může být použit jako doplněk k léčbě epilepsie, roztroušené sklerózy, familiární spastické paraparézy a dalších neurologických onemocnění [3,11].

Prolin (Obrázek 2t) je neesenciální aminokyselina, která se uplatňuje v hydrofobních reakcích bílkovin. Významně se podílí také na tvorbě chrupavek, vaziva a kostí, jelikož je spolu s hydroxyprolinem součástí kolagenu. Jeho další funkcí je stimulace tvorby glykogenu [3,11].



Obrázek 3: Struktury neproteinogenních aminokyselin – citrulin (a)^{bh}, ornitin (b)^{bi}, taurin (c)^{bj}, theanin (d)^{bk}, karnitin (e)^{bl}

Citrulin (Obrázek 3a) je aminokyselina, která je meziproduktem močovinného cyklu. Citrulin je využíván jako součást sportovní výživy kvůli stimulaci růstového hormonu, snížení svalové bolesti a zlepšení výkonnosti. Produktem katabolismu citrulinu je proteinogenní aminokyselina arginin [11,12].

Ornitin (Obrázek 3b) je neesenciální aminokyselina, která se uplatňuje při biosyntéze argininu, prolinu a polyaminů a hraje důležitou roli v močovinném cyklu. Kromě toho má

také imunomodulační, antikatabolické a hojivé účinky, stimuluje sekreci růstového hormonu a zvyšuje fyzickou výdrž [3,11,12].

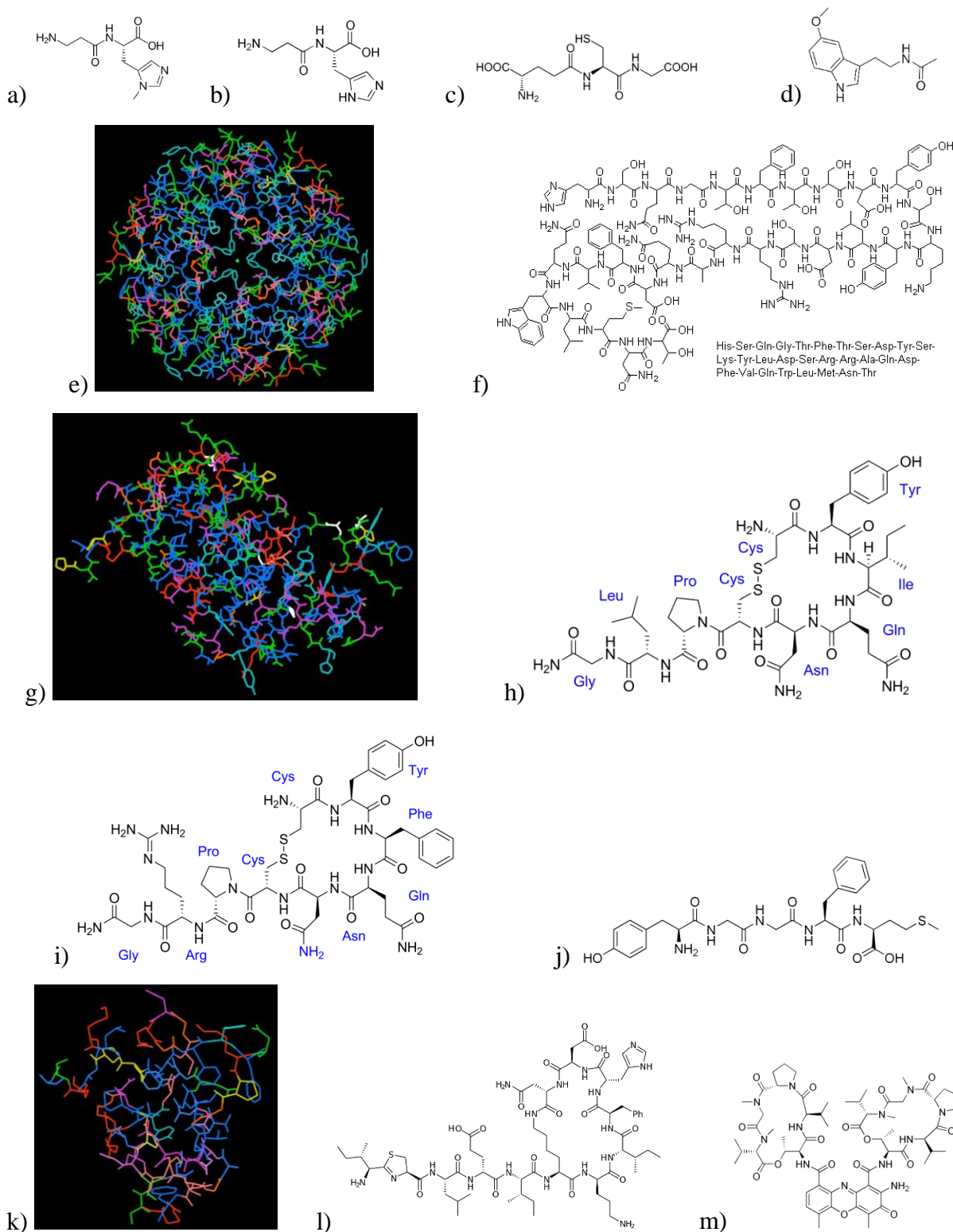
Taurin (Obrázek 3c) je neesenciální neproteinogenní aminokyselina, která má vysokou koncentraci v tělních tekutinách. Od ostatních aminokyselin se liší strukturou, jedná se o β -sulfokyselinu bez chirálního centra. Vyskytuje se volně intracelulárně, ve vysokých koncentracích se nachází zejména v CNS, sítnici a v srdečním a kosterním svalstvu. Mezi jeho nejvýznamnější funkce v organismu patří konjugace žlučových kyselin, stabilizace buněčných membrán a neurotransmise v mozku. Ovlivňuje také přenos vápenatých iontů přes buněčnou membránu a jejich intracelulární distribuci. Vykazuje antioxidační aktivitu, antihypercholesterolemický, antikonvulzní, antiarytmický, antidiabetický a mírný antihypertenzní efekt [3,11].

Theanin (Obrázek 3d) je neesenciální neproteinogenní aminokyselina, která vykazuje antikarcinogenní a antihypertenzní efekt, zlepšuje schopnost učení a navozuje relaxaci pravděpodobně vlivem na metabolismus serotoninu, dopaminu, popř. i dalších neurotransmiterů [3].

Karnitin (Obrázek 3e) nemá klasickou strukturu aminokyseliny, jedná se o hydroxykyselinu, která má ve své struktuře kvarterní amoniovou skupinu. Karnitin je podmíněně esenciální kyselina, která je charakteristickou součástí příčně pruhovaného svalstva a jater. Hraje také důležitou roli v metabolismu mastných kyselin. Používá se k ochraně srdečního svalu např. při srdeční ischemii, snižuje hladinu triacylglycerolů a používá se jako doplňkový prostředek při léčbě mužské neplodnosti [3].

1.1.1.3 Peptidy

Peptidy jsou přírodní látky složené ze dvou a více aminokyselin, jejichž relativní molekulová hmotnost je maximálně 10000 [13], některé zdroje udávají 5000 [14]. Peptidy můžeme podle velikosti rozdělit do dvou skupin, mezi oligopeptidy řadíme peptidy složené maximálně z deseti aminokyselin a mezi polypeptidy řadíme peptidy s více než deseti aminokyselinami. Peptidy vznikají kondenzací aminokyselin za vzniku peptidové vazby, která je vytvořena z karboxylové skupiny jedné aminokyseliny a aminoskupiny druhé aminokyseliny za odštěpení vody. Mezi peptidy patří celá řada biologicky významných látek, jako jsou hormony, antioxidanty, antibiotika a další [13]. Některé z nich jsou níže popsány podrobněji.



Obrázek 4: Struktury vybraných peptidů – anserin (a)^{bm}, karnosin (b)^{bn}, glutathion (c)^{bo}, melatonin (d)^{bp}, inzulin – hexamer (e)^{bq}, glukagon (f)^{br}, somatotropin (g)^{bs}, oxytocin (h)^{bt}, vasopresin (i)^{bu}, met-enkefalin (j)^{bv}, IGF I – monomer (k)^{bw}, bacitracin (l)^{bx}, aktinomycin D (m)^{by}; v barevných strukturách jsou modrou barvou znázorněny AMK alanin, isoleucin, leucin, methionin, fenylalanin, tryptofan a valin, zelenou barvou asparagin, glutamin, serin a threonin, červenou arginin a lysin, tyrkysovou histidin a tyrosin, bílou kyselina asparagová, žlutou prolin, oranžovou glycin, růžovou cystein a fialovou kyselina glutamová

Anserin (Obrázek 4a) je dipeptid s antioxidační aktivitou, zvyšuje schopnost učení, působí proti negativním důsledkům stresových faktorů a proti vyčerpání. Kromě toho zvyšuje dostupnost zinku z trávicí soustavy, stimuluje produkci NO a je součástí doplňků stravy pro pacienty trpící obezitou. Působí také antikarcinogenně a jako prevence osteoporózy [3].

Karnosin (Obrázek 4b) je dipeptid nacházející se v kosterním svalstvu, který hraje roli v regulaci nitrobuněčného vápníku a je základem pufrčního systému, který udržuje pH při kontrakci svalu za anaerobních podmínek [3].

Glutathion (Obrázek 4c) je tripeptid, který umožňuje transport aminokyselin a nízkomolekulárních peptidů přes buněčné membrány. Je kofaktorem některých enzymů a podílí se na odstraňování reaktivních forem kyslíku. Z tohoto důvodu je doporučován při všech nemocích, kde hraje významnou úlohu oxidační stres (např. rakovina, ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění a další) [3].

Melatonin (Obrázek 4d) je hlavním hormonem hypofýzy, který reguluje cirkadiánní rytmus, endokrinní sekreci (především sekreci růstového hormonu) a ovlivňuje spánek. Jeho tvorba je řízena cyklem dne a noci, světlo jeho sekreci zastavuje a tma naopak stimuluje [3].

Inzulin (Obrázek 4e) je polypeptidický hormon produkováný β -buňkami slinivky břišní, který hraje hlavní roli v regulaci hladiny glukózy v krvi (snižuje glykémii). Má také velký vliv na metabolismus proteinů a lipidů. Inzulin je v injekční formě podáván pacientům s diabetem [15,16].

Glukagon (Obrázek 4f) je polypeptidický hormon produkováný α -buňkami slinivky břišní, který spolu s inzulinem reguluje hladinu glukózy v krvi (zvyšuje glykémii). Glukagon má katabolický efekt, stimuluje rozklad glykogenu, lipidů a bílkovin. Je používán k léčbě hypoglykémie a během některých radiologických vyšetření žaludku a střev, při kterých je nezbytné snížení peristaltických pohybů [15,16].

Somatotropin (Obrázek 4g) je polypeptidický hormon syntetizovaný v adenohypofýze, který podněcuje normální růst kostí, svalů a chrupavek, stimuluje syntézu proteinů, podporuje laktaci, zvyšuje hladinu glukózy v krvi, zvětšuje ledviny a zlepšuje jejich funkci a zvyšuje tvorbu retikulocytů (vývojové stádium červených krvinek) v kostní dřeni [15,16].

Oxytocin (Obrázek 4h) je peptidický hormon syntetizovaný v hypothalamu a vylučovaný neurohypofýzou, který stimuluje vylučování mateřského mléka a způsobuje stahy dělohy při porodu. Ve vaječnicích stimuluje folikulární syntézu steroidních hormonů a ve varlatech je zodpovědný za pohyby semenotvorných kanálků, čímž usnadňuje vylučování spermií. V CNS hraje určitou roli při snižování účinků stresu na organismus [16].

Vasopresin (Obrázek 4i) je další peptidický hormon syntetizovaný hypothalamem a vylučovaný neurohypofýzou. Jeho funkcí je především regulace obsahu vody v těle a udržování určité osmolality, je schopný také ovlivňovat zužování periferních cév [16].

Liberiny a statiny jsou hormony produkované hypothalamem, jejichž funkcí je regulace sekrece hormonů z adenohipofýzy. Liberiny sekreci aktivují, zatímco statiny ji inhibují [12].

Endorfiny, enkefaliny (Obrázek 4j) **a dynorfiny** jsou endogenní opioidní peptidy působící v CNS. Jejich funkcí je především působení proti bolesti, dále zlepšují funkci pohybového aparátu, zpomalují průchod potravy trávicí soustavou a zpomalují činnost srdce a plic [16].

Inzulinu podobné růstové faktory IGF I (Obrázek 4k) **a IGF II** jsou malé polypeptidy syntetizované převážně v játrech, které regulují růst, aktivaci a diferenciaci určitých buněk a tkání. Kromě toho také zrychlují činnost ledvin, zvyšují jejich velikost i váhu. IGF I navíc snižuje hladinu cirkulujícího inzulinu a glukagonu, zvyšuje příjem glukózy tkáněmi a zastavuje výdej glukózy játry [15,16].

Bacitracin (Obrázek 4l), **gramicidin a aktinomycin D** (Obrázek 4m) jsou antibiotika s peptidovou strukturou. Působí pouze proti grampozitivním bakteriím, mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici tvorby buněčné stěny bakterií. Aktinomycin D má kromě antibiotických také antikarcinogenní účinky, používá se jako chemoterapeutikum k léčbě gestační trofoblastické nemoci, nefroblastomu, určitých typů sarkomů, rakoviny varlat a vaječnicků [15].

1.1.1.4 Proteiny

Proteiny jsou velké biomolekuly, které se skládají z jednoho nebo více řetězců aminokyselin, a jsou na ně vázány veškeré životní funkce zahrnující především katalýzu metabolických reakcí, DNA replikaci, odpověď na stimuly nebo stavební a transportní funkce. Proteiny jsou tvořeny několika sty až tisíci aminokyselin spojených peptidovou vazbou, sekvence aminokyselin, která je zakódována v genech, je u různých proteinů různá. Vlastnosti proteinů jsou určeny jejich strukturou, která má 4 úrovně – primární, sekundární, terciární a kvarterní, a díky tomu mohou vytvářet protáhlé, vláknité struktury, nebo naopak struktury kulovité až oválné. Kromě jednoduchých proteinů se v organismu vyskytují také proteiny složené, které kromě proteinové části mají na sobě navázanou také neproteinovou část. Tyto částice se pak nazývají glykoproteiny (obsahují navázaný sacharid), lipoproteiny (obsahují navázaný lipid), nukleoproteiny (obsahují navázanou nukleovou kyselinu), metaloproteiny (obsahují navázaný iont kovu), fosfoproteiny (obsahují fosfátovou skupinu)

a chromoproteiny (obsahují navázané barvivo) [17]. Za fyziologického pH převažuje u většiny proteinů negativní náboj [11].

Proteiny v potravě jsou buď živočišného, nebo rostlinného původu. Většina živočišných bílkovin (maso, mléko, vejce) obsahuje v dostatečném množství všechny esenciální aminokyseliny, a proto se tyto bílkoviny označují jako bílkoviny první kategorie. V rostlinných bílkovinách není zastoupení esenciálních aminokyselin obvykle kompletní, často chybí lysin, methionin a tryptofan. Hlavní výjimkou je sója, která obsahuje v dostatečném množství nejen všechny esenciální aminokyseliny, ale i esenciální mastné kyseliny a několik vitamínů [11].

Kolageny jsou vláknité proteiny (existuje více než 25 typů), které jsou základní stavební hmotou pojivových tkání. Ve formě doplňků stravy jsou používány při léčbě degenerativních kloubních onemocnění [3,15].

Laktoferrin je glykoprotein nacházející se především v mlezivu a mateřském mléce, jehož hlavní funkcí v organismu je přenos železa. Kromě toho má také výrazné imunomodulační, antimikrobiální, antivirové, antioxidační a antikarcinogenní účinky [3].

Kaseiny (α -, β -, κ -) jsou mléčné proteiny sloužící jako přenašeče některých kationtů, např. Ca, Fe, Zn a Cu [3].

β -laktoglobulin je další z mléčných proteinů, jehož funkcí je především přenos retinolu a mastných kyselin, ale má také antioxidační účinky [3].

α -laktalbumin je protein, který tvoří přibližně třetinu obsahu bílkovin kravského mléka. Jeho funkcí je regulace tvorby laktózy v mléčné žláze, slouží také jako přenašeč vápníku a imunomodulátor a vykazuje antikarcinogenní účinky [3].

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které je z hlediska struktury možné rozdělit do pěti skupin – **IgM**, **IgG**, **IgA**, **IgD** a **IgE**. Tyto proteiny jsou zodpovědné za imunitní odpověď organismu [3,15].

Albumin je hlavní protein krevní plazmy, který je přítomný také v tkáňovém a mozkomíšním moku. Jeho hlavními funkcemi je udržování osmotického tlaku krve a transport některých metabolitů, např. mastných kyselin, aminokyselin, steroidních hormonů, těžkých kovů a léčiv. Ve formě infuzí se používá ke zvýšení množství krevní plazmy u pacientů s rozsáhlým krvácením, popř. během některých chirurgických operací [15].

Fazeolamin je glykoprotein získávaný z plodů fazolu obecného, který se používá k podpůrné léčbě diabetu, při snižování tělesné hmotnosti a pro snížení projevů alkoholové kocoviny [3].

Royalisin a **Major Royal Jelly Proteins** jsou proteiny získávané z mateří kašičky, která je vylučována hltanovými žlázami včely medonosné jako stimulant růstu a vývoje včelí královny. Všechny zmíněné proteiny vykazují výraznou antimikrobiální a protikvasinkovou aktivitu [18–20].

Trávicí enzymy jsou látky proteinové povahy, které mají za úkol hydrolyzu různých složek potravy na jednodušší molekuly. Trávicí enzymy se vyskytují ve slinách, žaludku, střevech a slinivce břišní. K trávení polysacharidů na oligosacharidy jsou využívány **amylázy**, po nichž následuje trávení **laktázou**, **sacharázou**, **maltázou**, popř. **dextrinázou**, které štěpí příslušné disacharidy na jednotlivé monosacharidy. Proteiny jsou tráveny v žaludku pomocí **pepsinu** na polypeptidy, které jsou dále tráveny **trypsinem** a **chymotrypsinem** v tenkém střevě. K hydrolyze lipidů na mastné kyseliny a glycerol slouží především **pankreatická lipáza** tvořená ve slinivce břišní a působící v tenkém střevě [3,15].

Lysozym je antimikrobiální enzym schopný narušovat buněčnou stěnu mikroorganismů, synergista účinků imunoglobulinů a laktoferrinu. Je přítomen v slzách, slinách, sekretech sliznic, krevní plazmě a mateřském mléce [3].

Superoxiddismutáza je další zástupce z řady enzymů, který katalyzuje reakci mezi superoxidovými anionty a vodíkem za tvorby molekulárního kyslíku a peroxidu vodíku, čímž chrání buňky před oxidačním stresem [3].

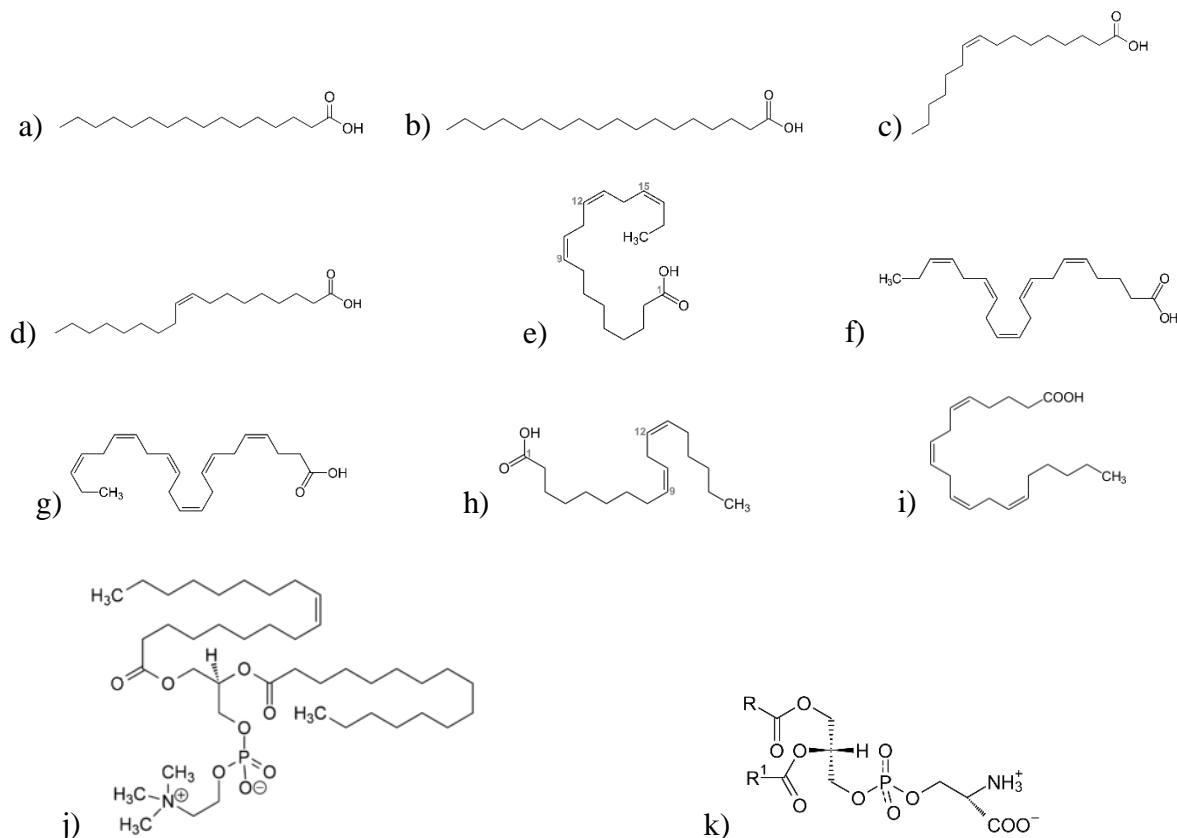
Bromelain je proteolytický enzym získávaný především z plodu ananasu, který má mimo jiné antikarcinogenní a protizánětlivé účinky, dále inhibuje agregaci krevních destiček a je doporučován jako doplněk při léčbě lehké formy ulcerózní kolitidy [3].

1.1.2 Mastné kyseliny a jejich deriváty, lipidy

Mastné kyseliny jsou organické kyseliny se čtyřuhlíkatým a delším uhlovodíkovým řetězcem. Tato skupina látek se dělí na nasycené, mononenasycené a polynenasycené mastné kyseliny. Většina přirozených mastných kyselin má přímý řetězec o sudém počtu uhlíků (12–30) a amfipatickou strukturu (hydrofobní uhlíkatý řetězec a hydrofilní karboxylovou část). Mastné kyseliny se v organismu mohou vyskytovat ve volné i vázané formě a jsou důležité pro správnou funkci kardiovaskulárního systému, centrální nervové soustavy, sítnice a dalších systémů. Některé mastné kyseliny jsou pro lidský organismus esenciální, není schopen si je sám syntetizovat, a proto je nutné je přijímat potravou [3,11,21–24].

Reakcí mastných kyselin s jednosytným, popř. trojsytným alkoholem (především glycerolem) vznikají lipidy. Lipidy jsou skupinou látek s širokým spektrem struktur a funkcí. Představují nejbohatší zdroj a hlavní zásobní formu energie v organismu, jsou hlavní složkou

buněčných membrán, slouží jako rozpouštědlo pro lipofilní látky (např. vitamíny rozpustné v tucích), představují mechanickou a tepelnou ochranu těla, hrají roli v termoregulaci, ve formě lipoproteinů představují hlavní způsob přepravy některých látek a jsou výchozí látkou pro syntézu steroidních hormonů a prostaglandinů [11,23,25].



Obrázek 5: Struktury mastných kyselin a fosfolipidů – kyselina palmitová (a)^{bz}, kyselina stearová (b)^{ca}, kyselina palmitoolejová (c)^{cb}, kyselina olejová (d)^{cc}, kyselina α -linolenová (e)^{cd}, kyselina eikosapentaenová (f)^{ce}, kyselina dokosaheptaenová (g)^{cf}, kyselina linolová (h)^{cg}, kyselina arachidonová (i)^{ch}, fosfatidylcholin (j)^{ci}, fosfatidylserin (k)^{cj}; R, R¹ označuje uhlovodíkové zbytky

Nasyčené mastné kyseliny nemají ve své struktuře žádnou dvojnou vazbu. Slouží jako energetický zdroj organismu a spolu s glycerolem tvoří základní stavební složku triacylglycerolů. Nejdůležitějšími zástupci této skupiny mastných kyselin je **kyselina palmitová** (Obrázek 5a) a **kyselina stearová** (Obrázek 5b) [11].

Mononenasyčené mastné kyseliny obsahují ve své struktuře jednu dvojnou vazbu. Mají funkci jako nasyčené mastné kyseliny a nejvýznamnějšími zástupci jsou **kyselina palmitoolejová** (Obrázek 5c) a **kyselina olejová** (Obrázek 5d) [11].

Polynenasycené mastné kyseliny mají ve své struktuře několik dvojných, popř. trojných vazeb. Biologicky nejvýznamnějšími jsou řady kyselin ω -3 a ω -6. Mezi ω -3 kyseliny řadíme

především kyselinu α -linolenovou, eikosapentaenovou a dokosahexaenovou a mezi ω -6 kyselinu linolovou a arachidonovou [11].

❖ **Kyselina α -linolenová** (Obrázek 5e) má významný příznivý vliv na kardiovaskulární systém, čímž snižuje riziko srdečních onemocnění. Má také antikarcinogenní účinek a působí pozitivně na imunitní funkce [3,11].

❖ **Kyselina eikosapentaenová** (Obrázek 5f) snižuje viskozitu krve, zvyšuje plasticitu erytrocytů a snižuje agregaci trombocytů. Jako doplněk stravy se může používat k zabránění hubnutí u pacientů se zhoubnými nádory. Používá se také k léčbě některých kožních onemocnění kvůli svým protizánětlivým účinkům [3,11].

❖ **Kyselina dokohexaenová** (Obrázek 5g) hraje významnou roli v mozkové tkáni, především v šedé kůře mozkové, je důležitá pro normální funkci neuronů, proces učení a paměti. Z tohoto důvodu je přidávána do umělé výživy novorozenců. Ovlivňuje také strukturu sítnice a celý proces vidění [3,11].

❖ **Kyselina linolová** (Obrázek 5h) snižuje obsah lipidů v tukové tkáni, čímž napomáhá při léčbě obezity. Pro své cytotoxické účinky na některé nádorové buňky (karcinom prsu, kolorektální karcinom a maligní melanom) se využívá jako doplněk stravy při léčbě nádorových onemocnění [3,11].

❖ **Kyselina arachidonová** (Obrázek 5i) je důležitou složkou fosfolipidů a prekurzorem pro syntézu eikosanoidů. Je důležitou složkou pro vývoj mozku a nervového systému, proto hraje důležitou roli ve výživě kojenců [3,11].

Lněný olej obsahuje především kyselinu linolovou a linolenovou, a proto jeho biologické účinky jsou kombinací účinků těchto dvou kyselin. Strava se sníženým obsahem tuku doplněná o lněný olej má příznivý vliv na kardiovaskulární systém. Olej je použitelný při léčbě revmatoidní artritidy a jiných zánětlivých onemocnění. Ve vysokých dávkách (nad 25 g denně) má projímavé účinky [3].

Rybí olej obsahuje kyselinu dokosahexaenovou a eikosapentaenovou. Používá se k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, při léčbě zánětlivých a autoimunitních procesů a jako doplněk stravy při psychických onemocněních [3].

Olej ze žraločích jater obsahuje především skvalen a lineární ethery. Používá se k posílení imunity u infekčních onemocnění, protože zvyšuje počet leukocytů. Působí proti vzniku krevních kapilár v některých nádorech (nádory kůže, ledvin, močového měchýře) a má radioprotektivní účinky [3].

Fosfolipidy jsou jedním z druhů složených lipidů, jejichž hlavní funkcí je tvorba buněčných membrán [11].

❖ *Fosfatidylcholin (lecitin)* (Obrázek 5j) se používá jako doplněk při léčbě psychických poruch, při ekzémech, onemocněních žlučníku, jater a revmatoidních artritidách [3].

❖ *Fosfatidylserin* (Obrázek 5k) je důležitý pro správnou funkci neuronů, přenos signálů, mezibuněčnou komunikaci a regulaci buněčného růstu. Působí také jako rezervoár pro fosfolipidy v mitochondriální membráně [3].

1.1.3 Sacharidy a jejich deriváty

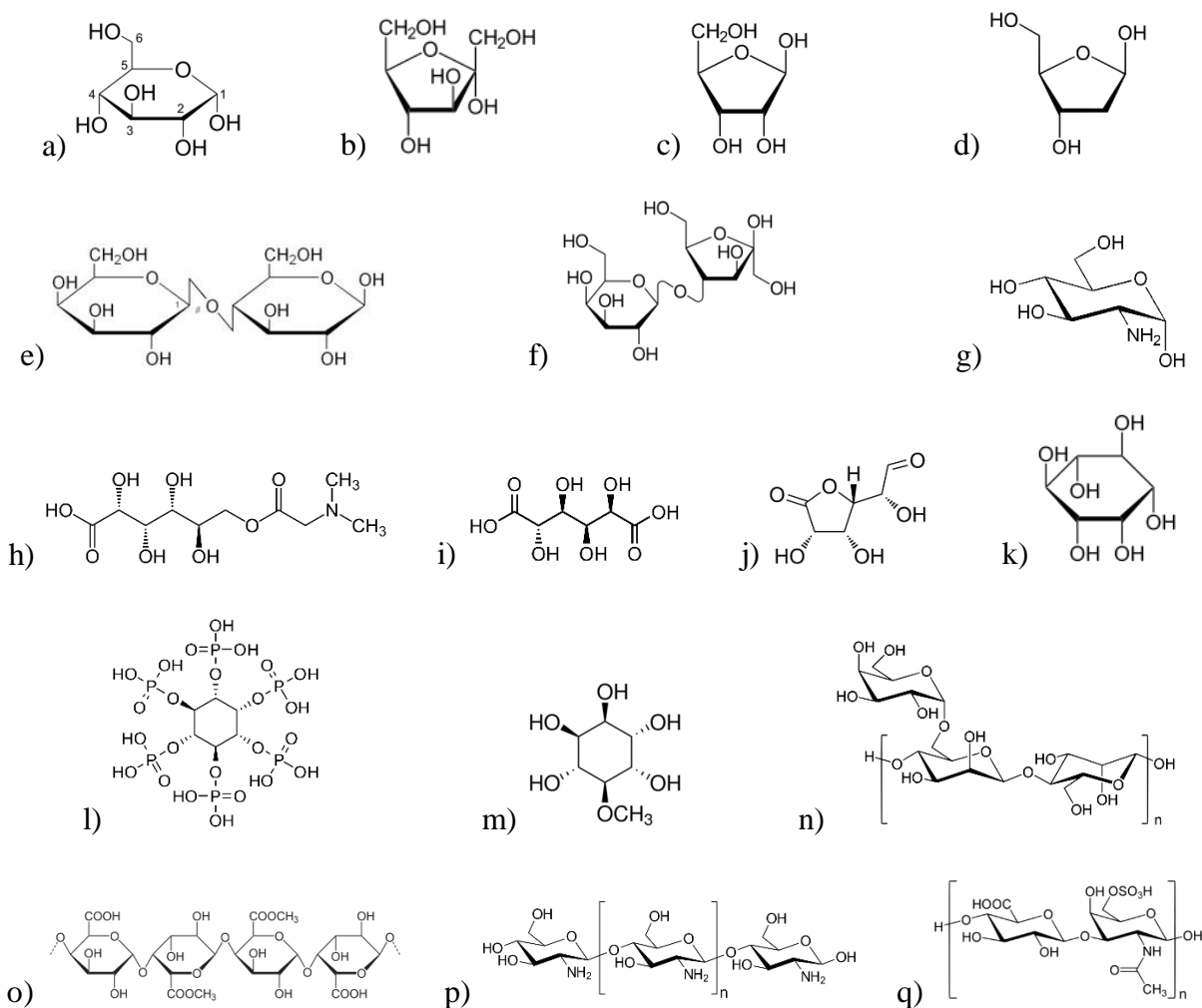
Sacharidy jsou aldehydy nebo ketony polyhydroxyalkoholů. Podle velikosti se člení na monosacharidy, disacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Mono- a disacharidy jsou polární látky dobře rozpustné ve vodě, zatímco polysacharidy jsou ve vodě špatně rozpustné nebo nerozpustné. Sacharidy hrají v živých organismech několik rolí. Polysacharidy slouží ke skladování energie (škrob, glykogen) nebo plní stavební funkci (celulóza). Celulóza má kromě stavební funkce také funkci vlákniny. Monosacharidy a disacharidy slouží především jako zdroj energie, popř. jsou součástí koenzymů a tvoří kostru nukleových kyselin. Sacharidy i jejich deriváty hrají také klíčovou roli v imunitním systému, při srážení krve a v dalších důležitých biochemických procesech [11,26].

Glukóza (Obrázek 6a) je nejdůležitějším zdrojem energie v energetickém metabolismu a téměř jediný zdroj energie pro mozkové buňky, čímž ovlivňuje psychologické procesy mozku. Působí také jako prekurzor pro syntézu několika důležitých sloučenin např. škrobu, glykogenu, glykoproteinů, glykolipidů, fruktózy, laktózy, manózy, galaktózy nebo různých uronových kyselin [26].

Fruktóza (Obrázek 6b) je jedním z monosacharidů využitelných jako zdroj energie, stimuluje akumulaci tuků a glykogenu v játrech. Vysoké dávky fruktózy mohou zvyšovat systolický krevní tlak a inzulínovou rezistenci a mohou způsobit vznik obezity [27].

Ribóza (Obrázek 6c) je základní stavební částicí při syntéze nukleotidů a nukleových kyselin. Používá se ke zvýšení funkčnosti svalstva, zlepšení atletického výkonu a vzestupu svalové energie. Je používána také k prevenci křečů, bolestí a ztuhlosti po cvičení u pacientů s některými onemocněními (AMPD, McArdleho choroba) [3,11].

Deoxyribóza (Obrázek 6d) je monosacharid odvozený od ribózy, který se podílí na stavbě DNA [26].



Obrázek 6: Struktury sacharidů a jejich derivátů – glukóza (a)^{ck}, fruktóza (b)^{cl}, ribóza (c)^{cm}, deoxyribóza (d)^{cn}, laktóza (e)^{co}, laktulóza (f)^{cp}, glukosamin (g)^{cq}, kyselina pangamová (h)^{cr}, kyselina glukarová (i)^{cs}, glukuronolakton (j)^{ct}, inositol (k)^{cu}, kyselina fytová (l)^{cv}, pinitol (m)^{cw}, guarová guma (n)^{cx}, pektin (o)^{cxy}, chitosan (p)^{cz}, chondroitin-sulfát (q)^{da}

Laktóza (Obrázek 6e) je disacharid tvořící 2–8 % hm. mateřského mléka savců, kde slouží jako zdroj energie pro kojence. Nestrávená laktóza putuje střevem a má funkci vlákniny. Kromě toho má také pozitivní efekt na absorpci minerálů, především vápníku a hořčíku [28].

Laktulóza (Obrázek 6f) příznivě ovlivňuje ekosystém střeva a jeho hygienu. Má mírně projímavé účinky a chrání střevo před vznikem kolorektálního karcinomu. Snižuje hladinu sérových lipidů a má hypoglykemický efekt [3].

Glukosamin (Obrázek 6g) je základní stavební látka pro syntézu glykoproteinů, glykolipidů, kyseliny hyaluronové, glykosaminoglykanů a proteoglykanů, které jsou důležitou složkou chrupavek, šlach, vazů, mukózních membrán, tkání oka a cévní stěny. Stimuluje metabolismus v chondrocytech kloubní chrupavky a v synoviálních buňkách [3,26].

Kyselina pangamová (Obrázek 6h) funguje jako donor methylskupiny podílející se na tvorbě některých aminokyselin, hraje roli v oxidaci glukózy a buněčném dýchání. Působí antioxidačně, chrání buňky před destruktivními oxidačními procesy. Podílí se také na metabolismu endokrinního systému a CNS, stimuluje jaterní funkce a může se významně podílet na detoxikačních procesech [3].

Kyselina glukarová (Obrázek 6i) se používá především jako prevence před vývojem karcinomů závislých na estrogeneru (karcinom prsu) a jiných typů nádorů závislých na produkci hormonů (karcinom prostaty) [3].

Glukuronolakton (Obrázek 6j) zlepšuje metabolismus hepatocytů, chrání organismus před vývojem cirhózy, má protizánětlivou aktivitu, protektivní efekt vůči poškození neuronů, působí proti únavě a navozuje pocit pohody [3].

Inositol (Obrázek 6k) je esenciální složkou buněčných fosfolipidů, dále je schopen podílet se na odstranění tuků z jaterních a střevních buněk a má podobný efekt jako antidepressiva typu SSRI. Používá se jako doplněk stravy při léčbě polycystických vaječníků, při zvýšených sérových hladinách testosteronu a lupénce [3].

Kyselina fytová (Obrázek 6l) chelatuje vícevazné kovové ionty (převážně Zn, Ca, Fe) za vzniku solí. V moči může snižovat výskyt šťavelanu, snižovat koncentraci vápenatých iontů a tím snižovat nebezpečí tvorby krystalických vápenatých solí v ledvinové tkáni. Jedná se o přírodní antioxidant redukující peroxidaci lipidů a má také antikarcinogenní aktivitu proti nádorům prsu, tlustého střeva, jater a prostaty [3].

Pinitol (Obrázek 6m) má protizánětlivý účinek, působí chemoprotektivně, antioxidačně, snižuje hladinu volných mastných kyselin v plazmě. Snižuje také hladinu krevní glukózy, stimuluje její transport do tkání a zvyšuje citlivost tkání vůči inzulinu, čímž napomáhá při léčbě diabetu typu 2 [3].

Guarová guma (Obrázek 6n) zpomaluje vyprazdňování žaludku a omezuje vstřebávání cukrů z potravy, čímž zvyšuje pocit sytosti [3].

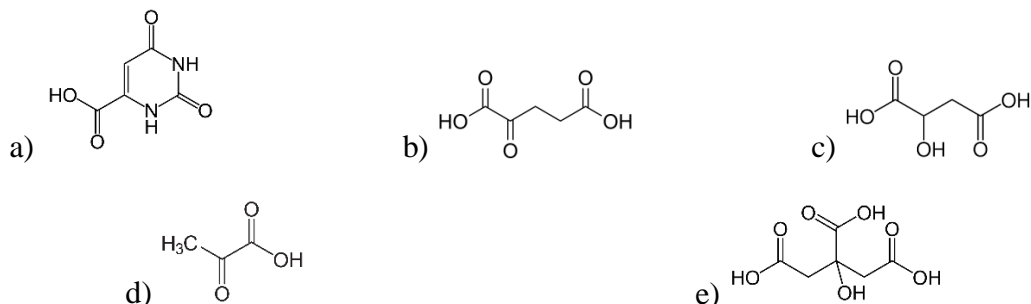
Pektin (Obrázek 6o) je perorálně používán jako adsorbent metabolitů ve střevech a pro snížení hladiny cholesterolu a triacylglycerolů. Snižuje riziko vzniku karcinomu tlustého střeva a má určité antibakteriální účinky [3,26].

Chitosan (Obrázek 6p) ve střevě váže žlučové kyseliny, má hemostatické účinky a přispívá k opravě některých poškozených tkání zvýšením aktivity makrofágů, fibroblastů a leukocytů [3].

Chondroitin-sulfát (Obrázek 6q) chrání tkáň chrupavky proti degradaci, působí proti rozvoji aterosklerózy, osteoporózy a osteoartritidy [3,26].

1.1.4 Organické kyseliny primárního metabolismu

Jedná se o organické kyseliny, které se bezprostředně podílejí na biosyntéze důležitých metabolitů nebo jsou bezprostřední součástí cyklu trikarboxylových kyselin a samostatně podané navozují různé biologické účinky [3].



Obrázek 7: Struktury organických kyselin primárního metabolismu – kyselina orotová (a)^{db}, kyselina α -ketoglutarová (b)^{dc}, kyselina jablečná (c)^{dd}, kyselina pyrohroznová (d)^{de}, kyselina citronová (e)^{df}

Kyselina orotová (Obrázek 7a) působí antiarytmicky, vazodilatačně a neuroprotektivně. Byl prokázán její efekt na tvorbu erytrocytů a leukocytů. Zlepšuje proces učení a používá se jako doplněk stravy při léčbě dny, hepatitid, nervových a kardiovaskulárních onemocnění [3].

Kyselina α -ketoglutarová (Obrázek 7b) je důležitým meziproduktem citrátového cyklu a dýchacího řetězce. V průběhu její oxidační dekarboxylace se tvoří molekula ATP. Je prekurzorem glutaminu a hraje klíčovou roli v metabolismu této látky. Má schopnost detoxikovat amoniak z nervové tkáně a významně se podílí na odstraňování dusíkatých metabolitů v průběhu metabolismu aminokyselin z tělních tekutin a tkání [3].

Kyselina jablečná (Obrázek 7c) se v kombinaci s hořčíkem používá jako doplněk stravy pro tlumení bolestivosti a dotykové citlivosti při fibromyalgii [3].

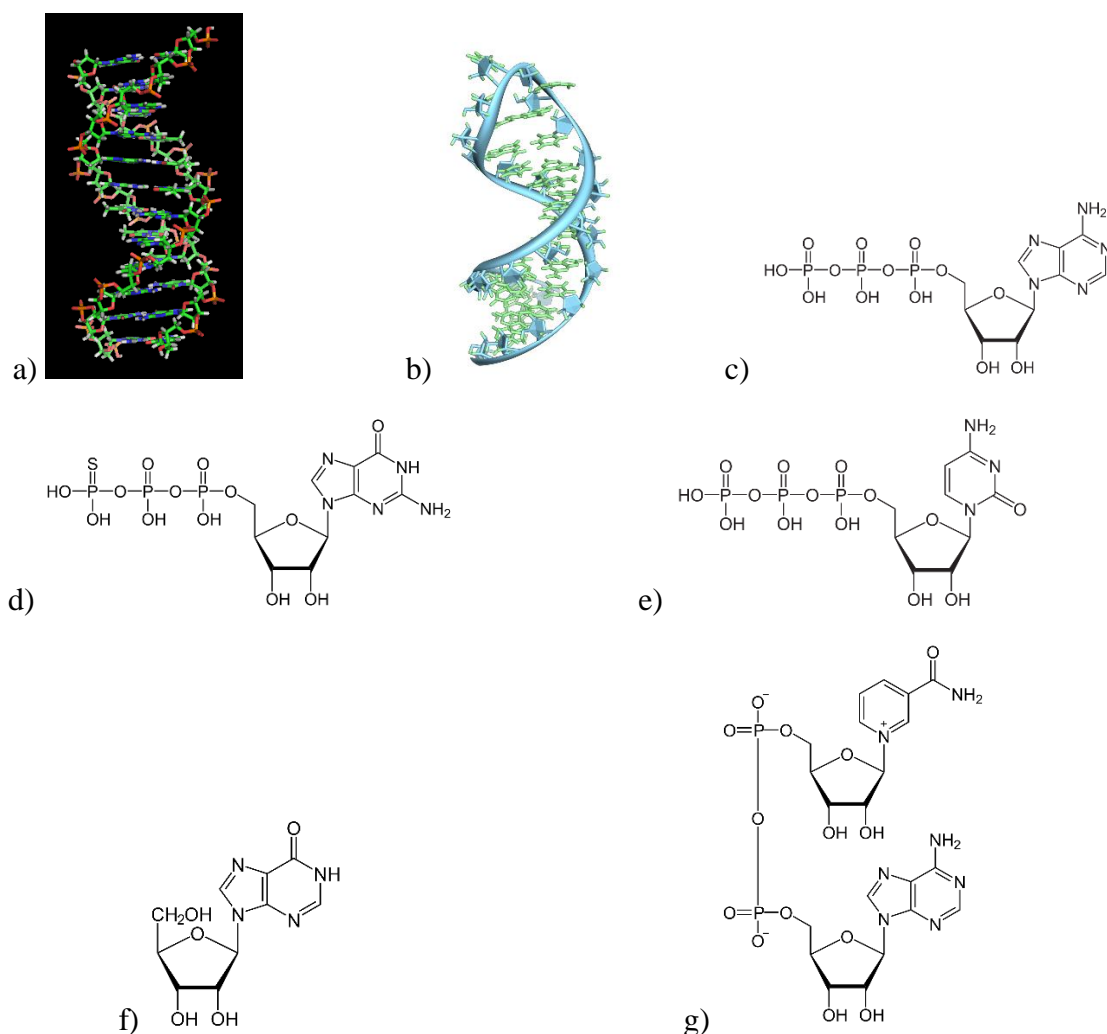
Kyselina pyrohroznová (Obrázek 7d) může zvyšovat rychlost oxidace tuků, snižovat tvorbu volných radikálů a snižovat rychlost oxidace sacharidů. Je používána při obezitě pro snížení tělesné hmotnosti, hyperlipidemiích a zhoubných nádorech. Velmi často se používá ve sportovní výživě pro zvýšení fyzické výkonnosti [3].

Kyselina citronová (Obrázek 7e) vzniká v citrátovém cyklu a poskytuje substráty pro dýchací řetězec, hraje však roli i v procesech glukoneogeneze, transaminace, deaminace a syntézy mastných kyselin. Její soli s kovy se používají jako zdroj minerálů při dietách a onemocněních. Je považována za významný inhibitor krystalizace moči [26].

1.1.5 Nukleové kyseliny a látky vzniklé jejich degradací

Nukleové kyseliny jsou organické látky polymerní struktury, které jsou tvořené jednotlivými nukleotidy spojenými 3,5-fosfodiesterovou vazbou. Hlavní funkcí nukleových kyselin je uchovávání genetické informace a regulace průběhu syntézy proteinů [26].

Nukleotidy ve své struktuře obsahují monosacharid (ribózu, deoxyribózu), dusíkatou bázi (adenin, guanin, cytosin, uracyl, thimin) a jednu až tři fosfátové skupiny. Kromě toho, že jsou základními stavebními jednotkami nukleových kyselin, mají různorodé funkce v energetickém metabolismu, při syntéze proteinů, regulaci enzymové aktivity (jsou součástí mnoha koenzymů) a v přenosu signálů [26].



Obrázek 8: Struktury nukleových kyselin a látek vzniklých jejich degradací – DNA (a)^{dg}, RNA (b)^{dh}, ATP (c)^{di}, GTP (d)^{dj}, CTP (e)^{dk}, inosin (f)^{dl}, NAD (g)^{dmm}

DNA (Obrázek 8a) je hlavní nositelkou genetické informace, kterou se řídí syntéza všech proteinů a zároveň je předávána dceřiným buňkám při buněčném dělení [26].

RNA (Obrázek 8b) je nukleová kyselina, která má několik podtypů lišících se především svojí funkcí. Hlavními podtypy jsou **mediátorová RNA (mRNA)**, která přenáší dědičnou informaci kódující přesné pořadí aminokyselin v bílkovině, **transferová RNA (tRNA)** sloužící jako přenašeč aminokyselin na místo vznikajícího polypeptidu a **ribosomální RNA (rRNA)**, která je jednou ze stavebních složek ribozomů [26].

ATP (Obrázek 8c) je hlavní biologický přenašeč volné energie [26].

GTP (Obrázek 8d) působí jako alosterický regulátor a jako zdroj energie pro syntézu proteinů [26].

CTP (Obrázek 8e) se účastní na biosyntéze fosfoglyceridů, sfyngomyelinu a substituovaných sfyngosinů [26].

Inosin (Obrázek 8f) se může v CNS podílet na stimulaci růstu axonů z nepoškozených nervových buněk směrem k buňkám poškozeným. Má neuroprotektivní, kardioprotektivní, protizánětlivý a imunostimulační účinek [3].

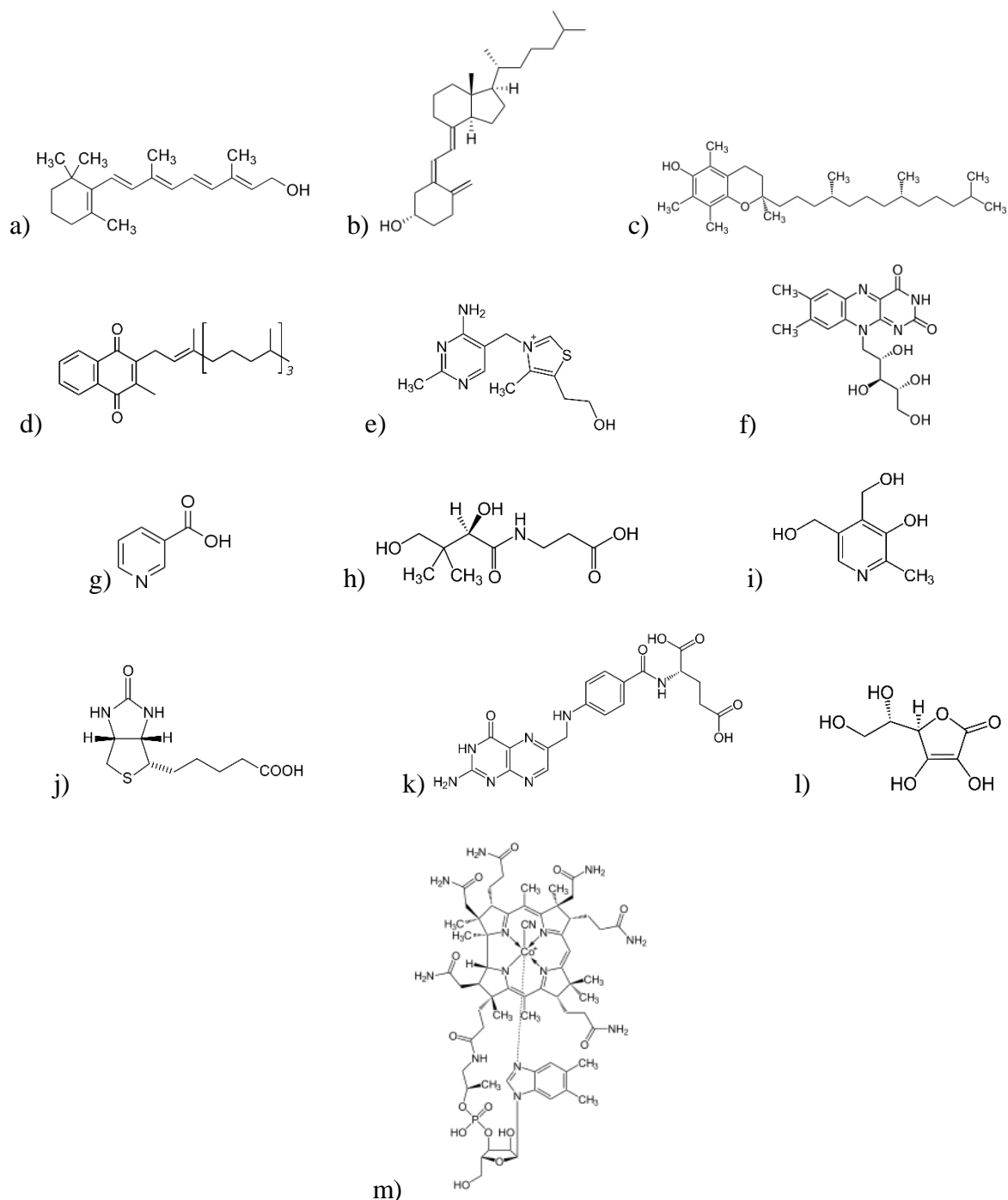
NAD/NADH (Obrázek 8g) hraje primární roli v elektronovém transportním řetězci v mitochondriích. Je nezbytnou sloučeninou uplatňující se v buněčných procesech při tvorbě energie z glukózy a ukládání v ATP. Může být použit při ovlivňování chronického únavového syndromu, hypertenze, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby a kardiovaskulárních onemocnění [3].

1.1.6 Biokatalyzátory

1.1.6.1 Vitamíny

Vitamíny jsou širokou skupinou chemicky různorodých látek s nízkou molekulovou hmotností, které lidský organismus nezbytně potřebuje. Jsou to látky esenciální, tzn., že si je lidský organismus nedovede sám vytvořit, ale musí je přijímat potravou. Vitamíny nejčastěji působí jako kofaktory enzymů a regulátory životních funkcí a uplatňují se také jako antioxidanty. Vitamíny jsou velice důležité pro správnou funkci organismu, protože se podílejí na metabolismu bílkovin, tuků i cukrů. Jsou také schopny zpomalovat degenerativní procesy způsobené stárnutím a posilují imunitní a biochemické reakce [29–31].

Vitamíny dělíme nejčastěji na základě jejich rozpustnosti a to do dvou skupin na vitamíny rozpustné v tucích (vit. A, D, E, K) a vitamíny rozpustné ve vodě (vit. skupiny B a vit. C) [31]. Biochemické vlastnosti jednotlivých vitamínů jsou podrobněji popsány dále.



Obrázek 9: Struktury vitamínů – A (a)^{dn}, D (b)^{do}, E (c)^{dp}, K (d)^{dq}, B₁ (e)^{dr}, B₂ (f)^{ds}, B₃ (g)^{dt}, B₅ (h)^{du}, B₆ (i)^{dv}, B₇ (j)^{dw}, B₉ (k)^{dx}, C (l)^{dy}, B₁₂ (m)^{dz}

Vitamín A (Obrázek 9a) je vitamín, který je důležitý pro dobrou zrakovou funkci, protože je výchozí látkou pro zrakový purpur. Jeho aldehyd (retinal) se váže na protein opsin v tyčinkách sítnice za vzniku rodopsinu, který má funkci fotoreceptoru. Vitamín A je také potřebný pro normální růst, funkci epitelálních buněk, odolnost vůči infekcím sliznic dýchacích cest, produkci pohlavních hormonů a působí také jako antioxidant [29–33].

Vitamín D (Obrázek 9b) není skutečný vitamín, jelikož není látkou esenciální. Jedná se o prohormon, který je kromě potravy získáván také syntézou v kůži pod vlivem slunečního záření. Jeho funkcí je regulace hladiny vápníku a fosforu v krvi, čímž pomáhá při stavbě a udržování silných kostí a zdravých zubů. Je důležitý také pro správnou funkci imunitního a endokrinního systému [29,34,35].

Vitamín E (Obrázek 9c) posiluje činnost pohlavních orgánů, zlepšuje sexuální výkonnost a u žen oddaluje období přechodu. Má velký význam také v léčbě neplodnosti a v těhotenství je důležitý pro zdravý vývoj plodu. Kromě toho má velmi dobré antioxidační vlastnosti [29,31,32].

Vitamín K (Obrázek 9d) uvádí do pohybu proces srážení krve, čímž působí preventivně proti vnitřnímu a nadměrnému krvácení. Hraje důležitou roli při metabolismu kostí a pojivové tkáni, je významný také pro správnou funkci ledvin a jater a pro udržování zdravých zubů [29,31,32].

Vitamín B₁ (Obrázek 9e) hraje důležitou roli jako koenzym v klíčových reakcích energetického metabolismu. Má příznivý vliv na nervový systém a duševní výkon a podporuje tvorbu acetylcholinu, který je nezbytný pro dobrou paměť a pozornost [29,31].

Vitamín B₂ (Obrázek 9f) je součástí flavoproteinových enzymů, které hrají důležitou roli v přenosu vodíku v oxidačních procesech uvnitř buněk, při kterých vzniká energie. Je důležitý pro sítnici oka, podporuje jasnější vidění a spolu s vitamínem A zlepšuje vidění za šera. Účastní se také tvorby nových buněk, podporuje správnou funkci jater a zvyšuje odolnost proti plísním, ekzémům a alergiím [29,31].

Vitamín B₃ (Obrázek 9g) je součástí NAD a NADP, které slouží jako kofaktory několika set různých enzymů. Oba kofaktory se účastní přenosu elektronů v respiračních systémech. Jedná se o vitamín mentální a nervové rovnováhy, jelikož odstraňuje výkyvy nálad a je nezbytný k dobré činnosti mozkových buněk [29–31].

Vitamín B₅ (Obrázek 9h) se jako součást koenzymu A a jiných koenzymů účastní klíčových reakcí v metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů. Hraje důležitou roli při biosyntéze mastných kyselin, cholesterolu, steroidních hormonů, neurotransmiterů, porfyrinu a hemoglobinu. Působí proti vzniku aterosklerózy, podporuje regeneraci tkáně, má pozitivní vliv na hojení ran a vředů a pomáhá při léčbě ekzémů [31,32].

Vitamín B₆ (Obrázek 9i) ve formě pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu působí jako koenzym při mnoha enzymatických reakcích, zejména v metabolismu aminokyselin, biogenních aminů, homocysteinu a při přeměně tryptofanu na vitamín B₃. Zvyšuje hladinu

dopaminu v mozku, předchází vzniku stresu a pomáhá snižovat únavu. Udržuje také rovnováhu mezi sodíkem a draslíkem a působí protirakovinně [29,31].

Vitamín B₇ (Obrázek 9j) působí jako koenzym značného počtu enzymů účastnících se karboxylačních reakcí. Tyto enzymy hrají důležitou roli v metabolismu cukrů, tuků, kyseliny propionové a rozvětvených aminokyselin. Upravuje hladinu cukru v krvi a chrání před diabetickým poškozením nervů. Snižuje bolesti ve svalech a zmírňuje projevy ekzémů a kožních onemocnění [29,31].

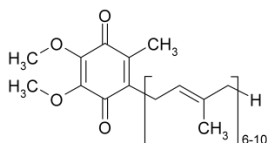
Vitamín B₉ (Obrázek 9k) je nezbytný při tvorbě koenzymů pro syntézu purinů a pyrimidinů, pro erythropoézu a ovlivňuje syntézu některých aminokyselin. Je velmi důležitý pro těhotné ženy, protože snižuje riziko vrozených poruch a má zásadní význam pro normální růst plodu. Je důležitý také pro správnou funkci nervového systému [29,36].

Vitamín B₁₂ (Obrázek 9m) se v metabolických procesech přeměňuje na své aktivní formy – koenzymy adenosylkobalamin a methylkobalamin. První zmíněný enzym je zodpovědný za intramolekulární přeskupování alkylových skupin při degradaci mastných kyselin a některých aminokyselin. Druhý z koenzymů hraje důležitou roli v transmethylačních procesech při syntéze methioninu a homocysteinu. Účastní se také biosyntézy purinových a pyrimidinových bází [31].

Vitamín C (Obrázek 9l) je oxidačně-redukčním a chelatačním činidlem organismu. Má významnou antioxidační aktivitu a roli v imunitním systému. Hraje důležitou roli při syntéze kolagenu, karnitinu a neurotransmiterů. Působí příznivě na snižování hladiny celkového cholesterolu v séru a zvyšuje hladinu HDL cholesterolu [30,37].

1.1.6.2 Ubichinony

Ubichinony jsou skupinou dimethoxymethylbenzochinonů, které se navzájem liší počtem izoprenových jednotek ve vedlejších terpenových řetězcích. Mohou být reverzibilně redukovány na hydrochinonovou formu, což je základem jejich funkce. Působí jako látky transportující elektrony na vnitřní membráně mitochondrií, čímž se účastní oxidačně-redukčních procesů spojených s dýcháním. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny látek je koenzym Q₁₀ [38].



Obrázek 10: Struktura koenzymu Q₁₀^{ea}

Koenzym Q_{10} (Obrázek 10) působí výrazně antioxidačně, stabilizuje membrány a účastní se tvorby ATP v průběhu oxidační respirace a řady dalších metabolických procesů. Kromě toho zvyšuje plazmatické hladiny HDL, α -tokoferolu, kyseliny askorbové, snižuje hladinu celkového cholesterolu, produktů peroxidace lipidů, malondialdehydu a dienových konjugátů. Používá se k prevenci kardiovaskulárních onemocnění a jako přídatná léčba neurodegenerativních onemocnění, neoplasmat, mužské neplodnosti, svalové dystrofie, lymeské borreliózy a dalších nemocí [3].

1.2 ITP stanovení biologicky aktivních látek

1.2.1 Biogenní aminy, aminokyseliny, peptidy a proteiny

1.2.1.1 Biogenní aminy

Obsah biogenních aminů v potravinách je jedním z kritérií kvality a mikrobiální kontaminace potravin. I přes potenciální škodlivost aminů je v potravinách regulován pouze obsah histaminu. Evropská unie vydala nařízení, podle kterého je maximální povolená koncentrace histaminu 100 mg/kg v čerstvých rybách a 200 mg/kg v rybách konzervovaných solením. Jelikož byla přítomnost biogenních aminů kromě ryb a masných výrobků potvrzena v široké škále dalších produktů, např. v pivech, vínech, sýrech, mléku, ovoci, zelenině, octu, čaji, čokoládě a kávě, je potřeba stále vyvíjet nové nebo zdokonalovat současné analytické metody k rychlé a spolehlivé analýze kvality potravin [39]. K tomuto účelu bylo vyvinuto také několik metod stanovení biogenních aminů pomocí ITP, které jsou stručně shrnuty v Tabulce 1.

Vzhledem k tomu, že se jedná o látky se silně bazickou povahou (hodnoty pK_a 8,5 – 12,5) a ve své struktuře obsahují jednu nebo více aminoskupin, které jsou schopné ochotně přijímat proton a přecházet na kationty, je pro jejich izotachoforetickou analýzu nejvhodnější zvolit kationtový režim [40–45].

1.2.1.2 Aminokyseliny

Ve struktuře aminokyselin (Obrázek 2) je přítomna alespoň jedna primární aminoskupina a současně alespoň jedna karboxylová skupina. Důležitou vlastností aminokyselin je jejich bipolární charakter, díky němuž se řadí mezi amfolyty. Pokud je výsledný náboj aminokyseliny nulový, je aminokyselina ve formě amfiontu. Hodnota pH, při které dostaneme amfiont, se nazývá izoelektrický bod (pI). Při fyziologickém pH existují aminokyseliny převážně jako karboxylátový aniont [11].

Analýza aminokyselin se provádí hned z několika důvodů. Vzhledem k tomu, že jsou některé aminokyseliny látky esenciální, tudíž je nutné je přijímat z potravy, je důležité, aby byla prováděna kontrola jejich přítomnosti v potravinách. Navíc některé aminokyseliny určují kvalitu potravin, např. prolin v medu, a podle jejich množství lze poznat falšování potravin. Analýza aminokyselin v tělních tekutinách (moč, krev, plazma) může pomoci v diagnostice různých onemocnění [46].

Vzhledem ke struktuře aminokyselin by použití izotachoforézy k jejich analýze mělo být výhodné, protože teoreticky by aminokyseliny mohly být stanoveny jak ve formě aniontu, tak ve formě kationtu. Možnost separovatelnosti jednotlivých aminokyselin je ovlivněna

hodnotami pK, takže v případě použití neutrálního elektrolytového systému nelze většinu aminokyselin stanovit přímo, protože jejich molekuly jsou elektroneutrální, a tudíž nedochází k jejich migraci v elektrickém poli. V případě použití elektrolytového systému s nízkým pH migrují aminokyseliny jako kationty, nicméně mají tak nízkou efektivní mobilitu, že je téměř nemožné najít vhodný koncový elektrolyt, a navíc rozdíly v rychlosti migrace jsou tak malé, že většina aminokyselin migruje v jedné směsné izotachoforetické zóně. Pouze bazické kyseliny lysin, arginin a histidin mají za těchto podmínek dostatečnou mobilitu, takže je lze tímto způsobem stanovit. Pokud je pH vedoucího elektrolytu naopak dostatečně vysoké (nad 8), lze většinu aminokyselin stanovit ve formě aniontu, nicméně nevýhodou tohoto postupu je migrace oxidu uhličitého ze vzduchu ve formě uhličitanu, který narušuje optimální separaci [47].

Kvůli výše zmíněným důvodům je pro analýzu aminokyselin vhodné použít některý z derivatizačních postupů, tj. reakce se síranem měďnatým [47], reakce s propanalem (popř. s jiným aldehydem) [47] nebo reakce s kyselinou dusitou [48]. Vybrané ITP metody pro stanovení některých aminokyselin jsou uvedeny v Tabulce 2.

1.2.1.3 Peptidy

Pomocí izotachofórey lze separovat bazické, neutrální i kyselé peptidy. Bazické peptidy lze analyzovat v kationtovém módu s využitím kyselého elektrolytového systému, zatímco neutrální a kyselé peptidy v aniontovém módu za použití alkalického elektrolytového systému. Hlavní oblastí použití izotachofórey v analýze přírodních i syntetických peptidů je kontrola jejich čistoty [49]. Vybrané aplikace izotachofórey k analýze peptidů jsou uvedeny v Tabulce 3.

1.2.1.4 Proteiny

Zatímco malé peptidy jsou pomocí izotachofórey jednoduše stanovitelné, analýza proteinů přináší obvykle několik problémů. Proteiny často i přes nepřilnavý povrch teflonu adherují na stěny kolony, navíc může docházet také k vytvoření filmu proteinů na povrchu elektrod vodivostního detektoru, a proto reprodukovatelnost analýz není tak dobrá jako v jiných případech. Ke vzorku proteinů je pro zlepšení separovatelnosti často přidávána směs polyaminopolykarboxylových kyselin, která má za úkol vytvořit prostor mezi zónami jednotlivých proteinů [47]. Některé ITP metody stanovení proteinů jsou popsány v Tabulce 4.

1.2.2 Mastné kyseliny

Vzhledem ke struktuře mastných kyselin (obsahují COOH skupinu a jsou schopné disociace) je analýza pomocí ITP v aniontovém módu možná bez potřeby derivatizace. Kyseliny migrují postupně podle délky jejich řetězce od nejkratší (nejrychlejší) po nejdelší (nejpomalejší). Kyseliny s řetězcem delším než 10 uhlíků mají ovšem velmi malou rozpustnost ve vodě. Při analýze kyselin s délkou řetězce kratší než 10 uhlíků stačí k jejich lepší rozpustnosti ve vodě přidat malé procento methanolu (např. směs voda-methanol 90:10 v/v), zatímco při analýze kyselin s delším řetězcem je nutné provádět analýzu za použití methanolu jako rozpouštědla [50]. To je ovšem možné jen v případě, že celá separační jednotka izotachofórey je vyrobena z chemicky odolného materiálu, např. z teflonu. V případě běžně komerčně dostupného přístroje, kde je z teflonu vyrobená pouze separační kapilára a zbytek separační jednotky je z plexiskla, je možné použít vodně-alkoholické prostředí o obsahu maximálně 30 % alkoholu. Rovněž použití jiných nevodných rozpouštědel není povoleno, a použití acetonu není vhodné ani v kombinaci s vodou [51]. Vybrané metody analýzy mastných kyselin shrnuje Tabulka 5.

1.2.3 Sacharidy

Vzhledem k tomu, že sacharidy jsou látky neiontové povahy, je potřeba je k jejich stanovení pomocí ITP derivatizovat na látky iontové, popř. vytvořit dostatečně stabilní komplex s určitým elektrickým nábojem. Pro látky polyhydroxylového charakteru se jako vhodná jeví reakce s kyselinou boritou za vzniku borátových komplexů [52]. Nicméně sacharidy prozatím nebyly izotachoforeticky stanovovány.

Byly stanovovány pouze některé metabolity sacharidů a látky s funkcí jednoduchých sacharidů, tzv. umělá sladidla (viz Tabulka 6). Umělá sladidla lze podle struktury rozdělit na dvě skupiny – látky iontové (acesulfam K, sacharin, cyklamát, aspartam), které lze stanovit bez derivatizace pomocí aniontové ITP, a látky neiontové (laktitol, sorbitol, mannitol, xylitol), které vzhledem k jejich polyhydroxylové struktuře je vhodné derivatizovat výše zmíněnou kyselinou boritou [52,53].

Polysacharidy jako hydroxyethylcelulóza, popř. hydroxypropylmethylcelulóza, jsou používány při izotachoforetické separaci jako přídatná látka do vedoucího elektrolytu k potlačení elektroosmotického toku [51].

1.2.4 Nukleové kyseliny a látky vzniklé jejich degradací

Nukleotidy mají strukturu polyaniontů, jejich mobilita v elektrickém poli se zvyšuje se zvyšujícím se pH, protože roste jejich náboj, nicméně rozdíly mezi efektivními pohyblivostmi jsou vyšší při nižších pH. Analýzy při nízkém pH mají navíc tu výhodu, že většina látek přítomných v biologických vzorcích (převážně proteiny) za těchto podmínek nemigruje v elektrickém poli, a tudíž nemohou narušovat analýzu nukleotidů. Izotachoforéza je aplikovatelná při kontrole kvality syntetických nukleotidů, pro sledování průběhu enzymových reakcí, ke stanovení obsahu nukleotidů v buňkách, tkáních, tělních tekutinách, popř. potravinách [54,55]. Některé metody vhodné pro stanovení nukleotidů jsou popsány v Tabulce 7.

Izotachoforéza v analýze nukleových kyselin se používá především k izolaci nukleových kyselin ze vzorku, jejich přečištění a zakoncentrování. K tomuto účelu je nutné mikropreparativní uspořádání izotachoforetického analyzátoru, kdy pomocí mikropreparativního kohoutu je jímána frakce nukleových kyselin, která je následně podrobena další analýze [56]. Vybrané aplikace jsou uvedeny v Tabulce 8.

1.2.5 Vitamíny

Izotachoforéza je převážně používána pro stanovení vitamínů rozpustných ve vodě ve vitamínových přípravcích, popř. v potravinách obohacených o příslušné vitamíny. Vzhledem k rozmanitosti chemických struktur vitamínů nelze stanovit všechny vitamíny během jedné analýzy. Na základě struktury lze vitamíny rozdělit do dvou skupin – vitamíny aniontového charakteru (kyselina nikotinová, kyselina pantothenová, kyselina listová, kyselina askorbová) a vitamíny kationtového charakteru (thiamin, nikotinamid, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin, kyanokobalamin) [52]. Některá izotachoforetická stanovení vitamínů rozpustných ve vodě jsou uvedena v Tabulce 9.

Vitamíny rozpustné v tucích není možné stanovovat ve vodném prostředí, k jejich analýze je potřeba použít nějaké nepolární rozpouštědlo (např. hexan, chloroform), což klasické komerční izotachoforetické analyzátory neumožňují.

1.2.6 Léčiva

Izotachoforéza se při analýze léčiv osvědčila především jako cenný nástroj ke kontrole složení a čistoty léčivých preparátů, kde hlavním úkolem je kvantifikace ionogenní farmaceuticky aktivní složky preparátu. ITP může být také použita pro stanovení obsahu léčiv v tělních tekutinách, nicméně jde o poměrně složitý úkol, neboť samotná matrice obsahuje

vysoké koncentrace iontových sloučenin. Navíc množství stanovovaného léčiva bývá natolik malé, že vytvoření dostatečně rozlišené a dostatečně dlouhé zóny stanovované látky je za pomoci samotné ITP téměř nemožné. Z tohoto důvodu se v těchto případech hojně využívá kombinace technik ITP a CZE, kde dochází nejprve k zakoncentrování analytu pomocí ITP a následnému stanovení pomocí CZE. Další možností je kombinace ITP se složitou předúpravou vzorku (např. odsolení a zakoncentrování analytu), nicméně tímto krokem ztrácíme jednu z hlavních výhod ITP [57]. V Tabulce 10 je zmíněno několik praktických aplikací ITP pro analýzu léčiv.

Tabulka 1: Vybrané metody pro stanovení biogenních aminů pomocí ITP

analyt	Matrice	režim	elektrolytový systém		metoda/detekce	literatura
			LE	TE		
kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, histamin, tyramin	ryby a rybí produkty	kationtový	5 mM Ba(OH) ₂ / 15 mM valin / 0,3% HPMC (pH 9,9)	20 mM Tris / 5 mM HCl (pH 8,3)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[40]
histamin, tyramin, fenyl-ethylamin	sýry	kationtový	5 mM Ba(OH) ₂ / 15 mM valin / 0,3% HPMC (pH 9,9)	20 mM Tris / 5 mM HCl (pH 8,3)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[41]
kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, histamin, tyramin	vepřové, hovězí a drůbeží maso	kationtový	5 mM Ba(OH) ₂ / 15 mM valin / 1% HEC (pH 8,5)	I) 20 mM Tris / HCl (pH 8,3), II) 20 mM histamin	ITP / kond.	[42]
histamin	ryby	kationtový	10 mM KOH / valin (pH 9,9)	20 mM Tris / HCl (pH 8,3)	ITP / kond.	[43]
histamin, kadaverin, putrescin, tyramin	omáčky, sýry, ryby, párky a salámy	kationtový	10 mM KOH / valin (pH 9,9)	20 mM Tris / HCl (pH 8,3)	ITP / kond.	[44]
kreatinin	kuřecí maso, šunky a salámy	kationtový	5 mM NH ₄ OH / 10 mM MES	10 mM EACA / 5 mM HAc	ITP / kond.	[45]
histamin, tyramin, 2-fenylethylamin	červená vína	kationtový	10 mM KOH / 20 mM MES / 0,1% HEC (pH 6,0)	10 mM EACA / 20 mM HAc / 0,05% HEC (pH 4,3)	ITP-CZE / UV-Vis (280 nm)	[58]
dopamin, tryptamin, serotonin, epinefrin, norepinefrin, normetanefrin	moč	kationtový	30 mM NaOH / MES / 0,1% HPC (pH 6,5)	100 mM HCl	ITP-CZE / UV (210 nm)	[59]

Tabulka 2: Vybrané metody pro stanovení aminokyselin pomocí ITP

analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
lysin, arginin, histidin, ornitin	sýry	kationtový	10 mM KAc / HAc / 2% HEC (pH 6,0)	10 mM β -alanin	ITP / kond.	[60]
histidin, 1-methylhistidin, 3-methylhistidin	maso a masné produkty	kationtový	5 mM NH_4OH / 10 mM MES	10 mM EACA / 5 mM HAc	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[61]
histidin	maso a masné produkty	kationtový	5 mM NH_4OH / 10 mM MES	10 mM EACA / 5 mM HAc / 40% MetOH	ITP / kond.	[62]
lysin	fermentační bujóny	kationtový	10 mM MESNa^+ / 1 mM EDTA / 0,1% HEC (pH 6,16)	5 mM tetrabutylamonium perchlorát	ITP / kond.	[63]
kys. γ -aminomáselná (GABA)	mozková tkáň potkana	kationtový	10 mM NaAc / HAc / 0,02% polyvinylalkohol (pH 4,5)	10 mM karnitinchlorid	ITP / kond.	[64]
kys. glutamová, kys. asparagová	rajčatová šťáva	aniontový	10 mM L-histidin-chlorid / histidin / 1% polyvinylpyrrolidon (pH 5,5)	5 mM MES / Tris (pH 6,0)	ITP / kond.	[65]
kys. γ -karboxyglutamová	moč	aniontový	10 mM HCl / β -alanin (pH 3,1)	10 mM kys. kapronová	ITP / kond.	[66]
théanin	zelené čaje a potravinové doplňky	aniontový	10 mM HCl / 20 mM Tris / 0,05% HEC (pH 8,1)	10 mM DL-valin / $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (pH 10,0)	ITP / kond.	[67]
glutamin	mozkomíšni mok	aniontový	5 mM MES / ammediol / 0,2% Triton X-100 (pH 9,05)	10 mM β -alanin / triethylamin (pH 10,0)	ITP / kond.	[68]

Tabulka 3: Vybrané metody pro stanovení peptidů pomocí ITP

analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
polyglycin		aniontový	10 mM HCl / Tris / 0,1% HPC (pH 8,4)	glycin	ITP / kond.	[69]
fragmenty lidského růstového hormonu		aniontový	10 mM HCl / Tris (pH 7,65)	glycin / Ba(OH) ₂ (pH 9,0)	ITP / teplotní, UV-Vis (254 nm)	[70]
somatostatin		kationtový	K ⁺ / kys. kakodylová	kreatinin	ITP / UV-Vis (254 nm)	[71]
inzulin		kationtový	KAc	glycin	ITP / UV-Vis (254 nm)	[72]
prasečí střevní peptid se somatostatinem na C-konci		kationtový	KAc	alanin	ITP / UV-Vis (254 nm)	[73]
hovězí vasoaktivní střevní peptid		kationtový	KAc	alanin	ITP / UV-Vis (254 nm)	[74]
pentapeptid na C-konci bombininu (povrchově aktivní peptid vylučovaný ropuchou Bombina maxima)	destilovaná voda	kationtový	5 mM KOH / HAc / 0,25% HPMC (pH 4,9)	5 mM β-alanin / HAc (pH 5,1)	ITP / teplotní, UV-Vis (254 nm)	[75]
inhibitor hovězího pankreatického hormonu (BPTI), inhibitory býčího semenného trypsinu (BUSI II, BUSI IIb)		kationtový	10 mM NaOH / HAc / 20 mM polyvinylalkohol (pH 4,8)	10 mM β-alanin / HAc (pH 4,5)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
adiuretin		kationtový	10 mM NaOH / HAc (pH 5,0)	10 mM β-alanin / HAc (pH 4,7)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]

adamantylamid-L-alanyl-D-isoglutamin		kationtový	5 mM KOH / HAC (pH 5,0)	10 mM β -alanin / HAC (pH 5,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
muramindipeptid (Mur-Ala-Gln)		aniontový	5 mM HCl / 10 mM histidin / 200 mM polyvinylalkohol (pH 6,1)	10 mM HEPES / Ba(OH) ₂ (pH 8,1)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
tryptické fragmenty lidského hemopexinu		aniontový	10 mM HCl / 20 mM histidin (pH 6,1)	10 mM HEPES / Ba(OH) ₂ (pH 8,1)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
inhibitory býčího semenného trypsinu (BUSI IA, BUSI IB1, BUSI IB2), inhibitory kravského kolostrálního trypsinu (CTI A, CTI B, CTI C)		aniontový	5 mM HCl / 10 mM Tris / 20 mM polyvinylalkohol (pH 8,1)	10 mM glycin / Ba(OH) ₂ (pH 10,5)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
prasečí inzulin, prasečí proinzulin		aniontový	5 mM HCl / 10 mM Tris / 10% obj. 2-propanol (pH 8,1)	10 mM glycin / Ba(OH) ₂ (pH 10,2)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[49]
L-alanyl-L-glutamin, L-aspartyl-L-glutamin	destilovaná voda	aniontový	I) 5 mM MES / ammediol / 0,4% HPMC (pH 9,1), II) 10 mM Cl ⁻ / BTP / 0,4% HPMC (pH 6,0)	I) 10 mM β -alanin / ammediol / Ba(OH) ₂ (pH cca 10), II) 10 mM MES / Tris (pH cca 6)	ITP / kond., UV-Vis (206 nm, 254 nm)	[76]
N-benzoyl-L-alanyl-L-glutamin	fosfátový pufr, destilovaná voda	aniontový	10 mM HCl / ammediol (pH 9,1)	I) 10 mM glutamin / Ba(OH) ₂ (pH 10,0), II) 10 mM β -alanin / Ba(OH) ₂ (pH 10,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[77]

nízkomolekulární iontové látky	syntetické peptidy	aniontový	10 mM Cl ⁻ / histidin (pH 5,75)	1 mM MES / Tris (pH 5,75)	ITP / kond.	[78]
		kationtový	10 mM KOH / HAc (pH 4,5)	10 mM β-alanin / HAc (pH 4,5)	ITP / kond.	

Tabulka 4: Vybrané metody pro stanovení proteinů pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
lipoproteiny	sérum	aniontový	5 mM kys. kakodylová / 1 mM Tris / 0,4% HPMC (pH 7,5)	5 mM β-alanin / Ba(OH) ₂ (pH 9,2)	ITP / teplotní, UV-Vis (254 nm, 280 nm)	[79]
lipoproteiny obarvené fluorescenčním lipofilním barvivem 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD)-ceramidem	sérum	aniontový	10 mM HCl / 17 mM ammediol / 0,3% HPMC (pH 8,65)	20 mM β-alanin / 17 mM ammediol / Ba(OH) ₂ (pH 10,5)	ITP / LIF (exc. 488 nm, em. 510 nm)	[80]
vliv diabetu typu 2 na lipoproteinový profil (barvení NBD-ceramidem)	sérum	aniontový	10 mM HCl / 18 mM ammediol / 0,3% HPMC (pH 8,8)	24 mM β-alanin / 13 mM amediol / Ba(OH) ₂ (pH 10,5)	ITP / LIF (exc. 488 nm, em. 510 nm)	[81]
vliv nefrotického syndromu na lipoproteinový profil (barvení NBD-ceramidem)	sérum	aniontový	10 mM HCl / 18 mM ammediol / 0,35% HPMC (pH 8,8)	20 mM β-alanin / 18 mM amediol / Ba(OH) ₂ (pH 10,4)	ITP / LIF (exc. 488 nm, em. 510 nm)	[82]
vliv léčiva rosuvastatinu na lipoproteinový profil (barvení NBD-ceramidem)	sérum	aniontový	10 mM HCl / 18 mM ammediol / 0,3% HPMC (pH 8,8)	24 mM β-alanin / 13 mM amediol / Ba(OH) ₂ (pH 10,5)	ITP / LIF (exc. 488 nm, em. 510 nm)	[83]
vliv kouření na lipoproteinový profil (barvení NBD-ceramidem)	sérum	aniontový	10 mM HCl / 18 mM ammediol / 0,3% HPMC (pH 8,8)	24 mM β-alanin / 13 mM amediol / Ba(OH) ₂ (pH 10,5)	ITP / LIF (exc. 488 nm, em. 510 nm)	[84]

lipoproteiny obarvené pomocí barviva Sudan Black B (SBB), Sudan Red 7B (SR7B) a NBD-ceramidu	sérum	aniontový	10 mM HCl / ammediol / 0,35% HPMC (pH 8,8)	20 mM β-alanin / ammediol (pH 9,4)	ITP / DAD (570 nm pro SBB, 520 nm pro SR7B), LIF (exc. 488 nm, em. 520 nm pro NBD-ceramid)	[85]
vliv kardiovaskulárních chorob na lipoproteinový profil (barvení pomocí Sudan Red 7B)	sérum	aniontový	10 mM H ₃ PO ₄ / ammediol / 0,25% HPMC (pH 9,0)	100 mM valin / ammediol (pH 9,2)	ITP / UV-Vis (519 nm)	[86]
enzym UDP-galaktopyranóza mutáza (UGM)	buněčný extrakt bakterie <i>E. coli</i>	aniontový	10 mM HCl / Tris / 0,2% mHEC (pH 8,7)	5 mM glycin / Tris (pH 9,3)	ITP / kond.	[87]
kyselé proteiny (glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, inhibitor trypsinu, β-laktoglobulin B, L-asparigináza, α-laktalbumin)		aniontový	HCl / Tris	20 mM TAPS / Tris (pH 8,3)	tITP-CZE / UV (191 nm, 214 nm)	[88]
bazické proteiny (lysozym, cytochrom c, ribonukleáza A, myoglobin, α-chymotripsinogen, β-laktoglobulin A, β-laktoglobulin B, uhličitandehydratáza)		kationtový	I) 20 mM triethylamin / HAc (pH 4,3), II) 20 mM β-alanin / HAc (pH 4,3)	I) 10 mM HAc	tITP-CZE / UV (214 nm)	[88]
mitochondriální proteom	mozek myši	kationtový	2% Pharmalyte	100 mM HAc (pH 2,8)	tITP-CZE / MS	[89]

Tabulka 5: Vybrané metody pro stanovení mastných kyselin pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
nasyčené mastné kyseliny (C ₁ -C ₁₈)	reakční směs uhlovodíků po oxidaci	aniontový	2 mM Cl ⁻ / Tris (pH 8,1) rozpuštěný ve směsi methanol-voda (95:5 v/v)	1 mM stearan / Tris (pH 8,7) rozpuštěný ve směsi methanol-voda (99:1 v/v)	ITP / kond	[50]
volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C ₂ -C ₅)	bachorová tekutina	aniontový	10 mM HCl / 22 mM EACA / 0,05% HEC (pH 4,5)	5 mM kys. kapronová	ITP / kond.	[90]
volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C ₁ -C ₉)	pitná voda	aniontový	5 mM Cl ⁻ / 0,1% HEC (pH 6,0) rozpuštěný ve směsi voda-methanol (80:20 v/v)	2,5 mM MES (pH 6,0) rozpuštěný ve směsi voda-methanol (70:30 v/v)	ITP / kond.	[91]
cysteinylleukotrieny (metabolity kys. arachidonové)	modelová směs	aniontový	5 mM HCl / Tris / 0,25% HPMC (pH 7,0)	10 mM fenol / Ba(OH) ₂ (pH 10,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[92]

Tabulka 6: Vybrané metody pro stanovení sacharidů pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
metabolity glukózy (ATP, ADP, pyruvát, laktát, 2,3-difosfoglycerát)	erythrocyty	aniontový	10 mM HCl / β -alanin / 0,1% mHEC (pH 3,21)	5 mM kys. kapronová / histidin (pH 6,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[93]
metabolity glukózy (ATP, ADP, laktát, 2,3-difosfoglycerát)	erythrocyty pacientů s talasémií	aniontový	10 mM HCl / β -alanin / 0,1% mHEC (pH 3,21)	5 mM kys. kapronová / histidin (pH 6,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[94]
umělá sladidla (acesulfam K, sacharin, cyklamát, aspartam, laktitol, sorbitol, mannitol, xylitol)	cukrovinky	aniontový	10 mM HCl / 14 mM Tris (pH 7,7)	5 mM L-histidin / 5 mM Tris (pH 8,3)	ITP / kond.	[53]
sacharidy značené pomocí (2-aminoethyl)trimethyl ammonium chloridu)		kationtový	NH ₄ Ac	HAc	tITP-CZE / kond.	[95]

Tabulka 7: Vybrané metody pro stanovení nukleotidů pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
ATP	kosterní a srdeční svalovina ropuchy, morčete, křečka a psa	aniontový	7 mM HCl / 13 mM β -alanin / 0,5% HPMC (pH 3,92)	5 mM kys. kapronová / Ba(OH) ₂ (pH 4,35)	ITP / UV-Vis (254 nm)	[96]
poměr ATP / ADP	tkáň krys (kosterní a hladká svalovina, srdce, játra, plíce a ledviny)	aniontový	5 mM HCl / β -alanin / 0,1% Triton X-100 (pH 3,89)	5 mM kys. kapronová (pH 3,94)	ITP / UV-Vis (254 nm)	[97]
UTP, GTP, ATP, CTP	jaterní buňky krys	aniontový	5 mM HCl / β -alanin / HPMC (pH 3,89)	5 mM kys. kapronová	ITP / UV-Vis (254 nm)	[98]
UTP, GTP, ATP, CTP	celé jaterní buňky a jádra jaterních buněk krys	aniontový	5 mM HCl / β -alanin / HPMC (pH 3,89)	5 mM kys. kapronová	ITP / UV-Vis (254 nm)	[99]
UTP, GTP, ATP, CTP	modelová směs	aniontový	5 mM HCl / β -alanin / HPMC (pH 3,89)	5 mM kys. kapronová	ITP / UV-Vis (254 nm)	[100]
UTP, GTP, ATP, CTP, TTP	modelová směs	aniontový	5 mM HCl / GABA (pH 4,0-5,0)	5 mM kys. kapronová (pH 5,0)	ITP / UV-Vis (254 nm)	[101]
ATP	modelová směs	aniontový	10 mM Cl ⁻ / Tris / 0,005% polyvinylalkohol / 2% methanol (pH 8,6)	5 mM HEPPS / Tris (pH 8,5)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[102]

Tabulka 8: Vybrané metody pro stanovení nukleových kyselin pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
fragmenty nukleových kyselin	modelová směs DNA s nízkou molekulovou hmotností	aniontový	10 mM HCl / histidin (pH 6,25)	10 mM MES / Tris (pH 8,0)	ITP / kond.	[56]
malé RNA (miRNA, siRNA, piRNA) obarvené pomocí SYBR® Green II	buněčný lysát	aniontový	100 mM HCl / 140 mM kys. 6-aminokapronová (pH 4)	10 mM kys. 6-aminokapronová / 50 mM kys. kapronová (pH 4)	ITP / fluorescenční (čip)	[103]
DNA obarvené pomocí SYBR® Green I	krev	aniontový	50 mM Tris / HCl / 0,1% Triton X (pH 8,2)	50 mM Tris / HEPES (pH 7,8)	ITP / fluorescenční (čip)	[104]
DNA obarvené pomocí SYBR® Gold	erythrocyty napadené malárií	aniontový	60 mM HCl / 100 mM Tris / 0,1% Triton X (pH 7,9)	40 mM Tris / 40 mM HEPES (pH 7,9)	ITP / fluorescenční (čip)	[105]

Tabulka 9: Vybrané metody pro stanovení vitamínů pomocí ITP

Analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
thiamin, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin	multivitaminové tablety	kationtový	20 mM KAc / HAc (pH 4,95)	20 mM GABA / HAc (pH 4,73)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[106]
Nikotinamid	multivitaminové tablety	kationtový	20 mM KAc / HAc (pH 4,95)	10 mM β -alanin / HCl (pH 1,8)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[106]
kys. nikotinová, riboflavin-5'-fosfát sodný	multivitaminové tablety	aniontový	10 mM HCl / ammediol (pH 8,95)	20 mM β -alanin / Ba(OH) ₂ (pH 10,0)	ITP / kond., UV-Vis (254 nm)	[106]
thiamin, pyridoxamin, pyridoxal, nikotinamid		kationtový	I) 10 mM KAc (pH 4,0-5,5), II) 10 mM mravenčan draselný (pH 3,5-4,0)	β -alanin	ITP / UV-Vis (254 nm)	[107]
thiamin, pyridoxin	pivo	kationtový	10 mM NaAc / HAc (pH 5,0)	10 mM EACA	ITP / kond.	[108]
kys. Nikotinová	farmaceutické přípravky	aniontový	I) 10 mM HCl / β -alanin (pH 3,5-4,0), II) 10 mM HCl / EACA (pH 4,5), 20% methanol	10 mM oktanoát	ITP / kond., UV	[109]
kys. Pantothenová	dětská výživa, lupínky	aniontový	10 mM HCl / Tris / 0,1% PVP (pH 6,0)	MES / Tris (pH 6,2)	ITP / kond.	[110]
kys. pantothenová, kys. listová, kys. Askorbová	multivitaminové tablety	aniontový	10 mM HCl / Tris / 0,1% PVP (pH 8,2)	5 mM taurin	ITP / kond.	[111]
kys. Askorbová	nápoje, potraviny	aniontový	10 mM HCl / β -alanin / 0,1% mHEC (pH 3,9)	5 mM kys. kapronová	ITP / kond., UV-Vis	[112]
thiamin, pyridoxin	tablety, krev	kationtový	10 mM NH ₄ Ac (pH 7,8)	20 mM HAc	ITP / MS	[113]
5-methyltetrahydrofolát	krev, plazma, moč		10 mM HCl / kreatinin / 0,005% HPC (pH 5,0)	10 mM MES	ITP-CZE / kond., UV (220 nm)	[114]

Tabulka 10: Vybrané metody pro stanovení léčiv pomocí ITP

analyt	matrice	režim	elektrolytový systém		metoda / detekce	literatura
			LE	TE		
kyselina flufenamová, mefenamová, niflumová a tolfenamová	farmaceutické přípravky - kapsle, krémy, gely	aniontový	10 mM HCl / 20 mM imidazol (pH 7,1)	10 mM kys. 5,5'-diethylbarbiturová (pH 7,5)	ITP / kond.	[115]
fenoprofen	sérum	aniontový	10 mM HCl / kys. 6-aminokapronová (pH 4,8)	5 mM MES	ITP / kond.	[116]
ibuprofen, diklofenak	pitná a říční voda	aniontový	10 mM kys. mravenčí (pH 2,9)	10 mM kys. propionová	SPE-ITP / MS	[117]
ibuprofen, naproxen	tablety	aniontový	10 mM HCl / kreatinin / 0,1% PVP (pH 5,0)	10 mM MES	ITP / kond.	[118]
kebuzon, tribuzon, fenylbutazon	farmaceutické přípravky - tablety, injekční roztoky, masti	aniontový	10 mM histidin-chlorid / histidin / 0,05% polyvinylalkohol (pH 6,1)	10 mM 4-nitrofenolát (pH 6,7)	ITP / kond.	[119]
tramadol	farmaceutické přípravky - kapsle, kapky, injekční roztoky, čípky	kationtový	5 mM pikolinát draselný / 5 mM kys. pikolinová (pH 5,25)	10 mM kys. mravenčí (pH 2,58)	ITP / kond.	[120]
sulbaktam	kryší sérum	aniontový	5 mM HCl / β -alanin / 0,08% HPMC / 5 mM β -cyklodextrin (pH 3,5)	5 mM kys. kapronová / roztok amoniaku (pH 4,5)	ITP / kond.	[121]
neomycin trisulfát	farmaceutické přípravky	kationtový	10 mM NaAc / HAc / 0,08% HEC (pH 5,5)	10 mM β -alanin	ITP / kond.	[122]

adriamycin	plazma	kationtový	10 mM NaAc / HAc / 60% methanol (pH 6,0)	10 mM β -alanin / 60% methanol	ITP / UV-Vis (254 nm)	[123]
metoprolol tartarát	farmaceutické přípravky	kationtový	10 mM kys. 3-morfolino-2-hydroxypropansulfonová / 10 mM NaCl / 2% HEC	10 mM glycyl-glycin	ITP / kond.	[124]
metoprolol tartarát amlodipin	farmaceutické přípravky moč	aniontový	10 mM HCl / β -alanin (pH 4-5)	5 mM kys. glutamová / 10 mM β -alanin	ITP / kond. ITP-CZE / UV-Vis (238 nm)	[124]
		kationtový	20 mM KAc / 20 mM HAc / 0,2% HEC (pH 4,75)	5 mM glycin		[125]
salbutamol, terbutalin sulfát, fenoterol hydrobromid	farmaceutické přípravky	kationtový	I) 10 mM histidin / HAc (pH 3,5), II) 10 mM KOH / HAc (pH 4,75)	HAc (pH 3,5)	ITP / kond.	[126]
naproxen, 6-O-desmethylnaproxen	sérum	aniontový	10 mM HCl / β -alanin / 0,1% HPMC (pH 4,0)	10 mM MES / Tris / 20% methanol (pH 6,9)	ITP / kond.	[127]
lamotrigin	sérum	kationtový	10 mM vodný amoniak / 20 mM MES / 10% methanol	5 mM EACA / 5 mM MES / 15% methanol	ITP-CZE / UV-Vis (254 nm)	[128]
doxepin	modelový roztok	kationtový	160 mM NaAc / deuterovaná HAc / β -cyklodextrin (pH 5,0)	160 mM deuterovaná HAc	ITP / NMR	[129]
maprotilin	sérum	kationtový	10 mM NaAc / HAc	10 mM β -alanin	ITP / kond.	[130]
imipramin, clomipramin, naprotilin	farmaceutické přípravky - tablety, injekce	kationtový	10 mM NaAc / HAc (pH 4,6)	10 mM β -alanin	ITP / kond.	[131]
citalopram, fluvoxamin, sertralin, fluoxetin	farmaceutické přípravky - tablety, injekce	kationtový	10 mM NaAc / HAc (pH 4,6)	10 mM β -alanin	ITP / kond.	[132]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

V Tabulce 11 je uveden seznam chemikálií, které byly použity k experimentální části práce.

Tabulka 11: Seznam použitých chemikálií

Název chemikálie	Výrobce
L-valin	Sigma-Aldrich
L-leucin	Sigma-Aldrich
L-isoleucin	Sigma-Aldrich
L-tyrosin	Sigma-Aldrich
L-lysin	Sigma-Aldrich
L-tryptofan	Sigma-Aldrich
L-arginin	Sigma-Aldrich
L-histidin	Sigma-Aldrich
L-cystein	Sigma-Aldrich
L-serin	Sigma-Aldrich
L-alanin	Sigma-Aldrich
glycin	Sigma-Aldrich
L-fenylalanin	Sigma-Aldrich
L-asparagin	Sigma-Aldrich
L-glutamin	Sigma-Aldrich
L-kyselina glutamová	Sigma-Aldrich
L-kyselina asparagová	Sigma-Aldrich
L-threonin	Sigma-Aldrich
L-prolin	Sigma-Aldrich
L-hydroxyprolin	Sigma-Aldrich
L-theanin	Sigma-Aldrich
taurin	Sigma-Aldrich
isethionová kyselina	Sigma-Aldrich
vinylsulfonová kyselina	Sigma-Aldrich
formaldehyd (36-38%)	Penta
thiamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich
kyselina nikotinová	Sigma-Aldrich
pantotenát vápenatý	Sigma-Aldrich
pyridoxin hydrochlorid	Sigma-Aldrich
pyridoxal hydrochlorid	Sigma-Aldrich
pyridoxamin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich
kyselina listová	Sigma-Aldrich
metformin hydrochlorid	Glentham Life Sciences
buformin hydrochlorid	Sigma-Aldrich
fenformin hydrochlorid	Sigma-Aldrich
triethanolamin	Sigma-Aldrich

diethanolamin	Sigma-Aldrich
monoethanolamin	Sigma-Aldrich
octan draselný	Sigma-Aldrich
kyselina octová 99%	Lachema
kyselina chlorovodíková 36%	Lachema
kyselina chlorovodíková 35%	Penta
β -alanin	Serva
α -cyklodextrin	Sigma-Aldrich
β -cyklodextrin	Sigma-Aldrich
histidin hydrochlorid	Reanal
histidin	Reanal
kyselina morpholinethansulfonová (MES)	Serva
kyselina valerová	Lachema
kyselina mravenčí	Penta
hydroxyethylcelulóza 4000	Serva
dusitan sodný	Lachema
kyselina sírová	Lachema
disiřičitan sodný	Lachema
hydroxid sodný	Lachema
silně kyselý katex (<i>Iontoměnič I</i>)	Merck
slabě kyselý katex (<i>Amberlite IRC 86</i>)	Sigma-Aldrich
močovina	Lachema
amidosulfonová kyselina	Lachema

2.2 Přístrojové vybavení

K separaci byl použit elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102 (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko). Přístroj je vybaven dvěma polytetrafluorethylenovými kolonami – předseparační a analytickou. Délka a průměr kapiláry předseparační kolony je 160 x 0,8 mm a její objem je asi 100 μ l. Délka a průměr kapiláry analytické kolony je 160 x 0,3 mm, a její objem je asi 10 μ l. Vzorek je do přístroje dávkován pomocí stříkačky přes dávkovací kohout o objemu 30 μ l. Pracovní proud je nastavitelný nezávisle pro oba elektrické okruhy. Detekce je prováděna pomocí kontaktních vodivostních detektorů a pomocí spektrofotometrického DAD detektoru (ECOM Flash 12 DAD 800 Detector). Získané záznamy z vodivostní detekce byly vyhodnocovány v programu ITPPro (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko), který je dodáván výrobcem spolu s přístrojem. Záznamy ze spektrofotometrické detekce byly vyhodnocovány v programu Clarity (verze 7.4.01.088, DataApex, Praha, ČR). Podmínky ITP analýz jsou uvedeny u jednotlivých metod stanovení.

Pro navažování chemikálií byly využívány analytické váhy Kern ABT 120-4M (Kern & Sohn GmbH., Balingen, Německo) a pro měření pH byl používán ISFET pH-metr Sentron SI400 7400-010 (Sentron, Leek, Nizozemsko), popř. Hanna 4221 (Hanna instruments, Praha, ČR). Roztoky byly rozpouštěny, popř. odplyňovány v ultrazvukové lázni K2 (Kraintek s.r.o., Podhájská, Slovensko). K zahřívání a míchání roztoků byla použita magnetická míchačka s ohřevem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR) a k pipetování roztoků byly využity poloautomatické pipety Finnpipette (Thermo Scientific, Waltham, USA) a Biohit Proline (Biohit, Helsinky, Finsko). Dále byly k experimentům využívány běžné laboratorní pomůcky a nádobí.

Pro kvalitativní analýzu je v izotachoforéze často využívána hodnota relativní výšky signálu (RSH, z angl. Relative Signal High), která je získána výpočtem podle následujícího vzorce:

$$RSH = \frac{I_{(X)} - I_{(LE)}}{I_{(TE)} - I_{(LE)}}$$

kde $I_{(X)}$ je intenzita signálu analytu, $I_{(LE)}$ intenzita signálu vedoucího elektrolytu a $I_{(TE)}$ intenzita signálu koncového elektrolytu. RSH se nejběžněji pohybuje v rozmezí hodnot od 0 do 1.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Izotachoforetické stanovení aminokyselin po jejich konverzi na hydroxykyseliny ve vzorcích nápojů a potravinových doplňků [48, 133–135]

3.1.1 Úvod

V dnešní době je stále větší zájem o analýzu složení potravin, ať už z důvodu stanovení výživových hodnot, nebo z důvodu kontroly kvality potravin. Kvůli této skutečnosti je vyvíjeno a optimalizováno mnoho analytických metod pro stanovení různých složek potravin. Jednou z běžně stanovovaných skupin jsou aminokyseliny, které jsou základní stavební jednotkou bílkovin a jsou esenciální pro výživu člověka.

Aminokyseliny jsou látky, které jsou ionizovány ve vodě, ale jejich molekuly mají amfoterní charakter. Pohyblivost aminokyselin v elektrickém poli je v rozmezí pH 3-10, které je běžně používané při izotachoforetické analýze, velmi nízká. Kvůli tomu není možné většinu aminokyselin přímo izotachoforeticky stanovit. Výjimkou jsou kyselé (kys. glutamová a kys. asparagová) a bazické aminokyseliny (histidin, lysin a arginin), které je možné bez problémů stanovit přímo bez jakékoliv derivatizace, protože jejich pohyblivost v elektrickém poli je dostatečná.

Jedna z možností přímého izotachoforetického stanovení aminokyselin v potravinách a potravinových doplncích byla popsána Jastrzebskou a kol. [60], kteří optimalizovali stanovení volných aminokyselin ve vzorcích sýrů. K tomuto účelu využili oba izotachoforetické módy – aniontový v kombinaci s alkalickým elektrolytovým systémem ke stanovení tyrosinu a fenylalaninu a kationtový pro stanovení lysinu, argininu, histidinu a ornitinu. Kationtový mód byl použit také Kvasničkou [61] ke stanovení derivátů histidinu ve vzorcích masa. Další práce zabývající se izotachoforetickou analýzou aminokyselin za použití aniontového módu a alkalického elektrolytového systému byly vypracovány Kvasničkou a kol. [67], Everaertsem a kol. [47], Hirokawou a kol. [136] a Prestem a kol. [137]. Problémem spojeným s izotachoforetickou analýzou za použití alkalického elektrolytu je migrace uhličitanových iontů pocházejících z atmosférického oxidu uhličitého, které prodlužují analýzu a způsobují snížení separační kapacity systému. Dalším problémem spojeným s migrací uhličitanových iontů je tvorba směsných zón, které negativně ovlivňují separační proces. Obsah uhličitanů je obvykle snižován přidávkem hydroxidu barnatého za vzniku nerozpustného uhličitanu barnatého. Nicméně ani tímto způsobem nelze uhličitaný odstranit úplně [138].

Při izotachforetické analýze se mnohem častěji využívají kyselé a neutrální elektrolytové systémy, které lze při přímé izotachforetické analýze aminokyselin použít pouze v případě kyseliny glutamové a asparagové. Jako příklad lze uvést práci Zgoly-Grzeškowiak [65], která se zabývá stanovením těchto dvou kyselin v rajčatové šťávě s využitím aniontového módu.

Jednou z možností, jak stanovit ostatní aminokyseliny v kyselých podmínkách, je použití nevodných rozpouštědel, například dimethylsulfoxidu [139] nebo propionaldehydu [47]. Další možností je derivatizace, tj. konverze aminokyselin na jiné sloučeniny, které nemají amfolytický charakter. Existuje několik způsobů derivatizace, které jsou vhodné pro izotachforetickou analýzu aminokyselin. Jedná se například o reakci s formaldehydem v alkalickém prostředí [140] nebo esterifikaci [141]. Při použití jiných analytických metod, které je možné použít ke stanovení aminokyselin, jako je např. kapalinová chromatografie, není nutné provádět derivatizaci, nicméně její provedení přináší řadu výhod (např. lepší separace nebo snížení detekčního limitu).

Další možností, která prozatím nebyla využita pro izotachforetickou analýzu, je reakce s kyselinou dusitou. V této práci jsme se zaměřili právě na tento způsob derivatizace, který je založen na konverzi aminoskupiny na diazokupinu, která následně hydrolyzuje za tvorby hydroxyskupiny. Cílem optimalizace metody bylo nalezení co nejlepších podmínek pro dostatečně citlivé stanovení aminokyselin v potravinových doplňcích a nápojích se zachováním hlavních výhod izotachoforézy, jako je snadná příprava vzorků, nízké náklady nebo relativně krátká doba analýzy.

3.1.2 Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém módu s použitím elektrolytového systému zahrnujícího vedoucí elektrolyt o složení 10 mM HCl s přídavkem β -alaninu k úpravě pH na 3,6 a 0,05% HEC k potlačení elektroosmotického toku. Koncovým elektrolytem byla 10 mM kyselina valerová s přídavkem hydroxidu sodného ke zvýšení rozpustnosti kyseliny valerové ve vodě. Hnací proud byl v předseparační kapiláře nastaven na hodnotu 250 μ A, v separační kapiláře na 50 μ A a před detekcí byl snížen na 30 μ A. Celková doba jedné analýzy se pohybovala okolo 35 minut.

3.1.3 Výsledky a diskuze

3.1.3.1 Konverze aminokyselin na hydroxykyseliny

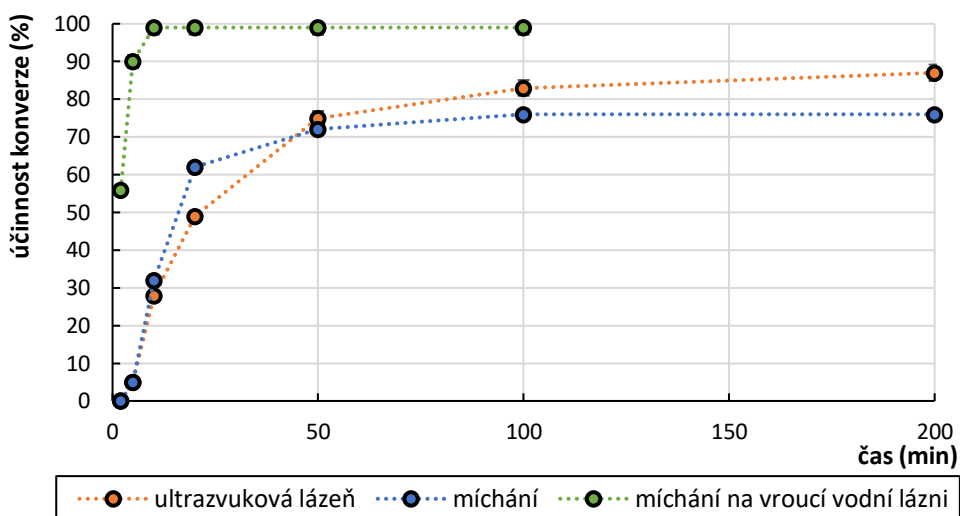
Reakce primární amino skupiny s kyselinou dusitou za tvorby diazoniové soli, která se následně rozkládá na odpovídající množství plynného dusíku, je základem manometrického stanovení látek obsahujících aminoskupinu, které bylo popsáno van Slykem [142, 143]. Reaktivita primárních aminoskupin se zvyšuje se zvyšující se teplotou a také s přítomností karboxylové skupiny v sousedství. Naopak reakce se zpomaluje se vzrůstající vzdáleností mezi amino a karboxyskupinou [144]. Tato fakta byla brána v úvahu při optimalizaci konverze, která je podrobně popsána níže.

Nejdůležitější roli ve van Slykeově metodě hraje kyselina dusitá (tvořená reakcí dusitanu sodného s kyselinou octovou), která slouží jako derivatizační činidlo. Množství kyseliny dusité v reakční směsi ovlivňuje také průběh reakce, jak je zmíněno dále. Dalším důležitým parametrem je pH reakční směsi, které by mělo být dostatečně nízké pro tvorbu kyseliny dusité ($pK_a = 3,15$ [145]), ale na druhou stranu dostatečně vysoké pro rychlý kvantitativní rozklad diazoniové soli na plynný dusík, respektive pro zabránění vedlejším reakcím, které mohou způsobit snížení výtěžku vznikající α -hydroxykyseliny. Tyto skutečnosti jsou hlavním důvodem, proč je optimalizace reakčních podmínek (tj. složení reakční směsi, způsob míchání, vliv teploty a doby reakce) nezbytná. Optimalizace konverze byla prováděna na leucinu a valinu, protože původně měly být analyzovány pouze aminokyseliny s nepolárním rozvětveným postranním řetězcem (tzv. BCAAs – leucin, isoleucin, valin). Optimalizace reakčních podmínek pro leucin a valin poskytla téměř totožné výsledky, proto jsou v následujícím textu zmíněny výsledky pouze pro leucin. V dalších letech byly analyzovány i další aminokyseliny a pro některé z nich (prolin, theanin, taurin) byla provedena vlastní optimalizace podmínek konverze a separace.

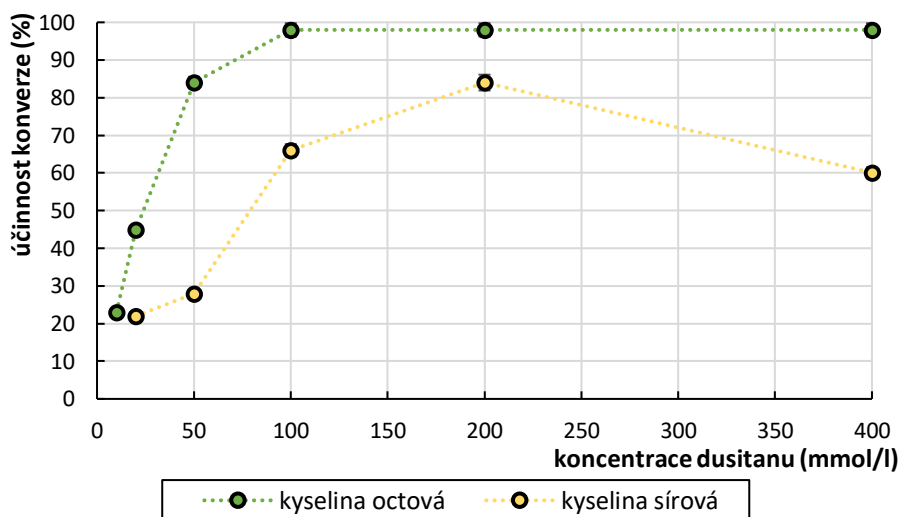
Vzhledem k tomu, že leucin je konvertován na 2-hydroxyisokapronovou kyselinu, byly výsledné účinnosti konverze vypočteny jako podíl délky zóny získané analýzou konvertovaného leucinu a délky zóny standardního roztoku 2-hydroxyisokapronové kyseliny o stejné koncentraci.

Jako první byl zkoumán vliv míchání, teploty a času na účinnost konverze při pětinasobném přebytku dusitanu sodného a kyseliny octové oproti leucinu (Graf 1). V této souvislosti je potřeba zmínit, že za laboratorních podmínek je kinetika konverze velmi pomalá, při použití ultrazvukové lázně a mechanického míchání není dosaženo dostatečné účinnosti konverze ani po více než 3 hodinách. Účinnost konverze byla dostatečně vysoká pouze v případě míchání na vroucí vodní lázni, její hodnota byla rovna $99,5 \pm 2,9$ % za méně

než 10 minut. Zvýšení účinnosti konverze vlivem zvýšení teploty za současného míchání lze vysvětlit snížením stability diazoniové soli a současně snížením rozpustnosti dusíku vznikajícího v roztoku.



Graf 1: Závislost účinnosti konverze leucinu na čase, teplotě a vlivu míchání – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM leucin; roztok před separací byl 20x zředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.

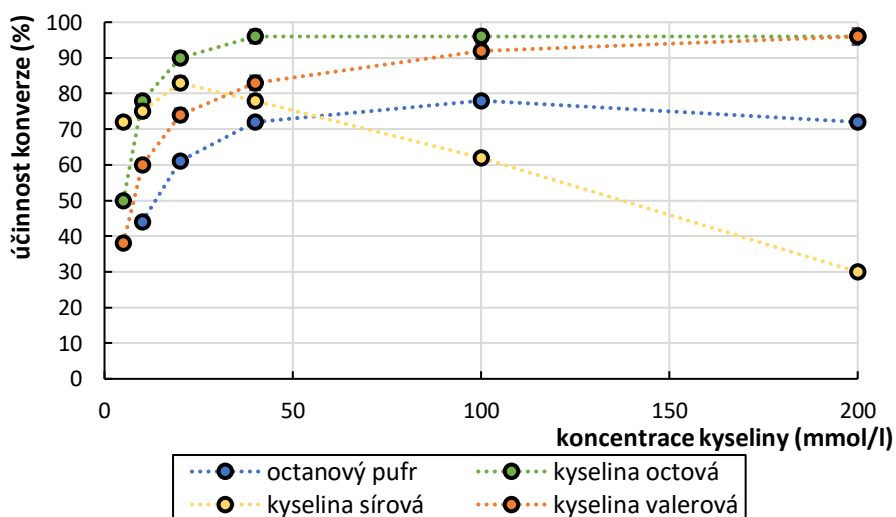


Graf 2: Závislost účinnosti konverze leucinu na koncentraci dusitanu v reakční směsi – složení reakční směsi: 100 mM kyselina octová resp. sírová a 20 mM leucin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.

Složení reakční směsi bylo dalším optimalizovaným parametrem. Nejprve byla měněna koncentrace dusitanu, který reagoval s konstantním množstvím leucinu (20 mM) a kyseliny

octové (100 mM), popř. sírové (100 mM). V tomto případě byla dosažena účinnost konverze $100,0 \pm 1,8 \%$ v případě kyseliny octové, zatímco v případě kyseliny sírové byla maximální účinnost pouze $83,5 \pm 2,5 \%$ (Graf 2).

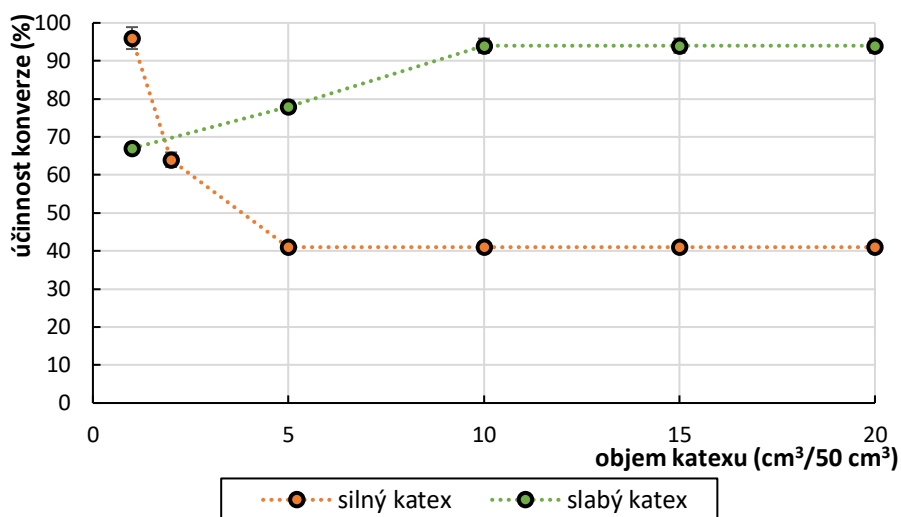
Obdobně byla zkoušena změna koncentrace kyseliny za konstantního množství dusitanu a leucinu (Graf 3). V tomto případě byla testována kyselina octová, sírová, valerová a octanový pufr (pH 4,76). Pomocí tohoto experimentu bylo opět potvrzeno, že použití kyseliny sírové není vhodné pro tento účel z důvodu nízké účinnosti konverze. S dále se zvyšujícím množstvím kyseliny sírové se účinnost konverze ještě snižuje, místo α -hydroxykyseliny vzniká odpovídající karbonylová sloučenina (aldehyd nebo keton) a kyselina mravenčí. V případě kyseliny octové byla dosažena účinnost konverze téměř 100 % již při použití 40 mM kyseliny, zatímco v případě velmi slabé kyseliny valerové až při použití 200 mM kyseliny. Kyselina valerová byla testována hlavně z toho důvodu, že byla použita jako koncový elektrolyt, a tudíž by separace nebyla komplikována další složkou reakční směsi. Kromě těchto kyselin bylo zkoušeno také použití octanového pufru hlavně z důvodu kontroly pH, které může ovlivnit vznik hydroxykyselin. Pomocí octanového pufru nicméně nebylo dosaženo požadované účinnosti. Lepších výsledků by možná bylo dosaženo použitím kyselejšího pufru, což ovšem nebylo již dále zkoumáno.



Graf 3: Závislost účinnosti konverze leucinu na koncentraci kyseliny v reakční směsi – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný a 20 mM leucin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.

Okyselení reakční směsi pomocí silného a slabého katexu poskytlo podobné výsledky jako okyselení pomocí silné a slabé kyseliny (Graf 4). Zatímco přidáním dostatečného

množství slabého katexu byla dosažena účinnost konverze $94,0 \pm 2,8$ %, již malý přebytek silného katexu způsobil značný pokles účinnosti konverze. Použití katexu může být výhodné, protože nedochází ke zvyšování množství iontů v roztoku, které mohou prodlužovat, popř. i znemožňovat následnou separaci. Existují ovšem i nevýhody, jako je složitější příprava vzorku a destrukce katexu během takto provedené přípravy (katex po regeneraci má jen zlomek původní kapacity).



Graf 4: Závislost účinnosti konverze leucinu na množství katexu v reakční směsi – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 20 mM leucin a 2 – 20 ml silně kyselého resp. slabě kyselého katexu v H-cyklu; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.

Optimalizace odhalila, že nejvhodnější složení reakční směsi je 100 mM dusitan, 100 mM kyselina octová a 1 až 20 mM aminokyselina, za použití mechanického míchání na vroucí vodní lázni po dobu 10 minut. Za těchto podmínek byla dosažena téměř 100 % účinnost konverze pro 1 mM a koncentrovanější roztok leucinu.

3.1.3.2 Izotachoforetická separace

Reakční směs po konverzi obsahuje kromě hydroxykyseliny také další anionty, které zvyšují požadavky na separační kapacitu kolony a prodlužují separační dobu. Jedná se konkrétně o dusitany, dusičnany (vytvořené oxidací dusitanů) a ionty kyseliny použité k okyselení (v tomto případě ionty octanové). Mobilita octanu je obvykle nižší než mobilita aniontů hydroxykyselin. Dusičnan je v malém množství tvořen již během konverze a jeho množství se rapidně zvyšuje s prodlužujícím se stáním reakční směsi. Jeho mobilita je mnohonásobně vyšší než mobilita hydroxykyselin, takže analýzu pouze prodlužuje, ale nijak ji neruší. Dusitan má nižší pohyblivost než dusičnan a může ovlivňovat separaci

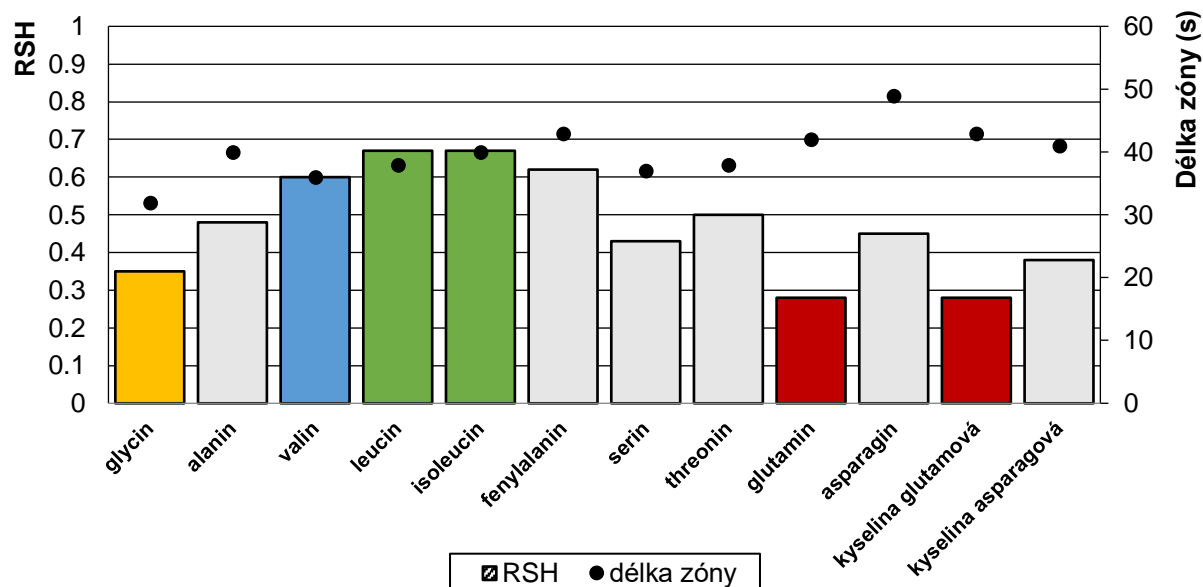
některých hydroxykyselin. Z tohoto důvodu byla snaha dusitan z reakční směsi odstranit. K tomuto účelu je v literatuře doporučováno několik látek, nejčastěji je zmiňována močovina a amidosulfonová kyselina. Použitím obou zmíněných látek vznikají další nežádoucí ionty – močovina působí pouze za velmi kyselých podmínek, takže je potřeba reakční směs okyselit silnou kyselinou a kyselina amidosulfonová je reakcí přeměněna na sírany, a navíc během separace vytváří také svou vlastní zónu. Z těchto důvodů je lepší dusitany neodstraňovat, ale pouze upravit podmínky separace tak, aby jejich zóna nerušila analýzu. V extrémních případech je možné přeměnit dusitany na dusičnany pomocí přídavku silně kyselého katechu a zahřívání směsi na vroucí vodní lázni po dobu 1 hodiny.

Izotachoforetická analýza může být prováděna s vedoucím elektrolytem o různém pH. V našem případě byl zvolen systém skládající se z chloridu jako vedoucího iontu a β -alaninu jako protiiontu. pH vedoucího elektrolytu bylo 3,6.

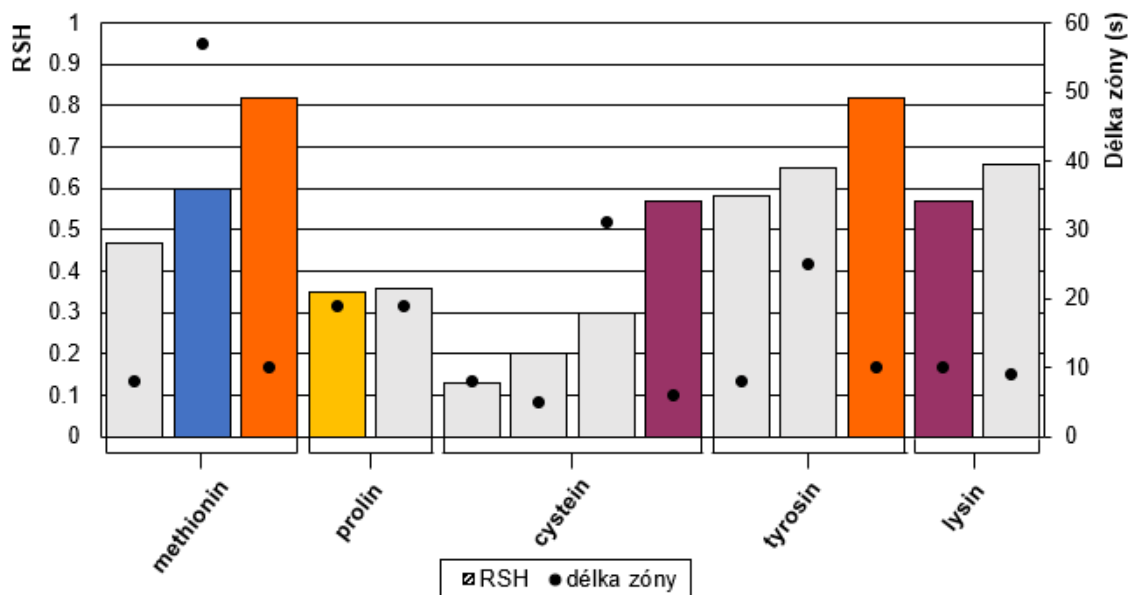
Za výše zmíněných optimalizovaných podmínek byly konvertovány a analyzovány biogenní aminokyseliny. Hlavními sledovanými parametry byly počet izotachoforetických zón, jejich délky a chování roztoku během konverze. Většina aminokyselin poskytovala minimálně jeden izotachoforeticky stanovitelný produkt, některé z nich poskytovaly dva (prolin, lysin), tři (methionin, tyrosin), popř. i čtyři (cystein) produkty. Produkty konverze tryptofanu (dva) a histidinu (jeden) nebylo možné stanovit v kyselém elektrolytovém systému, byly analyzovány za použití neutrálního systému (vedoucí elektrolyt o pH 7 složený z 10 mM HCl + imidazol, koncový elektrolyt 10 mM HEPES). Arginin nelze tímto způsobem stanovit, protože bazická guanidinová skupina argininu je velmi stabilní a pravděpodobně nereaguje s kyselinou dusitou. Arginin ale lze izotachoforeticky stanovit přímo, bez derivatizace.

Při stanovení aminokyselin poskytujících jeden měřitelný produkt bylo pro většinu z nich dosaženo různých hodnot relativní výšky signálu. Výjimkou byly dvě dvojice, konkrétně leucin/isoleucin a kyselina glutamová/glutamin. Druhá zmíněná dvojice poskytuje po konverzi stejný produkt – 2-hydroxyglutarovou kyselinu. Produkty konverze leucinu a isoleucinu za určitých podmínek rozseparovat lze, jak je zmíněno dále.

Aminokyseliny mající více produktů konverze komplikují analýzu, protože některé produkty vytvářejí směsné zóny (tyto produkty jsou označeny stejnou barvou v Grafu 5 a Grafu 6; např. produkt konverze glycinu a první produkt konverze prolinu mají stejnou hodnotu RSH a jsou označeny žlutou barvou; produkty, které nemají stejnou hodnotu RSH s žádným jiným produktem jsou označeny světle šedě). Z tohoto důvodu není vyvinutá metoda vhodná pro stanovení všech biogenních aminokyselin během jedné analýzy, nicméně se hodí pro analýzu jednodušších směsí, jako jsou např. potravinové doplňky.



Graf 5: Aminokyseliny poskytující jeden produkt konverze – relativní výšky signálů a délky zón; složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok před separací byl 80x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.



Graf 6: Aminokyseliny poskytující více produktů konverze – relativní výšky signálů a délky zón; složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok před separací byl 80x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina valerová + NaOH (pH 7,24); analytická kolona.

3.1.4 Optimalizovaná stanovení

3.1.4.1 Stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA)

Úvod

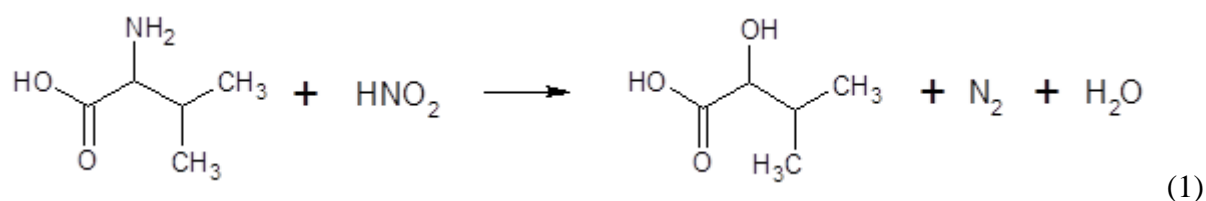
Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (valín, leucín, isoleucín) jsou součástí bílkovin, zdrojem dusíku při syntéze alaninu, kyseliny glutamové a glutaminu ve svalech a významným regulátorem metabolismu bílkovin.

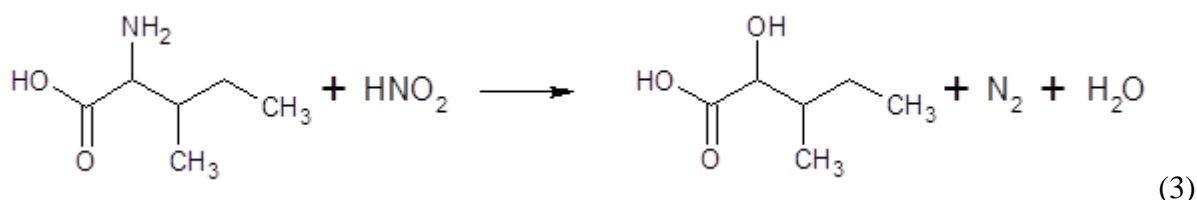
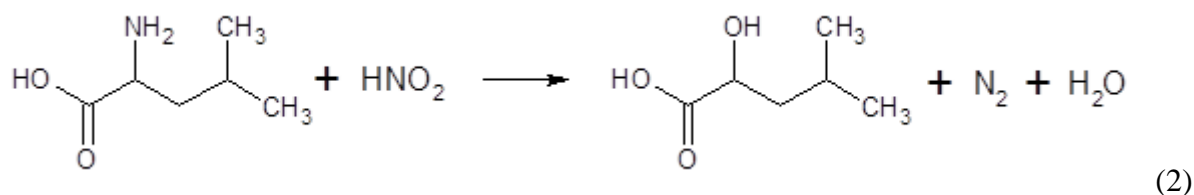
V kosterním svalu vzniká přesunem aminoskupiny z BCAA na α -ketoglutarát kyselina glutamová, která může být zdrojem aminoskupiny pro syntézu alaninu z pyruvátu nebo může být použita pro syntézu glutaminu. Bylo zjištěno, že BCAA hraje významnou roli také při tvorbě amidové skupiny glutaminu. Cesta přenosu aminoskupiny z BCAA na amidovou skupinu v molekule glutaminu zatím není jasná, je pouze známo, že aby k tomu mohlo dojít, je nutné, aby z aminoskupiny BCAA nejprve vzniknul amoniak.

Katabolismus BCAA probíhá pomocí enzymů BCAA aminotranferázy a BCKA dehydrogenázy. Reverzní transaminací katalyzovanou BCAA aminotranferázou vznikají ketokyseliny (BCKA). Z leucínu vzniká kyselina α -ketoisokapronová, z valínu kyselina α -ketoizovalerová a z isoleucínu kyselina α -keto- β -methylvalerová. Další reakcí katabolismu je oxidační dekarboxylace BCKA pomocí BCKA dehydrogenázy v mitochondriích. Vzniklé deriváty CoA (z leucínu vzniká β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, z valínu sukcinyl-CoA a z isoleucínu propionyl-CoA a acetyl-CoA) putují dále do citrátového cyklu. Katabolismus BCAA není na rozdíl od všech ostatních aminokyselin zahájen v játrech, ale ve tkáních, zejména v kosterních svalech.

BCAAs jsou významným substrátem pro syntézu bílkovin a řadou mechanismů zasahují do regulace jejich syntézy a degradace. BCAAs a jejich některé metabolity stimulují sekreci inzulínu a translaci ve svalech a játrech. Proteoanabolický efekt má zejména β -hydroxy- β -methylbutyrát (produkt katabolismu isoleucínu), který je často používán jako doplněk stravy pro zvýšení svalové síly [11].

BCAAs s dusitanem sodným v kyselém prostředí reagují za vzniku příslušných hydroxykyselin, konkrétně z valínu vzniká kyselina 2-hydroxyisovalerová (rovnice 1), z leucínu kyselina 2-hydroxyisokapronová (rovnice 2) a z isoleucínu kyselina 2-hydroxy-3-methylvalerová (rovnice 3) [146].





Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém módu s použitím elektrolytového systému zahrnujícího vedoucí elektrolyt o složení 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu k úpravě pH na 3,6 a 20 mM α -cyklodextrinu. Koncovým elektrolytem byla 10 mM kyselina octová. Hnací proud byl v předseparační kapiláře nastaven na hodnotu 250 μA , v separační kapiláře na 50 μA a před vodivostní detekcí byl snížen na 30 μA . Celková doba jedné analýzy se pohybovala okolo 30 minut.

Jako vzorky byly použity potravinové doplňky Amino 1000, BCAA Mega Capsules (Vitalmax s.r.o., Frýdlant v Čechách, ČR) obsahující 450 mg L-isoleucinu, 300 mg L-leucinu a 150 mg L-valinu v jedné želatinové kapsli a BCAA Liquid Orange Flavour (Penco s.r.o., Řevnice, ČR) obsahující 400 mg leucinu, 200 mg valinu, 200 mg isoleucinu a 400 mg glutaminu ve 20 ml nápoje.

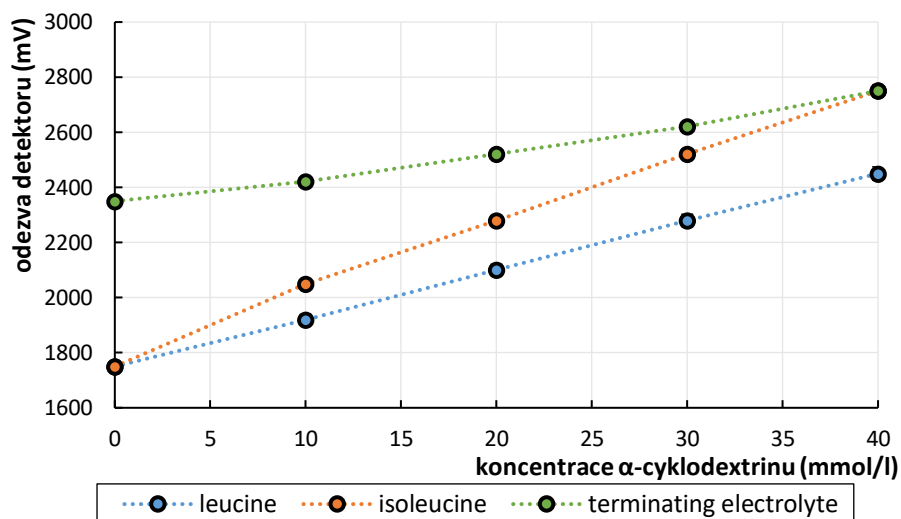


Obrázek 11:
Testované potravinové
doplňky s obsahem
BCAA^{eb,ec}.

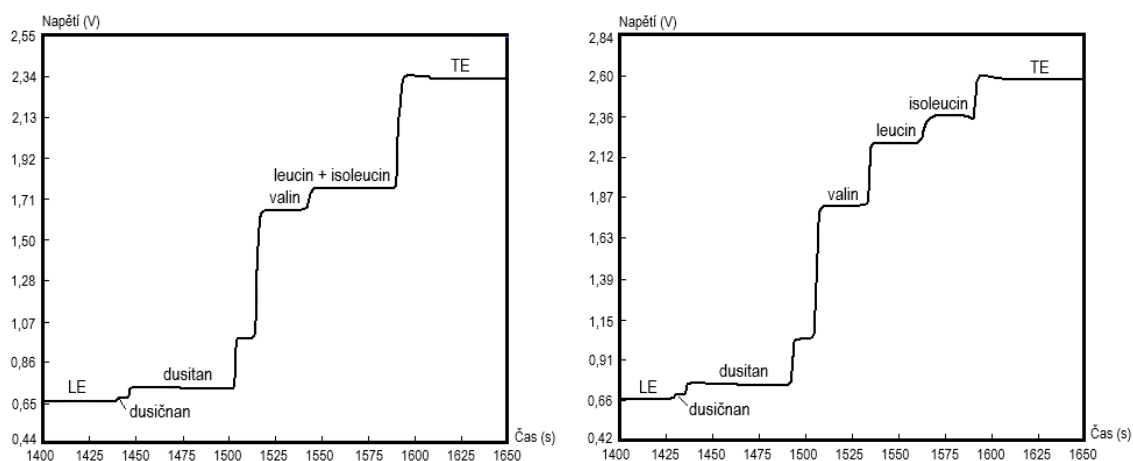
Optimalizace podmínek reakce a separace

Průběh optimalizace podmínek reakce je popsán v kapitole 3.1.3.1. Vzhledem k tomu, že při použití elektrolytového systému zmíněného výše (kapitola 3.1.2) byla pohyblivost, resp. RSH, konvertovaného leucinu a isoleucinu stejná, byl hledán elektrolytový systém, ve kterém by tyto dvě aminokyseliny bylo možné rozseparovat. Z důvodu, že se jedná se o polohové izomery, které se liší polohou methylové skupiny v postranním řetězci, bylo

navrhnuto použití cyklodextrinů. Byl zkoušen přídavek α - a β - cyklodextrinu do vedoucího elektrolytu, ale pouze použití α -cyklodextrinu se ukázalo jako úspěšné. Optimálním přídavkem bylo 20 mmol/l (Graf 7), kdy zóna isoleucinu byla dostatečně vzdálená jak od zóny leucinu, tak od octanu použitého jako koncový elektrolyt. Octan byl použit namísto valerátu z důvodu urychlení analýzy vlivem vyšší mobility v elektrickém poli. S použitím tohoto elektrolytového je možné dosáhnout dobré separace všech tří aminokyselin, viz Obrázek 12.



Graf 7: Závislost odezvy vodivostního detektoru na koncentraci α -cyklodextrinu ve vedoucím elektrolytu – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok před separací byl 200x ředěn (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

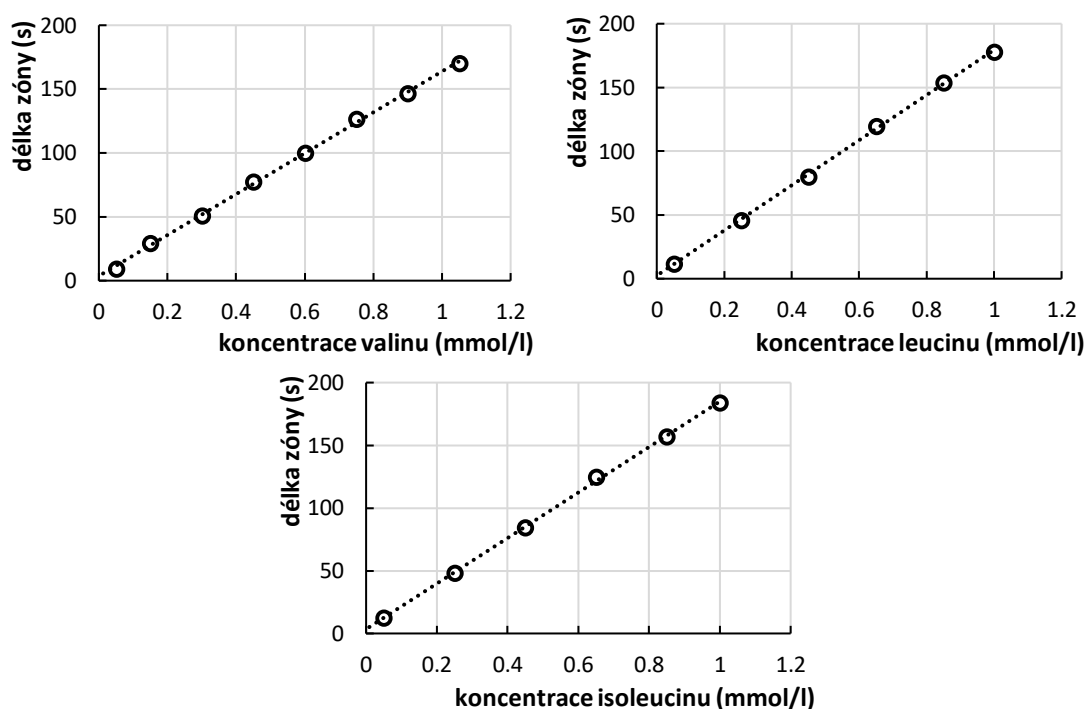


Obrázek 12: Izotachforeogram standardů BCAA po konverzi bez přídavku α -cyklodextrinu do vedoucího elektrolytu (vlevo) a s přídavkem 20 mM α -cyklodextrinu (vpravo) – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM AMK, roztok před separací byl 200x ředěn (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibračních roztoků byly použity zásobní roztoky valinu, leucinu a isoleucinu o koncentracích 100 mmol/l. Ze zásobního roztoku valinu byly připraveny roztoky o koncentracích 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 21 mmol/l do 50 ml odměrných baněk, do kterých bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného. Baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku a byly umístěny do vroucí vodní lázně, kde za intenzivního míchání byly ponechány po dobu 10 minut. Po konverzi byly roztoky 20x naředěny a analyzovány. Kalibrační roztoky leucinu a isoleucinu byly připravovány stejným způsobem s výjimkou koncentrací. V tomto případě byly připraveny roztoky o koncentracích 1, 5, 9, 13, 17 a 21 mmol/l. Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační křivky (Graf 8).



Graf 8: Kalibrační křivky BCAA – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 1 – 21 mM AMK; roztoky před separací byly 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 20 mM α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Výsledné koncentrace kalibračních roztoků valinu byly v rozmezí 0,05 – 1,05 mmol/l. V tomto rozmezí vykazovala kalibrační křivka, kterou lze popsat rovnicí $y [s] = 152,32 \times [mmol/l] + 4,27$, dobrou linearitu (hodnota $R^2 = 0,9985$). V případě leucinu byly kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 0,05 – 1,00 mmol/l, ve kterém kalibrační křivka vykazovala linearitu s hodnotou $R^2 = 0,9994$. Kalibrační křivku leucinu je možné popsat rovnicí přímky $y [s] = 181,07 \times [mmol/l] + 0,02$. Pro isoleucin je rozmezí koncentrací

kalibračních roztoků stejné jako v případě leucinu. V tomto rozmezí má kalibrační křivka charakter přímky popsané rovnicí $y [s] = 184,6 \times [mmol/l] + 0,04$. Hodnota R^2 je pro tuto přímku rovna 0,9992.

Mez detekce a stanovení

Pro tuto metodu byly jako meze stanovení určeny koncentrace valinu, leucinu a isoleucinu projevující se zónami vzniklých hydroxykyselin o délce 1 sekundy. Jako mez detekce byla zvolena koncentrace aminokyselin odpovídající $\frac{1}{3}$ meze stanovení. Z kalibračních přímek byly vypočteny meze stanovení pro valin 16,0 $\mu\text{mol/l}$, pro leucin a isoleucin 15,0 $\mu\text{mol/l}$. Meze detekce jsou následně 5,3 $\mu\text{mol/l}$, pro leucin a isoleucin 5,0 $\mu\text{mol/l}$. Mez detekce lze zlepšit snížením koncentrace vedoucího elektrolytu a snížením separačního proudu. Bylo vyzkoušeno použití 2 mM HCl a hnacího proudu 10 μA , což mělo za následek snížení meze detekce a stanovení přibližně na polovinu u všech tří aminokyselin.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z pěti po sobě následujících měření roztoků valinu, leucinu a isoleucinu po konverzi. Dávkované koncentrace byly rovny 1 mmol/l pro všechny standardní roztoky. Pro valin byla získána hodnota opakovatelnosti 2,1 %, pro leucin 1,8 % a pro isoleucin 1,9 %. Tyto hodnoty jsou dostatečné pro rutinní analýzu.

Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla stanovena analýzou konvertovaných standardních roztoků aminokyselin o koncentraci 0,1 mmol/l a byla vypočítána jako poměr naměřené a skutečné koncentrace vynásobené 100, aby byla hodnota výtěžnosti udána v %. Pro výpočet naměřené koncentrace byly použity výše uvedené kalibrační křivky. Hodnota výtěžnosti valinu je rovna $97,0 \pm 2,5 \%$, leucinu $97,8 \pm 1,4 \%$ a isoleucinu $97,6 \pm 1,7 \%$. Vzhledem k tomu, že se hodnoty výtěžností blíží 100 %, byla prokázána vhodnost metody ke stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem v modelových vzorcích a tato metoda byla následně aplikována na vzorky doplňků stravy.

Příprava a analýza reálného vzorku

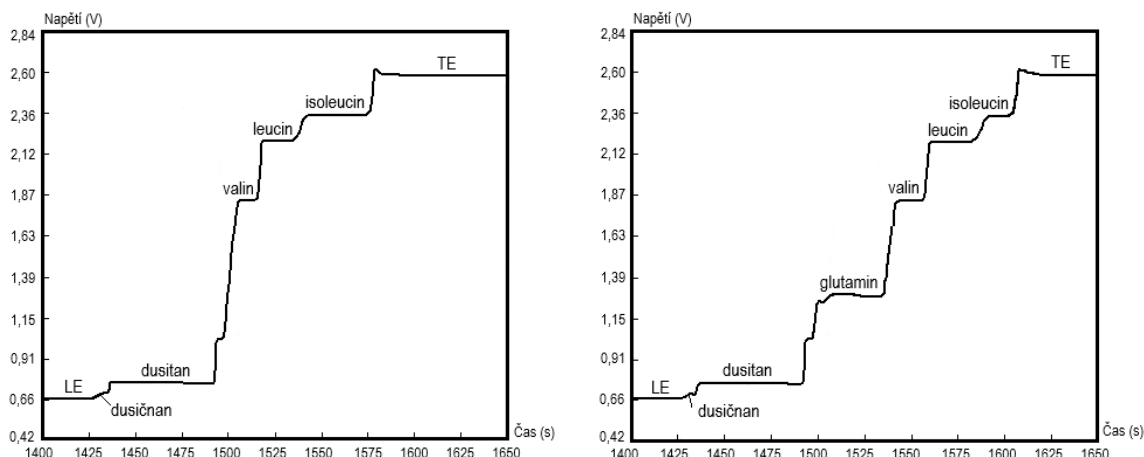
K analýze a kvantifikaci metodou kalibrační křivky byly jednotlivé vzorky zpracovány následovně: jedna kapsle vzorku BCAA Mega Capsules byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody v odměrné baňce. Následně bylo z této baňky pipetováno 5 ml roztoku

vzorku do 50 ml odměrné baňky, přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Poté byla baňka umístěna do vroucí vodní lázně a za intenzivního míchání zde byla ponechána po dobu 10 minut. Nakonec byl roztok ochlazen, 10x zředěn a analyzován. Tekutý vzorek BCAA Liquid Orange Flavour byl připraven pipetací 2 ml vzorku do 50 ml odměrné baňky, přidáním 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného a doplněním destilovanou vodou po rysku. Konverze byla provedena za stejných podmínek jako u předchozího vzorku. Před analýzou byl tento vzorek ředěn 20x.

Pro kvantifikaci metodou standardního přídatku byly vzorky připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě s tím rozdílem, že před konverzí byl k reakčnímu roztoku tablety přidán 1 ml zásobního roztoku obsahujícího 100 mmol/l valinu, 100 mmol/l leucinu a 100 mmol/l isoleucinu a k reakčnímu roztoku tekutého vzorku bylo přidáno 1,5 ml téhož zásobního roztoku. Výsledky získané oběma metodami jsou uvedeny v Tabulce 12 a jsou porovnány s obsahy aminokyselin deklarovanými výrobcem. Izotachforeogramy obou vzorků jsou uvedeny na Obrázku 13.

Tabulka 12: Obsah jednotlivých aminokyselin ve vzorcích doplňků stravy

BCAA Mega Capsules			
Aminokyselina	Obsah (mg/kapsle) – metoda kalibrační křivky	Obsah (mg/kapsle) – metoda standardního přídatku	Výrobcem deklarovaný obsah (mg/kapsle)
Valin	134,4 ± 4,1	157,7 ± 4,9	150
Leucin	282,6 ± 13,4	311,0 ± 4,5	300
Isoleucin	467,1 ± 7,2	465,8 ± 5,5	450
BCAA Liquid Orange Flavour			
Aminokyselina	Obsah (mg/20 ml) – metoda kalibrační křivky	Obsah (mg/20 ml) – metoda standardního přídatku	Výrobcem deklarovaný obsah (mg/20 ml)
Valin	170,0 ± 3,6	177,1 ± 3,9	200
Leucin	403,9 ± 6,5	407,9 ± 6,9	400
Isoleucin	201,9 ± 3,3	204,0 ± 3,5	200



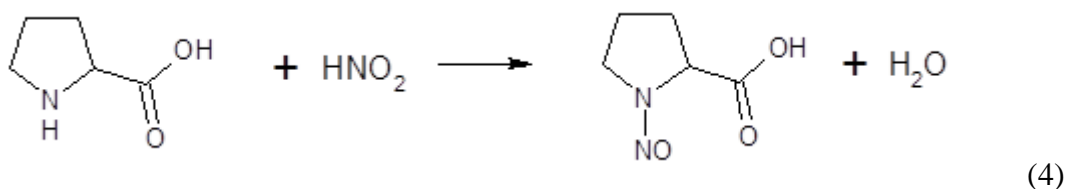
Obrázek 13: Izotachoforeogram vzorku kapsle (vlevo) a vzorku nápoje (vpravo) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 20 mM α -cyklodextrin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.1.4.2 Stanovení prolinu

Úvod

Prolin je neesenciální aminokyselina nepolárního charakteru, jejímž prekurzorem je kyselina glutamová. V metabolismu má prolin důležitou úlohu při formování prostorových struktur bílkovin a také při hydrofobních interakcích bílkovin. Je začleněn do tkáňových proteinů, kde může být hydroxylován na 4-hydroxyprolin. Obě tyto aminokyseliny je možné ve významném množství nalézt v kolagenu, kde tvoří až 30 % jeho hmotnosti [11]. Z potravin, ve kterých je prolin přítomen ve vyšších koncentracích, je možné zmínit včelí med. Obsah prolinu v medu může být až 500 mg/kg. Jedná se o jeden z ukazatelů kvality medu a v případě, že med obsahuje méně než 180 mg prolinu/kg medu, je takový med považován za falšovaný, tj. ředěný, popř. uměle doslazovaný [147].

Zatímco primární aminy reagují s kyselinou dusitou za vzniku odpovídající hydroxylsločeniny, sekundární aminy, mezi které řadíme i prolin, reagují za tvorby N-nitrosaminů (rovnice 4). Tyto látky mohou být relativně nestálé a mohou dále reagovat [146].



Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém módu s použitím

elektrolytového systému o následujícím složení: 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu k úpravě pH na 2,4 a 0,05% HEC jako vedoucí elektrolyt a 10 mM kyselina octová jako koncový elektrolyt. Hnací proud v předseparační koloně byl nastaven na hodnotu 400 μ A a v analytické koloně na 35 μ A. Detekce byla prováděna pouze pomocí vodivostního detektoru.

Jako vzorek byl použit potravinový doplněk Flexit Liquid Orange (Nutrend d.s., Olomouc, ČR) ve formě nápoje obsahující 1000 mg prolinu ve 100 ml nápoje. Dalším analyzovaným vzorkem byl domácí med ze soukromého chovu v Pardubicích. Med obsahuje prolin v koncentracích 200 – 500 mg/kg. Nízká koncentrace prolinu může být důkazem falšování medu.

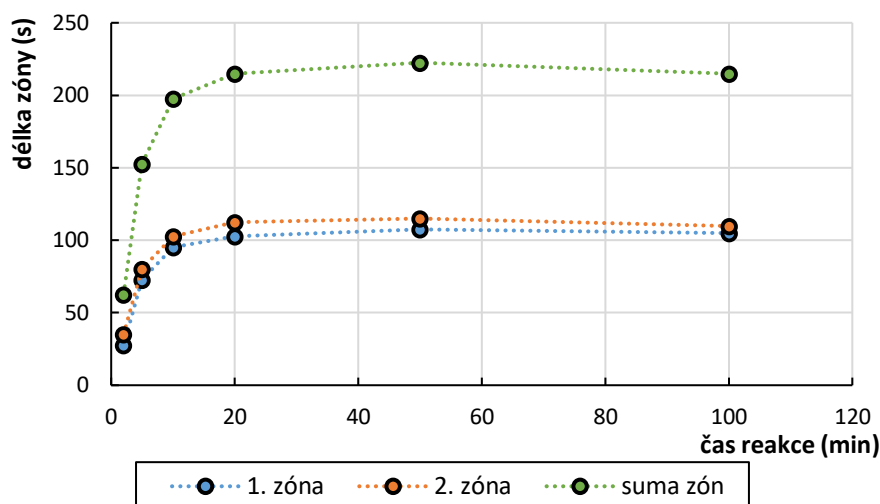


Obrázek 14: Analyzované vzorky obsahující prolin^{ed,ef}.

Optimalizace podmínek reakce a separace

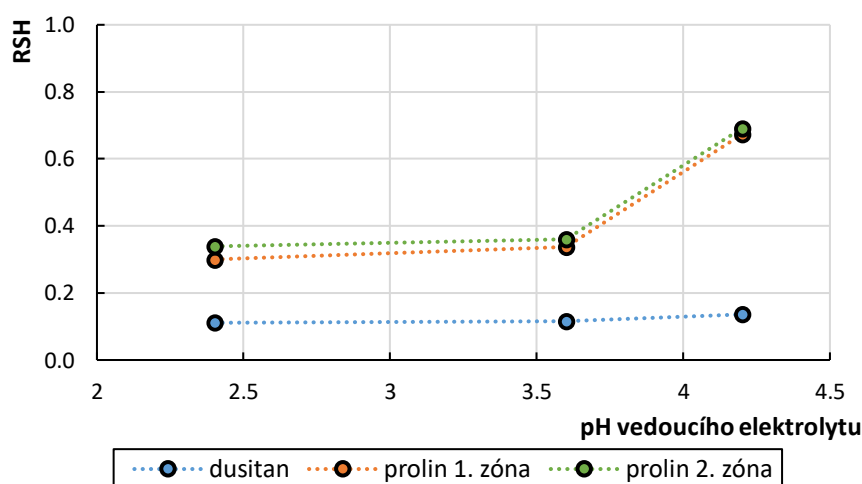
Pro analýzu prolinu nebyla provedena optimalizace složení reakční směsi, bylo předpokládáno, že výsledky budou obdobné jako v případě analýzy BCAA. Z tohoto důvodu byla k derivatizaci použita 100 mM kyselina octová a 100 mM dusitan sodný. Během analýzy prolinu po konverzi byly detekovány dvě od sebe oddělené zóny, tzn., že prolin po konverzi poskytuje minimálně dva produkty, které jsou stanovitelné pomocí aniontového módu ITP. Tyto dvě zóny lze při dodržení stejných reakčních podmínek využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prolinu.

Největší účinnosti konverze bylo dosaženo pomocí míchání reakční směsi na vroucí vodní lázni, proto byla v případě prolinu optimalizována pouze doba reakce za těchto podmínek (Graf 9). Bylo zjištěno, že nejúčinnější konverze bylo dosaženo po 50 minutách reakce, kdy byla délka zón prolinu největší. Při dalším prodlužování reakce docházelo ke zkracování zón vlivem rozkladných reakcí produktů konverze. Reprodukovatelných výsledků bylo dosaženo již po 10 minutách reakce, proto v našem případě byla reakce v tomto čase ukončena. V případě potřeby nižšího detekčního limitu by bylo možné dobu reakce prodloužit na zmíněných 50 minut.



Graf 9: Závislost účinnosti konverze prolinu na době zahřívání ve vroucí vodní lázni – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM prolin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Při zkoumání chování zón prolinu po konverzi bylo zjištěno, že jejich vzájemná poloha a rozlišení závisí na pH vedoucího elektrolytu (Graf 10). Zatímco při pH 3,6 měly zóny prolinu neostrý přechod, při pH 2,4 byly od sebe ostře odděleny. Nevýhodou bylo, že za stejného hnacího proudu došlo k prodloužení analýzy o cca 10 minut. Při pH 4,2 došlo k přiblížení zón natolik, že došlo téměř k jejich splnutí, navíc došlo k výraznému snížení výšky zóny koncového elektrolytu. I přes prodloužení doby analýzy byl k dalším analýzám zvolen vedoucí elektrolyt o pH 2,4.

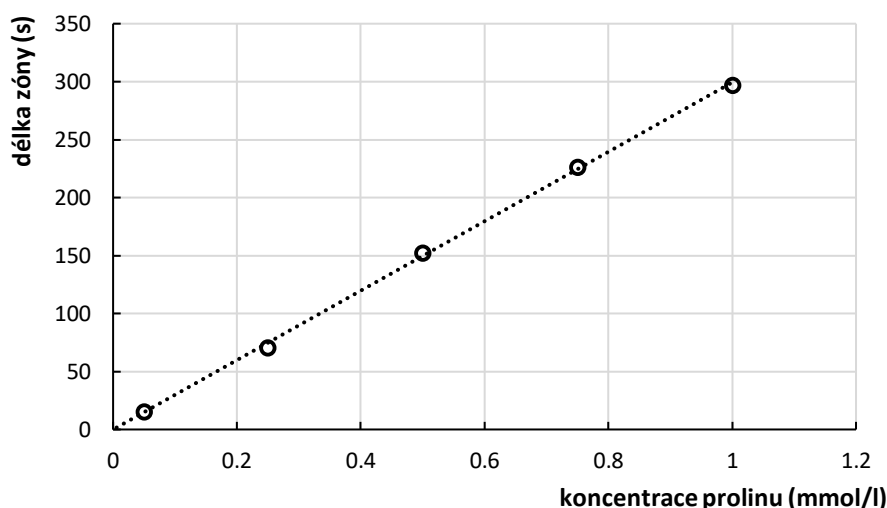


Graf 10: Závislost relativních výšek signálů na pH vedoucího elektrolytu – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM prolin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4; 3,6 a 4,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibračních roztoků byl použit zásobní roztok prolinu o koncentraci 100 mmol/l. Z tohoto roztoku byly pipetováním příslušných objemů do 50 ml odměrných baněk připraveny roztoky o koncentracích 1, 5, 10, 15 a 20 mmol/l. K těmto objemům standardů bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného, baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku a byly umístěny do vroucí vodní lázně, kde za současného míchání byly ponechány 10 minut. Před měřením byly všechny roztoky 20x ředěny na konečné koncentrace 0,05; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mmol/l. Takto připravené kalibrační roztoky byly analyzovány a byla sestrojena kalibrační křivka (Graf 11). Ve zvoleném rozmezí koncentrací lze kalibrační křivku popsat rovnicí přímky $y [s] = 302,06 \times [mmol/l] + 0,004$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9990$.



Graf 11: Kalibrační křivka prolinu – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 2 – 20 mM prolin; roztoky před separací byly 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Pro tuto metodu byla jako mez stanovení určena koncentrace prolinu projevující se zónou o délce 1 sekundy. Jako mez detekce byla zvolena koncentrace aminokyseliny odpovídající $\frac{1}{3}$ meze stanovení. Z kalibrační přímky byla vypočtena mez stanovení 2,61 μ mol/l a mez detekce 0,87 μ mol/l.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z pěti po sobě následujících měření roztoku prolinu po konverzi. Dávkovaná koncentrace byla 0,5 mmol/l. Hodnota opakovatelnosti je za těchto podmínek rovna 2,1 %.

Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla v tomto případě počítána jako podíl koncentrace získané analýzou 0,5 mM prolinu po konverzi a skutečné koncentrace. Hodnota podílu byla vynásobena 100 pro získání hodnoty v %. Ke kvantifikaci koncentrace prolinu byla použita kalibrační křivka uvedená v Grafu 11. Výtěžnost metody je rovna $96,2 \pm 1,9$ %.

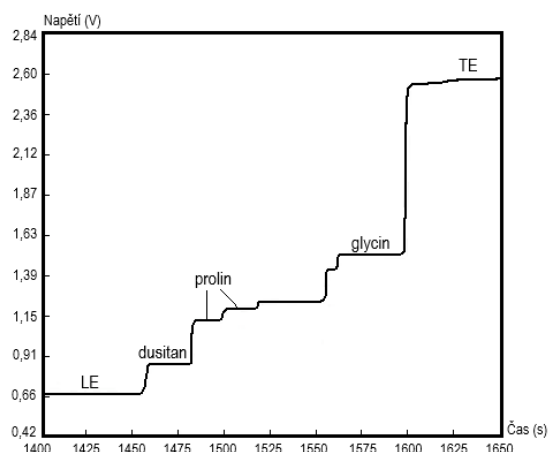
Příprava a analýza reálného vzorku

Vzorek potravinového doplňku Flexit byl připravován následovně: do 50 ml odměrné baňky byly napipetovány 2 ml nápoje, bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Následně byla umístěna do vroucí vodní lázně, kde za současného míchání probíhala konverze po dobu 10 minut. Poté byla baňka ochlazena a roztok byl před analýzou 20x zředěn. Pro stanovení metodou standardního přídatku byl ke 2 ml vzorku v 50 ml odměrné baňce před konverzí přidán 1 ml 0,1 M zásobního roztoku prolinu. Další postup byl stejný jako v předchozím případě. Naměřené výsledky spolu s deklarováním obsahem prolinu jsou uvedeny v Tabulce 13. Izotachforeogram takto připraveného vzorku je uveden na Obrázku 15.

V případě medu probíhala příprava vzorku navážením 1, 5 a 10 g medu do 50 ml odměrné baňky, bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného a byla provedena konverze ve vroucí vodní lázni. Vzorek byl před analýzou 20x ředěn. Analýzou roztoku po konverzi bylo zjištěno, že med obsahuje mnoho látek iontové povahy, hlavně organické kyseliny, které znemožňují stanovení prolinu touto metodou.

Tabulka 13: Obsah prolinu v potravinovém doplňku Flexit Liquid

Obsah prolinu (mg/100 ml) – metoda kalibrační křivky	Obsah prolinu (mg/100 ml) – metoda standardního přídavku	Výrobce deklarováný obsah prolinu (mg/100 ml)
914,8 ± 60,8	973,9 ± 27,3	1000



Obrázek 15: Izotachoforeogram vzorku nápoje – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 2,4); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.1.4.3 Stanovení theaninu

Úvod

Theanin je neproteinogenní aminokyselina odvozená od kyseliny glutamové. Theanin byl poprvé nalezen v 50. letech 20. století v lístcích čajovníku (*Camellia sinensis* a ostatní druhy rodu *Camellia*). Kromě rostlin rodu *Camellia* byl později nalezen také v hříbu hnědém (*Xerocomus badius*). Theanin tvoří 1 – 3 % sušiny lístků čajovníku a více než 50 % obsahu všech volných aminokyselin. Jedná se o hlavní komponentu zeleného čaje, která je zodpovědná za chuť a vůni a jeho obsah určuje také kvalitu čaje.

Bylo dokázáno, že theanin má příznivý vliv na fyzické i duševní zdraví člověka – navozuje relaxaci, zvyšuje koncentraci a schopnost učit se, redukuje fyzický i psychický stres, zlepšuje kvalitu spánku, prohlubuje uvolněnou náladu, působí jako prevence před vaskulárními nemocemi, redukuje krevní tlak, inhibuje negativní efekty kofeinu, působí neuroprotektivně, zlepšuje imunitní systém, snižuje akumulaci tuků a zamezuje přibírání na váze.

Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém módu s použitím elektrolytového systému o následujícím složení: 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu k úpravě pH na 3,6 a 0,05% HEC jako vedoucí elektrolyt a 10 mM kyselina octová jako koncový elektrolyt. Hnací proud v předseparační koloně byl nastaven na hodnotu 400 μ A a v analytické koloně na 35 μ A. Detekce byla prováděna pouze pomocí vodivostního detektoru.

Jako vzorek byl vybrán doplněk stravy ve formě tablet L-theanin (Vetrisol s.r.o., Praha, ČR) s obsahem 200 mg theaninu v jedné tabletě a zelené sypané čaje Sencha a Yunnan zakoupené v obchodním domě Grand v Pardubicích. Theanin tvoří až 3 % sušiny v závislosti na druhu a kvalitě zeleného čaje. V černých čajích není theanin obsažen v tak vysokém množství z důvodu fermentačních procesů během výroby těchto čajů.

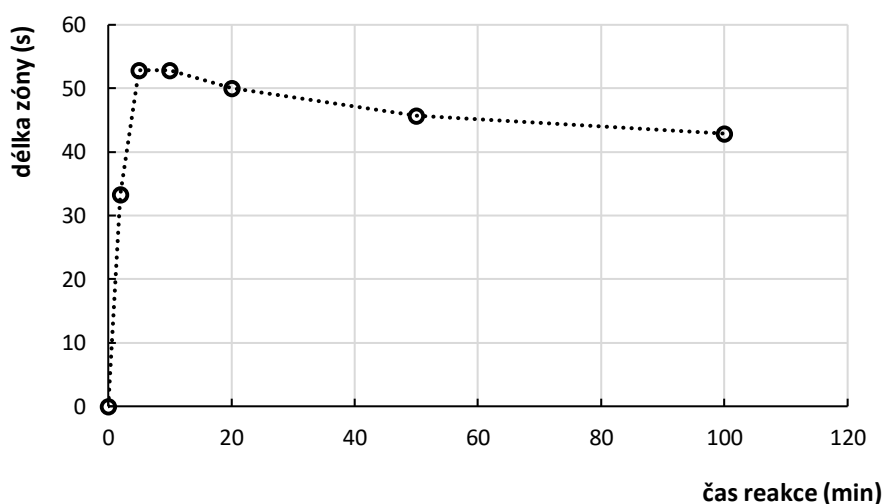


Obrázek 16: Analyzované vzorky s obsahem theaninu – zleva: tablety L-theanin^{eg}, zelený čaj Sencha^{eh} a zelený čaj Yunnan^{ei}.

Optimalizace podmínek reakce a separace

Stejně jako v předchozích případech byla provedena konverze theaninu pomocí 100 mM kyseliny octové a 100 mM dusitanu sodného za intenzivního míchání reakční směsi ve vroucí vodní lázni. Analýzou theaninu po konverzi bylo zjištěno, že poskytuje pouze jeden izotachforeticky stanovitelný produkt, jehož struktura nebyla dále zjišťována. Cílem práce bylo zjistit, zda je konverze pomocí kyseliny dusité vhodná jako derivatizační krok pro kvalitativní a kvantitativní analýzu theaninu pomocí kapilární izotachoforézy.

Součástí optimalizace konverze bylo stejně jako v případě prolinu pouze proměření závislosti účinnosti konverze theaninu na době reakce (Graf 12).



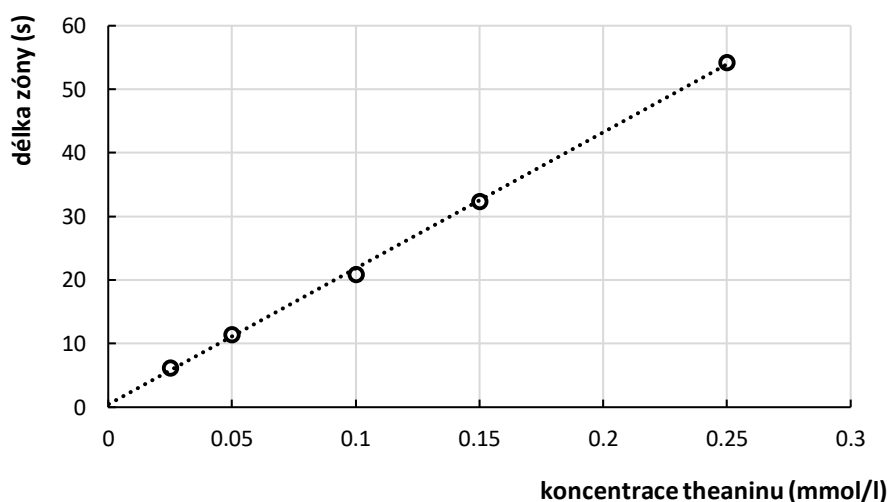
Graf 12: Závislost účinnosti konverze theaninu na době zahřívání ve vroucí vodní lázni – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 5 mM theanin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 0,25 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Z měření vyplynulo, že délka zóny konvertovaného theaninu byla stejná a zároveň maximální po 5 a 10 minutách reakce. Po 20 minutách docházelo ke zkracování této zóny a začala se objevovat jiná zóna patřící pravděpodobně rozkladnému produktu. Z důvodu zabránění poklesu účinnosti konverze kvůli rozkladným reakcím byla doba reakce zkrácena z 10 minut (doba reakce ostatních aminokyselin) na 8 minut.

Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibrační křivky theaninu byl použit zásobní roztok o koncentraci 50 mmol/l. Z tohoto roztoku byly do 50 ml odměrných baněk připraveny roztoky o koncentracích 0,5; 1; 2; 3 a 5 mmol/l. Následně byla provedena konverze těchto roztoků s pomocí kyseliny octové a dusitanu sodného. Po konverzi byly roztoky ochlazeny, 20x zředěny na výsledné koncentrace 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 a 0,25 mmol/l a analyzovány. V rozsahu zvolených koncentrací je kalibrační křivka theaninu (Graf 13) lineární (koeficient determinace $R^2 = 0,9992$) a lze ji popsat rovnicí přímky $y [s] = 211,88 \times [mmol/l] + 0,005$.



Graf 13: Kalibrační křivka theaninu – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 0,5 – 5 mM theanin; roztoky po konverzi 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Mez detekce a stanovení byla určena stejným způsobem jako v předchozích případech a pro theanin nabývá hodnot 1,21 μ mol/l, resp. 3,63 μ mol/l.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z pěti po sobě následujících měření roztoku theaninu po konverzi. Dávkovaná koncentrace byla 0,2 mmol/l. Hodnota opakovatelnosti je za těchto podmínek rovna 1,4 %.

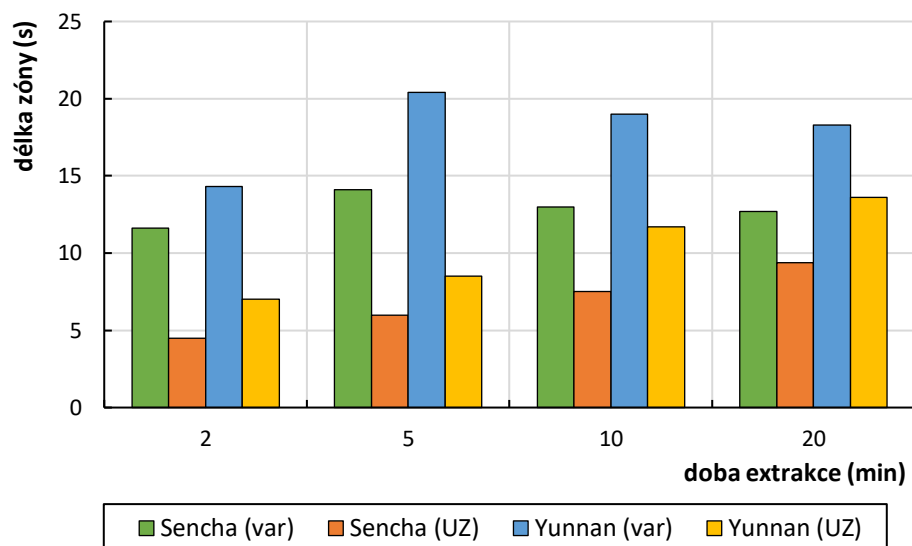
Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla počítána jako podíl koncentrace získané analýzou 0,2 mM theaninu po konverzi a skutečné koncentrace. Hodnota podílu byla následně udána v %. Ke kvantifikaci koncentrace theaninu byla použita kalibrační křivka uvedená v Grafu 13. Výtěžnost metody je rovna $96,3 \pm 0,9$ %.

Příprava a analýza reálných vzorků

Vzorek tablet s obsahem theaninu byl připraven následujícím způsobem: jedna tableta byla rozdrčena v třecí misce a vzniklý prášek byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky, která pak byla přibližně do tří čtvrtin doplněna destilovanou vodou. Následně byla baňka vložena do ultrazvukové lázně, kde byla ponechána 10 minut. Poté byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Z této baňky bylo dále pipetováno 5 ml roztoku do 50 ml odměrné baňky, ve které byla provedena konverze. Před analýzou byl roztok ještě 20x zředěn. Pro stanovení metodou standardního přídatku byl před konverzí k 5 ml roztoku vzorku přidán 1 ml 50 mM zásobního roztoku theaninu.

Pro vzorky sypaných zelených čajů byl nejprve optimalizován způsob a doba extrakce. Byla vybrána extrakce theaninu vodou za laboratorní teploty s pomocí ultrazvukové lázně a extrakce ve vroucí vodě. V obou případech bylo na analytických vahách naváženo cca 0,5 g čaje a toto množství bylo vpraveno do kádinky s 20 ml destilované vody. V případě extrakce ve vroucí vodě byla do kádinky nalita voda o teplotě 100 °C a v případě extrakce za laboratorní teploty byla kádinka se vzorkem a destilovanou vodou umístěna do ultrazvukové lázně. Takto připravené vzorky byly extrahovány po zvolené časové úseky (2, 5, 10 a 20 minut). Po uplynutí dané doby byl obsah kádinky převeden přes skládaný filtr do 50 ml odměrné baňky, kádinka i filtr byly propláchnuty malým množstvím horké destilované vody. Následně byla v této baňce provedena konverze za pomoci kyseliny dusité. Před separací byl roztok po konverzi 20x ředěn a do přístroje byl dávkován přes mikrofiltr s póry o velikosti 1 μm.



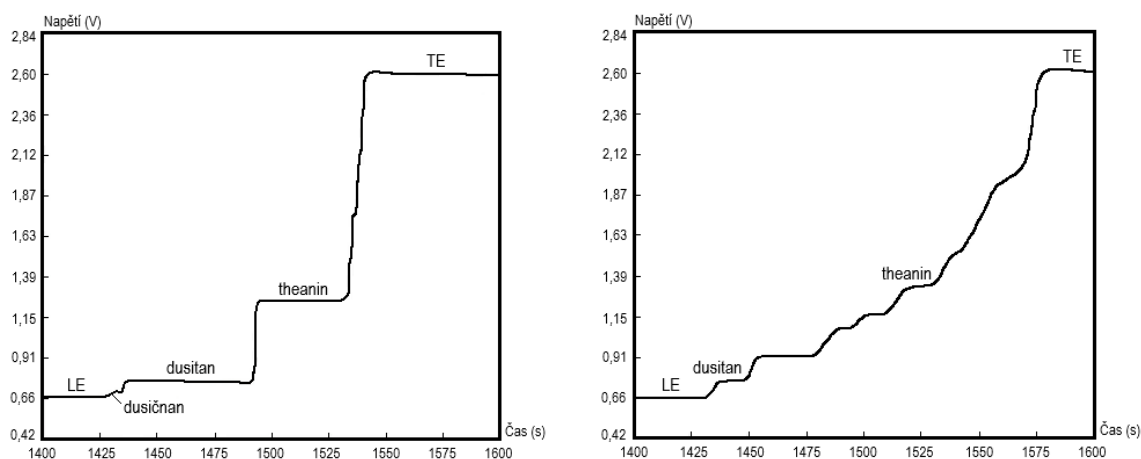
Graf 14: Vliv doby a typu extrakce čajů na délku zóny theaninu – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a extrakt z 0,5 g čaje; roztoky před separací byly 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Z Grafu 14 je patrné, že nejvyšší výtěžnost extrakce theaninu z čaje byla dosažena pomocí vroucí vody. Optimální doba výluhu je 5 minut, při kratší době je extrakce nedostatečná a při delší době nastává pravděpodobně rozklad theaninu a výtěžnost se snižuje. Extrakci v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty bylo i po 20 minutách dosaženo pouze dvoutřetinové výtěžnosti oproti extrakci ve vroucí vodě. Pro kvantitativní analýzu byla z těchto důvodů zvolena extrakce vroucí vodou po dobu 5 minut.

Ke stanovení obsahu theaninu ve vzorcích čajů byly s analytickou přesností naváženy cca 4 g sypaného čaje. Navážka byla vložena do 60 ml vroucí destilované vody, kde byla ponechána po dobu 5 minut. Následně byl roztok přefiltrován přes skládaný filtr do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Ke stanovení bylo pipetováno 10 ml výluhu z čaje do 50 ml odměrné baňky, ve které byla provedena konverze s kyselinou dusitou. Pro analýzu metodou standardního přídatku byl před konverzí k 10 ml výluhu přidán 1 ml 50 mM roztoku theaninu. Před analýzou byly roztoky 20x ředěny a dávkovány přes mikrofiltr. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14 a izotachoforeogramy na Obrázku 17.

Tabulka 14: Obsah theaninu v analyzovaných vzorcích

Tablety L-theanin		
Obsah theaninu (mg/tableta) – metoda kalibrační křivky	Obsah theaninu (mg/tableta) – metoda standardního přídavku	Výrobce deklarovaný obsah theaninu (mg/tableta)
173,4 ± 3,5	178,6 ± 3,5	200
Obsah theaninu (mg/g) – metoda kalibrační křivky		Obsah theaninu (mg/g) – metoda standardního přídavku
Zelený čaj Sencha		
20,7 ± 0,2		23,1 ± 0,4
Zelený čaj Yunnan		
33,3 ± 0,4		36,2 ± 0,2



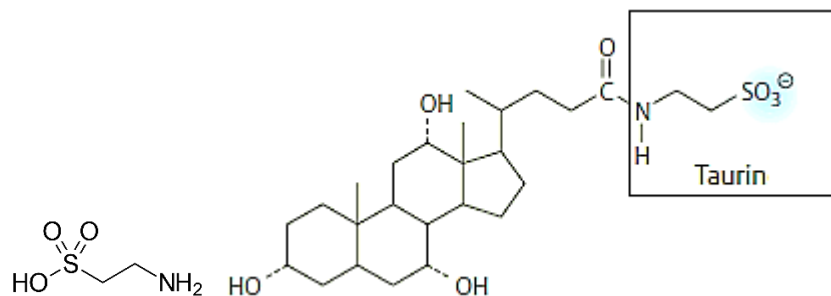
Obrázek 17: Izotachforeogramy vzorku tablet (vlevo) a čaje Yunnan (vpravo) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin + 0,05% HEC (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.1.4.4 Stanovení taurinu

Úvod

Přestože taurin není součástí proteinů, patří k aminokyselinám s nejvyšší koncentrací v tělních tekutinách. Ve vysokých koncentracích se nachází zejména v centrálním nervovém systému, sítnici a v srdečním a kosterním svalstvu. Mezi jeho nejznámější funkce patří konjugace žlučových kyselin, stabilizace buněčných membrán a neurotransmise v mozku. Taurin ovlivňuje transport vápenatých iontů přes buněčnou membránu a jejich intracelulární distribuci. Hraje také klíčovou roli při oxidativní fosforylaci a má farmakologické účinky na játra a žlučník. Dále byl prokázán jeho antikonvulzivní účinek u epilepsie a pozitivní účinek na srdeční sval, včetně snižování vysokého krevního tlaku. Jako hlavní produkt

metabolismu aminokyselin obsahujících síru je vylučován buď močí, nebo žlučí ve vazbě se žlučovými kyselinami [11].



Obrázek 18: Struktura taurinu (vlevo)^{ej} a konjugované žlučové kyseliny (vpravo)^{ek}.

Taurin je esenciální aminokyselinou u koček, kde jeho absence v potravě způsobuje degeneraci sítnice oka a slepotu. U lidí jsou zásoby taurinu vysoké a projevy jeho nedostatku u dospělých jsou vzácné [11].

Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém módu s použitím elektrolytového systému o složení 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu k úpravě pH na 3,6 jako vedoucí elektrolyt a s 10 mM kyselinou octovou jako koncový elektrolyt. Hnací proud v předseparační koloně byl nastaven na hodnotu 300 μ A a v analytické koloně na 50 μ A. Detekce byla prováděna pouze pomocí vodivostního detektoru. Doba trvání jedné analýzy byla přibližně 25 minut.

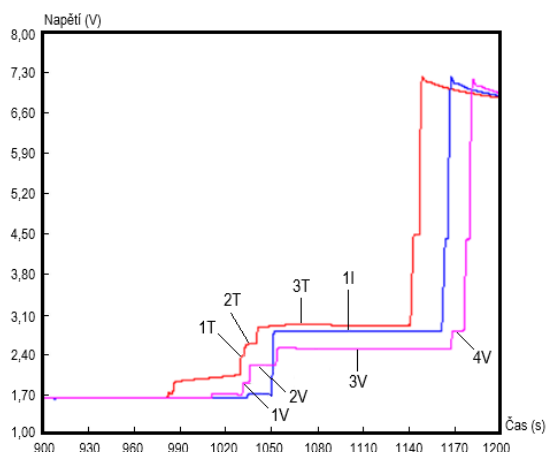
Jako vzorky byly použity čtyři energetické nápoje od různých výrobců – Maximal G (Buszezs Zrt., Budapešť, Maďarsko) s obsahem taurinu 1,017 g/250 ml, QXE (Van Pur, Rakszawa, Polsko) s obsahem 1,040 g/250 ml, Tiger (výrobce a země původu neuvedena) s obsahem 1,017 g/250 ml, CrazyWolf (výrobce neuveden, Polsko) s obsahem 1,051 g/250 ml a jeden energetický gel CarboSnack s meruňkovou příchutí (Nutrend d.s., Olomouc, ČR) s obsahem 500 mg taurinu v 55 g balení gelu.



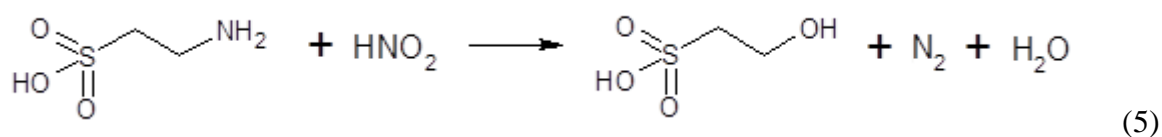
Obrázek 19: Analyzované vzorky energetických nápojů a energetického gelu^{el-ep}.

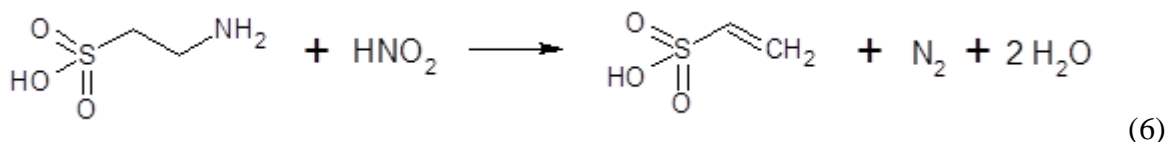
Optimalizace podmínek reakce a separace

Analýzou roztoku taurinu po konverzi bylo zjištěno, že poskytuje tři izotachforetické zóny (1T – 3T, viz Obrázek 20). Nejpomalejší a zároveň nejdelší zóna 3T patří hlavnímu produktu konverze, tj. kyselině isethionové (rovnice 5). Dvě rychlejší zóny (1T a 2T) pochází od kyseliny vinylsulfonové, která je druhým, minoritním, produktem konverze (rovnice 6). Standardní roztok této kyseliny, připravený z technické chemikálie, poskytoval dokonce čtyři zóny (1V – 4V), které jsou zřejmě přítomny díky možné polymeraci kyseliny. V roztoku po konverzi byly viditelné z těchto čtyř zón pouze dvě, odpovídající zónám 2V a 3V (zóna 1V je možná taky přítomna, ale je ztracena v dusitanu).

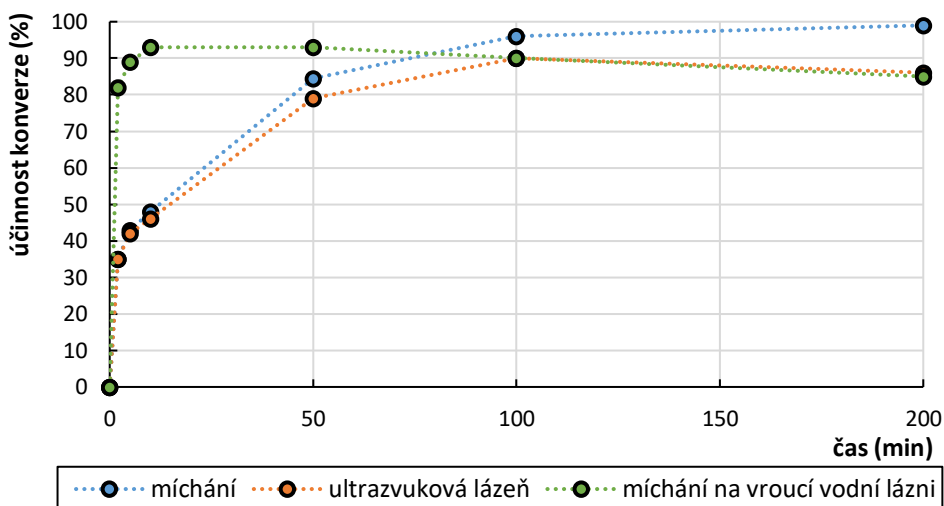


Obrázek 20: Izotachforeogramy standardního roztoku konvertovaného taurinu (červená křivka), kyseliny isethionové (modrá křivka) a kyseliny vinylsulfonové (růžová křivka) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona. (Pozn. časová osa platí pouze pro červenou křivku)





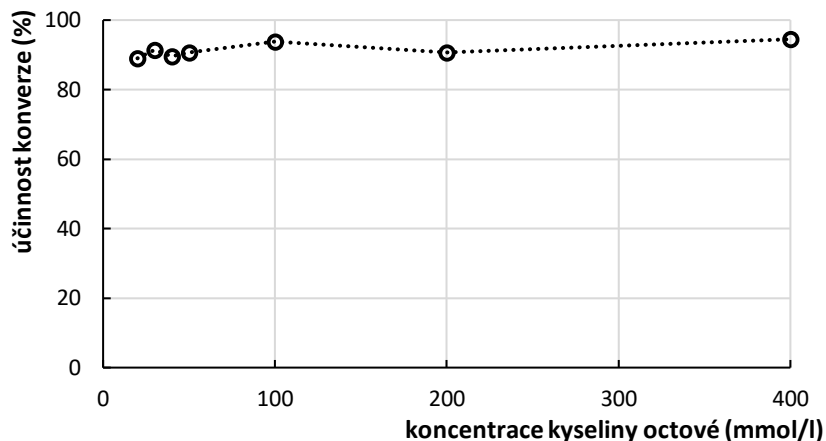
V případě taurinu byla stejně jako u BCAA provedena konverze pomocí 100 mM kyseliny octové a 100 mM dusitanu sodného třemi různými způsoby, tj. v ultrazvukové lázni, za mechanického míchání při laboratorní teplotě a za mechanického míchání ve vroucí vodní lázni, a byla zjišťována její účinnost jako podíl délky zóny konvertovaného taurinu a délky zóny standardního roztoku kyseliny isethionové o koncentraci jako taurin. Z Grafu 15 je patrné, že nejlepší účinnosti konverze bylo na rozdíl od BCAA dosaženo při mechanickém míchání po dobu 200 minut. Nicméně vzhledem k časové náročnosti tohoto způsobu konverze byla nakonec vybrána konverze na vroucí vodní lázni, kde již po 10 minutách byla dosažena účinnost konverze okolo 93 %. Zajímavostí tohoto způsobu konverze je, že přibližně po hodině od začátku zahřívání začaly v baňce vznikat oranžové dýmy, pravděpodobně oxidy dusíku, což potvrzuje i křivka účinnosti, kde po 50 minutách dochází k poklesu účinnosti konverze. V případě konverze v ultrazvukové lázni nebylo ani po 200 minutách dosaženo uspokojivého výsledku.



Graf 15: Závislost účinnosti konverze taurinu na čase, teplotě a vlivu míchání – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

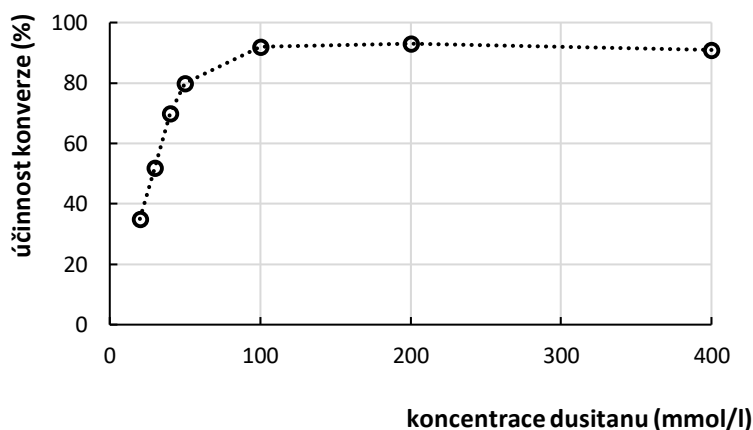
Dalším optimalizovaným parametrem byla koncentrace kyseliny octové v reakční směsi. Z Grafu 16 je zřejmé, že koncentrace kyseliny octové nemá vliv na účinnost konverze, jelikož i po minimálním přídatku kyseliny dojde k uspokojivému výsledku konverze. Tento jev

je zřejmě způsoben tím, že sulfoskupina nepřijímá kyselé vodíky, a proto stačí k okyselení směsi z důvodu převedení dusitanu na kyselinu dusitou pouze malé množství kyseliny octové. Tímto chováním se taurin výrazně liší od ostatních aminokyselin, kde se koncentrace kyseliny octové projevuje velice výrazně (Graf 3).



Graf 16: Závislost účinnosti konverze taurinu na koncentraci kyseliny octové v reakční směsi – složení reakční směsi: 100 mM dusitan sodný, 20 – 400 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Posledním optimalizovaným parametrem konverze byla koncentrace dusitanu sodného v reakční směsi. Z výsledků (Graf 17) je patrné, že s rostoucí koncentrací dusitanu se účinnost konverze zvyšuje. Po dosažení koncentrace 100 mmol/l dojde k ustálení a se zvyšující se koncentrací dusitanu už dále nedochází ke zvyšování účinnosti konverze.

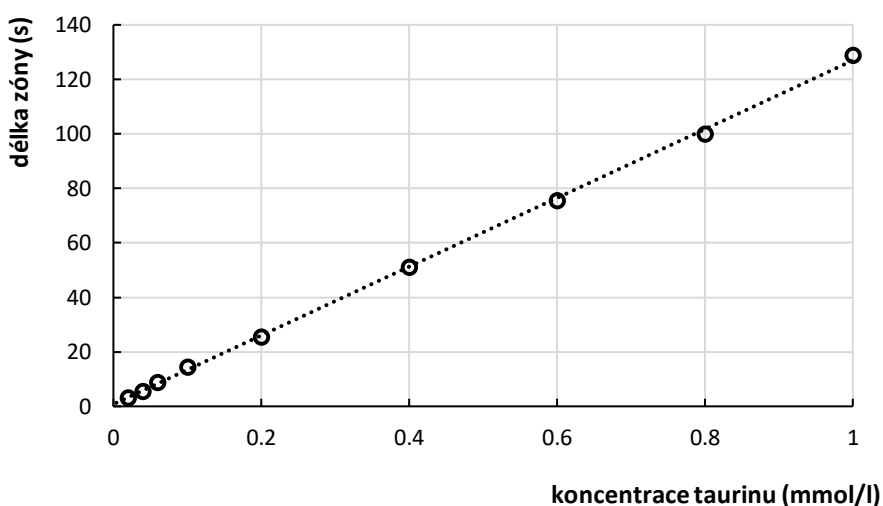


Graf 17: Závislost účinnosti konverze taurinu na koncentraci dusitanu sodného v reakční směsi – složení reakční směsi: 20 – 400 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 20 mM taurin; roztok před separací byl 20x ředěn (výsledná koncentrace 1 mmol/l); vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibrační křivky taurinu (Graf 18) byl použit zásobní roztok o koncentraci 100 mmol/l. Z tohoto roztoku byly do 50 ml odměrných baněk připraveny roztoky o koncentracích 0,4; 0,8; 1,2; 2; 4; 8; 12; 16 a 20 mmol/l. Následně byla provedena konverze těchto roztoků s pomocí kyseliny octové a dusitanu sodného. Po konverzi byly roztoky ochlazeny, 20x zředěny na výsledné koncentrace 0,02; 0,04; 0,06; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mmol/l a analyzovány. Pro sestavení kalibrační křivky byla vzhledem k nejlepší linearitě použita suma délek všech tří zón, které taurin po konverzi poskytoval. Ve zvoleném rozmezí koncentrací lze kalibrační křivku popsat rovnicí přímky $y [s] = 123,68 \times [\text{mmol/l}] + 0,83$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9997$.



Graf 18: Kalibrační křivka taurinu – složení reakční směsi před konverzí: 100 mM dusitan sodný, 100 mM kyselina octová a 0,4 – 20 mM taurin; roztoky před separací byly 20x ředěny, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Mez detekce a stanovení byla určena stejným způsobem jako v předchozích případech a pro taurin nabývá hodnot 2,7 $\mu\text{mol/l}$, resp. 8,0 $\mu\text{mol/l}$.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z pěti po sobě následujících měření roztoku taurinu po konverzi. Dávkováná koncentrace byla 0,7 mmol/l. Hodnota opakovatelnosti je za těchto podmínek rovna 1,54 %.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka pěti po sobě provedených analýz od začátku konverze až po konečnou ITP separaci. Vzhledem k tomu, že navážky taurinu nebyly totožné, byly naměřené délky zón přepočítány na navážku 1 g taurinu. Z těchto délek byla následně vypočtena relativní směrodatná odchylka, která vyjádřená v procentech určuje reprodukovatelnost metody. V případě taurinu byla hodnota reprodukovatelnosti 1,95 %.

Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla počítána jako podíl koncentrace získané analýzou 0,7 mM taurinu po konverzi a skutečné koncentrace. Hodnota podílu byla následně udána v %. Ke kvantifikaci koncentrace taurinu byla použita kalibrační křivka uvedená v Grafu 18. Výtěžnost metody je rovna $92,6 \pm 1,54$ %.

Příprava a analýza reálných vzorků

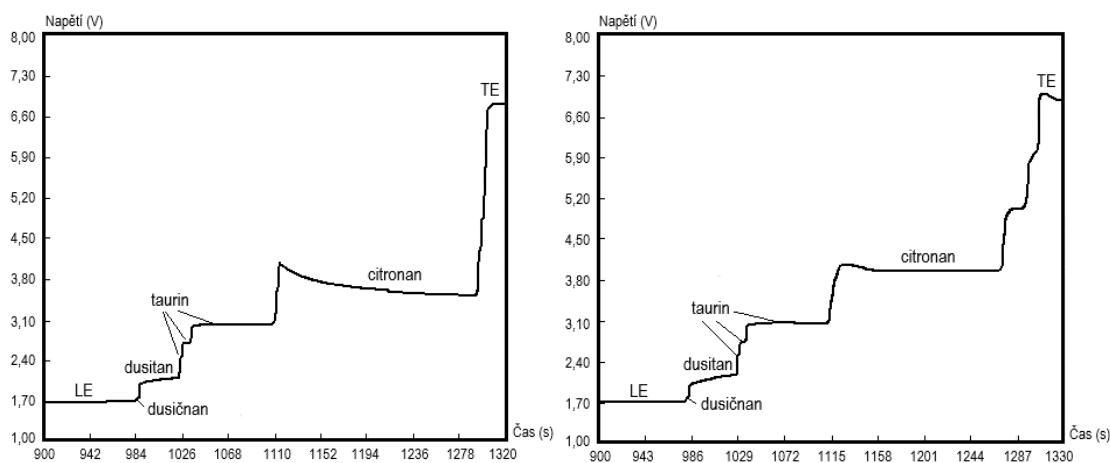
Vzorky energetických nápojů byly připraveny následujícím způsobem: do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 25 ml vzorku, bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové, 5 ml 1 M dusitanu sodného a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Následně byla baňka vložena do ultrazvukové lázně kvůli odstranění oxidu uhličitého, kde byla ponechána po dobu několika minut. Po odplynění byla vložena do vroucí vodní lázně, kde byla za současného míchání 10 minut zahřívána. Roztok po proběhlé konverzi byl před analýzou 20x naředěn. Ze vzorku gelu bylo na analytických vahách naváženo cca 10 g, které byly kvantitativně převedeny do 50 ml odměrné baňky a dále bylo postupováno jako v předchozím případě.

Příprava vzorků pro analýzu metodou vícenásobného standardního přídatku byla obdobná, rozdíl byl pouze v tom, že ke vzorku před konverzí bylo přidáno 5 a 10 ml standardního roztoku taurinu o koncentraci 30 mmol/l. Získané výsledky spolu s obsahy deklarovanými výrobcí jsou uvedeny níže v Tabulce 15.

Obsah taurinu v energetickém nápoji Crazy Wolf byl dříve analyzován také pomocí voltametrie a HPLC [148]. V případě voltametrie byl zjištěn obsah taurinu $0,80 \pm 0,07$ g/250 ml a v případě HPLC $0,76 \pm 0,03$ g/250 ml. Hodné pozornosti je to, že ve všech případech byly zjištěny nižší obsahy taurinu, než deklaruje výrobce.

Tabulka 15: Obsah taurinu v analyzovaných vzorcích

Obsah taurinu (g/250 ml) – metoda kalibrační křivky	Obsah taurinu (g/250 ml) – metoda standardního přídatku	Výrobce deklarovaný obsah taurinu (g/250 ml)
Energetický nápoj Maximal G		
0,88 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,02
Energetický nápoj QXE		
0,87 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,04
Energetický nápoj Tiger		
0,88 ± 0,01	0,83 ± 0,02	1,05
Energetický nápoj Crazy Wolf		
0,88 ± 0,01	0,86 ± 0,02	1,05
Obsah taurinu (g/55 g) – metoda kalibrační křivky	Obsah taurinu (g/55 g) – metoda standardního přídatku	Výrobce deklarovaný obsah taurinu (g/55 g)
Energetický gel CarboSnack		
0,45 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,5



Obrázek 21: Izotachoforeogram vzorku energetického nápoje Tiger (vlevo) a energetického gelu (vpravo) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,6); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.1.5 Závěr

Byla vyvinuta izotachoforetická metoda ke stanovení aminokyselin v různých maticích, především potravinových doplňcích a nápojích. Tato metoda je založena na konverzi aminokyselin pomocí kyseliny dusité za vzniku hydroxykyselin, v případě prolinu vzniká nitrosoprolin. Pro některé aminokyseliny (BCAA, prolin, theanin, taurin) byla provedena

optimalizace podmínek konverze a izotachoforetické separace a následně byly stanoveny parametry metody. Pro konverzi byly jako neoptimálnější vybrány následující podmínky: koncentrace aminokyseliny max. 20 mmol/l, koncentrace dusitanu sodného 100 mmol/l, koncentrace kyseliny octové 100 mmol/l, způsob konverze: zahřívání na vroucí vodní lázni se současným mícháním po dobu 10 minut (pro theanin byla doba zkrácena na 8 minut). Elektrolytový systém vhodný pro separaci byl složen z 10 mM HCl s přídavkem β -alaninu k úpravě pH (3,6, resp. 2,4 pro analýzu prolinu) jako vedoucího elektrolytu a 10 mM kyseliny octové jako koncového elektrolytu. K separaci BCAA bylo z důvodu oddělení zóny leucinu od zóny izoleucinu k vedoucímu elektrolytu přidáno 20 mmol/l α -cyklodextrinu. Meze detekce se pohybovaly v rozmezí od 1 do 5 μ mol/l, meze stanovení od 3 do 15 μ mol/l, opakovatelnost byla přibližně 2 % a nižší a výtěžnost byla v rozmezí od 93 do 98 %. Vyvinutá metoda splňuje požadavky kladené na rutinní analýzy a je vhodná pro stanovení většiny aminokyselin v různých méně složitých matricích.

3.2 Izotachoforetické stanovení vitamínů sk. B v doplňcích stravy [149, 150]

3.2.1 Úvod

Vitamíny skupiny B jsou strukturně poměrně odlišné sloučeniny, které řadíme mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Všechny tyto látky jsou esenciální a jsou nezbytné pro správné fungování organismu. V případě nedostatku některého z vitamínů nastává tzv. hypovitaminóza, tj. stav, který dlouhodobě neléčený může vést k vážným zdravotním problémům až ke smrti. Vitamíny skupiny B hrají důležitou roli při metabolických pochodech, slouží převážně jako kofaktory enzymů, regulátory metabolismu a antioxidanty. Biologické funkce jednotlivých vitamínů jsou podrobněji popsány v teoretické části této práce.

Ke stanovení vitamínů v různých matricích byly popsány postupy zahrnující různé analytické koncovky. Nejčastěji používanými jsou metody chromatografické, převážně HPLC a metody elektromigrační, kde převažuje využití kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie. V posledních letech byly publikovány HPLC metody pro stanovení vitamínů skupiny B v potravinách [151–165], dětských výživách [166, 167], farmaceutických přípravcích [168–171], mateřském mléku [172], moči [157, 173], séru [174], plazmě [156, 157, 175] a tkáních [176]. Micelární elektrokinetická chromatografie byla použita především pro analýzu multivitaminových přípravků [177–179]. Kapilární zónová elektroforéza byla využita pro stanovení vitamínů skupiny B v potravinách [180–182], krmivech pro hospodářská zvířata [183] farmaceutických přípravcích [184], moči [185], plazmě [185] a slinách [185]. Dříve bylo publikováno také několik postupů stanovení vitamínů pomocí izotachoforézy [106–114], nicméně většina z nich se zabývá stanovením pouze jednoho, popř. dvou vitamínů během jedné analýzy. Z dalších metod byla k analýze vitamínů skupiny B využita spektrofotometrie [186–188], fluorimetrie [189–192], infračervená [193] a Ramanova [193] spektrometrie, průtoková injekční analýza [194–201], voltametrie [202, 203] a amperometrie [204, 205].

3.2.2 Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýza byla prováděna v aniontovém i kationtovém módu s použitím elektrolytového systému o následujícím složení: 10 mM histidin chlorid s histidinem k úpravě pH na 6,2 jako vedoucí elektrolyt a 10 mM MES jako koncový elektrolyt pro analýzu aniontů. Pro analýzu kationtů byl zvolen elektrolytový systém složený z vedoucího elektrolytu 10 mM octanu draselného s kyselinou octovou k úpravě pH na 5,0

a koncového elektrolytu 10 mM kyseliny octové. Hnací proud v předseparační koloně byl při analýze aniontů nastaven na hodnotu 250 μA , v analytické koloně na 50 μA a před detekcí byl snížen na 30 μA . Kationty byly separovány za použití hnacího proudu 300 μA v předseparační koloně a 80 μA v analytické koloně. Detekce byla prováděna pomocí vodivostního a spektrofotometrického detektoru.

Jako vzorky byly použity různé vitamínové tablety – Biosil Plus (Naturvita, Slušovice, ČR) s obsahem 6 mg kyseliny pantothenové a 150 μg biotinu v jedné tabletě; Acidum folicum Léčiva (Zentiva, Praha, ČR) s obsahem 10 mg kyseliny listové na tabletu; B-Komplex Zentiva (Zentiva, Praha, ČR) s obsahem 2 mg thiaminu, 2 mg riboflavinu, 1 mg pyridoxinu, 3 mg pantothenátu vápenatého a 20 mg nikotinamidu v jedné tabletě; B-komplex forte (Generica, Piešťany, Slovensko), kde jedna tableta obsahuje 10 mg thiaminu, 10 mg riboflavinu, 10 mg pyridoxinu, 10 μg kyanokobalaminu, 0,5 mg biotinu, 50 mg nikotinamidu, 1 mg kyseliny listové a 40 mg kyseliny pantothenové, a vitamínové kapsle Imunofit (JuWital, Praha, ČR) s obsahem 2,1 μg kyanokobalaminu, 10,5 mg nikotinamidu, 1 mg pyridoxinu, 50 μg biotinu, 1 mg riboflavinu a 2 mg thiaminu.

Kromě výše zmíněných vzorků byla zkoušena také analýza vitamínů kationtového charakteru v šumivých vitamínových tabletách. Ta byla bohužel neúspěšná z důvodu velmi vysokého obsahu sodíku, kvůli němuž byla překročena separační kapacita kolony. V případě naředění vzorku nebylo také možné obsah vitamínů stanovit, jelikož oproti sodíku byly ve velmi nízké koncentraci, tj. pod limitem stanovitelnosti.



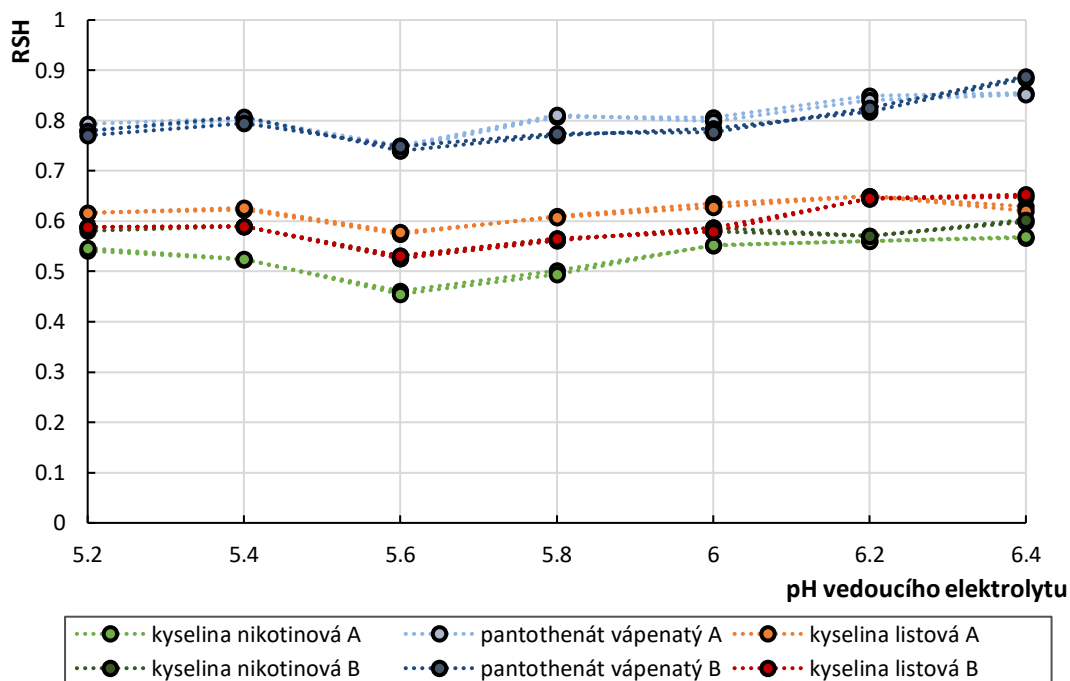
Obrázek 22: Analyzované vitamínové doplňky stravy^{eq-et}.

3.2.3 Výsledky a diskuze

3.2.3.1 Optimalizace podmínek separace

Jako první byla prováděna optimalizace elektrolytových systémů použitých k separaci vitamínů. Byl hledán takový elektrolytový systém, ve kterém je možné stanovit co nejvíce vitamínů během jedné analýzy. V aniontovém módu byla analyzována kyselina nikotinová,

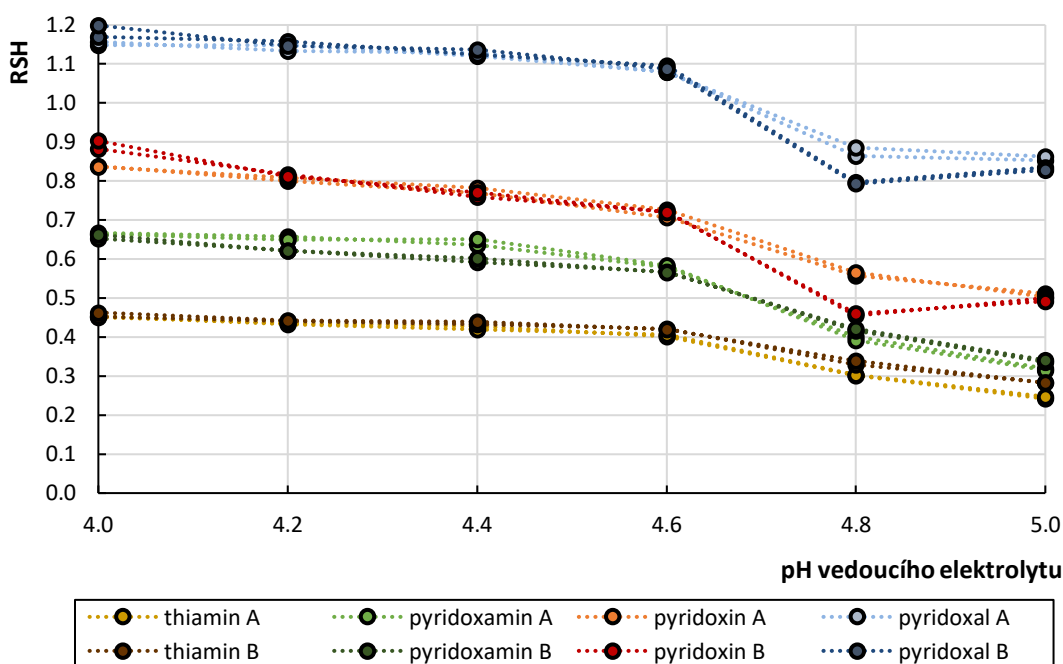
listová a pantothenát vápenatý. Vzhledem k jejich hodnotám pK_a (kyselina nikotinová 2,05 a 4,81 [145]; kyselina pantothenová 4,35 [206]; kyselina listová 2,16; 3,79; 4,47 a 7,90 [207]) byl vybrán mírně kyselý vedoucí elektrolyt složený z 10 mM histidin-chloridu s histidinem v rozmezí pH 5,2 – 6,4. Každý vitamín byl měřen samostatně (A) a ve směsi s ostatními vitamíny (B). Pouze při pH 6,2 a 6,4 bylo možné rozseparovat kyselinu nikotinovou a kyselinu listovou (Graf 19). Vzhledem k lepšímu rozlišení zón bylo pro další analýzy vybráno pH 6,2.



Graf 19: Závislost relativních výšek signálů vitamínů na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 5,2 – 6,4); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.

V kationtovém módu byl měřen thiamin, pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Vzhledem k tomu, že jsou tyto vitamíny stanovovány v protonované formě, je lepší je stanovovat v kyselém elektrolytovém systému. Byl tedy vybrán nejpoužívanější elektrolytový systém pro kyselou oblast, a to 10 mM octan draselný s kyselinou octovou k úpravě pH jako vedoucí elektrolyt a 10 mM kyselina octová jako koncový elektrolyt. Bylo zvoleno pH vedoucího elektrolytu v rozmezí od 4,0 do 5,0. V rozmezí pH od 4,0 do 4,6 docházelo k dobré separaci všech čtyř vitamínů, nicméně pyridoxal migroval pomaleji než koncový elektrolyt. Při pH 4,8 se dvojice pyridoxamin a thiamin během separace chovala nestandardně. Zóna pyridoxaminu předbíhala zónu thiaminu i přesto, že RSH pyridoxaminu bylo vyšší než RSH thiaminu. Tomuto jevu se říká vynucený izotachoforetický systém, kdy analyty migrují v opačném

pořadí, než jaké odpovídá pořadí jejich efektivních pohyblivostí v daném operačním systému [3]. Jako nejvhodnější se tedy jevílo pH 5,0, které bylo používáno při dalších experimentech (Graf 20).



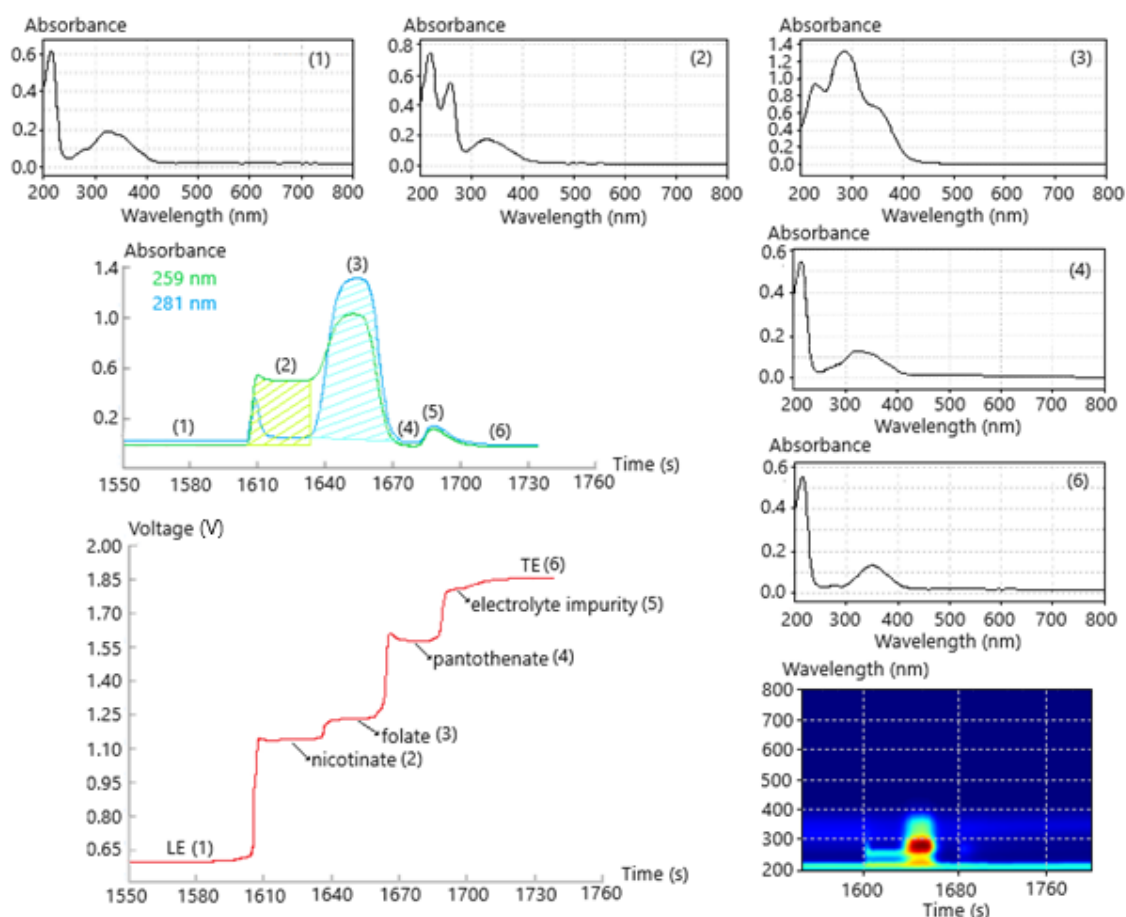
Graf 20: Závislost relativních výšek signálů vitamínů na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 4,0 – 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.2.3.2 Optimalizace spektrofotometrické detekce

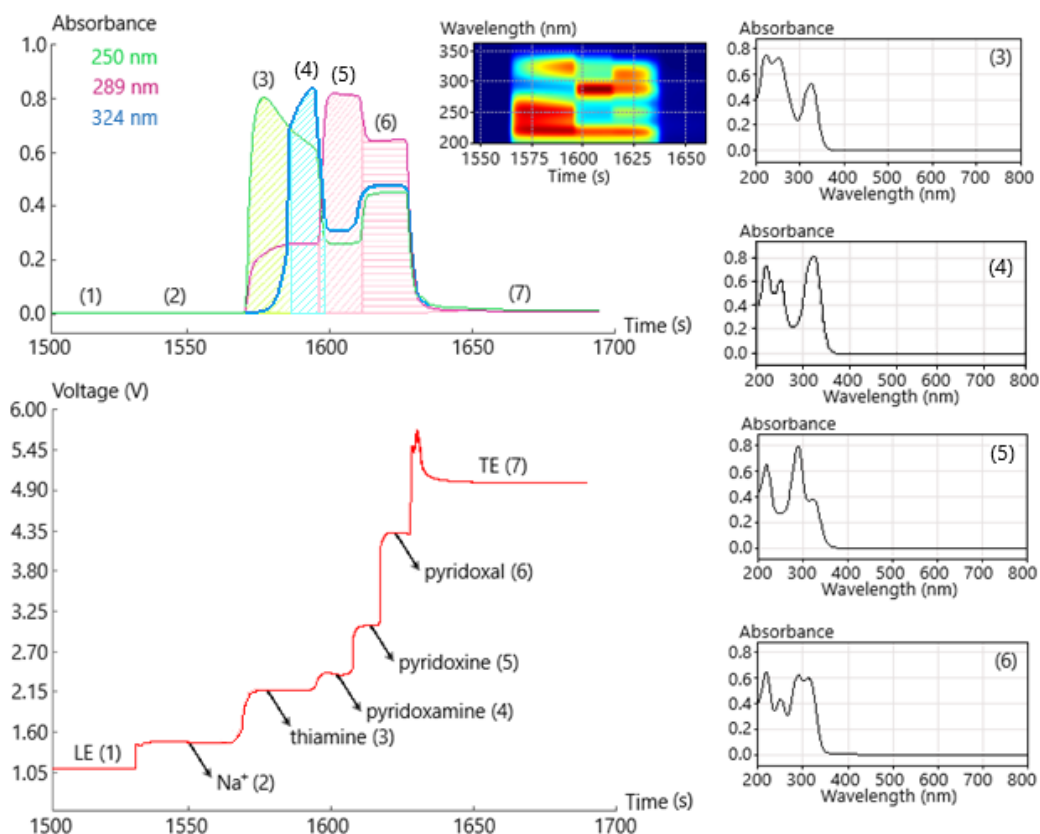
Po optimalizaci elektrolytového systému byla provedena optimalizace spektrofotometrické detekce, při které byly vybírány vlnové délky vhodné k detekci jednotlivých vitamínů.

V aniontovém módu jsou absorpční spektra vedoucího elektrolytu (histidin-chloridu s histidinem), koncového elektrolytu (MES) a pantothenátu téměř stejná, tzn. že pantothenát nelze za těchto podmínek spektrofotometricky detekovat. Kyselina nikotinová ve srovnání s předchozími vytváří další absorpční pás v oblasti mezi 239 a 285 nm s lokálním absorpčním maximem při 259 nm, které bylo vybráno pro její detekci. Kyselina listová absorbuje ze všech výše zmíněných látek nejvýrazněji, její absorpční spektrum je složeno ze tří pásů, z nichž prostřední má největší intenzitu. K detekci byla vybrána vlnová délka 281 nm, která je absorpčním maximem nejintenzivnějšího pásu a zároveň absorpčním maximem celého spektra (Obrázek 23).

V kationtovém módu je možné detekovat všechny čtyři stanovované vitamíny (tj. thiamin, pyridoxin, pyridoxal i pyridoxamin). Všechny zmíněné analyty absorbují v rozmezí od 200 do 350 nm. Thiamin má ve svém spektru tři lokální maxima, tj. 221 nm, 250 nm a 324 nm, z nichž nejvyšší absorbanci vykazuje při 221 nm, nicméně k detekci byla vybrána vlnová délka 250 nm z důvodu nižší absorpce ostatních analytů. Pyridoxamin má ve svém spektru rovněž tři maxima o vlnových délkách 219 nm, 250 nm a 324 nm, z nichž k detekci bylo vybráno absorpční maximum 324 nm, které je zároveň absorčním maximem celého spektra. Absorpční spektrum pyridoxinu má rovněž tři lokální maxima a to při 218 nm, 289 nm a 322 nm. K detekci byla vybrána vlnová délka 289 nm, při které pyridoxin absorbuje nejvíce. Pyridoxal má absorpční spektrum se čtyřmi absorpčními maximy při 218 nm, 250 nm, 289 nm a 312 nm. K detekci byla stejně jako v případě pyridoxinu vybrána vlnová délka 289 nm, při které u pyridoxalu dochází k přibližně stejné absorpci jako v případě 218 nm (Obrázek 24).



Obrázek 23: Záznam vodivostní a spektrofotometrické detekce pro analýzu standardních roztoků vitamínů sk. B o koncentraci 20 mg/l v aniontovém módu – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.



Obrázek 24: Záznam vodivostní a spektrofotometrické detekce pro analýzu standardních roztoků vitamínů sk. B o koncentraci 20 mg/l v kationtovém módu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.2.3.3 Validace metody

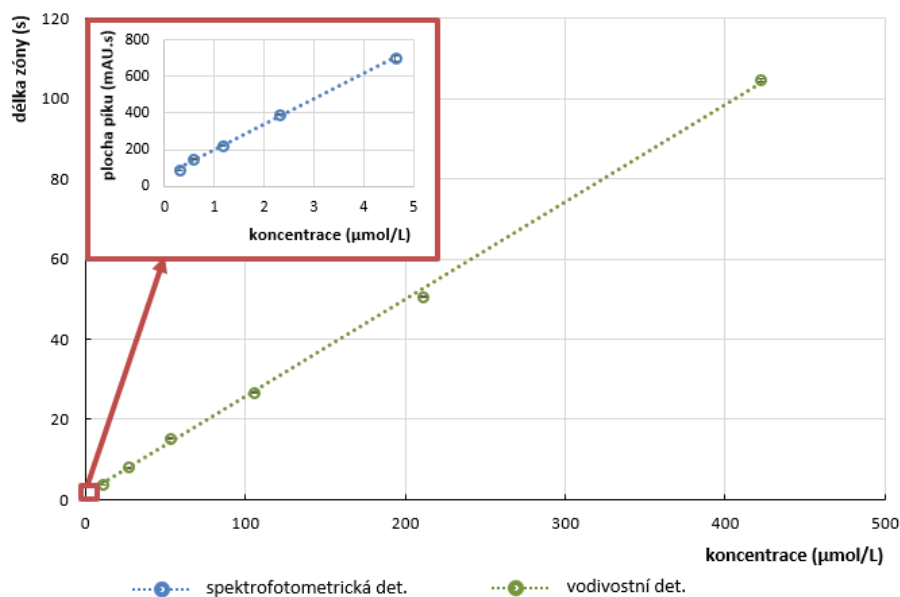
Linearita kalibrační závislosti

Kalibrační roztoky kyseliny nikotinové byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 11,6 mmol/l v případě spektrofotometrické detekce a 10,6 mmol/l v případě vodivostní detekce. Tyto zásobní roztoky byly následně naředěny na koncentrace 0,3; 0,6; 1,2; 2,3; 4,6 $\mu\text{mol/l}$ a 10,6; 26,4; 52,8; 105,6; 211,2; 422,4 $\mu\text{mol/l}$.

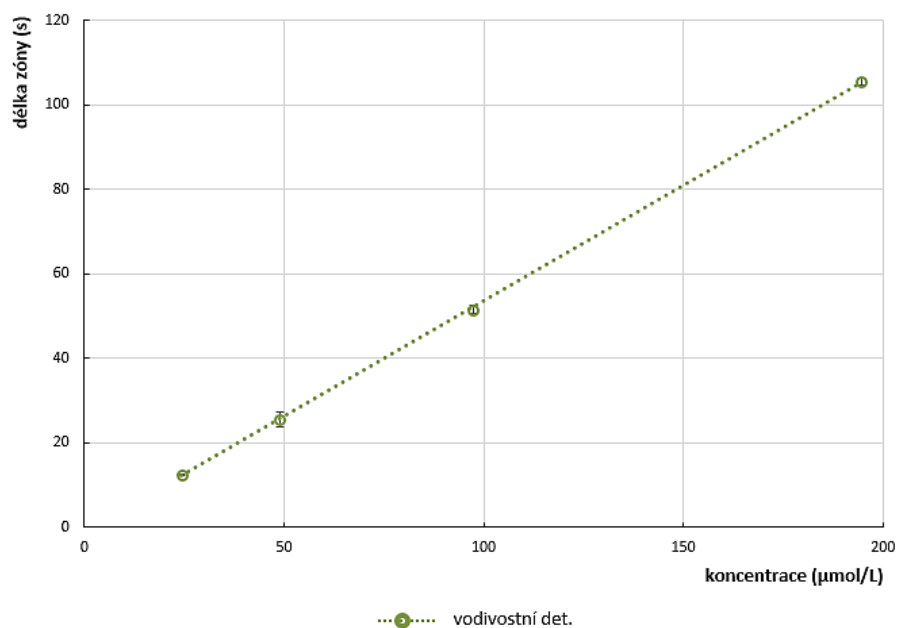
Kalibrační roztoky pantothenátu vápenatého byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 4,9 mmol/l na koncentrace 24,4; 48,8; 97,3; 194,6 $\mu\text{mol/l}$.

K sestavení kalibračních křivek kyseliny listové byly použity kalibrační roztoky o koncentracích 0,06; 0,1; 0,2; 0,5; 0,9; 2,4; 4,7 $\mu\text{mol/l}$ připravené ze zásobního roztoku o koncentraci 2,4 mmol/l a kalibrační roztoky o koncentracích 10,2; 27,8; 55,5; 101,0; 202,0; 404,0 $\mu\text{mol/l}$ připravené z 10,2 mmol/l zásobního roztoku.

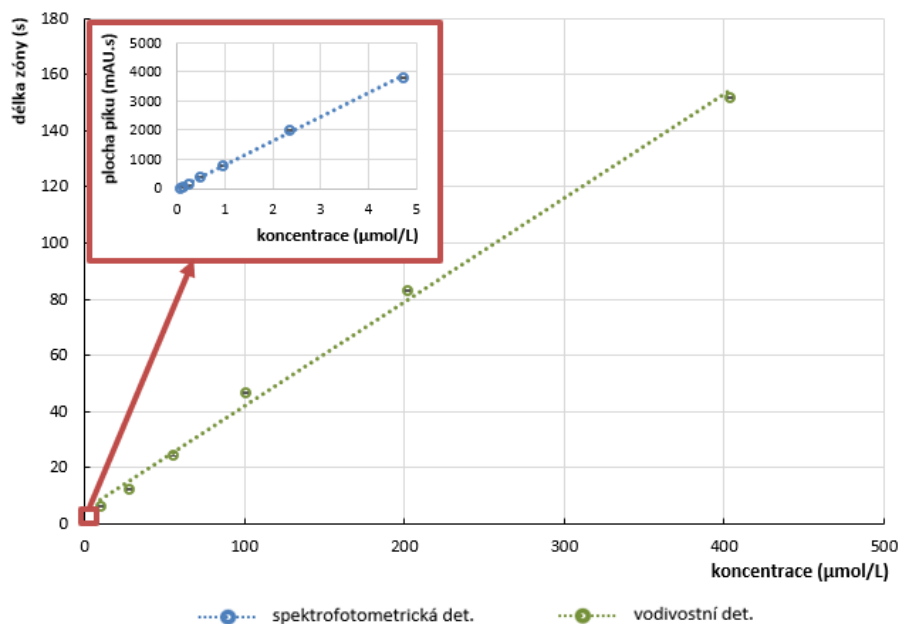
Všechny zmíněné kalibrační křivky jsou lineární v celých zvolených rozsazích koncentrací a lze je popsat rovnicemi uvedenými v Tabulce 16.



Graf 21: Kalibrační křivka kyseliny nikotinové – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; spektrofotometrická detekce při 259 nm, analytická kolona.



Graf 22: Kalibrační křivka pantothenátu vápenatého – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona.



Graf 23: Kalibrační křivka kyseliny listové – vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; spektrofotometrická detekce při 281 nm, analytická kolona.

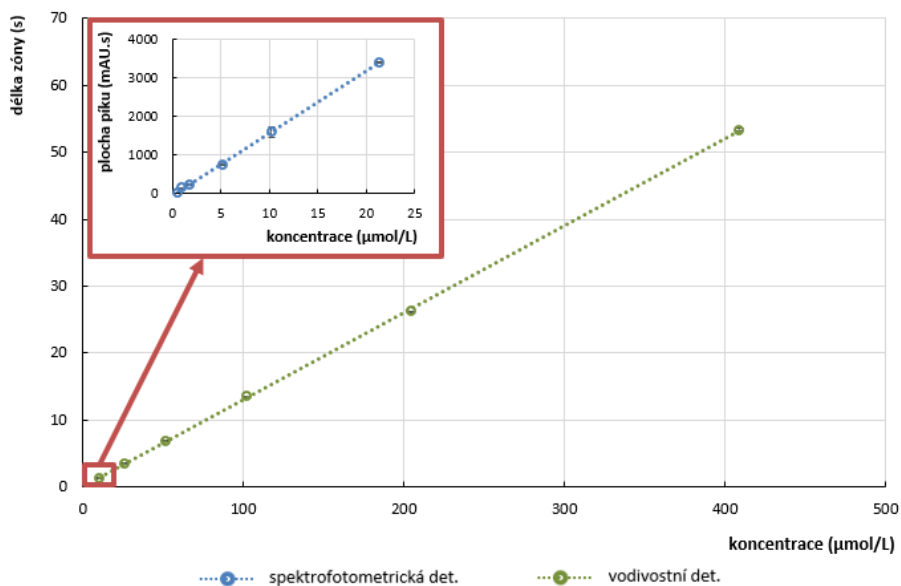
Kalibrační roztoky thiaminu byly pro spektrofotometrickou detekci připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 17,2 mmol/l na koncentrace 0,5; 0,9; 1,7; 5,1; 10,2 a 21,3 μmol/l. V případě vodivostní detekce byly kalibrační roztoky thiaminu připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 10,2 mmol/l na koncentrace 10,2; 25,6; 51,1; 102,2; 204,5 a 408,9 μmol/l.

Kalibrační křivka pyridoxinu měřená pomocí spektrofotometrické detekce byla sestrojena z kalibračních roztoků o koncentracích 1,6; 4,0; 8,0; 16,0 μmol/l připravených ředěním 4,0 mmol/l zásobního roztoku. Kalibrační roztoky o koncentracích 10,5; 26,2; 52,3; 104,6; 209,3; 418,6 μmol/l pro sestrojení kalibrační křivky měřené pomocí vodivostní detekce byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 10,5 mmol/l.

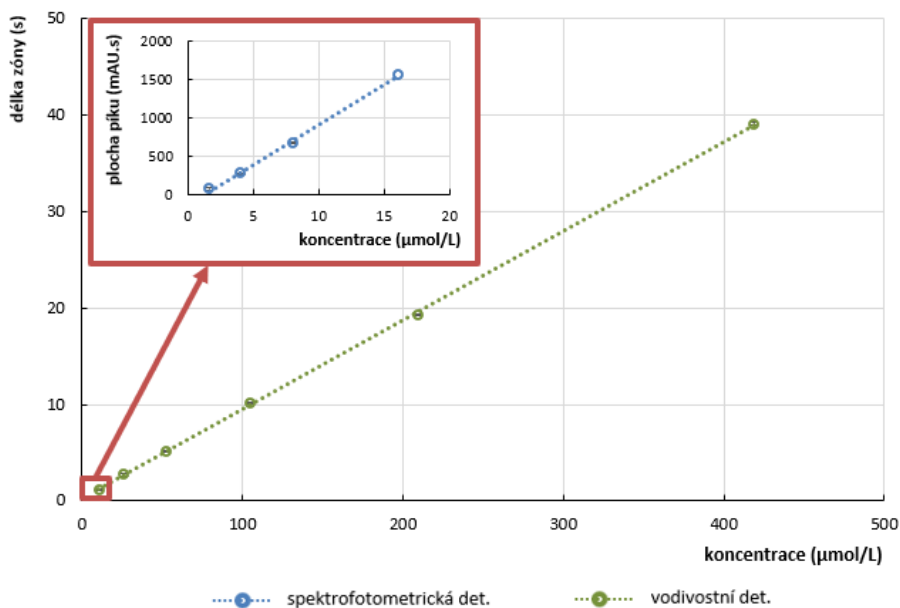
Zásobní roztok pyridoxalu, z něhož byly připraveny 0,9; 1,9; 4,7; 9,3 a 18,6 μmol/l kalibrační roztoky pro spektrofotometrickou detekci, měl koncentraci 4,6 mmol/l. Kalibrační roztoky o koncentracích 10,7; 26,7; 53,3; 106,6; 213,1 a 426,3 μmol/l použité pro vodivostní detekci byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 10,7 mmol/l.

Kalibrační roztoky o koncentracích 1,1; 2,2; 5,5; 11,0 a 21,9 μmol/l pyridoxaminu pro spektrofotometrickou detekci byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 5,5 mmol/l. Pro vodivostní detekci byly zvoleny kalibrační roztoky o koncentracích 12,0; 30,0; 60,1; 120,1; 240,2 a 480,4 μmol/l připravené ze zásobního roztoku o koncentraci 12,0 mmol/l.

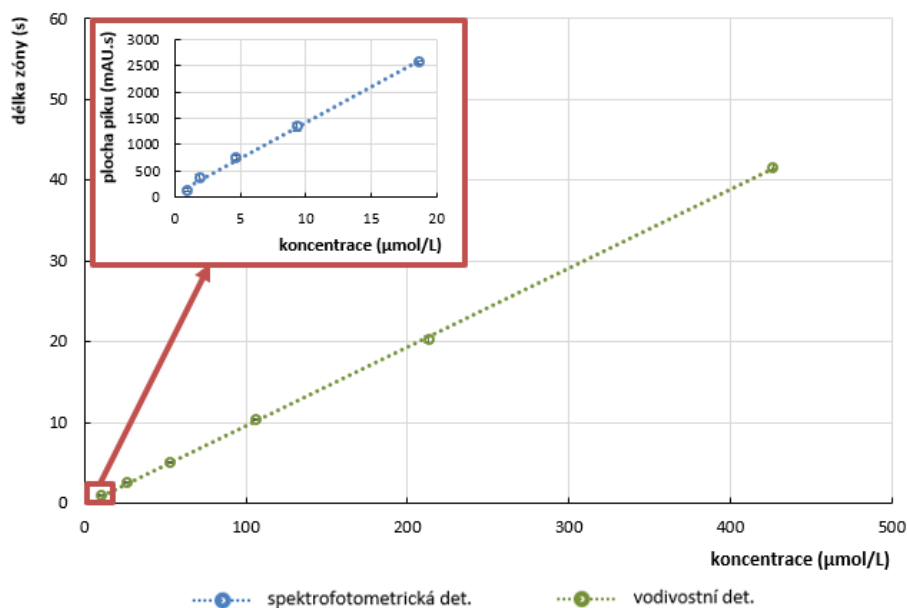
Všechny zmíněné kalibrační křivky jsou lineární v celých zvolených rozsazích koncentrací a lze je popsat rovnicemi uvedenými v Tabulce 17.



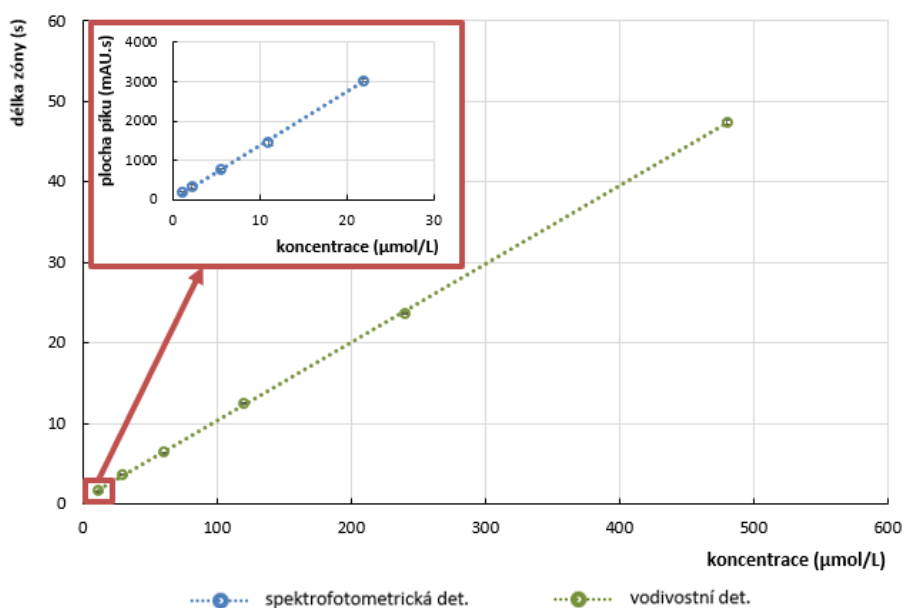
Graf 24: Kalibrační křivka thiaminu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 250 nm, analytická kolona.



Graf 25: Kalibrační křivka pyridoxinu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 289 nm, analytická kolona.



Graf 26: Kalibrační křivka pyridoxalu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 289 nm, analytická kolona.



Graf 27: Kalibrační křivka pyridoxaminu – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; spektrofotometrická detekce při 324 nm, analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Meze detekce a stanovení pro vodivostní detekci byly určeny stejným způsobem jako v předchozích případech. Mez stanovení v případě spektrofotometrické detekce byla určena jako koncentrace analytu poskytující pík o ploše 10 mAU·s a mez detekce byla následně

vypočtena jako třetina meze stanovení. V případě, že úsek kalibrační křivky byl kladný, byl pro účel zjištění meze stanovení nastaven na hodnotu 0.

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena pro každý analyt jako relativní směrodatná odchylka pěti po sobě následujících analýzách standardních roztoků o přibližné koncentraci 20 mg/l. V případě spektrofotometrické detekce byla měřena jak plocha, tak výška píků.

Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla stanovena analýzou standardních roztoků vitamínů o koncentraci 4,0 $\mu\text{mol/l}$ v případě spektrofotometrické detekce a 100 $\mu\text{mol/l}$ v případě vodivostní detekce a byla vypočítána jako poměr naměřené a skutečné koncentrace vynásobené 100, aby byla hodnota výtěžnosti udána v %. Pro výpočet naměřené koncentrace byla použita metoda kalibrační křivky.

Všechny výše zmíněné parametry metody jsou kvůli přehlednosti uvedeny v Tabulce 16 a Tabulce 17.

Tabulka 16: Parametry metody pro jednotlivé vitamíny aniontového charakteru

Vodivostní detekce			
	Kyselina nikotinová	Pantothénát vápenatý	Kyselina listová
RSH	0,570 ± 0,018	0,818 ± 0,016	0,644 ± 0,014
Kalibrační křivka L [s], c [$\mu\text{mol/l}$]	$L = 0,37 \cdot c + 4,84$	$L = 0,27 \cdot c - 1,19$	$L = 0,24 \cdot c + 1,46$
Výtěžnost [%]	99,3 ± 0,4	99,8 ± 1,5	99,3 ± 0,4
Opakovatelnost [%]	0,25	4,82	2,51
Limit detekce [$\mu\text{mol/l}$]	1,38	1,22	0,91
[$\mu\text{g/l}$]	169,9	267,5	401,7
Limit stanovení [$\mu\text{mol/l}$]	4,13	3,65	2,70
[$\mu\text{g/l}$]	509,7	802,5	1205,1
Spektrofotometrická detekce			
	Kyselina nikotinová	Pantothénát vápenatý	Kyselina listová
Vlnová délka [nm]	259 nm	/	281 nm
Kalibrační křivka S [mAU], c [$\mu\text{mol/l}$]	$S = 138,68 \cdot c + 63,01$		$S = 818,34 \cdot c - 14,79$
Výtěžnost [%]	99,5 ± 7,7		101,7 ± 6,4
Opakovatelnost* [%]	3,36 (3,98)		2,68 (0,76)
Limit detekce [$\mu\text{mol/l}$]	0,02		0,01
[$\mu\text{g/l}$]	2,6		4,4
Limit stanovení [$\mu\text{mol/l}$]	0,063		0,030
[$\mu\text{g/l}$]	7,8		13,3

* Hodnoty bez závorek byly získány měřením ploch píků a hodnoty v závorkách měřením výšek píků

Tabulka 17: Parametry metody pro jednotlivé vitamíny kationtového charakteru

Vodivostní detekce				
	Thiamin	Pyridoxin	Pyridoxal	Pyridoxamin
RSH	0,245 ± 0,004	0,508 ± 0,006	0,858 ± 0,006	0,318 ± 0,004
Kalibrační křivka L [s], c [μmol/l]	$L = 0,13 \cdot c + 0,16$	$L = 0,09 \cdot c + 0,27$	$L = 0,10 \cdot c + 0,04$	$L = 0,10 \cdot c + 0,65$
Výtěžnost [%]	106,9 ± 0,6	101,6 ± 0,2	108,9 ± 0,2	104,6 ± 0,2
Opakovatelnost [%]	0,90	0,40	3,71	0,30
Limit detekce [μmol/l]	2,58	3,60	3,44	3,44
[μg/l]	684,6	609,0	575,0	578,6
Limit stanovení [μmol/l]	7,74	10,80	10,32	10,32
[μg/l]	2053,8	1827,1	1725,1	1735,7
Spektrofotometrická detekce				
	Thiamin	Pyridoxin	Pyridoxal	Pyridoxamin
Vlnová délka [nm]	250	289	289	324
Kalibrační křivka S [mAU], c [μmol/l]	$S = 161,05 \cdot c - 46,09$	$S = 104,03 \cdot c - 126,42$	$S = 135,02 \cdot c + 79,09$	$S = 136,61 \cdot c + 7,82$
Výtěžnost [%]	103,7 ± 4,9	103,1 ± 10,5	101,7 ± 5,3	102,5 ± 6,1
Opakovatelnost* [%]	1,59 (1,05)	2,59 (1,20)	0,78 (0,71)	1,48 (3,14)
Limit detekce [μmol/l]	0,12	0,44	0,02	0,02
[μg/l]	30,8	74,0	3,9	4,1
Limit stanovení [μmol/l]	0,35	1,31	0,07	0,07
[μg/l]	92,4	221,6	11,8	12,3

* Hodnoty bez závorek byly získány měřením ploch píků a hodnoty v závorkách měřením výšek píků

3.2.3.4 Příprava a analýza vzorků

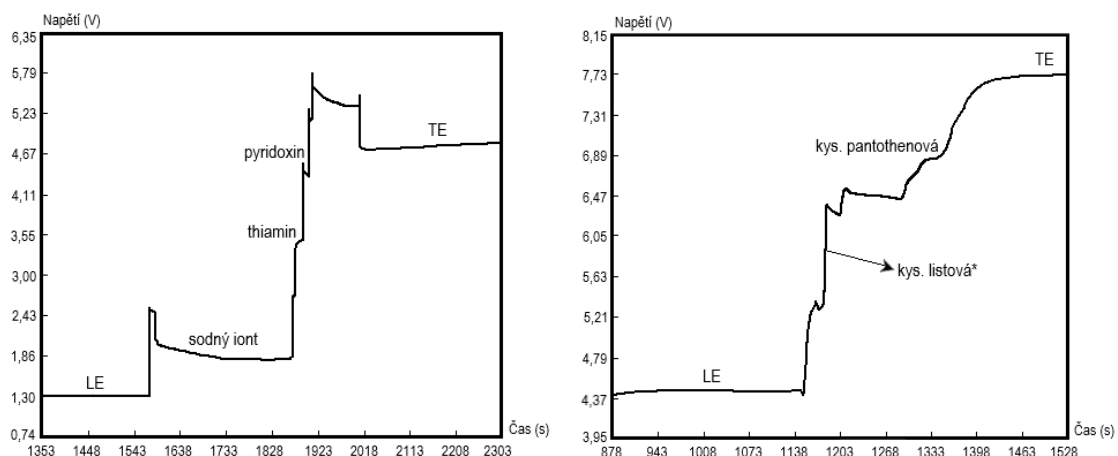
Jedna (v případě vzorků Biosil Plus, Acidum folicum a B-komplex forte), popř. dvě tablety (v případě vzorku B-Komplex Zentiva) byly rozdrceny pomocí tloučku v třecí misce. Vzniklý prášek byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Vzorek byl následně vhodně naředěn do další 50 ml odměrné baňky v závislosti na rozsahu kalibračních křivek. Obsah dvou vitamínových kapslí Imunofit byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou. Poté byl vzorek vhodně naředěn.

V případě analýz metodou standardního přídatku bylo před konečným doplněním 50 ml odměrných baněk destilovanou vodou přidáno 250 μl 10 mM standardního roztoku každého měřeného vitamínu.

Vzhledem k dostatečně vysokým koncentracím byla z časových důvodů pro analýzu vitamínových tablet použita pouze vodivostní detekce. Naměřené obsahy vitamínů spolu s obsahy deklarovanými výrobcem jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18: Obsah vitamínů v analyzovaných vzorcích

Vitamín	Obsah vitamínu (mg/tab) – metoda kalibrační křivky	Obsah vitamínu (mg/tab) – metoda standardního přídatku	Výrobce deklarovaný obsah vitamínu (mg/tab)
Biosil Plus			
Kyselina pantothenová	6,9 ± 0,4	6,8 ± 0,2	6,0
Acidum folicum Léčiva			
Kyselina listová	12,6 ± 0,7	9,4 ± 0,2	10,0
B-Komplex Zentiva			
Thiamin	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0
Pantothenát vápenatý	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,0
Pyridoxin	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0
B-komplex forte			
Thiamin	8,9 ± 0,1	10,3 ± 0,1	10,0
Kyselina pantothenová	43,6 ± 0,7	37,4 ± 0,4	40,0
Pyridoxin	9,8 ± 0,1	9,4 ± 0,1	10,0
Kyselina listová	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0
Imunofit			
Thiamin	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0
Pyridoxin	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0



Obrázek 25: Izotachforeogramy vzorku vitaminových tablet B-komplex forte – analýza kationtů (vlevo); vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona; analýza aniontů (vpravo); vedoucí elektrolyt: 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 6,2); koncový elektrolyt: 10 mM MES; analytická kolona. Obsah kyseliny listové byl stanovován z méně naředěného vzorku, proto je v obrázku vpravo uvedena pouze oblast, ve které lze pozorovat signál kyseliny, ale viditelná zóna zde chybí.

3.2.4 Závěr

Byla vypracována izotachforetická metoda pro stanovení sedmi vitamínů skupiny B během dvou analýz. Tři z nich, konkrétně kyselina nikotinová, pantothenát vápenatý a kyselina listová, byly stanoveny v aniontovém módu za použití 10 mM histidin-chloridu s histidinem (pH 6,2) jako vedoucího elektrolytu a 10 mM MES jako koncového elektrolytu. Zbylé čtyři, tj. thiamin, pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin, byly stanoveny jako kationty za použití elektrolytového systému složeného z 10 mM octanu draselného s kyselinou octovou k úpravě pH na hodnotu 5,0 sloužících jako vedoucí elektrolyt a koncového elektrolytu 10 mM kyseliny octové. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometrického a vodivostního detektoru. Metoda byla validována, její parametry jsou uvedeny výše v textu a splňují požadavky na běžně prováděné analýzy. Metoda byla vyzkoušena na vitaminových přípravcích, pro které se ukázala jako vhodná. V případě jednodušších matic s vyššími obsahy vitamínů může izotachforeza nahradit složitější a ekonomicky náročnější chromatografické techniky.

3.3 Izotachoforetické stanovení ethanolaminů ve vzorcích kosmetických a farmaceutických produktů [208–211]

3.3.1 Úvod

Ethanolaminy (monoethanolamin – MEA; diethanolamin – DEA; triethanolamin – TEA) jsou čiré viskózní bezbarvé až slabě nažloutlé kapaliny s amoniakálním zápachem, dobře mísitelné s vodou i řadou organických rozpouštědel. Vzhledem k přítomnosti aminové a hydroxylové skupiny mají podobné chemické vlastnosti jako aminy a alkoholy – s volnými kyselinami tvoří soli, hydroxylová skupina sloučeniny umožňuje tvorbu esterů [212]. Jejich základní vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 19. Vzhledem k tomu, že ethanolaminy našly rozsáhlé využití v řadě oborů, jsou průmyslově vyráběny ve velkých množstvích.

Tabulka 19: Základní vlastnosti ethanolaminů [212–215]

	MEA	DEA	TEA
mol. hmot. (g/mol)	61,08	105,14	149,19
teplota tání (°C)	10,3-10,5	28,0	21,6
teplota varu (°C)	171	268,8	335,4
hustota (g/cm ³)	1,0117	1,0966	1,1242
pK _a	9,5	8,88	7,76

Monoethanolamin, HOCH₂CH₂NH₂, je používán k výrobě činidel pro textilní a zemědělský průmysl, jako součást adheziv a je také součástí kovoobráběcích kapalin na vodní bázi, kde slouží jako inhibitor koroze. V kosmetice a farmaceutickém průmyslu je používán především k úpravě pH, jeho soli (salicylát a benzoát) slouží jako konzervanty. Obsah MEA v kosmetice není omezen, nicméně EU nařizuje, že MEA použitý k výrobě kosmetiky musí mít čistotu minimálně 99 % a může obsahovat maximálně 0,5 % sekundárních aminů a 50 µg/kg nitrosaminu a musí být uchováván v kontejnerech bez obsahu dusitanů [216]. Akutní i chronická toxicita MEA je mírná (orální letální dávka je 0,7 – 15 g/kg, stanoveno na myších a králících), při dermální aplikaci způsobuje podráždění kůže a její zčervenání, při aplikaci vyšších koncentrací (okolo 200 mg/kg) může dojít k nekróze kůže a k tvorbě strupů a jizev. Při orálním podání vysokých dávek MEA (850 mg/kg/den) v době březosti samic dochází k reprodukční a vývojové toxicitě, projevující se zvýšenou úmrtností matek a sníženou životaschopností mláďat. Studie o možné karcinogenitě nebyly provedeny. MEA je do těla vstřebáván přes kůži, perorálně i inhalačně, je metabolizován především v játrech, kde je zabudováván do fosfolipidů a dochází také

ke zvýšení jeho hladiny v krevní plazmě. Z organismu je vylučován převážně močí (cca 75 %) z 10 % v nezměněné podobě, ze 40 % je přeměněn na močovinu, z 20 % na glycin a minoritně také na serin, kyselinu močovou a cholin [213].

Diethanolamin, $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$, je používán k výrobě emulgačních a dispergačních činidel pro textilní a zemědělský průmysl, k výrobě vosků, minerálních a rostlinných olejů, parafinů, leštidel, ropných deemulgátorů a aditiv do cementů. Používá se také jako mazivo v textilním průmyslu, zvlhčující a změkčující prostředek na kůži, alkalizační přísada a surfaktant ve farmaceutickém průmyslu a absorbent kyselých plynů. V kosmetice je z důvodu tvorby karcinogenních nitrosaminů jeho použití zakázáno [217], může se v ní vyskytovat pouze jako nečistota v MEA, popř. v TEA. DEA je mírně toxický (orální letální dávka je 0,8 – 3 g/kg, stanoveno na potkanech a morčatech), při orálním podání v koncentracích vyšších než 125 mg/kg/den březím samicím vykazuje známky reprodukční a vývojové toxicity, projevující se snížením přírůstu hmotnosti matek, zvýšením úmrtnosti matek a snížením porodní hmotnosti mláďat. V současné době je klasifikován jako potenciální karcinogen pro člověka. DEA se do organismu vstřebává hlavně kůží a perorálně a dochází k jeho akumulaci v játrech (27 %) a ledvinách (5 %). Malá množství (do 0,5 %) se ukládají také ve slezině, mozku, srdci a krvi. Z organismu je vylučován převážně močí (22 %), stolicí je vyloučeno pouze 2,4 % vstřebaného DEA [214].

Triethanolamin, $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$, má široké spektrum aplikací, jako je výroba cementu, kosmetický a textilní průmysl nebo výroba léčiv. Je také přidáván do kapalin k obrábění kovů, chladicích kapalin, herbicidů a insekticidů [212]. V kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je TEA přidáván kvůli jeho emulgačním, neutralizačním a detergentním vlastnostem. Z tohoto důvodu je přítomen ve většině kosmetických produktů, jako jsou tělová mléka, šampony, mýdla, pěny na holení atd. a také v některých farmaceutických produktech, především v mastech, krémech a gelech [218, 219]. Nařízení EU stanovuje maximální obsah 2,5 % hm. TEA v kosmetických produktech, které jsou nanášeny na tělo a neoplachují se, pro produkty, které se oplachují, není obsah TEA omezen. Navíc čistota použitého TEA musí být minimálně 99 % s maximálním obsahem 0,5 % sekundárních aminů a 50 µg/kg nitrosaminu [216]. TEA je pro člověka mírně toxický, orální letální dávka se pohybuje v rozmezí 5 – 15 g/kg. Dále je prokázáno, že TEA může způsobit kontaktní alergie a podráždění očí. Karcinogenita TEA nebyla prokázána, nicméně v některých studiích bylo zjištěno, že v případě samic myši krmených TEA bylo zvýšené riziko vzniku jaterního tumoru [220]. TEA je rychle absorbován po orální a dermální aplikaci a je vylučován převážně nezměněn (95 %) močí (okolo 60 %)

a stolicí (okolo 20 %). Malé množství TEA může před vyloučením vytvářet konjugáty s kyselinou glukuronovou [220, 221].

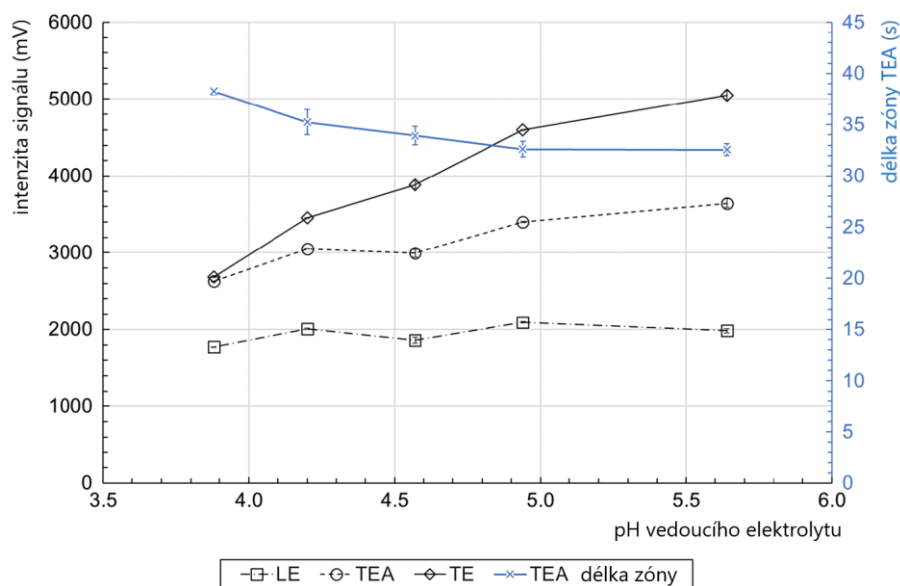
Ke stanovení obsahu ethanolinů v různých matricích byla navržena řada postupů využívajících především různých chromatografických [222–242], elektroseparačních [243, 244] a elektrochemických [245–247] technik.

Vzhledem k širokému využití MEA a TEA mj. v kosmetických přípravcích, se kterými se dostává do přímého a případně i dlouhodobého kontaktu s lidskou pokožkou, je vhodné mít možnost kontroly jejich obsahu. Kromě chromatografických postupů se nabízí i izotachofórze, jejíž výhodou jsou obvykle nízké nároky na přípravu vzorku k analýze, nižší finanční náklady a větší ekologičnost z důvodu nepřítomnosti organických rozpouštědel. Vzhledem k poměrně vysokým obsahům MEA a TEA v kosmetice příliš nevedí hlavní nevýhoda izotachofórze, kterou je poměrně vysoká mez stanovení. Obsahy DEA v kosmetice by ale měly být tak nízké, že jeho izotachoforetické stanovení bez předběžného oddělení od matrice vzorku a pravděpodobně i od MEA resp. TEA bude pravděpodobně obtížné až nemožné.

3.3.2 Použité chemikálie, materiál a instrumentace

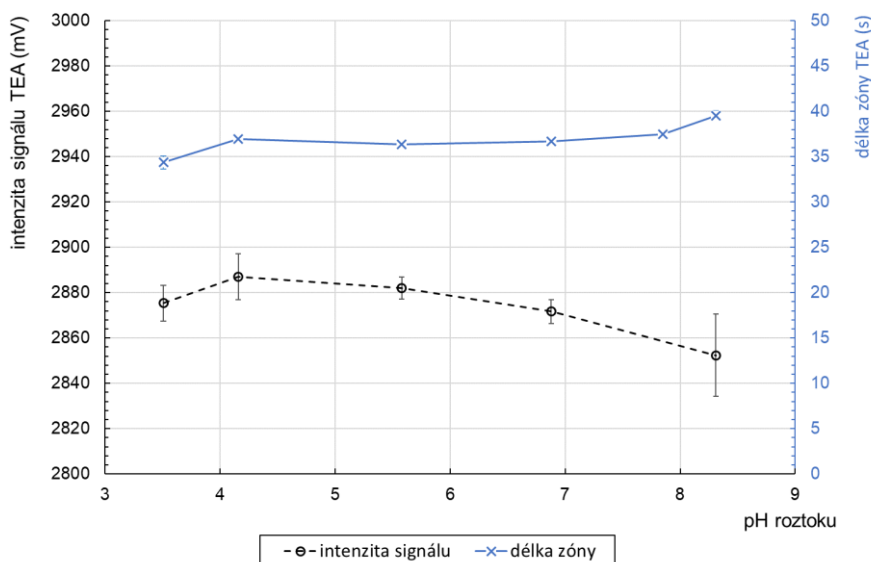
Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýzy byly prováděny v kationtovém módu za použití 10 mM octanu sodného, 0,05% HEC a kyseliny octové jako vedoucího elektrolytu (pH 4,6) a 10 mM kyseliny octové jako koncového elektrolytu. Separační proud v předseparační kapiláře byl nastaven na hodnotu 200 μA a v analytické kapiláře na 50 μA . Před detekcí byl v analytické kapiláře proud snížen na 30 μA . Detekce byla prováděna pouze pomocí vodivostního detektoru. Za těchto podmínek doba jedné analýzy nepřekročila 35 minut.

Jako vzorky byly použity farmaceutické a kosmetické přípravky s obsahem TEA. Bylo vybráno pět vzorků krémů – krém na ruce s měsíčkovým extraktem (ALPA a.s., Velké Meziříčí, ČR), odličovací krém True Colour (Avon, New York, USA, produkt vyroben v Polsku), Derma Guard bariérový krém (Bohumil Svoboda, Říčany, ČR), masážní krém Strong Power (RRmedik, Žilina, Slovensko), Ibalgin krém (Zentiva Group, a.s., Praha, ČR), dva vzorky gelů – gel na holení Gillette Fusion ProGlide gel (Procter&Gamble, Cincinnati, USA), gel na vlasy Garnier Fructis Style (L'Oréal, Paříž, Francie), tělový peeling (Avon, New York, USA, produkt vyroben v Polsku), hydratační sprej (Avon, New York, USA, produkt vyroben v Polsku) a chladičový roll-on Altermed antisectin (Omega Pharma a.s., Brno, ČR).



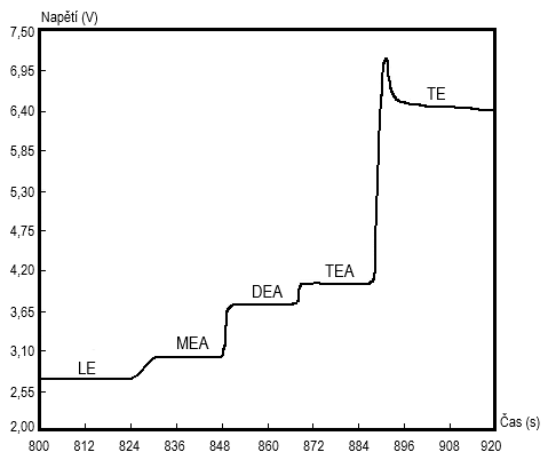
Graf 28: Závislost intenzity signálů a délky zóny TEA na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztok TEA; předseparační kolona.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo pH roztoku standardu, popř. vzorku. Kvůli potřebě protonace TEA bylo předpokládáno, že okyselením roztoku by mohlo dojít ke zlepšení separačního procesu. Tento předpoklad nebyl experimentálně potvrzen. Bylo zjištěno, že vliv pH roztoku na separaci je minimální. Intenzita signálu a délka zóny TEA byla ve všech případech téměř stejná (Graf 29), ale i přesto byl roztok okyselován pomocí konc. kyseliny octové na pH 4.



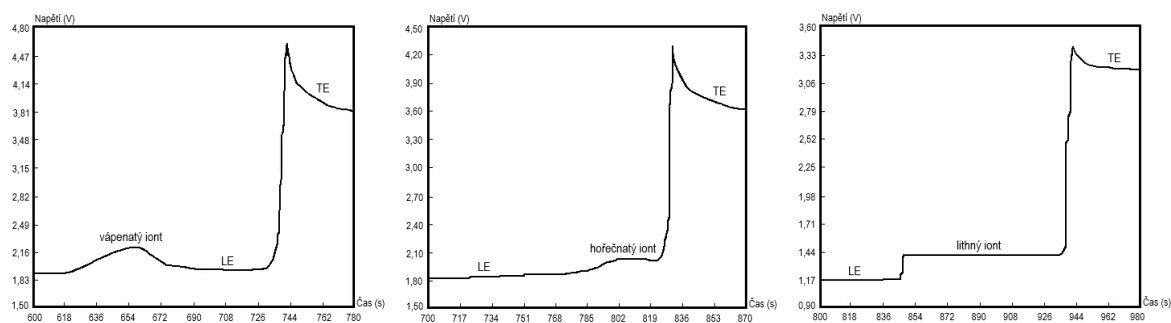
Graf 29: Závislost intenzity signálů a délky zóny TEA na pH dávkovaného roztoku – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztok TEA; předseparační kolona.

Dále byla za výše zmíněných podmínek vyzkoušena analýza ekvimolární směsi MEA, DEA a TEA (Obrázek 27). Nejvyšší mobilitu z ethanolaminů má MEA, následuje DEA a nejpomalejší je TEA. V případě ekvimolární směsi jsou délky zón všech tří ethanolaminů téměř stejné.



Obrázek 27: Izotachoforeogram směsi 0,5 mM ethanolaminů – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová, předseparační kolona.

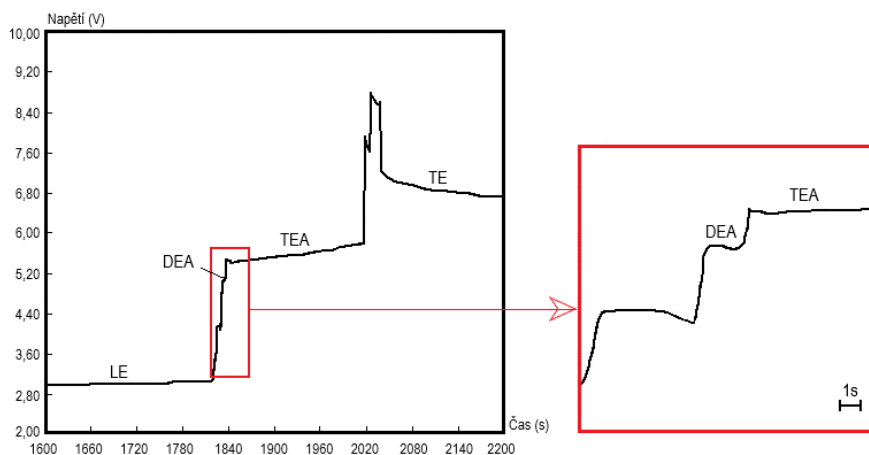
Následně bylo zjišťováno, zda některý z iontů běžně přítomných v kosmetice neruší stanovení ethanolaminů. Za tímto účelem byly analyzovány 1 mM roztoky vápenatých, hořečnatých a lithných iontů (Obrázek 28). Bylo zjištěno, že žádný z těchto iontů netvoří směšnou zónu s ethanolaminy. Mobilita MEA (RSH 0,150), DEA (RSH 0,230) i TEA (RSH 0,299) je výrazně nižší než mobilita vybraných iontů (vápník migruje před vedoucím iontem, RSH hořčíku je 0,028 a RSH lithia 0,108).



Obrázek 28: Izotachoforeogramy vybraných iontů – 1 mM standardní roztoky vápenatých iontů, hořečnatých iontů a lithných iontů; vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; předseparační kolona.

Vzhledem k tomu, že kosmetika určená pro člověka nesmí obsahovat více než 0,5 % hm. DEA ve srovnání s TEA [216], bylo zjišťováno i to, jestli lze tak malé množství DEA v TEA ještě detekovat. V případě čistého roztoku TEA a DEA ve vodě je to možné a podařilo

se to i v kosmetickém přípravku Altermed antisectin chladivý roll-on (bylo přidáno 0,5 % hm. DEA, v čistém přípravku nebyl DEA detekován, Obrázek 29). Obecně je ale nutné si možnost detekce DEA v TEA při tak nepříznivém poměru ověřit pro každý analyzovaný kosmetický přípravek.



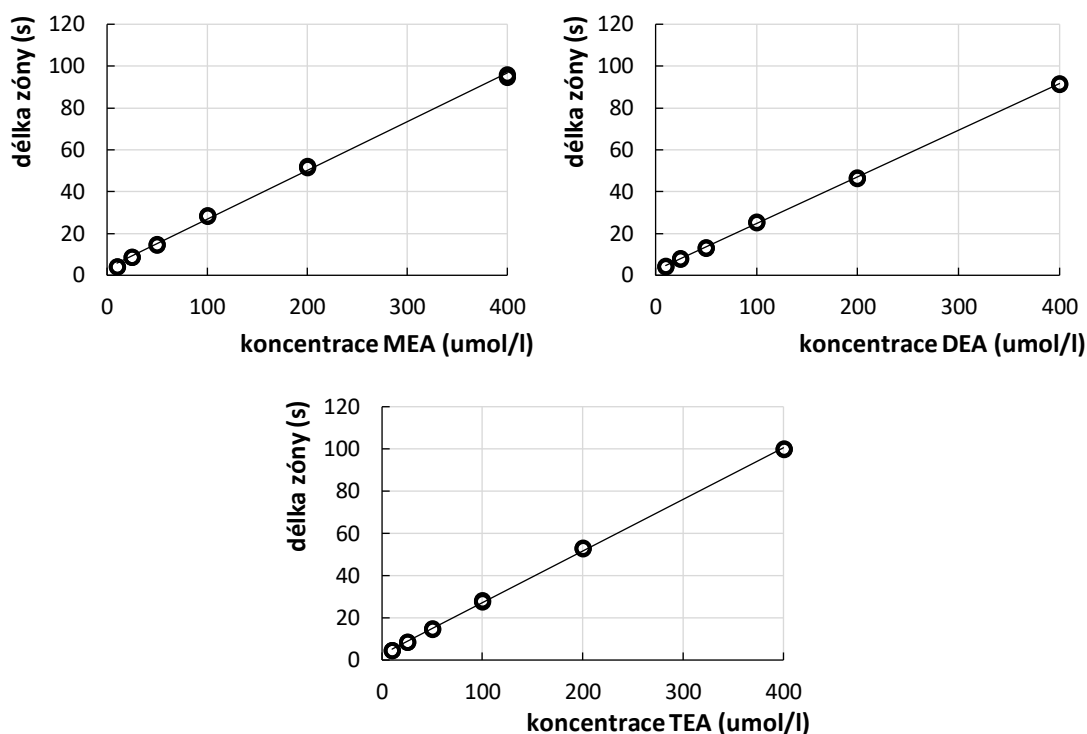
Obrázek 29: Izotachoforeogram vzorku Altermed Antisectin s přidavkem 0,5 % DEA ve srovnání s TEA – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.3.3.2 Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibračních roztoků byly použity zásobní roztoky MEA, DEA a TEA o koncentraci 10 mmol/l. Z těchto roztoků byly pipetováním příslušných objemů do 50 ml odměrných baněk připraveny roztoky o koncentracích 10, 25, 50, 100, 200 a 400 $\mu\text{mol/l}$. Baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku a vzniklé roztoky byly okyseleny konc. kyselinou octovou na pH 4. Takto připravené kalibrační roztoky byly analyzovány a byly sestrojeny kalibrační křivky (Graf 30).

Ve zvoleném rozmezí koncentrací lze kalibrační křivku MEA popsat rovnicí přímky $y [\text{s}] = 0,233 \times [\mu\text{mol/l}] + 3,481$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9981$, kalibrační křivku DEA rovnicí $y [\text{s}] = 0,223 \times [\mu\text{mol/l}] + 2,438$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$ a kalibrační křivku TEA rovnicí $y [\text{s}] = 0,245 \times [\mu\text{mol/l}] + 2,734$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9995$.



Graf 30: Kalibrační křivky ethanolaminů – vedoucí elektrolyt 10 mM octan sodný + kyselina octová + 0,05% HEC (pH 4,6); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Mez detekce a stanovení byla určena stejným způsobem jako v předchozích případech a pro všechny ethanolaminy je přibližně rovna 1,5 μmol/l, resp. 4,5 μmol/l.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena pouze pro TEA jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z deseti po sobě následujících měření standardního roztoku o koncentraci 0,2 mmol/l okyseleného kyselinou octovou na pH 4. Hodnota opakovatelnosti je za těchto podmínek rovna 3,53 %.

Výtěžnost (správnost)

Výtěžnost byla stanovena analýzou standardního roztoku TEA o koncentraci 50 μmol/l a byla vypočítána jako poměr naměřené a skutečné koncentrace vynásobené 100, aby byla hodnota výtěžnosti udána v %. Pro výpočet naměřené koncentrace byla použita metoda kalibrační křivky a metoda vícenásobného standardního přídávku (2 přídávky každý o koncentraci 50 μmol/l). Hodnota výtěžnosti byla v případě kvantifikace pomocí kalibrační křivky rovna 109,0 ± 2,8 % a v případě standardního přídávku 96,0 ± 3,6 %. Vzhledem k tomu, že se hodnoty výtěžností blíží 100 %, byla prokázána vhodnost metody ke stanovení

TEA a tato metoda byla následně aplikována na vzorky farmaceutických a kosmetických produktů.

3.3.3.3 Příprava a analýza vzorků

Navážené množství vzorku (přibližně 0,2 g) bylo převedeno do 50 ml odměrné baňky s 45 ml destilované vody. K tomuto obsahu byla ještě přidána 1 M kyselina octová k úpravě pH na hodnotu 4. Takto připravený roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně, kde byl sonifikován, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění vzorku. Následně byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Všechny takto připravené vzorky byly analyzovány v předem optimalizovaném elektrolytovém systému popsáném výše.

Z důvodu potřeby navážení co nejmenšího množství vzorku za účelem vyhnutí se tvorby suspenze s lipidovými bázemi z kosmetických a farmaceutických přípravků, byly analýzy vzorků prováděny v analytické koloně, která poskytuje nižší limity stanovení než předseparační kolona. Nicméně vzorky s vysokým obsahem TEA, tj. přibližně 0,2 % hm. a vyšším, je možné analyzovat pouze v předseparační koloně s mírně horší hodnotou opakovatelnosti (cca 5 % místo 3,5 %).

Ke kvantifikaci obsahu TEA byly použity dvě metody – metoda kalibrační křivky a metoda vícenásobného standardního přídatku (dva přídatky, každý o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$). Naměřené obsahy TEA jsou uvedeny v Tabulce 20. Bohužel reálný obsah TEA není na obalech přípravků uveden, a proto bylo pouze kontrolováno, zda obsah TEA není vyšší než povoluje EU, tj. 2,5 % hm. pro produkty, které jsou nanášeny na kůži a neoplachují se (v Tabulce 20 označeny žlutě).

Tabulka 20: Obsah TEA v analyzovaných vzorcích

Název vzorku	Obsah TEA (% hm.) – metoda kalibrační křivky	Obsah TEA (% hm.) – metoda standardního přídatku
Krém na ruce s měsíčkovým extraktem	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Odličovací krém True Colour	0,23 ± 0,02	0,29 ± 0,02
Derma Guard bariérový krém	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Masážní krém Strong Power	1,43 ± 0,03	1,38 ± 0,01
Ibalgin krém	0,37 ± 0,01	0,43 ± 0,01
Gel na holení Gillette Fusion ProGlide	6,61 ± 0,11	6,06 ± 0,16
Gel na vlasy Garnier Fructis Style	1,52 ± 0,02	1,42 ± 0,02
Tělový peeling Avon	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,03
Hydratační sprej Avon	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Chladivý roll-on Altermed antisectin	0,54 ± 0,02	0,46 ± 0,01

3.3.4 Závěr

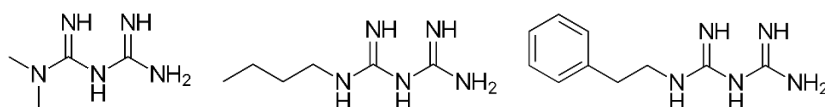
Byla vyvinuta izotachforetická metoda pro stanovení ethanolaminů ve farmaceutických a kosmetických produktech. Pomocí této metody jsou ethanolaminy stanoveny jako kationty, tj. protonované, za použití elektrolytového systému složeného z 10 mM octanu sodného s 0,05% HEC a kyselinou octovou k úpravě pH na hodnotu 4,6 jako vedoucího elektrolytu a 10 mM kyseliny octové jako koncového elektrolytu. V tomto elektrolytovém systému byly určeny následující parametry metody: mez detekce ethanolaminů přibližně 1,5 $\mu\text{mol/l}$, mez stanovení 4,5 $\mu\text{mol/l}$, opakovatelnost 3,5 %, výtěžnost blízká 100 % a lineární rozsah v rozmezí dvou koncentračních řádů (10 – 400 $\mu\text{mol/l}$). Metoda byla odzkoušena na reálných vzorcích komerčně dostupných farmaceutických a kosmetických přípravků s deklarovanou přítomností TEA. Vyvinutá metoda by mohla být vhodná pro praktické použití.

3.4 Izotachoforetické stanovení biguanidových antidiabetik ve vzorcích léčiv obsahujících metformin jako účinnou látku [248]

3.4.1 Úvod

Biguanidy jsou léčiva rostlinného původu, která jsou hojně používána k léčbě diabetu mellitu typu 2 od 50. let minulého století. Mezi tuto skupinu antidiabetik řadíme metformin, buformin a fenformin. Metformin je v dnešní době k léčbě diabetu typu 2 lékem první volby a zároveň je také celosvětově nejpředepisovanějším lékem k léčbě tohoto onemocnění. Kromě léčby diabetu typu 2 je metformin používán jako podpůrný lék k léčbě syndromu polycystických ovárií a těhotenského diabetu. Další dva zmíněné biguanidy přestaly být klinicky používané kvůli vysokému riziku vzniku laktátové acidózy u pacientů léčících se těmito léky. Metformin byl z amerického trhu také na nějakou dobu stažen, ale poté, co byla potvrzena jeho bezpečnost, byl na trh v roce 1995 znovu uveden [249].

Metformin působí především v játrech, kde inhibuje glukoneogenezi blokováním mitochondriálního redoxního transportu. Nicméně celý mechanismus účinku není zatím zcela jasný, protože metformin působí na celou řadu orgánů a jeho účinky jsou rozmanité. Metformin je po orální aplikaci vstřebáván v gastrointestinálním traktu přibližně ze 70 – 80 %, zbytek je vyloučen stolicí. Metformin je po vstřebání v organismu rychle distribuován a akumuluje se v jícnu, žaludku, tenkém střevě, slinných žlázách a ledvinách. Data získaná z pokusů na myších dokazují, že hlavní depotní tkáň pro metformin je tkáň tenkého střeva. Metformin v lidském těle není pravděpodobně metabolizován, pouze jedna studie uvádí, že může procházet určitou transformací, nicméně žádné jeho metabolity ani konjugáty nebyly identifikovány. Vylučování metforminu probíhá ledvinami a je vyloučeno pouze méně než 5 % z požití dávky [249, 250].



Obrázek 30: Struktury metforminu (vlevo)^{fe}, buforminu (uprostřed)^{ff} a fenforminu (vpravo)^{fg}.

Metod ke stanovení metforminu je několik, nejčastěji používanou technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, převážně s hmotnostní detekcí. Touto technikou byl stanovován metformin v lidské plazmě [251–256], moči [254, 257], povrchové vodě [258–262] a farmaceutických přípravcích [263–266]. Z dalších technik byla ke stanovení metforminu ve farmaceutických přípravcích použita kapilární zónová elektroforéza [267] a vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie [268]. Izotachoforéza je další možností

ke stanovení metforminu ve farmaceutických přípravcích, nicméně žádná publikace zabývající se touto problematikou ještě nebyla publikována. Z tohoto důvodu byla vytvořena a optimalizována metoda popsaná níže, která se zabývá simultánní analýzou metforminu, buforminu a fenforminu.

3.4.2 Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Analýzy byly prováděny v kationtovém systému s vedoucím elektrolytem složeným z 10 mM octanu draselného s přidavkem kyseliny octové (pH 5,0) a koncovým elektrolytem 10 mM kyselinou octovou. Hnací proud v předseparační koloně byl nastaven na hodnotu 300 μ A a v analytické koloně na 50 μ A. Detekce byla prováděna pomocí vodivostního a spektrofotometrického detektoru. Byla zaznamenávána spektra všech analytů v rozmezí vlnových délek 200 – 800 nm, pro kvantifikaci obsahu analytů byla vybrána vlnová délka absorpčních maxim analytů, tj. 230 nm. Za těchto podmínek doba jedné analýzy nepřekročila 25 minut.

Jako vzorky byla použita léčiva od různých výrobců obsahující metformin jako účinnou látku, která byla na lékařský předpis zakoupena v lékárně. Byly vybrány potahované tablety Siofor 500 (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo) s obsahem metforminu 390 mg v 1 tabletě, potahované tablety Siofor 850 (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo) s obsahem 662,9 mg metforminu v tabletě, potahované tablety Siofor 1000 (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo) s obsahem 780 mg metforminu v tabletě, potahované tablety Stadamet 850 (STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel, Německo) s obsahem 662,9 mg metforminu v tabletě a tablety s postupným uvolňováním Glucophage XR 500 mg (Merck Serono, Lyon, Francie) s obsahem 390 mg metforminu v tabletě.



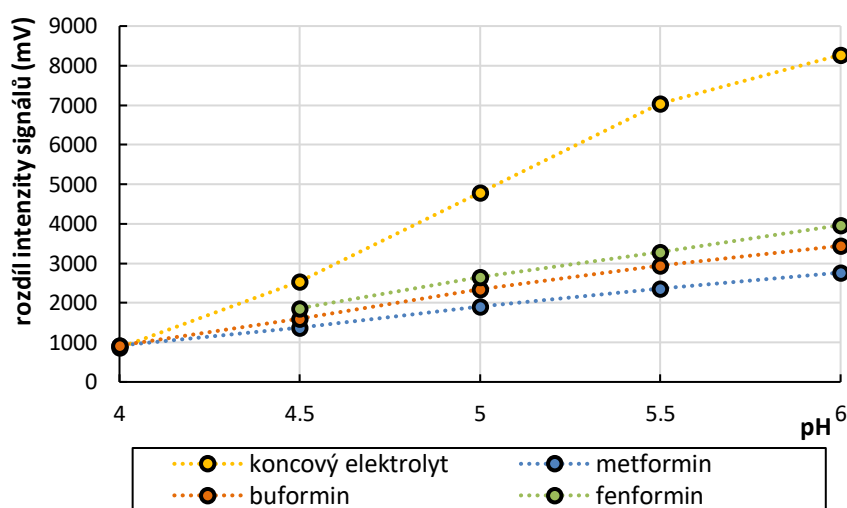
Obrázek 31: Analyzované vzorky antidiabetických léčiv s různým obsahem metforminu^{fh-fl}.

3.4.3 Výsledky a diskuze

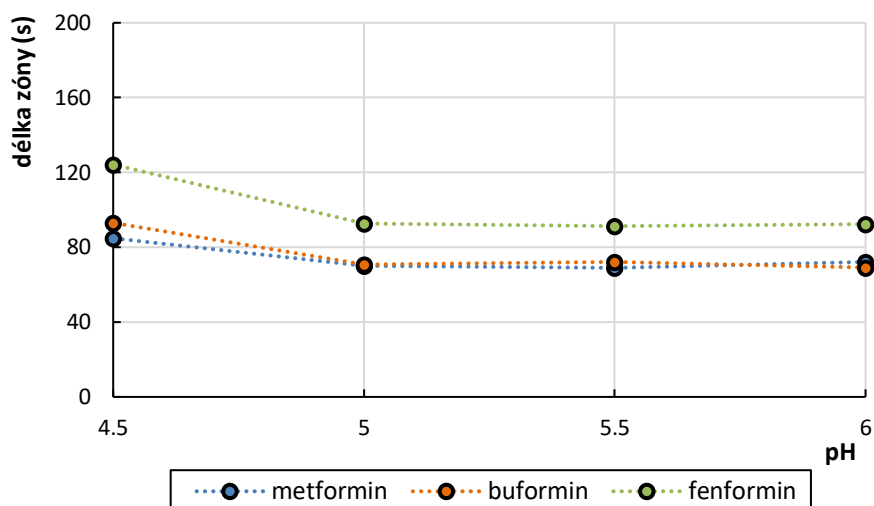
3.4.3.1 Optimalizace podmínek separace

K analýze směšného standardu metforminu, buforminu a fenforminu byl použit kationtový mód s běžně používaným elektrolytovým systémem složeným z vedoucího

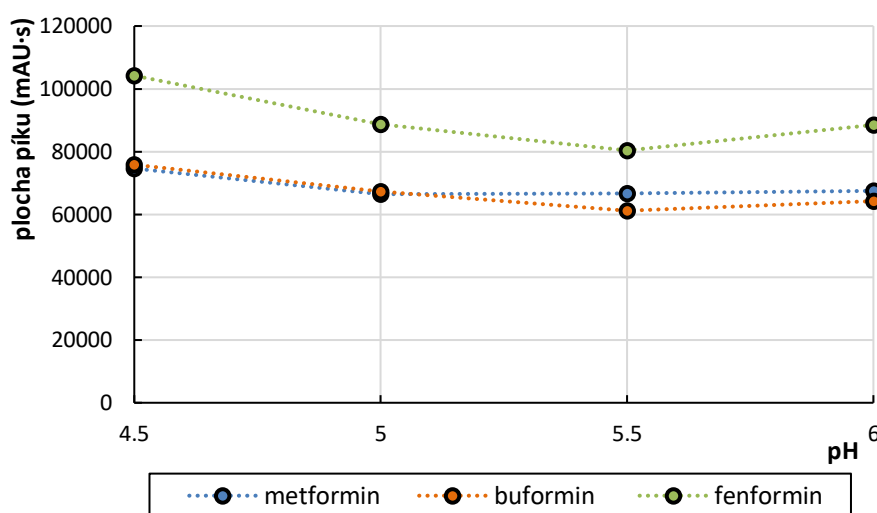
elektrolytu 10 mM octanu draselného s kyselinou octovou k úpravě pH na hodnotu 6,0 a koncového elektrolytu tvořeného 10 mM kyselinou octovou. V tomto elektrolytovém systému bylo možné separovat všechny tři výše zmíněné analyty, a proto byl dále zkoumán pouze vliv pH vedoucího elektrolytu, kterým lze nejvíce ovlivnit separační proces. Bylo vyzkoušeno pět různých hodnot pH a sice 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 a 6,0. Po proběhlé separaci byl nejprve stanoven rozdíl intenzity signálů analytů a vedoucího elektrolytu, který je uveden v Grafu 31. Z tohoto grafu je patrné, že vedoucí elektrolyt o pH 4,0 není vhodný pro tuto analýzu, neboť pohyblivosti biguanidů jsou příliš vysoké a dochází téměř ke splnutí zón metforminu, buforminu a koncového elektrolytu, zóna fenforminu není vůbec přítomná, protože fenformin migruje pomaleji než koncový elektrolyt. Vedoucí elektrolyty o pH 4,5 – 6,0 je možné k analýze použít, nicméně při pH 4,5 a 5,0 jsou jednotlivé zóny vzájemně ostřeji ohraničené. Nakonec bylo vybráno pH 5,0 z důvodu vyššího odstupu koncového elektrolytu od fenforminu oproti pH 4,5. Nicméně v případě potřeby dosažení nižší meze stanovení je výhodnější použít pH 4,5, jelikož při tomto pH je délka zón biguanidů nejdelší (Graf 32), a tudíž je největší i plocha píků (Graf 33) získaných spektrofotometrickou detekcí. Biguanidy jsou látky, které absorbují záření v oblasti přibližně od 200 do 260 nm, jejich absorpční maximum je ve všech případech při 230 nm (Obrázek 32). Z tohoto důvodu je možné použít jak vodivostní, tak spektrofotometrickou detekci, která umožňuje stanovení minimálně o řád nižších koncentrací.



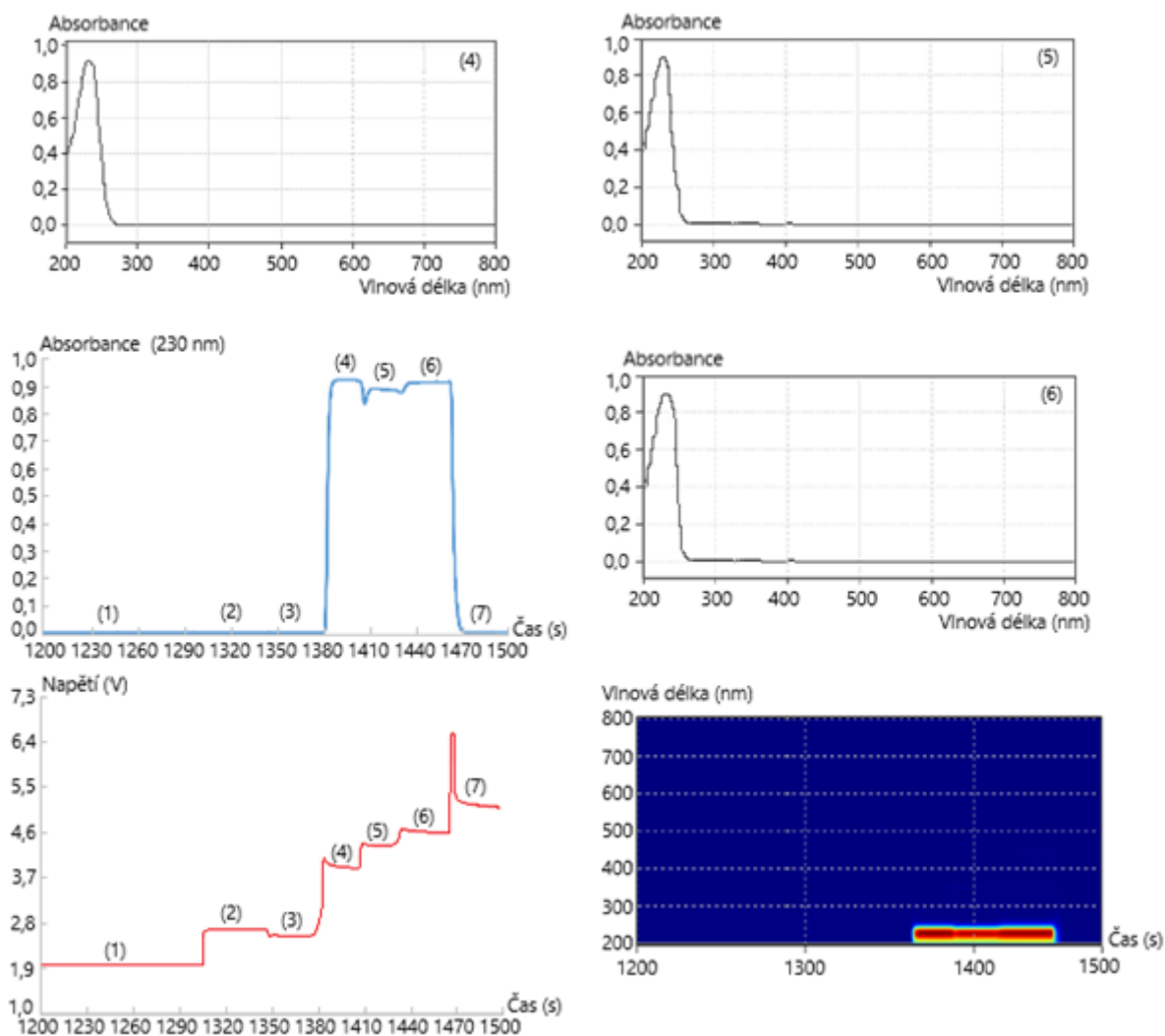
Graf 31: Závislost rozdílů intenzity signálů analytů a vedoucího elektrolytu na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.



Graf 32: Závislost délek zón analytů na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.



Graf 33: Závislost ploch signálů analytů na pH vedoucího elektrolytu – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; vlnová délka detekce 230 nm; analytická kolona.



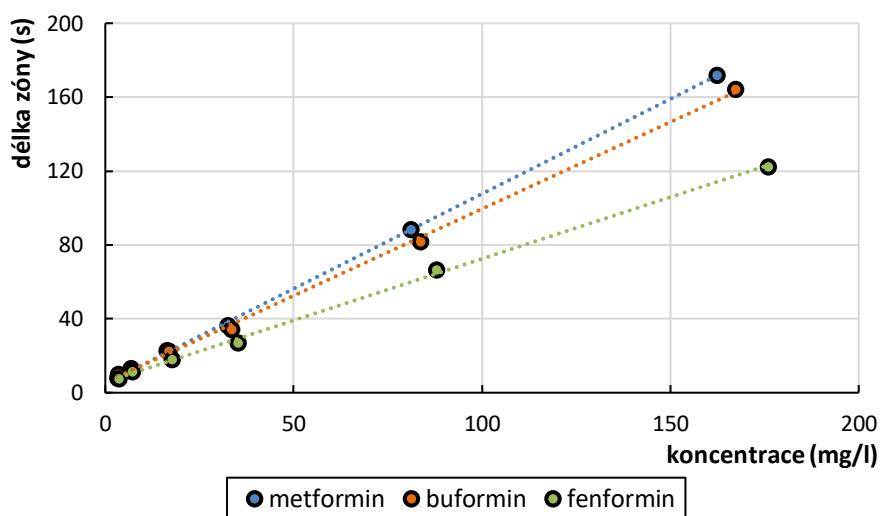
Obrázek 32: Analýza biguanidů – vodivostní a spektrofotometrická detekce; vedoucí iont K^+ (1); Mg^{2+} (2), Na^+ (3), metformin (4), buformin (5), fenformin (6), koncový iont H^+ (7); vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; analytická kolona.

3.4.3.2 Validace metody

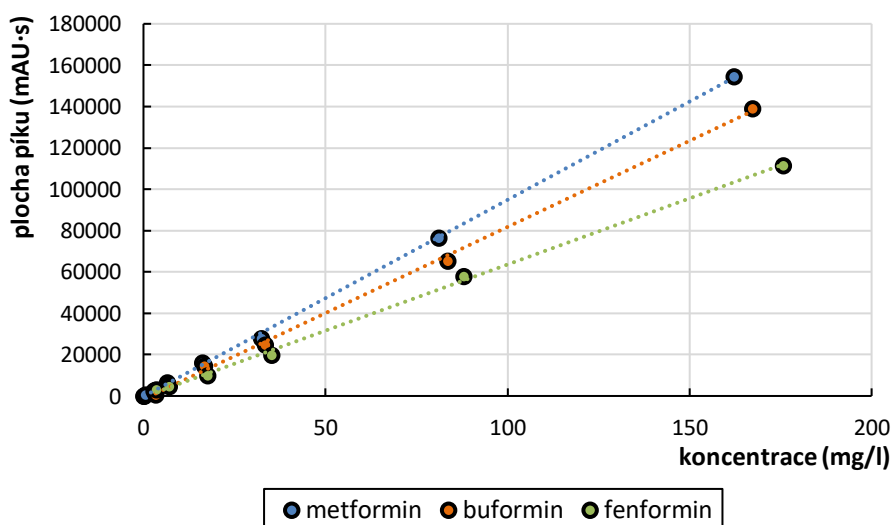
Linearita kalibrační závislosti

Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku obsahujícího 20,8 mg metforminu, 20,6 mg buforminu a 20,7 mg fenforminu v 100 ml. Z tohoto roztoku byly pipetováním příslušných množství připraveny směsné kalibrační roztoky obsahující metformin v koncentracích 3,24; 6,49; 16,22; 32,44; 81,1 a 162,2 mg/l, buformin v koncentracích 3,34; 6,69; 16,72; 33,44; 83,6 a 167,2 mg/l a fenformin v koncentracích 3,52; 7,03; 17,58; 35,16; 87,89 a 175,8 mg/l. Tyto roztoky byly analyzovány pomocí vodivostní a spektrofotometrické detekce (230 nm) a byly sestaveny kalibrační křivky (Graf 34 a Graf 35). Ve vybraném rozmezí koncentrací lze kalibrační křivku metforminu tvořenou daty

z vodivostního detektoru popsat rovnicí přímky $y [s] = 1,027 \times [\text{mg/l}] + 4,948$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9997$ a kalibrační křivku naměřenou pomocí spektrofotometrického detektoru rovnicí přímky $y [\text{mAU}\cdot\text{s}] = 950,9 \times [\text{mg/l}] - 248,9$ s koeficientem $R^2 = 0,9996$. Rovnice kalibračních přímek buforminu jsou $y [s] = 0,940 \times [\text{mg/l}] + 5,491$ ($R^2 = 0,9989$) pro vodivostní detekci a $y [\text{mAU}\cdot\text{s}] = 833,2 \times [\text{mg/l}] - 1576,8$ ($R^2 = 0,9987$) pro spektrofotometrickou detekci a pro fenformin jsou rovny $y [s] = 0,667 \times [\text{mg/l}] + 5,753$ ($R^2 = 0,9989$) pro vodivostní detekci a $y [\text{mAU}\cdot\text{s}] = 639,8 \times [\text{mg/l}] - 400,4$ ($R^2 = 0,9987$) pro spektrofotometrickou detekci.



Graf 34: Kalibrační křivka biguanidů – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; vodivostní detekce; analytická kolona.



Graf 35: Kalibrační křivka biguanidů – vedoucí elektrolyt 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt 10 mM kyselina octová; 0,5 mM standardní roztoky; spektrofotometrická detekce (230 nm); analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Meze detekce a stanovení pro vodivostní detekci byly určeny stejným způsobem jako v předchozích případech a pro metformin jsou rovny 0,30 mg/l, resp. 0,9 mg/l; pro buformin 0,33 mg/l, resp. 1,0 mg/l a pro fenformin 0,47 mg/l, resp. 1,4 mg/l. Pro výpočty mezí byla hodnota úseku kalibračních křivek nastavena na 0.

Mez stanovení v případě spektrofotometrické detekce byla určena jako koncentrace analytu poskytující pík o ploše 10 mAU·s a mez detekce byla následně určena jako třetina meze stanovení. Meze stanovení byly počítány pomocí přímé úměrnosti z prvních bodů kalibračních křivek jednotlivých analytů. Pro metformin je mez stanovení rovna 11,4 µg/l, pro buformin 63,8 µg/l a pro fenformin 11,5 µg/l. Meze detekce jsou následně rovny: pro metformin 3,8 µg/l, pro buformin 21,3 µg/l a pro fenformin 3,8 µg/l.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka délek zón získaných z pěti po sobě následujících měření roztoku směšného standardu obsahujícího 55 mg/l metforminu, 53 mg/l buforminu a 51 mg/l fenforminu. Hodnota opakovatelnosti je za těchto podmínek pro vodivostní detekci metforminu rovna 3,6 %, buforminu 7,3 % a fenforminu 4,2 %. Při spektrofotometrické detekci byla hodnota opakovatelnosti stanovení metforminu 4,6 %, buforminu 3,4 % a fenforminu 5,2 %.

3.4.3.2.4 Výtěžnost (správnost)

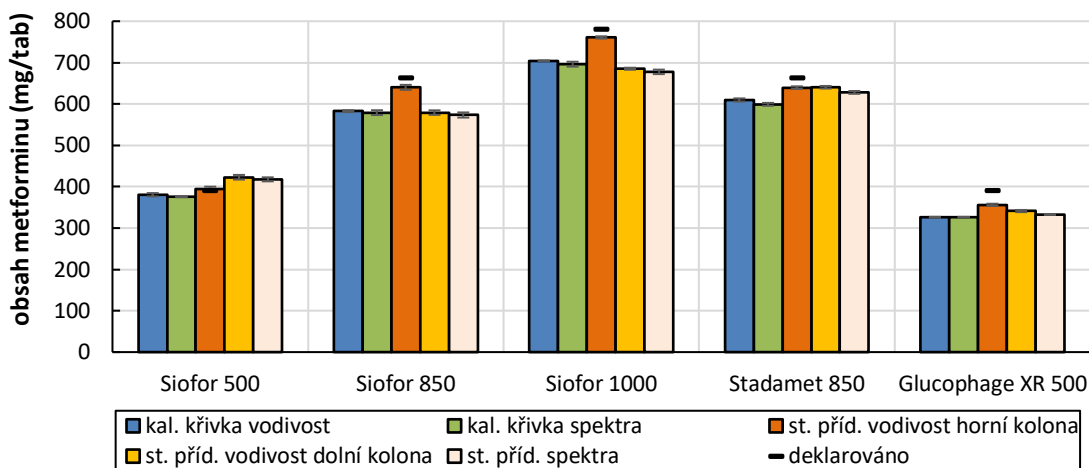
Výtěžnost byla stanovena analýzou směšného standardního roztoku obsahujícího 81,1 mg/l metforminu, 83,6 mg/l buforminu a 87,9 mg/l fenforminu. Hodnota výtěžnosti byla vypočítána jako poměr naměřené a skutečné koncentrace vynásobené 100, aby byla hodnota výtěžnosti udána v %. Pro výpočet naměřené koncentrace byla použita kalibrační křivka, která je uvedena v Grafu 34. Pro metformin byla výtěžnost rovna $100,1 \pm 0,2$ %, pro buformin $96,8 \pm 0,7$ % a pro fenformin $103,8 \pm 0,8$ %.

3.4.3.3 Příprava a analýza vzorku

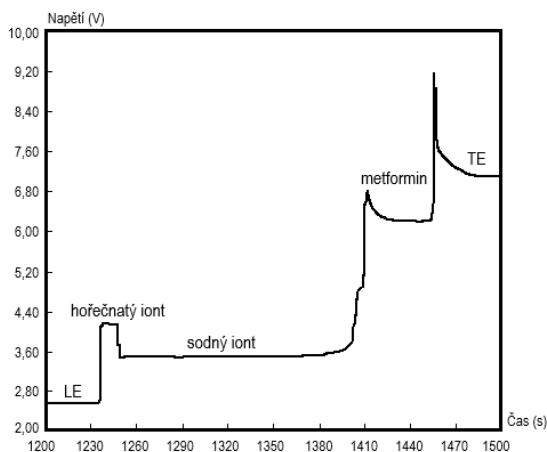
Jako reálné vzorky byla vybrána antidiabetika obsahující metformin jako účinnou látku, jejich seznam je uveden v kapitole 3.4.2. Léčivé přípravky obsahující buformin a fenformin jako účinnou látku jsou v ČR zakázány z důvodu možného vzniku laktátové acidózy u pacientů léčících se pomocí těchto přísad. Z tohoto důvodu nebylo možné získat reálné vzorky obsahující tyto dva analyty.

Vzorky byly připravovány následovně: jedna tableta byla rozdrčena v třecí misce a vzniklý prášek byl následně převeden do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Pro lepší rozpuštění prášku byla baňka před úplným doplněním umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně. Z tohoto roztoku bylo následně pipetováno 0,5 ml do 50 ml odměrné baňky. Takto vzniklý roztok byl analyzován pomocí ITP v optimalizovaném elektrolytovém systému. Problém nastal u tablet Glucophage XR 500, protože se jedná o tablety s postupným uvolňováním. Při přípravě vzorku výše popsaným způsobem bylo při analýze stanoveno pouze přibližně 50 % obsahu metforminu, který byl deklarován výrobcem. Z tohoto důvodu byl postup přípravy pro tento vzorek upraven. Roztok vzorku vzniklý rozpuštěním prášku v destilované vodě byl ponechán do dalšího dne za současného míchání pomocí magnetického míchadla, aby co největší množství metforminu bylo uvolněno z matrice tablety. Následně byl roztok 100x ředěn a analyzován stejně jako v případě ostatních vzorků. Pro analýzu pomocí vícenásobného standardního přídatku byl postup stejný s tím rozdílem, že k 0,5 ml vzorku bylo přidáno 2,5 ml, popř. 5 ml, standardního roztoku metforminu o koncentraci 300 mg/l.

Kvantifikace obsahu metforminu byla provedena dvěma způsoby, a to pomocí metody kalibrační křivky a metody vícenásobného standardního přídatku. Data ke kvantifikaci byla získána pomocí vodivostní detekce v předseparační (horní) koloně, vodivostní detekce v analytické (dolní) koloně a spektrofotometrické detekce při 230 nm. Z Grafu 36 je patrné, že téměř u všech vzorků byl stanoven nižší obsah metforminu než deklaruje výrobce. Prozatím není zřejmé, zda se jedná o systematickou chybu metody nebo zda je obsah metforminu v tabletách nižší. K určení příčiny nižšího obsahu by měla být provedena analýza vzorků pomocí referenční metody (pravděpodobně kapalinové chromatografie), která prozatím z časových důvodů bohužel nebyla provedena. Z pěti způsobů kvantifikace se deklarovaným obsahům nejvíce blížily výsledky stanovené metodou vícenásobného standardního přídatku z dat vodivostní detekce v horní koloně. Naměřené obsahy se v tomto případě pohybovaly v rozmezí od 91,3 do 101,2 % deklarovaného obsahu. Na ukázkou je na Obrázku 33 uveden izotachforeogram vzorku Siofor 500.



Graf 36: Obsah metforminu ve vzorcích antidiabetik



Obrázek 33: Izotachforeogram vzorku tablety Siofor 500 – vedoucí elektrolyt: 10 mM octan draselný + kyselina octová (pH 5,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; analytická kolona.

3.4.4 Závěr

Byla vypracována izotachforetická metoda pro stanovení biguanidových antidiabetik, tj. metforminu, buforminu a fenforminu, za pomoci vodivostní a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 230 nm. Metoda je založena na separaci těchto analytů jako kationtů v elektrolytovém systému tvořeném vedoucím elektrolytem 10 mM octanem draselným s kyselinou octovou k úpravě pH na 5,0 a koncovým elektrolytem 10 mM kyselinou octovou. Byla provedena úspěšná validace metody, získané parametry (uvedené výše) vyhovují požadavkům kladeným na rutinní analýzy. Metoda byla odzkoušena na vzorcích tablet obsahujících metformin jako účinnou látku. Vzhledem k tomu, že byly téměř ve všech případech stanoveny nižší obsahy, bude následovat analýza tablet pomocí referenční metody, díky níž bude zjištěno, zda je tato metoda vhodná pro praktické použití.

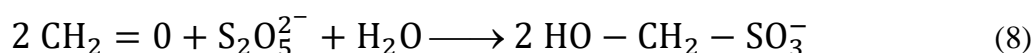
3.5 Izotachoforetické stanovení formaldehydu ve vzorku Kutvirtova kloktadla [269]

3.5.1 Úvod

Tato práce se zabývá vývojem izotachoforetické metody pro stanovení formaldehydu v kapalných vzorcích.

Vzhledem k širokému použití formaldehydu (metanalu), jeho toxicitě a těkavosti, je jeho působení významným faktorem pro lidské zdraví – jedná se o karcinogen skupiny 1, tedy prokázaný karcinogen pro člověka. V potravinářství se používá jako konzervační prostředek (nese označení E 240), ale v České republice je jeho používání v potravinářství zakázáno [270]. Formaldehyd má dezinfekční a čistící účinky, v medicíně se používá ke sterilizaci lékařských pomůcek, je také součástí Kutvirtova kloktadla, jehož použití je doporučeno v případě bolestí v krku, při angínách a k dezinfekci nosohltanu. Formaldehyd se běžně vyskytuje také v životním prostředí, vytváří se oxidací uhlovodíků a v menší míře rozkladem rostlinných zbytků [271]. Vzhledem k jeho toxickým vlastnostem nejen pro člověka, ale i pro ostatní živočichy, je nutné jeho obsah v různých matricích pečlivě sledovat. K tomuto účelu bylo vyvinuto a optimalizováno mnoho analytických metod. Nejčastěji používanými metodami jsou plynová (GC) a kapalinová chromatografie (HPLC). V posledních letech byly vytvořeny HPLC metody pro stanovení obsahu formaldehydu v kravském mléku [272], pitné vodě [273], korku [274], aerosolech do elektronických cigaret [275], lidské tkáni [276], potravinách z Bangladěše (ovoce, zelenina, čerstvé ryby, mléko) [277], pivu [278], ovocných džusech [279] a pomocí GC metody pro stanovení formaldehydu v tatéřském inkoustu [280] a v moči [281]. Bylo vytvořeno také několik senzorů (impedanční [282], amperometrický [283]), pomocí nichž lze formaldehyd stanovit. Dalšími možnostmi pro stanovení formaldehydu jsou metody spektrometrické [284, 285] a elektrochemické [286].

Pomocí kapilární izotachoforézy není možné stanovit formaldehyd přímo, protože se nejedná o látku iontové povahy. Z tohoto důvodu je nutné formaldehyd převést na nějakou iontovou sloučeninu. V této práci byla zvolena reakce formaldehydu s disířičitanem sodným za vzniku hydroxymethylsulfonátu (rovnice 8), který byl následně detekován.



3.5.2 Použité chemikálie, materiál a instrumentace

Použité chemikálie jsou uvedeny v Tabulce 11 v kapitole 2.1. Použitá instrumentace je popsána v kapitole 2.2. Stanovení hydroxymethylsulfonátu bylo prováděno v aniontovém režimu s vedoucím elektrolytem složeným z 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu (pH 3,2) a koncovým elektrolytem 10 mM kyselinou mravenčí. Hnací proud v předseparační koloně byl nastaven na 250 μ A, a v analytické koloně na 50 μ A, přičemž během detekce byl snížen na 30 μ A. Celková doba jednoho měření se pohybovala okolo 30 minut.

Jako reálný vzorek bylo použito Kutvirtovo kloktadlo (Obrázek 34, připravila Lékárna Pharmacia, Praha-Zbraslav, ČR), které bylo na lékařský předpis zakoupeno v lékárně. Podle dohledané receptury [287] obsahuje ve 102 g vzorku 10 g 35% formaldehydu (3,43 % hm., 1,27 mol/l), 2 g Mentholum racemicum, 5 g tinktury Ratanhiae, a 85 g 60% etanolu.

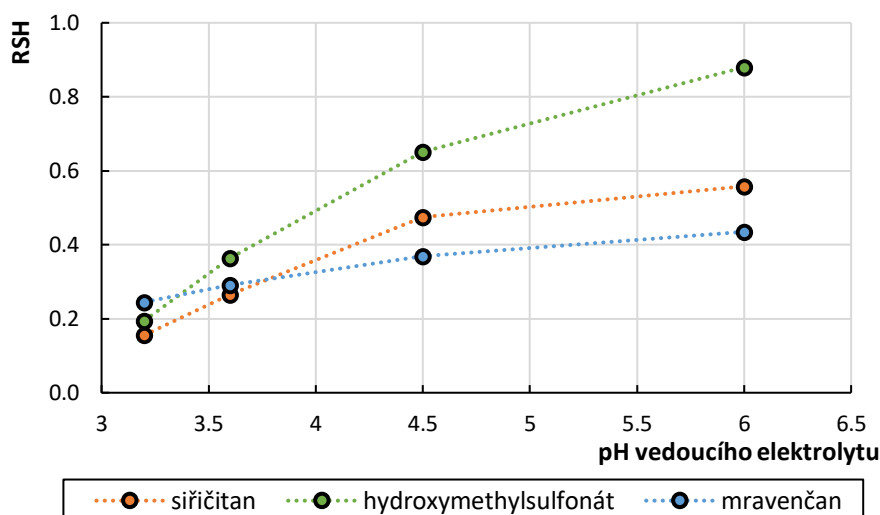


Obrázek 34:
Kutvirtovo kloktadlo

3.5.3 Výsledky a diskuze

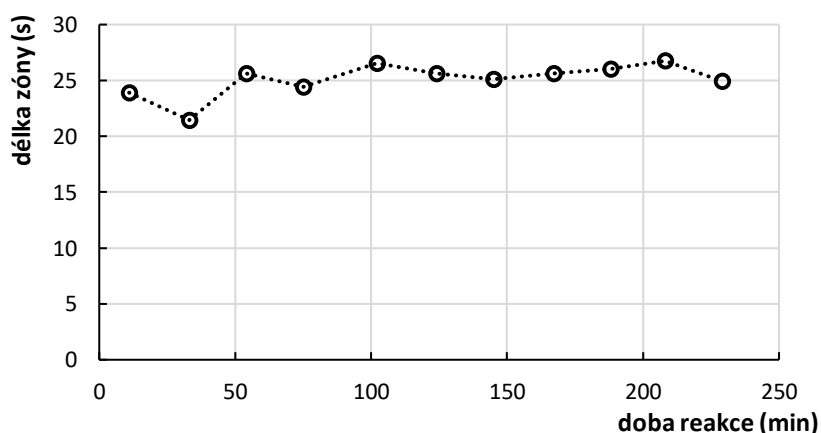
3.5.3.1 Optimalizace podmínek reakce a separace

Pro stanovení formaldehydu ve formě hydroxymethylsulfonátu byl nejprve optimalizován elektrolytový systém (Graf 37). Jako vedoucí elektrolyt byla ve více kyselé oblasti zkoušena 10 mM HCl s přidavkem β -alaninu k úpravě pH na hodnoty 3,2 a 3,6 a v mírně kyselé oblasti 10 mM histidin-chlorid pufrovaný pomocí histidinu na pH 4,5 a 6,0. Jako koncový elektrolyt byla zvolena 10 mM kyselina octová. Ke zjištění hodnot relativních výšek signálů byla provedena analýza 2 mM standardního roztoku siřičitanu a 1 mM standardních roztoků hydroxymethylsulfonátu a kyseliny mravenčí. Z optimalizace vyplynulo, že pro rychlou analýzu je nejvhodnější elektrolytový systém s vedoucím elektrolytem o pH 3,2, protože rychlost migrace hydroxymethylsulfonátu v elektrickém poli je při tomto pH nejvyšší. Kyselina octová, sloužící jako koncový elektrolyt, byla nahrazena kyselinou mravenčí, která má vyšší pohyblivost v elektrickém poli a následuje hned za zónou hydroxymethylsulfonátu.



Graf 37: Vliv pH vedoucího elektrolytu na relativní výšku signálu (RSH) – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2 a 3,6) a 10 mM histidin-chlorid + histidin (pH 4,5 a 6,0); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová; 1 mM standardní roztoky disiřičitanu sodného, hydroxymethylsulfonátu a kyseliny mravenčí; předseparační kolona.

Následně byl zkoumán vliv doby reakce na délku zóny vzniklého hydroxymethylsulfonátu (Graf 38). Bylo zjišťováno, zda se s prodlužující se dobou reakce bude prodlužovat délka zóny hydroxymethylsulfonátu. K tomuto účelu byla do kádinky připravena reakční směs obsahující 0,5 ml 36% formaldehydu, 500 mg disiřičitanu sodného a 4,5 ml destilované vody. Kádinka s reakční směsí byla umístěna na magnetické míchadlo a její obsah byl míchán po celou dobu reakce. Během průběhu reakce bylo po určitém čase odebíráno vždy 30 μ l reakční směsi do 50 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto naředěná reakční směs byla analyzována v optimalizovaném elektrolytovém systému a byla zaznamenávána délka zóny hydroxymethylsulfonátu.



Graf 38: Vliv doby reakce na délku zóny hydroxymethylsulfonátu – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.

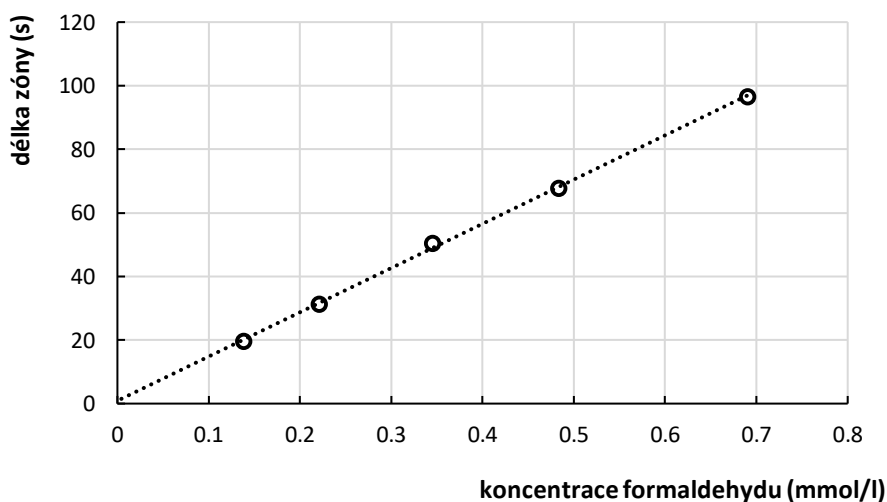
Z naměřených hodnot je zřejmé, že délka zóny je po celou dobu reakce téměř konstantní (je rovna přibližně 25 s), nedochází ani k výraznému zkrácení ani prodloužení zóny. Z časových a praktických důvodů byla zvolena doba reakce 30 minut, která odpovídá přibližně době jedné izotachoforetické analýzy, takže je možné během analýzy připravit následující vzorek.

3.5.3.2 Validace metody

Linearita kalibrační závislosti

K přípravě kalibračních roztoků byl použit zásobní roztok složený z 250 μl 36% formaldehydu a 300 mg disířičitanu sodného v 50 ml odměrné baňce, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Tento roztok byl při laboratorní teplotě ponechán v klidu po dobu 30 minut, aby došlo ke zreagování všech složek roztoku. Po uplynutí doby reakce bylo z tohoto roztoku pipetováno 100, 160, 250, 350 a 500 μl do 50 ml odměrných baněk, které byly doplněny destilovanou vodou po rysku.

Takto připravené roztoky v rozmezí koncentrací 0,138 – 0,690 mmol/l byly analyzovány a byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost délky zóny hydroxymethylsulfonátu na koncentraci formaldehydu (Graf 39). Ve vybraném koncentračním rozmezí vykazuje kalibrační křivka dobrou linearitu, hodnota spolehlivosti R^2 je rovna 0,9993. Rovnice regrese kalibrační přímky je $y \text{ [s]} = 139,16 \times \text{[mmol/l]} + 0,89$.



Graf 39: Kalibrační křivka formaldehydu – vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt: 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.

Mez detekce a stanovení

Pro tuto metodu byla jako mez stanovení určena koncentrace formaldehydu projevující se zónou hydroxymethylsulfonátu o délce 1 sekundy. Jako mez detekce byla zvolena

koncentrace formaldehydu odpovídající $\frac{1}{3}$ meze stanovení. Z kalibrační přímky byla vypočtena mez stanovení 7,1 $\mu\text{mol/l}$ a mez detekce 2,4 $\mu\text{mol/l}$.

Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti metody bylo provedeno pět měření téhož roztoku o koncentraci 0,173 mmol/l. Opakovatelnost byla následně určena jako relativní směrodatná odchylka těchto pěti měření. Pro tuto metodu byla její hodnota 1,58 %, což je více než postačující pro rutinní analýzy.

Výtěžnost (správnost)

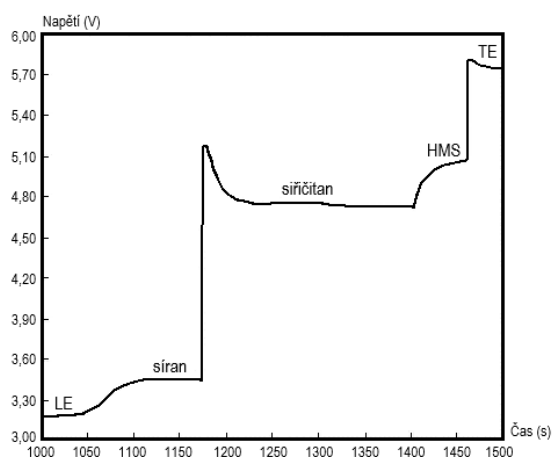
Vhodnost metody ke stanovení analytu určuje mimo jiné i její výtěžnost. Ta se určuje pomocí roztoku o známé koncentraci analytu, jehož koncentrace se určí pomocí kalibrační křivky, popř. standardního přídatku tak, jako by se jednalo o vzorek s neznámou koncentrací. Podíl získaný podělením nalezené a skutečné koncentrace vynásobený stem pak udává výtěžnost metody. V tomto případě byl připraven roztok o koncentraci formaldehydu 173 $\mu\text{mol/l}$. Ten byl pomocí metody standardního přídatku analyzován a zjištěná koncentrace formaldehydu v roztoku byla $165 \pm 1 \mu\text{mol/l}$. Výtěžnost metody je rovna $95,4 \pm 0,5 \%$. Tato hodnota odpovídá kritériím kladeným na rutinní analýzy. Souhrnně tedy lze říct, že všechny parametry metody jsou dostatečné pro použití metody ke stanovení obsahu formaldehydu v kapalných vzorcích.

3.5.3.3 Příprava a analýza vzorku

Metoda byla odzkoušena na vzorku Kutvirtova kloktadla, které bylo na lékařský předpis zakoupeno v lékárně. Výrobcem udávaná koncentrace formaldehydu byla 1,27 mol/l. Příprava vzorku spočívala pouze v jeho naředění a přidání disiřičitanu sodného. Ke kvantifikaci byly použity dvě metody – metoda kalibrační křivky a metoda standardního přídatku. K analýze za pomoci metody kalibrační křivky bylo pipetováno 280 μl vzorku kloktadla do 1 l odměrné baňky, aby se obsah formaldehydu pohyboval v rozmezí kalibrační křivky. Následně bylo ke vzorku přidáno 200 mg disiřičitanu sodného a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl ponechán při laboratorní teplotě 30 minut v klidu, aby došlo ke zreagování formaldehydu se siřičitanovými ionty. Takto připravený vzorek byl analyzován. Ke stanovení obsahu formaldehydu metodou standardního přídatku byl vzorek zpracován následovně – k 28 μl vzorku ve 100 ml odměrné baňce bylo přidáno 150 μl zásobního roztoku formaldehydu o koncentraci 0,069 mol/l a směs byla doplněna

destilovanou vodou po rýsku. Následně byl vzorek proměřen pomocí izotachoforetického analyzátoru.

Pomocí metody kalibrační křivky byla stanovena koncentrace formaldehydu $1,46 \pm 0,02$ mol/l a pomocí metody standardního přídávku koncentrace 1,49 mol/l. Hodnoty získané oběma způsoby jsou téměř totožné, ale jsou o něco vyšší, než je hodnota udávaná výrobcem. Izotachoforeogram vzorku kloktadla je uveden na Obrázku 35.



Obrázek 35: Izotachoforeogram vzorku kloktadla – vedoucí elektrolyt (LE): 10 mM HCl + β -alanin (pH 3,2); koncový elektrolyt (TE): 10 mM kyselina mravenčí; analytická kolona.

3.5.4 Závěr

Byla vypracována izotachoforetická metoda pro stanovení obsahu formaldehydu v kapalných vzorcích. Metoda byla validována, byly stanoveny následující parametry: mez detekce $2,4 \mu\text{mol/l}$, mez stanovení $7,1 \mu\text{mol/l}$ formaldehydu, opakovatelnost 1,58 %, výtěžnost $95,4 \pm 0,5$ % a linearita kalibrační křivky ve zvoleném rozsahu koncentrací. Všechny parametry metody odpovídají nárokům na běžné analýzy. Optimalizovanou metodou byl stanoven obsah formaldehydu ve vzorku Kutvirtova kloktadla, které podle výrobce obsahuje $1,27$ mol/l formaldehydu. Kloktadlo bylo analyzováno metodou kalibrační křivky i metodou standardního přídávku. Pomocí kalibrační křivky byla stanovena koncentrace $1,46 \pm 0,02$ mol/l a pomocí standardního přídávku koncentrace 1,49 mol/l.

4. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá problematikou izotachoforetické analýzy biologicky aktivních látek v léčivých přípravcích a doplňcích stravy. V teoretické části jsou stručně shrnuty biologické účinky vybraných skupin látek vycházejících z primárního metabolismu, jelikož se jedná o biologicky aktivní látky, které jsou ve spojení s izotachoforézou v odborné literatuře zmiňovány nejčastěji. Dále je uveden stručný náhled do problematiky izotachoforetického stanovení výše zmíněných skupin látek spolu s přehledem metodik nalezených v odborné literatuře.

Výsledková a diskuzní část práce je věnována vývoji metod izotachoforetického stanovení vybraných analytů, tj. aminokyselin, vitamínů sk. B, ethanolaminů, biguanidových antidiabetik a formaldehydu ve vzorcích léčivých přípravků a doplňků stravy. Hlavním účelem těchto stanovení je především kontrola kvality vybraných produktů.

Všechny metody stanovení byly validovány, stanovovanými parametry byla mez detekce a stanovení, opakovatelnost, výtěžnost a linearita. Získané hodnoty splňovaly požadavky kladené na běžně prováděné analýzy. Metody byly dále testovány na vybraných reálných vzorcích, čímž byla prokázána jejich aplikovatelnost a praktické využití.

Ukázalo se, že optimalizovaná izotachoforetická stanovení mohou být v určitých případech levnější alternativou chromatografických metod.

5. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Přednášky

1. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jan Černohorský: Stanovení formaldehydu pomocí CITP po převedení na hydroxymethylsulfonát, XIX. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí, Ovčárna pod Pradědem 19.-21.4.2017
2. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Klára Sollichová: Stanovení kyanidů pomocí kapilární izotachoforézy, Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2017, Kouty nad Desnou 3.-5.5.2017
3. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jana Vladyková: Influence of Cyclodextrins to Isotachophoretic Separation of Selected Ions, XXXVII. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice u Děčína 15.-19.5.2017
4. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Milan Sýs: Isotachophoretic Determination of Amino Acids After Their Conversion to Hydroxy Acids, 13th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha 21.-22.9.2017
5. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Markéta Špůrová: Izotachoforetické stanovení vybraných iontů ve vzorcích cukrů, XX. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí, Ovčárna pod Pradědem 25.-27.4.2018
6. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jana Lenčová: Isotachophoretic Determination of Triethanolamine in Cosmetic Products, XXXVIII. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice u Děčína 21.-25.5.2018
7. Michaela Kovářová, Michaela Frühbauerová, Lenka Žemličková, Martin Bartoš: Isotachophoretic Determination of Water-Soluble Vitamins in Food Supplements, 25th YISAC 2018, Gratz 2.-5.7.2018
8. Michaela Janečková, Martin Bartoš, Tereza Dušková: Identifikace produktů vzniklých konverzí vybraných aminokyselin po jejich izotachoforetické separaci, Monitorování cizorodých látek a hodnocení rizik v životním prostředí I., Kojetín 10.-12.4.2019
9. Michaela Janečková, Martin Bartoš, Tatiana Be: Quality control of antidiabetic drugs using isotachopheresis, 26th YISAC 2019, Pardubice 24.-27.6.2019

Příspěvky ve sbornících konferencí

1. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jan Černohorský: Stanovení formaldehydu pomocí CITP po převedení na hydroxymethylsulfonát, Sborník příspěvků ze semináře

- XIX. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí, str. 93-98, 2017, ISBN 978-80-7560-086-8 [269]
2. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Klára Sollichová: Stanovení kyanidů pomocí kapilární izotachoforézy, Sborník přednášek Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2017, str. 29, 2017, ISBN 978-80-7560-046-2
 3. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jana Vladyková: Influence of Cyclodextrins to Isotachophoretic Separation of Selected Ions, Sborník přednášek XXXVII. Moderní elektrochemické metody, str. 113-117, 2017, ISBN 978-80-905221-5-2 [133]
 4. Martin Bartoš, Magda Janoušková, Michaela Kovářová: Isotachophoretic Determination of Melamine, Sborník přednášek XXXVII. Moderní elektrochemické metody, str. 10-13, 2017, ISBN 978-80-905221-5-2
 5. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Markéta Špůrová: Izotachoforetické stanovení vybraných iontů ve vzorcích cukrů, Sborník příspěvků ze semináře XX. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí, str. 81-88, 2018, ISBN 978-80-7560-154-4
 6. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Jana Lenčová: Isotachophoretic Determination of Triethanolamine in Cosmetic Products, Sborník přednášek XXXVIII. Moderní elektrochemické metody, str. 137-140, 2018, ISBN 978-80-905221-6-9 [209]
 7. Martin Bartoš, Jaromír Kulhánek, Michaela Kovářová: Isotachophoretic Determination of Theanine, Sborník přednášek XXXVIII. Moderní elektrochemické metody, str. 19-22, 2018, ISBN 978-80-905221-6-9 [134]
 8. Vojtěch Valášek, Martin Bartoš, Michaela Kovářová: Izotachoforetické stanovení ethanolu, Studentská vědecká odborná činnost 2017/2018, str. 181-186, 2018, ISBN 978-80-7560-157-5
 9. Michaela Kovářová, Michaela Frühbauerová, Lenka Žemličková, Martin Bartoš: Isotachophoretic Determination of Water-Soluble Vitamins in Food Supplements, 25th YISAC 2018 Book of Abstracts, str. 27-30, 2018, ISBN 978-3-200-05620-6 [149]
 10. Martin Bartoš, Michaela Kovářová, Jana Lenčová: Izotachoforetické stanovení triethanolaminu v kosmetických přípravcích, Sborník přednášek LI. semináře o tenzidech a detergentech, str. 81-88, 2018, ISBN 978-80-7395-173-5 [210]
 11. Michaela Frühbauerová, Michaela Janečková, Martin Bartoš, Lenka Žemličková, Libor Červenka: Využití izotachoforézy pro analýzu vitamínů skupiny B, Zborník příspěvků Mladí vedci – Bezpečnost potravinového řetězce, str. 74-77, 2018, ISBN 978-80-897-38-18-2 [150]

12. Michaela Janečková, Martin Bartoš, Tereza Dušková: Identifikace produktů vzniklých konverzí vybraných aminokyselin po jejich izotachoforetické separaci, Sborník příspěvků ze semináře Monitorování cizorodých látek a hodnocení rizik v životním prostředí I., str. 59-66, 2019, ISBN 978-80-7560-234-3 [135]
13. Michaela Janečková, Martin Bartoš, Tatiana Be: Quality control of antidiabetic drugs using isotachopheresis, 26th YISAC 2019 Book of Abstracts, str. 29, 2019, ISBN 978-80-7560-224-4 [248]
14. Martin Bartoš, Michaela Janečková: Izotachoforetické stanovení ethanolaminů, Sborník přednášek LII. semináře o tenzidech a detergentech, str. 61-67, 2019, ISBN 978-80-7560-257-2. [211]

Příspěvky v odborných časopisech

1. Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Tomáš Míkysek, Dana Hloušková, Blanka Hyhlíková, Jana Vladyková: Isotachophoretic determination of amino acids after their conversion to hydroxyacids, Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly, 149 (9), str. 1709-1718, 2018 [48]
2. Michaela Janečková, Martin Bartoš, Jana Lenčová: Isotachophoretic determination of triethanolamine in cosmetic products, Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly, 150 (3), str. 387-390, 2019 [208]

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Guaadaoui A, Benaicha S, Elmajdoub N, Bellaoui M, Hamal A (2014) *Int J Nutr Food Sci* 3:174
- [2] Brekhman II (1980) *Man and biologically active substances*. Pergamon Press Ltd., Oxford
- [3] Opletal L (2010) *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Karolinum, Praha
- [4] Franzen F, Eysell K (1969) *Biologically active amines found in man*. Pergamon Press Ltd., Oxford
- [5] Maintz L, Novak N (2007) *Am J Clin Nutr* 85:1185
- [6] Salvador et al. (2000) *Can J Physiol Pharm* 78:359
- [7] Iversen SD, Iversen LL (2006) *Trends Neurosci* 30:188
- [8] Farooqui T, Farooqui AA Eds. (2010) *Biogenic Amines: Pharmacological, Neurochemical and Molecular Aspects in the CNS*. Nova Science Publishers, New York
- [9] Himwich HE, Himwich WA Eds. (1964) *Progress in Brain Research: Biogenic Amines*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam
- [10] Raina A, Jänne J (1975) *Med Biol* 53:121
- [11] Holeček M (2006) *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Grada, Praha
- [12] Koolman J, Röhm KH (2012) *Barevný atlas biochemie*. Grada, Praha
- [13] Odstrčil J (2005) *Biochemie*. Institut pro další vzdělávání, Brno
- [14] Banga AK (1995) *Therapeutic Peptides and Proteins*. Technomic Publishing Company, Lancaster
- [15] Walsh G (2003) *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd., Chicester
- [16] Kastin AJ (2013) *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, San Diego
- [17] Whitford D (2005) *Proteins: Structure and Function*. John Wiley and Sons Ltd., Chicester
- [18] Koc AN et al. (2011) *J Med Food* 14:128
- [19] Romanelli A et al. (2011) *J Pep Sci* 17:348
- [20] Shen L et al. (2012) *Plos One* [cit. 4.12.2019] Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0047194&type=printable>

- [21] Ahmad MU Ed. (2017) *Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications*. AOCS Press, Academic Press, San Diego
- [22] Mostofsky DI, Yehuda S, Salem N Eds. (2001) *Fatty Acids: Physiological and Behavioral Functions*. Humana Press, Totowa
- [23] Kuksis A Ed. (1978) *Fatty Acids and Glycerides*. Plenum Press, New York
- [24] Chow CK Ed. (2008) *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. CRC Press, Boca Raton
- [25] Vance DE, Vance JE Eds. (2008) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, San Diego
- [26] Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (2015) *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill Education, New York
- [27] Kretowicz M, Johnson RJ, Ishimoto T, Nakagawa T, Manitius J (2011) *Int J Nephrol* [cit. 30.1.2020] Dostupné z: <http://downloads.hindawi.com/journals/ijn/2011/315879.pdf>
- [28] Schaafsma G (2008) *Int Dairy J* 18:458
- [29] Mandžuková J (2005) *Léčivá síla vitamínů, minerálů a dalších látek*. Start, Benešov
- [30] Velíšek J, Hajšlová J (2009) *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor
- [31] Hlúbik P, Opltová L (2004) *Vitamíny*. Grada Publishing, Praha
- [32] Jordán V, Hemzalová M (2001) *Antioxidanty zázračné zbraně*. Jota, Brno
- [33] Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2004) *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing, Praha
- [34] Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989) *N Engl J Med* 320:980
- [35] Palička V (2011) *Int Med Prax* 13:383
- [36] Šimonová I, Karovičová J, Kohajdová Z (2008) *Potravinářstvo* 2:60
- [37] Hlúbik P (2002) *Int Med Prax* 4:161
- [38] Metzler DE, Metzler CM (2001) *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. Academic Press, San Diego
- [39] Kohajdová Z, Karovičová J (2001) *Bull Food Res* 40:75
- [40] Rubach K, Offizorz P, Breyer C (1981) *Z Lebensm-Unters Forsch* 172:351
- [41] Ginzinger W, Hohenauer W (1984) *Milchwirtschaft Ber* 80:251
- [42] Jastrebska A (2012) *Eur Food Res Technol* 235:563
- [43] Voldřich M, Hrdlička J, Opatová M (1988) *Potrav Vědy* 6:99
- [44] Karovičová J, Kohajdová Z, Lukáčová D (2002) *Bull Food Res* 41:187

- [45] Kvasnička F, Voldřich M (2000) *Electrophoresis* 21:2848
- [46] Hughes AB (2012) *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Analysis and Function of Amino Acids and Peptides*. Wiley VCH Verlag, Weinheim
- [47] Everaerts FM, Beckers JL, Verheggen ThPEM (1976) *Isotachopheresis: Theory, Instrumentation and Applications*. Elsevier, Amsterdam
- [49] Kašička V, Prusík Z (1989) *J Chromatogr A* 470:209
- [50] Koval M, Kaniansky D, Hutta M, Lacko R (1985) *J Chromatogr* 325:151
- [51] Zelenský I (nedatováno) *Základný kurz izotachofórézy: Separácia aniónov a separácia kationov*. ÚRVJT VVZ PJT, Spišská Nová Ves
- [52] Kvasnička F (2000) *Electrophoresis* 21:2780
- [53] Herrmannová M, Křivánková L, Bartoš M, Vytřas K (2006) *J Sep Sci* 29:1132
- [54] Bruchelt G, Niethammer D (1993) *J Chromatogr* 618:57
- [55] Holloway CJ, Lüstorff J (1980) *Electrophoresis* 1:129
- [56] Datinská V, Voráčová I, Berka J, Foret F (2018) *J Chromatogr A* 1548:100
- [57] Gebauer P, Boček P (1997) *Electrophoresis* 18:2154
- [58] Ginterová P et al. (2012) *J Chromatogr B* 904:135
- [59] Xu Z, Okada J, Timerbaev R, Hirokawa T (2009) *J Sep Sci* 32:4143
- [60] Jastrzebska A, Piasta AM, Szlyk E (2015) *J Food Compos Anal* 40:136
- [61] Kvasnička F (1999) *J Chromatogr A* 838:191
- [62] Jastrebska A, Piasta AM, Filipiak-Szok A, Szlyk E (2013) *Anal Let* 43:1364
- [63] Madajová V, Kaniansky E, Čižmárová E, Hudec M (1985) *J Chromatogr A* 320:131
- [64] Ageta T, Mikasa H, Kojima K, Kodama H (1982) *J Chromatogr B* 233:361
- [65] Zgola-Grzeškowiak A, Grzeškowiak T (2012) *Int J Food Prop* 15:628
- [66] Ageta T, Mizobuchi N, Kodama H (1987) *J Chromatogr B* 419:334
- [67] Kvasnička F, Krátká J (2006) *Cent Eur J Chem* 4:216
- [68] Hiraoka A, Miura I, Tominaga I, Hattori M (1989) *Clin Biochem* 22:293
- [69] Hirokawa T, Kiso Y, Gas B, Zusková I, Vacík J (1993) *J Chromatogr A* 628:283
- [70] Kopwille A, Chillemi F, Bosisio-Righetti AB, Righetti P (1973) *Protides Biol Fluids* 21:657
- [71] Kopwille A, Lundin R, Sievertsson H (1974) *LKB Application Note* 159
- [72] Martin AJP, Hampson F (1975) *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachopheresis*. Elsevier, Amsterdam
- [73] Pradayrol L, Chayvialle JA, Carlquist M, Mutt V (1978) *Biochem Biophys Res Com*

85:701

- [74] Carlquist M, Mutt V, Jörnvall H (1979) *FEBS Let* 108:457
- [75] Friedel K, Holloway CJ (1981) *Electrophoresis* 2:116
- [76] Stehle P, Fürst P (1985) *J Chromatogr A* 346:271
- [77] Stehle P, Bahsitta HP, Fürst P (1986) *J Chromatogr A* 370:131
- [78] Janssen PSL, Van Nispen JW (1984) *J Chromatogr A* 287:166
- [79] Kopwillem A, Lundin H, Bosisio-Righetti AB, Righetti PG (1975) *Protides Biol Fluids* 22:737
- [80] Schmitz G, Möllers C, Richter V (1997) *Electrophoresis* 18:1807
- [81] Zhang B, Kaneshi T, Ohta T, Saku K (2005) *J Lip Res* 46:2265
- [82] Wang Y, Wang H, Ju S, Pu J, Wang Z (2009) *Labmedicine* 40:544
- [83] Zhang B et al. (2009) *J Lip Res* 50:1832
- [84] Takata K et al. (2014) *Circ J* 78:2955
- [85] Moreno-Gordaliza E et al. (2016) *Anal Clin Acta* 944:57
- [86] Bittolo-Bom G, Cazzolato G (1999) *J Lip Res* 40:170
- [87] Bodor R et al. (2013) *Chromatographia* 76:321
- [88] Foret F, Szökö E, Karger BR (1993) *Electrophoresis* 14:417
- [89] Xueping F et al. (2008) *Electrophoresis* 29:2215
- [90] Filípek J (2009) *Acta Vet Brno* 78:627
- [91] Hutta M, Simunicová E, Kaniansky D, Tkacova J, Brtko J (1989) *J Chromatogr A* 470:223
- [92] Tsikas D, Fauler J, Brunner G, Frölich JC (1991) *J Chromatogr* 545:375
- [93] Renner S, Prohaska V, Gerber C, Niethammer D, Bruchelt G (2001) *J Chromatogr A* 916:247
- [94] Kuci Z et al. (2006) *J Biochem Biophys Met* 69:79
- [95] Partyka J, Foret F (2012) *J Chromatogr A* 1267:116
- [96] Aomine M, Arita M, Imanishi S, Kiyosue T (1982) *Jap J Physiol* 32:741
- [97] Pérez JA, Mateo F, Meléndez-Hevia E (1982) *Electrophoresis* 3:102
- [98] Eriksson G (1980) *Anal Biochem* 109:239
- [99] Andersson M, Christensson PI, Lewan L, Stenram U (1987) *Int J Biochem* 19:641
- [100] Hjalmarsson SG, Baldesten A (1981) *CRC Crit Rev Anal Chem* 11:261
- [101] Bours J, Dempewolf J, Schaake S, Rink H (1987) *J Chromatogr* 403:336
- [102] Andersson M, Christensson PI, Lewan L, Stenram U (1987) *Int J Biochem* 19:641

- [103] Schoch RB, Ronaghi M, Santiago JG (2009) *Lab Chip* 9:2145
- [104] Persat A, Marshall LA, Santiago JG (2009) *Anal Chem* 81:9507
- [105] Marshall LA, Han CM, Santiago JG (2011) *Anal Chem* 83:9715
- [106] Röben R, Rubach K (1984) *Analytical and Preparative Isotachopheresis: Proceedings: 3rd International Symposium on Isotachopheresis*. Walter de Gruyter & Co., Berlin
- [107] Offizorz P, Rubach K (1984) *Fresenius J Anal Chem* 317:662
- [108] Jastrzebska A, Kowalska S, Szlyk E (2017) *J Food Comp Anal* 57:80
- [109] Kenndler E, Katzenberger R (1986) *Microchim Acta* 88:415
- [110] Sádecká J, Karasová G, Polonský J (2003) *Eur Food Res Technol* 216:440
- [111] Sádecká J, Polonský J (2004) *Chemia Anal* 49:167
- [112] Stanovenie kyseliny askorbovej v potravinách. Villa Labeco aplikačný list č. 16. [cit. 14.10.2019] Dostupné z: <https://www.villalabeco.sk/aplikacie/AL16.pdf>
- [113] Tomáš R, Koval M, Foret F (2010) *J Chromatogr A* 1217:4144
- [114] Pantůčková P, Křivánková L (2010) *Electrophoresis* 31:3391
- [115] Polášek M, Pospíšilová M, Urbánek M (2000) *J Pharm Biomed Anal* 23:135
- [116] Sádecká J, Hercegová A, Polonský J (1999) *J Chromatogr B* 729:11
- [117] Malá Z, Gebauer P, Boček P (2016) *Anal Chim Acta* 907:1
- [118] Sádecká J, Čákr M, Hercegová A, Polonský J, Skačáni I (2001) *J Pharm Biomed Anal* 25:881
- [119] Pospíšilová M, Jokl V, Polášek M, Mokrý J (1995) *J Pharm Biomed Anal* 13:1147
- [120] Pospíšilová M, Polášek M, Jokl V (1998) *J Pharm Biomed Anal* 18:777
- [121] Jelínek I, Rejholec V, Roubal Z, Snopek J, Smolková-Keulemansová E (1989) *J Chromatogr* 495:338
- [122] Kurzawa M, Jastrzebska A, Szlyk E (2009) *Chem Pap* 63:255
- [123] Akedo H, Shinkai K (1982) *J Chromatogr* 227:262
- [124] Kurzawa M (2010) *Chem Pap* 64:294
- [125] Mikuš P et al. (2008) *J Chromatogr B* 875:266
- [126] Ackermans MT, Beckers JL, Everaerts FM, Seelen IGJA (1992) *J Chromatogr* 590:341
- [127] Čákr M et al. (2001) *J Chromatogr A* 916:207
- [128] Budáková L, Brozmanová H, Kvasnička F, Grundmann M (2009) *Chem Listy* 103:166
- [129] Jones CJ, Larive CK (2012) *Anal Chem* 84:7099
- [130] Čákr M, Buzinkaiová T, Polonský J, Kořínková V (2000) *Electrophoresis* 21:2834

- [131] Buzinkaiová T, Sádecká J, Polonský J, Vlašičová E, Kořínková V (1993) *J Chromatogr* 638:231
- [132] Buzinkaiová T, Polonský J (2000) *Electrophoresis* 21:2839
- [136] Hirokawa T, Gojo T, Kiso Y (1986) *J Chromatogr* 52:415
- [137] Prest JE, Baldock SJ, Fielden PR, Goddard NJ, Treves Brown BJ (2004) *J Chromatogr A* 1051:221
- [138] Hirokawa T, Taka T, Yokota Y, Kiso Y (1991) *J Chromatogr* 555:247
- [139] Kler PA, Huhn C (2014) *Anal Bioanal Chem* 406:7163
- [140] Everaerts FM, van den Put JM (1970) *J Chromatogr* 52:415
- [141] Roach D, Gehrke CW (1969) *J Chromatogr A* 44:269
- [142] van Slyke DD (1911) *J Biol Chem* 9:185
- [143] van Slyke DD (1912) *J Biol Chem* 12:275
- [144] Kainz G, Huber H (1959) *Microchim Acta* 47:51
- [145] Kotrlý S, Šůcha L (1988) *Chemické rovnováhy v analytické chemii*. SNTL, Praha
- [146] Macháček V, Parchantek J, Večeřa M (2001) *Organická chemie*. Univerzita Pardubice, Pardubice
- [147] Kukurová K, Kohajdová Z, Karovičová J, Vrbíková L (2009) *Potravinářstvo* 2:44
- [148] Farag AS, Klikarová J, Česlová L, Vytřas K, Sýs M (2019) *Talanta* 202:486
- [151] Fracassetti D, Limbo S, D'Incecco P, Tirelli A, Pellegrino L (2018) *Eur Food Res Technol* 244:1545
- [152] Bueno-Solano C et al. (2009) *J Liq Chromatogr R T* 32:3009
- [153] Vinas P, Balsalobre N, Lopez-Erroz C, Hernandez-Cordoba M (2004) *J Agr Food Chem* 52:1789
- [154] Juraja SM, Trenerry VC, Millar RG, Scheelings P, Buick DR (2003) *J Food Compos Anal* 16:93
- [155] Ofitserova M, Nerkar S (2013) *LC GC North Amer Suppl*:20
- [156] Hiki A, Yamajima Y, Uematsu Y (2016) *J Food Hyg Saf* 57:96
- [157] Lang R, Yagar EF, Eggers R, Hofmann T (2008) *J Agr Food Chem* 56:11114
- [158] Perrone D, Donangelo CM, Farah A (2008) *Food Chem* 110:1030
- [159] Alves ST, Dias RCE, Benassi MD, Scholz MBD (2006) *Quim Nova* 29:1164
- [160] Chandra-Hioe MV, Bucknall MP, Arcot J (2011) *Anal Bioanal Chem* 401:1035
- [161] Tornero EM, Espinosa-Mansilla A, Meras ID (2017) *Microchem J* 133:333
- [162] Silveria CMM, Della Lucia CM, Pirozi MR, Montini TA, Pinheiro-SanT'Ana HM

(2016) *Acta Chromatogr* 28:455

- [163] Sami R et al. (2014) *J Chem* [cit. 26.2.2020] Dostupné z: <http://downloads.hindawi.com/journals/jchem/2014/831357.pdf>
- [164] Leporati A et al. (2005) *Anal Chim Acta* 531:87
- [165] Huckler B, Wakeling L, Vriesekoop F (2011) *J Agr Food Chem* 59:12278
- [166] Naz N, Kashif A, Sheikh W, Abbas M, Khan AM (2016) *Orient J Chem* 32:947
- [167] Woollard DC, Indyk HE, Christiansen SK (2000) *Food Chem* 69:201
- [168] Dinc E, Baleanu D (2012) *J AOAC Int* 95:903
- [169] Bhattacharya S, Roemer S (2015) *Abstracts Pap Amer Chem Soc* 250:129
- [170] Grossi LD et al. (2013) *Lat Am J Pharm* 32:67
- [171] Li Y, Brown PR (2003) *J Liq Chromatogr R T* 26:1769
- [172] Hampel D, York ER, Allen LH (2012) *J Chromatogr B* 903:7
- [173] Zantova K, Tvrzicka E, Vecka M, Zak A (2015) *Chem Pap* 109:950
- [174] Rybak ME, Pfeiffer CM (2004) *Anal Biochem* 333:336
- [175] Capo-chichi CD, Gueant JL, Feillet F, Namour F, Vidailhet M (2000) *J Chromatogr B* 739:219
- [176] Liu J, Pickford R, Meagher AP, Ward RL (2011) *Anal Biochem* 411:210
- [177] Ni XJ, Xing XP, Cao YH, Cao GQ (2014) *J Chromatogr A* 1370:263
- [178] Sanchez JM, Salvado V (2002) *J Chromatogr A* 950:241
- [179] Gomis DB, Gonzalez LL, Alvarez DG (1999) *Anal Chim Acta* 396:55
- [180] Vidal-Valverde C, Diaz-Pollan C (1999) *Eur Food Res Technol* 209:355
- [181] Su AK, Chang YS, Lin CH (2004) *Talanta* 64:970
- [182] Liu OQ, Liu YL, Guan Y, Jia L (2009) *J Sep Sci* 32:1011
- [183] Komarova NV, Solomonova AP, Kamentsev YS (2005) *Abstracts Pap Amer Chem Soc* 230:U279
- [184] Fotsing L, Filet M, Chiap P, Hubert P, Crommen J (1999) *J Chromatogr A* 853:391
- [185] Mrestani Y, Neubert RHH (2000) *J Chromatogr A* 871:351
- [186] Lopez de Alba PL, Lopez-Martinez L, Cerda V, Amador-Hernandez J (2006) *J Braz Chem Soc* 17:715
- [187] Sheraz MA et al. (2014) *Cent Eur J Chem* 12:635
- [188] Pathak A, Rajput SJ (2008) *Indian J Pharm Sci* 70:513
- [189] Sikorska E et al. (2008) *Anal Chim Acta* 613:207
- [190] Niazi A, Yazdanipour A, Ghasemi J, Abbasi A (2006) *J Chin Chem Soc* 53:503

- [191] Becker EM, Christensen J, Frederiksen CS, Hauqaard VK (2003) *J Dairy Sci* 86:2508
- [192] Torres-Sequeiros RA, Garcia-Falcon MS, Simal-Gandara J (2001) *Chromatographia* 53:S236
- [193] Mazurek S, Szostak R (2012) *Vib Spectrosc* 62:10
- [194] Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Sanz A, Guillen A (2004) *J Pharm Biomed Anal* 34:551
- [195] Song ZH, Hou S (2002) *J Pharm Biomed Anal* 28:683
- [196] Safavi A, Karimi MA, Nezhad MRH (2005) *Luminescence* 20:170
- [197] Aniceto C, Canaes LD, Fatibello O, Cavalheiro CCS (2000) *Quim Nova* 23:637
- [198] Zhang GF, Chen HY (2000) *Anal Lett* 33:3285
- [199] Monferrer-Pons L, Alvarez-Rodriguez L, Esteve-Romero J, Garcia-Alvarez-Coque MC (2000) *Anal Lett* 33:539
- [200] Song ZH, Wang L (2003) *Phytochem Anal* 14:216
- [201] Wang LH, Hung HC (2006) *J Liq Chromatogr R T* 29:329
- [202] Wu SH et al. (2007) *Electroanalysis* 19:2251
- [203] Karimian N et al. (2015) *RSC Adv* 5:35089
- [204] Ferreira LMC, Martins PR, Araki K, Toma HH, Angnes L (2015) *Electroanalysis* 27:2322
- [205] Georgescu R, van Staden JF, Stefan-van Staden RI, Boscornea C (2015) *J Porphyr Phthalocyanines* 19:679
- [206] DrugBank. The Governors of the University of Alberta. [cit. 2.3.2020] Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01783>
- [207] Sköld C et al. (2006) *J Med Chem* 49:6660
- [212] Frauenkron M, Melder JP, Ruider G, Rossbacher R, Höke H (2012) *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [213] Fiume M et al. (2015) *Int J Toxicol* 34:84S
- [214] Fiume M et al. (2017) *Int J Toxicol* 36:89S
- [215] Fiume M et al. (2013) *Int J Toxicol* 32:59S
- [216] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. [cit. 11.11.2019] Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf

- [217] Lessmann H, Uter W, Schnuch A, Geier J (2009) *Cont Dermat* 60:243
- [218] Zhu S et al. (2005) *J Phys Chem B* 109:11753
- [219] Shin KO, Lee YM (2016) *Arch Pharm Res* 39:66
- [220] Nordic council of ministers (1993) *Health effects of selected chemicals*. Kjeld Brandt, Copenhagen
- [221] PubChem Open Chemistry Database. National Library of Medicine, Rockville. [cit. 2.10.2019] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7618>
- [222] Brydia LE, Persinger HE (1967) *Anal Chem* 39:1318
- [223] Plekos R, Kobyliczyk K, Grzybowski J (1967) *Anal Chem* 47:1157
- [224] Giachetti C (1998) *Chromatographia* 48:443
- [225] Campo P, Suidan MT, Chai Y, Davis J (2010) *Talanta* 80:1110
- [226] Campbell LD, Carson S, Van Bramer D (1991) *J Chromatogr A* 546:381
- [227] Worsfold PJ, Yan B (1991) *Anal Chim Acta* 246:447
- [228] Bouyoucos SA, Melcher RG (1986) *Am Ind Hyg Assoc J* 47:185
- [229] Lehotay J, Hatrik Š, Motošická A (1995) *J Liq Chromatogr* 18:1647
- [230] Mrklas O, Chu A, Lunn S (2003) *J Environ Monit* 5:336
- [231] Kako K, Nakamura A, Nagashima Y, Ishida J, Fukamizu A (2015) *J Chromatogr B* 1006:93
- [232] Dawodu OF, Meisen A (1993) *J Chromatogr A* 629:297
- [233] Boneva S (1991) *Chromatographia* 31:171
- [234] Shahi P, Hu YF, Chakma A (1994) *J Chromatogr A* 687:121
- [235] Wang X, Wang C, Cai TP, Cheng Y, Wu T, Zhang F (2007) *J Instr Anal* 26:352
- [236] Chou HJ (2005) *J AOAC Int* 88:592
- [237] Akito T, Takashi K, Akira J, Warren H, Yuichiro K (2012) *J Occup Health* 54:340
- [238] Matuška R, Preisler L *Analyst* (1990) 115:1271
- [239] Niina N et al. (2005) *Anal Sci* 21:497
- [240] Gilbert R, Rioux R, Saheb SE (1984) *Anal Chem* 56:106
- [241] Xiaowan L et al. (2016) *Anal Meth* 8:2915
- [242] Shin KO, Lee YM (2016) *Arch Pharm Res* 39:66
- [243] Sollenberg J (1997) *Proc Contr Qual* 10:313
- [244] Bord N, Crétier G, Rocca JL, Bailly C, Souchez JP (2004) *Anal Bioanal Chem* 380:325
- [245] Liang G, Man Y, Jin X, Pan L, Liu X (2016) *Anal Chim Acta* 936:222

- [246] Jackson WA, LaCourse WR, Dobberpuhl DA, Johnson DC (1991) *Electroanalysis* 3:607
- [247] Yilmaz VT, Menek N, Odabasoglu M (1993) *Cem Concr Res* 23:603
- [249] Flory J, Lipska K (2019) *Clin Rew Education*. [cit. 8.11.2019] Dostupné z: https://web.uniroma1.it/spec_medint/sites/default/files/jama_flory_2019_it_190003.pdf
- [250] Dunn CJ, Peters DH (1995) *Drugs* 49:721
- [251] AbuRuz S, Millership J, McElnay J (2005) *J Chromatogr B* 817:277
- [252] Wang M, Miksa IR (2007) *J Chromatogr B* 856:318
- [253] Zhang L, Tian Y, Zhang Z, Chen Y (2007) *J Chromatogr B* 854:91
- [254] Keal J, Somogyi A (1986) *J Chromatogr* 378:503
- [255] Liu A, Coleman SP (2009) *J Chromatogr B* 877:3695
- [256] Koseki N, Kawashita H, Niina M, Nagae Y, Masuda N (2005) *J Pharm Biomed Anal* 36:1063
- [257] Thevis M, Geyer H, Schänzer W (2005) *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:928
- [258] Bones J, Thomas K, Nesterenko PN, Paull B (2006) *Talanta* 70:1117
- [259] Cahill JD, Furlong ET, Burkhardt MR, Kolpin DW, Anderson LG (2004) *J Chromatogr A* 1041:171
- [260] Ferrer I, Zweigenbaum JA, Thurman EM (2010) *J Chromatogr A* 1217:5674
- [261] Kolpin DW et al. (2002) *Environ Sci Technol* 36:1202
- [262] Martín J, Buchberger W, Santos JL, Alonso E, Aparicio I (2012) *J Chromatogr B* 895-896:94
- [263] Malleswararao CSN, Suryanarayana MV, Mukkanti K (2012) *Sci Pharm* 80:139
- [264] El-Bagary RI, Elkady EF, Ayoub BM (2011) *Int J Biomed Sci* 7:201
- [265] AlShehri M, AlZoman N, AlHarbi H, AlSulaihik K, AlOdaib F (2018) *J Chem Soc Pak* 40:495
- [266] El-Zaher AA, Elkady EF, Elwy HM, Saleh MA (2016) *J AOAC Int* 99:957
- [267] Yardimci C, Özaltin N (2005) *Anal Chim Acta* 549:88
- [268] Modi DK, Patel BH (2013) *J Liq Chromatogr R T* 36:618
- [270] Claeys W et al. (2009) *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26:1265
- [271] Salthammer T, Mentese S, Marutzky R (2010) *Chem Rev* 110:2536

- [272] Rezende FBD, Chebibub AMDS, Netto ADP, Marques FFD (2017) *Microchem J* 134:383
- [273] Malekpour A, Ahmadi N (2017) *Food Anal Met* 10:1817
- [274] Brandao PF et al. (2017) *Anal Bioanal Chem* 409:2885
- [275] Flora JW et al. (2017) *J Chromatogr Sci* 55:142
- [276] Yilmaz B, Asci A, Kucukoglu K, Albayrak M (2016) *J Sep Sci* 39:2963
- [277] Wahed P, Razzaq MA, Dharmapuri S, Corrales M (2016) *Food Chem* 202:476
- [278] Zhao JC, Wang GL, Cao T, Guo Z (2016) *Food Anal Met* 9:156
- [279] Hassan J, Shams GR, Meighani H (2015) *J Anal Chem* 70:1495
- [280] Lim HH, Shin HS (2017) *J Chromatogr Sci* 55:109
- [281] Alekseenko AN, Zhurba OM, Efimova NV, Rukavishnikov VS (2017) *J Anal Chem* 72:83
- [282] Kannan PK, Saraswathi R (2017) *J Mat Res* 32:2800
- [283] Demkiv O, Smutok O, Gonchar M, Nisnevitch M (2017) *Materials* 10:503
- [284] Nascimento CF et al. (2015) *Talanta* 144:1189
- [285] Ganjikhah M, Shariati S, Bozorgzadeh E (2017) *J Iran Chem Soc* 14:763
- [286] Qiao J, Chang JJ, Wang HJ, Sun TJ, Dong C (2017) *Anal Lett* 50:80
- [287] Formaldehydi Kutvirtí gargarisma [cit. 2.3.2020] Dostupné z: <https://www.e-laborator.cz/zbozi/formaldehydi-kutvirti-gargarisma-20g-pipeta>

Zdroje obrázků

- aa Histamine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Histamine>
- ab Serotonin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>
- ac Tryptamin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Tryptamin.svg>
- ad Dopamin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Dopamin>
- ae Adrenaline [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Adrenaline>
- af Noradrenalin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Noradrenalin>
- ag Tyramin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Tyramin>
- ah Phenethylamin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Phenethylamin>
- ai Creatinine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Creatinine>
- aj Putrescine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Putrescine>
- ak Cadaverine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cadaverine>

- al Spermine [cit. 5.3.2020] Dostupné z:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/s3836?lang=en®ion=CZ>
- am Spermidine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Spermidine>
- an Glycin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glycin>
- ao Alanin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Alanin>
- ap Valin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Valin>
- aq Leucin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Leucin>
- ar Isoleucin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Isoleucin>
- as Fenylalanin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylalanin>
- at Tyrosin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Tyrosin>
- au Tryptofan [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Tryptofan>
- av Lysin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Lysin>
- aw Arginin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Arginin>
- ax Histidin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Histidin>
- ay Aspartic acid [cit. 5.3.2020] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspartic_acid
- az Kyselina glutamová [cit. 5.3.2020] Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_glutamová
- ba Asparagin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Asparagin>
- bb Glutamin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glutamin>
- bc Cystein [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cystein>
- bd Methionin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Methionin>
- be Serin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Serin>
- bf Threonin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Threonin>
- bg Prolin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Prolin>
- bh Citrulin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Citrulin>
- bi Ornitin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Ornitin>
- bj Taurin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Taurin>
- bk Theanine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Theanine>
- bl Carnitine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carnitine>
- bm Anserine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Anserine>
- bn Carnosine [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carnosine>
- bo Glutathion [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glutathion>
- bp Melatonin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin>

- bq Human Insulin [cit. 5.3.2020] Dostupné z:
<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P01308>
- br Glucagon [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <http://www.chinachemnet.com/33236/Glucagon-1069572.html>
- bs Human Growth Hormone [cit. 5.3.2020] Dostupné z:
<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P01241>
- bt Oxytocin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oxytocin>
- bu Vasopressin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Vasopressin>
- bv Met-enkephalin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Met-enkephalin>
- bw Insulin Like Growth Factor I [cit. 5.3.2020] Dostupné z:
<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P05019>
- bx Bacitracin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacitracin>
- by Dactinomycin [cit. 5.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dactinomycin>
- bz Palmitic acid [cit. 6.3.2020] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Palmitic_acid
- ca Stearic acid [cit. 6.3.2020] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Stearic_acid
- cb Kyselina palmitoolejová [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_palmitoolejová
- cc Oleic acid [cit. 6.3.2020] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Oleic_acid
- cd α -Linolensäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
<https://de.wikipedia.org/wiki/%CE%91-Linolensäure>
- ce Eicosapentaensäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
<https://de.wikipedia.org/wiki/Eicosapentaensäure>
- cf Docosahexaensäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
<https://de.wikipedia.org/wiki/Docosahexaensäure>
- cg Linolsäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Linolsäure>
- ch Arachidonsäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
<https://de.wikipedia.org/wiki/Arachidonsäure>
- ci Phosphatidylcholine [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatidylcholine>
- cj Phosphatidylserin [cit. 6.3.2020]
Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Phosphatidylserin>
- ck Glukóza [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glukóza>
- cl Fructose [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Fructose>

- cm Ribóza [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Ribóza>
- cn Deoxyribóza [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Deoxyribóza>
- co Laktóza [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
http://www.1sg.sk/www/data/01/projekty/2015_2016/falcons/vyrobcovia/Projekt_Bozie_dary/Mlieko_text.html
- cp Lactulose [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haworth_projection_of_lactulose.svg
- cq Glukosamin [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glukosamin>
- cr Pangamsäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Pangamsäure>
- cs Kyselina glukarová [cit. 6.3.2020]
Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_glukarová
- ct Glucuronolactone [cit. 6.3.2020]
Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glucuronolactone>
- cu Inosit [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Inosit>
- cv Kyselina fytová [cit. 6.3.2020] Dostupné z: http://sestra.org/Kyselina_fytová
- cw D-Pinitol [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://www.watson-int.com/d-pinitol-cas-10284-63-6/>
- cx Guma guar [cit. 6.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Guma_guar
- cy Pektine [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Pektine>
- cz Chitosan [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>
- da Chondroitin [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Chondroitin>
- db Orotic acid [cit. 6.3.2020] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Orotic_acid
- dc 2-oxoglutarát [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/2-oxoglutarát>
- dd Äpfelsäure [cit. 6.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Äpfelsäure>
- de Kyselina pyrohroznová [cit. 6.3.2020] Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_pyrohroznová
- df Kyselina citronová [cit. 6.3.2020]
Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_citronová
- dg DNA [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/DNA>
- dh RNA [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/RNA>
- di Adenosine triphosphate [cit. 7.3.2020] Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_triphosphate

- dj Guanosine triphosphate [cit. 7.3.2020] Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Guanosine_triphosphate
- dk Cytidintriphosphat [cit. 7.3.2020]
Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Cytidintriphosphat>
- dl Inosin [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Inosin>
- dm Nikotinamidadenindinukleotid [cit. 7.3.2020] Dostupné z:
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Nikotinamidadenindinukleotid>
- dn Vitamín A [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_A
- do Vitamín D [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_D
- dp Tocopherol [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Tocopherol>
- dq Vitamín K [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_K
- dr Vitamín B1 [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_B1
- ds Vitamín B2 [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_B2
- dt Niacin [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Niacin>
- du Kyselina pantothenová [cit. 7.3.2020] Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_pantothenová
- dv Vitamín B6 [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_B6
- dw Biotin [cit. 7.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Biotin>
- dx Kyselina listová [cit. 7.3.2020]
Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_listová
- dy Vitamín C [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_C
- dz Vitamín B12 [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitamín_B12
- ea Koenzym Q10 [cit. 7.3.2020] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Koenzym_Q10
- eb Amino 1000, BCAA Mega Capsules [cit. 8.3.2020] Dostupné z:
<http://www.sypacky.sk/33665-vitalmax-bcaa-amino-1000-mega-capsules>
- ec BCAA Liquid Orange Flavour [cit. 8.3.2020] Dostupné z:
<https://www.penco.cz/en/aminoacids-span-bcaa-liquid-1000ml-/span-orange>
- ed Med [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.dobrehouby.eu/produkt/med-akatovy/>
- ef Flexit Liquid Orange [cit. 8.3.2020]
Dostupné z: https://www.cyklomania.cz/prodej/Nutrend_Flexit_Liquid_500ml_-_citron
- eg Tablety L-theanin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.mall.cz/pripravky-na-nervy/vetrisol-l-theanin-30-tbl-100002514880>

- ^{eh} Zelený čaj Sencha [cit. 8.3.2020] Dostupné z: https://www.manutea.cz/japan-sencha-bio-zeleny-cajx1259?gclid=EAIaIQobChMI0qLfiaq65wIVQ9HeCh2FyA5iEAQYAiABEgI3T_D_BwE#g:1000
- ^{ei} Zelený čaj Yunnan [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.manutea.cz/zeleny-yunnan-op-zeleny-caj-x1134>
- ^{ej} Taurin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Taurin>
- ^{ek} Konjugovaná žlučová kyselina Převzato z: Koolman J, Röhm KH (2012) Barevný atlas biochemie. Grada, Praha
- ^{el} Energetický nápoj Maximal G [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.billa.at/produkte/maximal-g-energydrink/00-416036>
- ^{em} Energetický nápoj QXE [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.e-cukrovinky.cz/e-cukrovinky/eshop/6-1-NAPOJE/-4-/5/3458-Energy-drink-QXE-250ml-SUPER-CENA>
- ^{en} Energetický nápoj Tiger [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.akcniceny.cz/akce/tiger-energy-drink-250ml-vybrane-druhy/>
- ^{eo} Energetický nápoj CrazyWolf [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.akcniceny.cz/akce/energy-drink-crazy-wolf-3085509/>
- ^{ep} CarboSnack [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.ebiopotraviny.cz/Carbosnack-merunka-brno-kralovopole-zdravavyziva>
- ^{eq} Biosil Plus [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.drmax.cz/biosil-plus-tbl-60>
- ^{er} Acidum folicum Léčiva [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.emimino.cz/bazar/acidum-folicum-kyselina-listova-873065/>
- ^{es} B-Komplex Zentiva [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://lieky24.sk/160-b-komplex-zentiva-30-drg.html>
- ^{et} B-komplex forte [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/b-komplex-forte-tbl-20generica/>
- ^{eu} Krém na ruce s měsíčkovým extraktem [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://starostlivost-o-ruky-a-nechty.heureka.sk/aro-krem-na-ruky-mesickovy-100-ml/>
- ^{ev} Odličovací krém True Colour [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://produkty.mamotoja.pl/avon/avon-preparat-do-demakijazu-oczu-z-odzywka>
- ^{ew} Derma Guard bariérový krém [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/dermaguard-barierovy-krem-110ml>

- ^{ex} Masážní krém Strong Power [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.benu.cz/strong-power-masazni-krem-100g>
- ^{ey} Gel na holení Gillette Fusion ProGlide [cit. 8.3.2020] Dostupné z: https://www.europarfemy.cz/gel-na-holeni-gillette-fusion-proglide-hydrating_z7954/
- ^{ez} Gel na vlasy Garnier Fructis Style [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.zbozi.cz/vyrobek/garnier-endurance-24h-ultra-strong-gel-200-ml/>
- ^{fa} Avon tělový peeling [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.notino.cz/avon/naturals-body-care-sensational-body-scrub>
- ^{fb} Avon hydratační sprej [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.vinted.cz/damska-kosmetika/pece-o-telo-kosmetika/17138794-avon-hydratacni-sprej-na-telo-senses-romantic-garden-of-eden>
- ^{fc} Ibalgin krém [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/ibalgin-krem-100g/>
- ^{fd} Altermed antisectin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.notino.cz/altermed/antisectin-chladivy-roll-on-pro-zmirneni-svedeni/>
- ^{fe} Metformin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Metformin>
- ^{ff} Buformin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Buformin>
- ^{fg} Fenformin [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phenformin>
- ^{fh} Siofor 500 [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <http://www.lekarstva-iz-germani.com/sakharnyj-diabet/585-artane-2-mg-tabletten-100-sht.html>
- ^{fi} Siofor 850 [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://www.abc-lekarna.cz/siofor-850-60x850mg-potahovane-tablety-66129-zkusenosti>
- ^{fj} Siofor 1000 [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <https://pharmacy-new.org/siofor-1000-mg-30-tablets>
- ^{fk} Glucophage XR [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <http://medicall.qa/product/glucophage-xr-500mg-tab-30s/>
- ^{fl} Stamet 850 [cit. 8.3.2020] Dostupné z: <http://www.stada-pharma.cz/produkty/leky-na-predpis/stadamet-500-stadamet-850/>

7. PŘÍLOHY

Příloha 1: Michaela Kovářová, Martin Bartoš, Tomáš Mikysek, Dana Hloušková, Blanka Hyhlíková, Jana Vladyková: Isotachophoretic determination of amino acids after their conversion to hydroxyacids, Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly, 149 (9), str. 1709-1718, 2018

Příloha 2: Michaela Janečková, Martin Bartoš, Jana Lenčová: Isotachophoretic determination of triethanolamine in cosmetic products, Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly, 150 (3), str. 387-390, 2019