

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Markéta Marková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace derivatizace a separace aminokyselin přítomných v potravinových
doplňcích

Markéta Marková

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Marková**
Osobní číslo: **C19570**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Optimalizace derivatizace a separace aminokyselin přítomných v potravinových doplňcích**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na způsoby derivatizace aminokyselin vyskytujících se v doplňcích stravy pro sportovce. Dále se zaměřte na analýzu derivátů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s různými typy detekce.
2. Na základě literární rešerše vyberte vhodné derivatizační činidlo a optimalizujte derivatizační postup s využitím standardů aminokyselin.
3. Optimalizujte rychlou chromatografickou separaci pro deriváty standardů aminokyselin obsažených v doplňcích stravy pro sportovce. Pro separaci využijte systém s obrácenými fázemi.
4. Optimalizovaný derivatizační postup a chromatografickou separaci využijte pro analýzu reálných vzorků.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jitka Klikarová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Optimalizace derivatizace a separace aminokyselin přítomných v potravinových doplňcích 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 15. 7. 2021

Bc. Markéta Marková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. a konzultantce Ing. Jitce Klikarové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, praktické připomínky a ochotu při vypracování diplomové práce. V neposlední řadě patří poděkování celé rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá analýzou aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA) přítomných v potravinových doplňcích. Teoretická část je věnována obecné charakteristice aminokyselin, proteinů a potravinových doplňků. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci derivatizace a separace BCAA pomocí RP-HPLC s předkolonovou derivatizací fenyliothiokyanátem. Deriváty aminokyselin byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem. Optimalizovaná metoda byla validována a poté aplikována na reálné vzorky potravinových doplňků, kde bylo sledováno jejich deklarované množství uvedené na obalu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Doplňky stravy, aminokyseliny, kapalinová chromatografie, derivatizace

TITLE

Optimization of derivatization and separation of amino acids present in food supplements

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the analysis of branched chain amino acids (BCAA) present in food supplements. The theoretical part is devoted to the general characteristics of amino acids, proteins and food supplements. The experimental part is focused on the optimization of derivatization and separation of BCAA using RP-HPLC with pre-column derivatization using phenyl isothiocyanate. Amino acid derivatives were detected using a diode array detector. The optimized method was validated and then applied to real samples of food supplements, where their declared amount stated on the packaging was monitored.

KEYWORDS

dietary supplements, amino acids, liquid chromatography, derivatization

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1	AMINOKYSELINY	15
1.1.1	Dělení	16
1.1.2	Vlastnosti	17
1.2	VĚTVENÉ AMINOKYSELINY (BCAA)	21
1.2.1	Fyziologické účinky BCAA	23
1.2.2	Metabolismus BCAA	25
1.3	BÍLKOVINY	26
1.3.1	Klasifikace bílkovin	26
1.3.2	Zdroje bílkovin	27
1.3.3	Denaturace bílkovin	28
1.3.4	Rychlost obratu proteinů	28
1.4	POTRAVINOVÉ DOPLŇKY	29
1.4.1	Denní příjem	29
1.4.2	Kvalita a bezpečnost suplementů	30
1.5	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	31
1.5.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	31
1.5.2	Iontově-výměnná chromatografie (IEC)	37
1.6	DERIVATIZACE	37
1.6.1	Ninhydrin	39
1.6.2	O-ftaldialdehyd (OPA)	39
1.6.3	Fenylisothiokyanát (PITC)	40
1.6.4	9-fluorenylmethoxychlorformiát (FMOC)	40
1.6.5	6- aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC)	41
1.6.6	Dansyl-chlorid (Dns-Cl)	41
1.6.7	Dabsyl-chlorid (DBS)	42

1.6.8	N-hydroxysukcinimidyl- α -(9-acridin)-acetát (HSAA).....	42
1.7	ANALÝZA AMINOKYSELIN.....	42
1.7.1	Hydrolyza.....	43
1.7.2	Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací.....	45
1.7.3	RP-HPLC s předkolonovou derivatizací.....	45
2	CÍL PRÁCE.....	48
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	49
3.1	Přístroje a vybavení.....	49
3.2	Použité chemikálie.....	50
3.3	Pracovní roztoky.....	50
3.4	Vzorky.....	51
3.5	Pracovní postup analytického stanovení BCAA ve vzorcích potravinových doplňků pomocí RP-HPLC s PITC derivatizací.....	52
3.5.1	Příprava vzorků.....	52
3.5.2	Příprava zásobních roztoků vzorků.....	52
3.5.3	Derivatizace.....	52
3.6	Optimalizované podmínky pro stanovení aminokyselin v potravinových doplňcích.....	53
3.7	Kvantitativní stanovení BCAA v potravinových doplňcích.....	54
3.7.1	Příprava standardů aminokyselin pro sestavení kalibrační přímky.....	54
3.8	Statistické zpracování experimentálních dat.....	54
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
4.1	Optimalizace derivatizačního kroku.....	55
4.2	Optimalizace podmínek separace PITC derivátů aminokyselin pomocí RP-HPLC.....	55
4.2.1	Vliv mobilní fáze.....	55
4.2.2	Vliv koncentrace.....	57
4.2.3	Vliv stacionární fáze.....	58
4.2.4	Gradientová eluce.....	59

4.3	Kvantitativní stanovení BCAA v potravinových doplňcích	60
4.3.1	Kalibrace	60
4.3.2	Analýza vzorků	62
4.4	Validace analytické metody	64
4.4.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti	64
4.4.2	Návratnost metody	65
4.4.3	Opakovatelnost	66
4.5	Porovnání derivatizačních metod	67
5	ZÁVĚR	71
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
7	PŘÍLOHY	87

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Strukturní vzorce α , β a γ -aminokyselin.....	15
Obrázek 2 - Disociace AMK v kyselém prostředí.....	17
Obrázek 3 - Disociace AMK v bazickém prostředí.....	18
Obrázek 4 - Vzorec pro výpočet hodnoty izoelektrického bodu.....	18
Obrázek 5 - Schéma metabolismu BCAA.....	22
Obrázek 6 - Struktura α -helixu (vlevo) a β -skládaného listu (vpravo).....	27
Obrázek 7 - Schéma kapalinového chromatografu.....	32
Obrázek 8 - Schéma šesticestného dávkovacího zařízení.....	33
Obrázek 9 - Schéma pístového čerpadla.....	34
Obrázek 10 - Schéma detektoru diodového pole (DAD).....	36
Obrázek 11 - Výměna iontů na iontoměniči.....	37
Obrázek 12 - Schéma reakce AK s ninhydrinem.....	39
Obrázek 13 - Schéma reakce OPA s primárním aminem v přítomnosti merkptoethanolu....	40
Obrázek 14 - Schéma reakce PITC s AK.....	40
Obrázek 15 - Schéma reakce Dns-Cl s aminokyselinami.....	41
Obrázek 16 - Chromatografická separace vzorku BCAA za použití mobilní fáze 70 mM octanu sodného při vybraných hodnotách pH.....	56
Obrázek 17 - Chromatografická separace vzorku BCAA za použití mobilní fáze 70 mM octanu amonného při vybraných hodnotách pH.....	57
Obrázek 18 - Chromatografická separace standardů BCAA za podmínek izokratické eluce s kolonou C ₁₈ Zorbax SB-Aq.....	58
Obrázek 19 - Chromatografická separace derivátů standardů BCAA za podmínek izokratické eluce s kolonou Ascentis Express F5.....	59
Obrázek 20 - Optimalizovaná chromatografická separace standardů BCAA aminokyselin... 60	60
Obrázek 21 - Kalibrační přímky vybraných aminokyselin.....	61
Obrázek 22 - Chromatografický záznam vzorku 7 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC sušící metodou.....	68
Obrázek 23 - Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 7 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC metodou z roztoku.....	69
Obrázek 24 - Chromatografický záznam vzorku 9 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC sušící metodou a koeluce lysinu s činidlem.....	69

Obrázek 25 - Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 9 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC metodou z roztoku.....	70
Tabulka 1 - Přehled aminokyselin.....	19
Tabulka 2 - Hodnoty PDCAAS u vybraných zdrojů bílkovin.....	30
Tabulka 3 - Porovnání vybraných derivatizačních činidel.....	38
Tabulka 4 - Příklady činidel používaných pro kyselou hydrolýzu.....	44
Tabulka 5 - Přehled vzorků potravinových doplňků vybraných pro analýzu BCAA.....	51
Tabulka 6 - Podmínky gradientové eluce pro separaci aminokyselin BCAA v potravinových doplňcích.....	53
Tabulka 7 - Parametry kalibračních přímků vybraných aminokyselin.....	61
Tabulka 8 - Průměrné hodnoty koncentrací, návratnosti a získané relativní směrodatné odchylky jednotlivých AK na vybraných koncentračních hladinách.....	66
Graf 1 - Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím valinu uvedeným na obalu vzorku.....	63
Graf 2 - Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím isoleucinu uvedeným na obalu vzorku.....	63
Graf 3 - Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím leucinu uvedeným na obalu vzorku.....	64

Seznam zkratek

AK	Aminokyseliny
AK-P	Aminokyselinový pool
Ala	Alanin
AQC	6-aminochinoly-N-hydroxysukcinimidylkarbamát
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Kyselina asparagová
BCAA	Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
BCAT	Enzym aminotransferáza
BCKA	Ketokyseliny s rozvětveným řetězcem
BCKD	Enzym dehydrogenáza
C₁₈	Oktadecyl silikagel
C₈	Oktyl silikagel
CE	Kapilární elektroforéza
Cys	Cystein
DAD	Detektor s diodovým polem
DBS	Dabsyl-chlorid
DDP	Doporučený denní příjem
Dns-Cl	Dansyl-chlorid
FLD	Fluorescenční detektor
FMOc	9-fluorenylmetoxychlorformiát
GC	Plynová chromatografie
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
Gly	Glycin
HCl	Kyselina chlorovodíková
His	Histidin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSAA	N-hydroxysukcinimidyl- α -(9-acridin)-acetát
IEC	Iontově-výměnná chromatografie

Ile	Isoleucin
Ka	Disociační konstanta
KIC	Kyselina α -ketoisokapronová
KIV	Kyselina α -ketoisovalerová
KMV	Kyselina α -keto- β -methylvalerová
LC	Kapalinová chromatografie
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometr
MS/MS	Tandemový hmotnostní spektrometr
MSA	Kyselina metansulfonová
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s normálními fázemi
OPA	O-ftaldialdehyd
PDCAAS	Index vstřebatelnosti podle složení aminokyselin
Phe	Fenylalanin
pI	Izoelektrický bod
PITC	Fenylisothiokyanát
Pro	Prolin
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
RSD	Relativní směrodatná odchylka
Ser	Serin
SF	Stacionární fáze
TEA	Triethylamin
Thr	Threonin
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
UV/VIS	Spektrofotometrický detektor
Val	Valin

ÚVOD

Aminokyseliny jsou základní stavební složkou organismů a účastní se mnoha životně důležitých procesů. Jejich nerovnováha může způsobit vážná onemocnění nebo poruchy metabolismu. V lidském těle se vyskytují buď ve volné formě nebo vázané amidovými vazbami v bílkovinách. Aminokyseliny jsou přijímány hlavně z potravy a některé si tělo dokáže syntetizovat samo.

Potravinové doplňky s obsahem aminokyselin patří k trvale nejoblíbenějším produktům užívaných nejen sportovci, ale také běžnou populací. Jsou doporučovány fyzicky aktivním jedincům k prevenci katabolismu bílkovin během cvičení, snížení únavy, zlepšení koncentrace či podpoře hubnutí. Jejich účinky by měly v zásadě pozitivní, nicméně nadměrným užíváním může dojít i k poškození zdraví jedince. Doplňky stravy patří do zvláštní kategorie potravin, na které se nevztahuje povinnost výrobce provést testy účinnosti a nezávadnosti před jeho uvedením na trh. To je spojeno s jejich falšováním, nesplněním deklarovaného obsahu nebo přítomností zakázaných látek. Jejich rychlou a efektivní analýzou tak lze možné kontaminanty identifikovat či zkontrolovat, zda se množství deklarované výrobcem shoduje se skutečným obsahem. Jejich stanovení dále slouží k odhalení metabolických onemocnění či k charakterizaci bílkovinných frakcí.

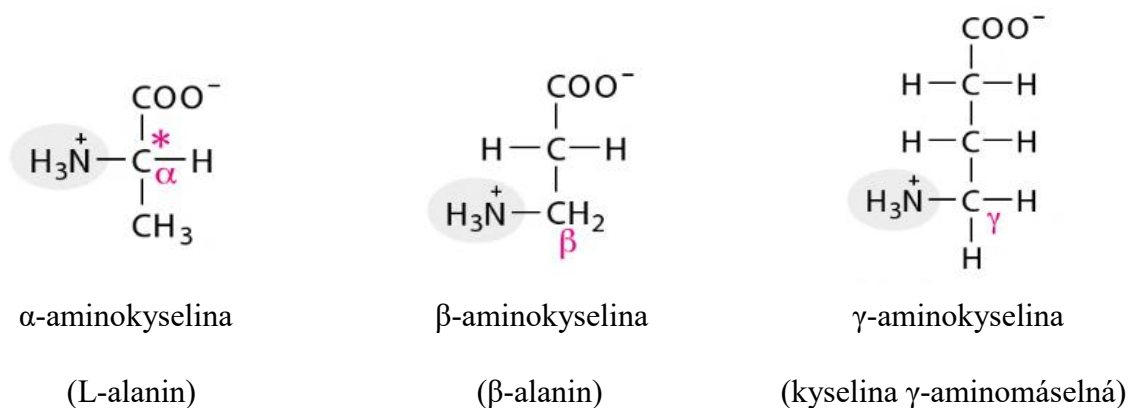
Analýza aminokyselin probíhá nejčastěji metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi a po předchozí derivatizaci s vhodným derivatizačním činidlem. Detekce derivátů aminokyselin se provádí pomocí spektrofotometrického, fluorimetrického nebo elektrochemického detektoru.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny (AK) jsou substitučními deriváty karboxylových kyselin obsahující nejméně jednu bazickou aminovou a kyselou karboxylovou skupinu navázanou na jednom atomu uhlíku [1-3]. Jsou obsaženy v lipidech, fungují také jako prekurzory neurotransmiterů, hormonů, enzymů nebo některých metabolitů a poskytují atomy uhlíku nebo dusíku pro syntézu dalších biomolekul [3, 4]. Jejich příjem vede k pozitivní dusíkové bilanci, tzn. k syntéze proteinů, dále přispívají k prevenci před nemocemi a oxidačním stresem [2, 5, 6].

V lidském organismu se vyskytuje 20 biogenních aminokyselin, ze kterých je tělo schopné proteosyntézou sestavit bílkoviny. Nazývají se proteinogenní a jsou základními stavebními jednotkami proteinů [4, 7, 8]. Vyskytují se přirozeně ve formě α -aminokyselin (2-aminokarboxylové kyseliny), kde je aminoskupina vázaná na atomu uhlíku sousedícího s karboxylovou skupinou [4]. Kromě glycinu představuje α -uhlík aminokyselin chirální centrum a mohou tedy existovat ve dvou enantiomerních formách D a L. Glycin nemá na svém α -uhlíku navázané 4 různé substituenty, nemá tedy žádný střed symetrie a nemůže tyto enantiomery tvořit. K zápisu vzorců se využívá, podobně jako u sacharidů, znázornění pomocí Fischerovy projekce. Díky tomu lze stanovit, o jaký enantiomer se jedná. Drtivá většina přirozených aminokyselin se nachází v L-konfiguraci, D-aminokyseliny se nachází pouze u bakterií. Odlišné konfigurace enantiomerů může znamenat neúčinnost či jiné nežádoucí účinky, které mohou vážně poškodit zdraví [1, 4].



Obrázek 1: Strukturální vzorce α , β a γ -aminokyselin [4].

1.1.1 Dělení

Aminokyseliny se dají rozdělit do několika skupin podle mnoha aspektů. Například dělení dle pozice, kterou vůči sobě zaujímá aminoskupina a karboxylová skupina, je můžeme dělit na α , β nebo γ -aminokyseliny (Obrázek 1) [3, 4].

Z hlediska postradatelnosti je můžeme rozdělit do tří skupin. Esenciální AK jsou pro tělo nepostradatelné a organismus je nedokáže sám endogenně syntetizovat, proto je musíme přijímat z potravy [9]. Patří mezi ně valin, leucin, izoleucin, tryptofan, fenylalanin, lysin, methionin a threonin [10]. Mezi semiesenciální AK se řadí arginin a histidin. Tyto AK jsou esenciální jen do určitého věku nebo při zatížení organismu. Zbýlých 11 jsou neesenciální a ty si tělo dokáže samo syntetizovat přeměnou dostupných AK nebo z vedlejších produktů metabolismu sacharidů [9, 11]. Mezi neesenciální AK patří asparagin, glutamin, glycin, kyselina glutamová, kyselina asparagová, prolin, tyroxin, cystein, serin, alanin a arginin [10]. Pro stavbu a syntézu bílkovin je nutný přísun všech 20 aminokyselin a jejich nedostatek může vést k projevům podvýživy [1].

Z hlediska charakteru postranního řetězce, který se významně podílí na chemických vlastnostech AK, je můžeme dělit na kyselé, neutrální a bazické. Mezi neutrální AK řadíme glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin a threonin. Kyselé aminokyseliny, mezi které patří kyselina glutamová a asparagová, jsou při fyziologickém pH téměř zcela disociovány a vyskytují se tedy ve formě aspartátů či glutamátů [1, 4]. Kyselina glutamová zlepšuje nervovou činnost a oddaluje svalovou únavu [10]. Lysin, histidin a arginin patří do skupiny bazických AK, které se při fyziologickém pH protonují. Kladně nabitá ϵ -aminoskupina u lysinu je vysoce reaktivní a díky tomu se účastní reakcí v aktivních centrech enzymů. Je nezbytným stavebním prvkem tělesných bílkovin, účastní se procesu vstřebávání vápníku a napomáhá při rekonvalescenci po operaci nebo úrazech. Bohatými zdroji lysinu jsou luštěniny, maso a brambory. Histidin je nezbytný pro růst a obnovu tkání. Arginin disponuje silnou bazicitou a polárním charakterem zejména díky přítomnosti guanidinové skupiny ve své molekule. Hraje důležitou roli při posílení imunitního systému, v metabolismu dusíku a je intermediátem ornitinového cyklu [1, 4, 10, 12].

Aromatické aminokyseliny mají ve svém postranním řetězci stabilizované jádro a řadíme mezi ně fenylalanin (nepolární), tyrozin a tryptofan (středně polární). Fenylalanin je hydrofobní a málo rozpustná AK odvozená od alaninu. Je prekurzorem fenylethylaminu, který je pro své

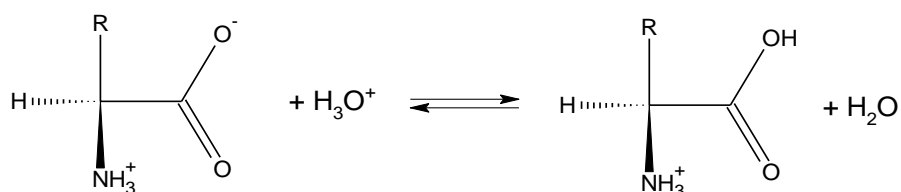
analgetické a antidepresivní účinky běžně užíván jako doplněk stravy. Bohatým zdrojem fenylalaninu jsou fazole, arašídý, mléčné výrobky nebo mandle [1, 8, 12].

Prolin a hydroxyprolin se často označují jako iminokyseliny, protože struktura jejich postranního řetězce je tvořena pyrolovým jádrem. Obě AK se podílí na syntéze kolagenu a dalších bílkovinách pojivové tkáně [10].

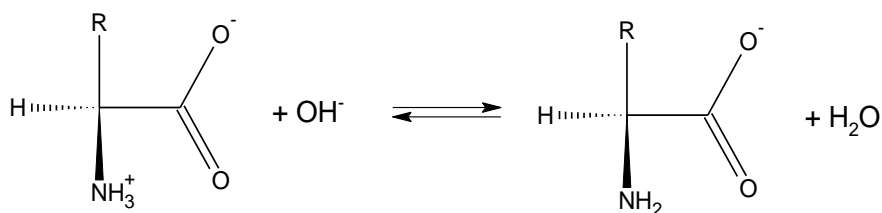
Mezi sirné AK, které mají ve svém postranním řetězci thiolovou skupinu, patří cystein a methionin. Methionin je esenciální AK, která je hlavním zdrojem síry v těle. Účastní se syntézy bílkovin a S-adenosylmethioninu, který slouží jako koenzym mnoha biochemických reakcí. Je prekurzorem cysteinu, glutationu, fosfolipidů nebo neurotransmiterů. Zdroje methioninu jsou především obilniny. Cystein obsahuje thiolovou skupinu, podílí se na aktivních centrech enzymů a účastní se tvorby disulfidových můstků, které vznikají oxidací dvou cysteinových zbytků. Tvorbou této vazby dojde ke spojení polypeptidových řetězců. Typickým příkladem cysteinového zesíťování je inzulin. Je součástí tripeptidu glutathionu, který má významné antioxidační vlastnosti [1, 10, 12, 13].

1.1.2 Vlastnosti

Díky přítomnosti kyselé i zásadité skupiny existují aminokyseliny výhradně ve formě dipolárních iontů (amfolytů), které mají vlastnosti podobné solím. V závislosti na pH prostředí se mohou chovat jako kyseliny nebo jako zásady. V kyselém vodném prostředí se dipolární iont AK chová jako báze, může tedy přijmout proton a vytvořit kation (Obrázek 2). Zatímco v bazickém prostředí dochází k tvorbě aniontu odštěpením protonu z molekuly (Obrázek 3). Jako celek molekula vystupuje jako neutrální látka [1, 2].



Obrázek 2: Disociace AMK v kyselém prostředí [1].



Obrázek 3: Disociace AMK v bazickém prostředí [1].

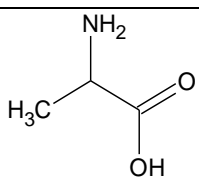
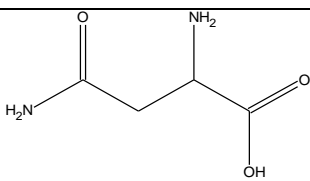
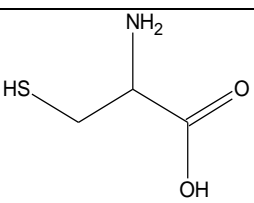
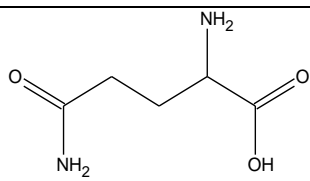
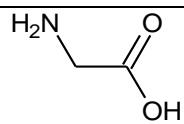
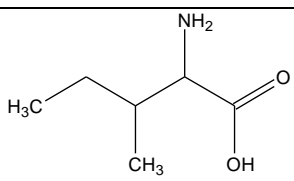
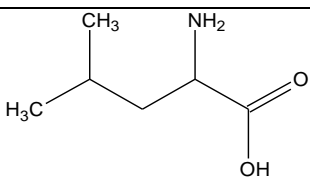
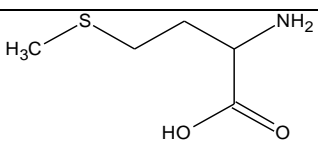
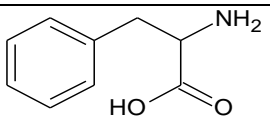
Takové pH roztoku, kdy se molekula nachází ve formě neutrálního dipolárního iontu se nazývá izoelektrický bod (pI). Hodnota pI je závislá na struktuře postranního řetězce aminokyseliny a lze ji numericky vypočítat na základě znalostí disociačních konstant K_a (Obrázek 4). Bílkoviny mají také různé hodnoty izoelektrických bodů a jejich rozpustnost se může měnit v závislosti na pH prostředí [1, 3, 4, 14]. Přibližné hodnoty disociačních konstant a pI aminokyselin jsou uvedeny v tabulce 1.

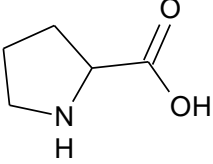
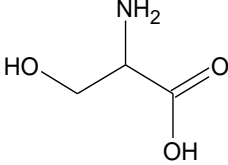
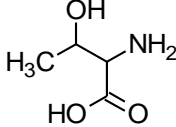
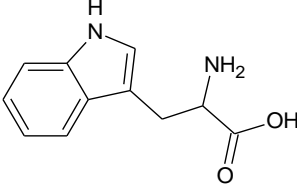
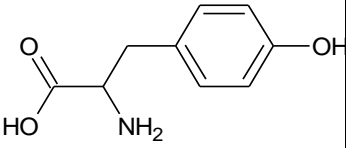
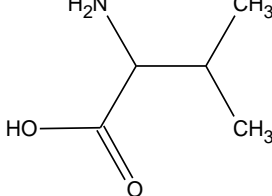
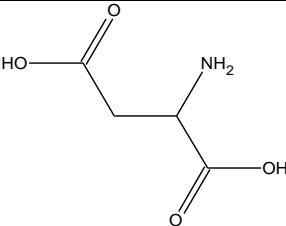
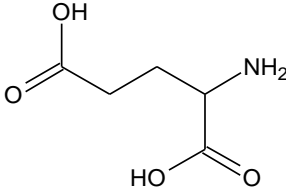
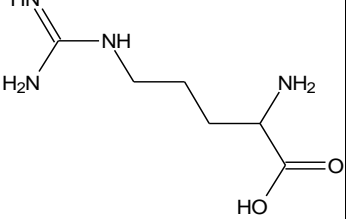
$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

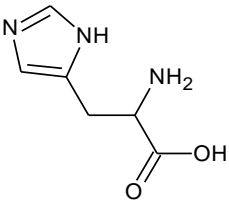
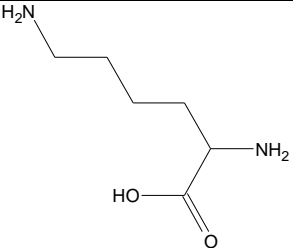
Obrázek 4: Vzorec pro výpočet hodnoty izoelektrického bodu [14].

Po vstřebání AK do krve a lymfy se aktivním transportem dostávají do buněk, kde jsou dále využity. Nejdůležitější funkcí aminokyselin je bezesporu jejich syntéza za vzniku bílkovin. Tento děj se nazývá proteosyntéza a skládá se ze dvou základních procesů, a to transkripce a translace. Dochází při něm ke spojování jednotlivých aminokyselin za vzniku dlouhých polypeptidových řetězců. To se nejčastěji děje ve svalové nebo jaterní tkáni [10]. Mezi aminokyseliny, které podporují růst svalové hmoty patří glutamin, lysin, arginin, ornitin a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin) [10, 14, 15].

Tabulka 1: Přehled aminokyselin [1].

Název	Zkratka	pKa ₁	pKa ₂ (+ řetězec)	Izoelektrický bod	Struktura
Alanin	Ala	2,34	9,69	6,01	
Asparagin	Asn	2,02	8,80	5,41	
Cystein	Cys	1,96	10,28 (+8,18)	5,07	
Glutamin	Gln	2,17	9,13	5,65	
Glycin	Gly	2,34	9,60	5,97	
Isoleucin	Ile	2,36	9,60	6,02	
Leucin	Leu	2,36	9,60	5,98	
Methionin	Met	2,28	9,21	5,74	
Fenylalanin	Phe	1,83	9,13	5,48	

Prolin	Pro	1,99	10,6	6,30	
Serin	Ser	2,21	9,15	5,68	
Threonin	Thr	2,09	9,10	5,60	
Tryptofan	Trp	2,83	9,39	5,89	
Tyrosin	Tyr	2,20	9,11 (+10,07)	5,66	
Valin	Val	2,32	9,62	5,96	
Kyselina asparagová	Asp	1,88	9,60 (+ 3,65)	2,77	
Kyselina glutamová	Glu	2,19	9,67 (+ 4,25)	3,22	
Arginin	Arg	2,17	9,04 (+12,48)	10,76	

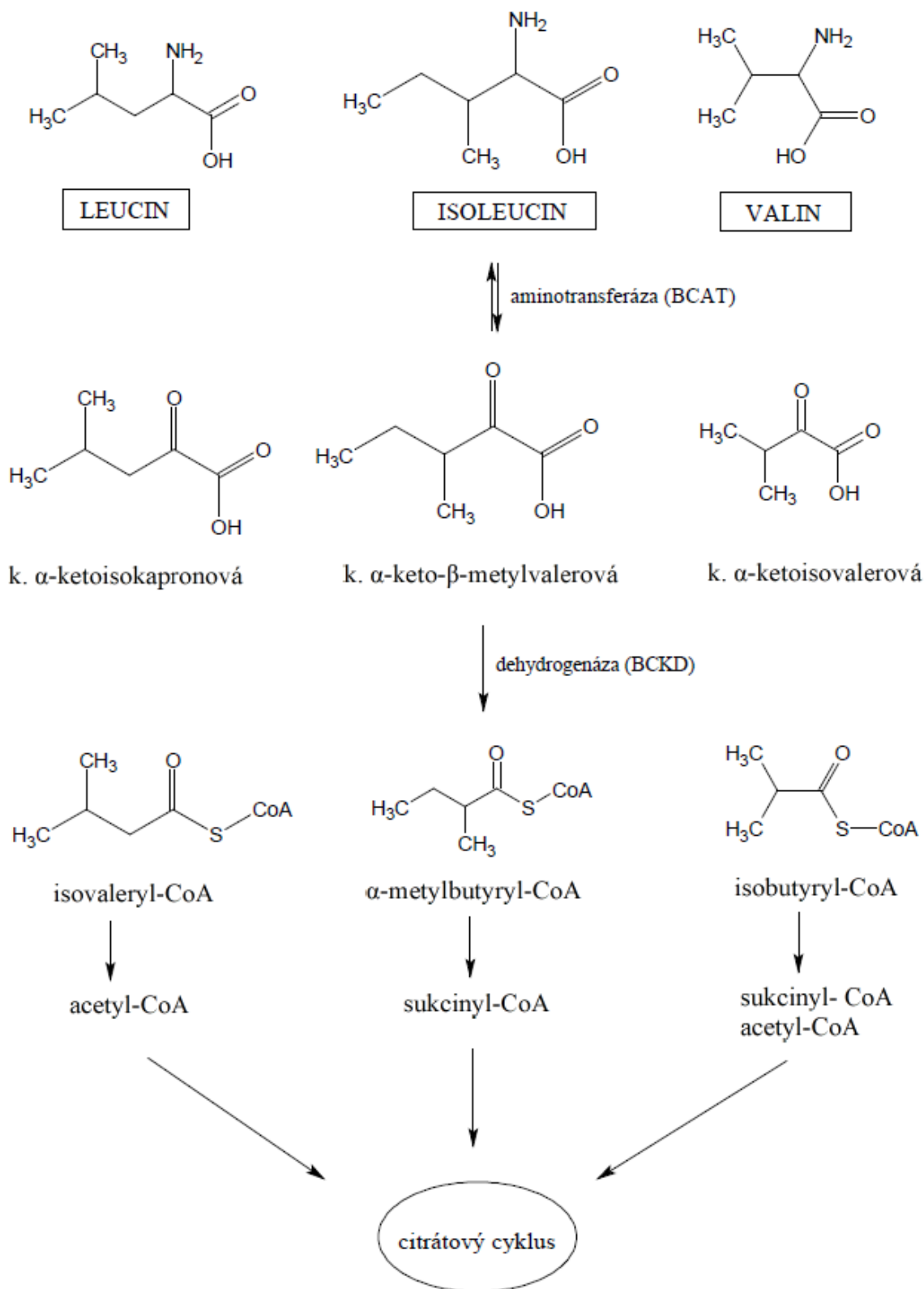
Histidin	His	1,82	9,17 (+6,00)	7,59	
Lysin	Lys	2,18	8,95 (+10,53)	9,74	

Naprostá většina AK (99 %) se využívá pro syntézu bílkovin a zbylé 1 % zůstává v těle ve formě volných aminokyselin, tzv. aminokyselinová hotovost neboli aminokyselinový pool (AK-P) [2, 11], který slouží jako rezervoár AK získaných absorpcí ze stravy nebo rozkladem bílkovin v tkáních. Při převaze anabolických reakcí je AK-P doplněn zejména aminokyselinami získanými z potravy, zatímco v katabolickém období (hlad, nemoci) jsou AK doplňovány z kosterního svalstva. V případě zátěže či nedostatku dochází k jeho aktivaci a doplnění potřebných AK organismu. Tyto zásoby jsou při hladovění vyčerpány během několika hodin. Nachází se v plazmě, extracelulárním nebo intracelulárním prostoru, kde je tato zásoba vyšší a výrazně ovlivňuje proteosyntézu [11, 16]. Nejvyšší zastoupení zde nacházejí esenciální aminokyseliny glutamin, glycin, alanin. Z neesenciálních to pak je lysin, threonin a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem [2]. Obecně platí, že AK-P má zásadní vliv na interakce aminokyselin, růst svalové hmoty a udržení rovnováhy AK v těle [11]. Koncentrace AK v plazmě a extracelulární části je v rovnováze s koncentrací AK v intracelulární části. Ve skutečnosti se jedná spíše o ustálený stav způsobený aktivním transportem aminokyselin [2].

1.2 VĚTVENÉ AMINOKYSELINY (BCAA)

Mezi aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA-z anglického Branched Chain Amino Acids) patří leucin, isoleucin a valin (Tabulka 1, Obrázek 5) [4, 8, 17, 18]. Jedná se o dobře vstřebatelné a rychle spalující [13] esenciální AK, které jsou si strukturně podobné. Bohatým zdrojem BCAA jsou luštěniny, maso a mléčné výrobky [7, 11, 19, 20]. Od ostatních aminokyselin se liší místem rozkladu, neboť BCAA se primárně rozkládají v kosterním

svalstvu, zatímco ostatní aminokyseliny v játrech [17, 20]. V poslední době patří mezi nejrozšířenější doplňky stravy vyhledávané zejména sportovci [13, 18].



Obrázek 5: Schéma metabolismu BCAA [17, 20].

1.2.1 Fyziologické účinky BCAA

Hlavní funkcí větvených aminokyselin je snížení katabolismu bílkovin a snížení poškození kosterních svalů vyvolané náročným tréninkem [7, 11, 13, 18-20]. Doplnky s BCAA obsahují vysoce kvalitní bílkoviny a účinně podporují syntézu svalové hmoty [20, 21]. Jednorázovou konzumací aminokyselin výrazných změn nelze dosáhnout, ovšem jejich dlouhodobá konzumace v kombinaci s pravidelným cvičením může vést ke zvýšené aktivitě růstového hormonu a syntézy kosterního svalstva [2, 7]. Nabízí se spousta klinických studií, kde jsou tyto účinky prokazovány [2, 17, 20] či vyvraceny [22].

Ze studie zkoumající účinky BCAA [23] bylo zjištěno, že tyto AK mají anabolické účinky zejména během regenerace po tréninku, a to během několika hodin až dní. Bylo také zjištěno, že užívání kombinace BCAA, glutaminu a syrovátkového proteinu při silovém tréninku vykazuje antikatabolické a ergogenní vlastnosti [21]. V jiné studii ovšem nebyly zaznamenány účinky ovlivňující výkon sportovce konzumací BCAA během tréninku [22]. Výsledky mohou být také závislé na proměnných, jako je složení těla, fáze tréninku, či vhodné načasování, proto je potřeba dalších výzkumů [21].

Suplementací BCAA se také předpokládá oddálení centrální únavy. Konkurence s aromatickými AK (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) může ovlivnit syntézu některých neurotransmiterů v mozku [21, 17]. Tryptofan patří mezi nepolární esenciální aminokyseliny, které získáváme z potravy nebo štěpením bílkovin. Jedná se o prekurzor serotoninu, melatoninu, či niacinu [2, 4] a je nezbytný pro správné fungování centrálního nervového systému [1, 2, 8]. Bylo prokázáno, že ovlivňuje syntézu a uvolňování serotoninu [2, 24]. Serotonin je neurotransmitter zodpovědný za pocit únavy po náročném cvičení a předpokládá se, že suplementací BCAA lze jeho produkci tlumit [22, 24].

BCAA mají také pozitivní účinky na respirační funkci organismu. Studiemi bylo zjištěno, že suplementací došlo ke snížení koncentrací CO_2 v krvi a zlepšení citlivosti dýchacího centra v mozku, což může souviset se sníženou hladinou serotoninu v centrálním nervovém systému [20].

Jsou také důležitými biomarkery pro odhalení cukrovky a obezity. Zvýšená hladina BCAA v plazmě může vést k inzulínové rezistenci a rozvoji diabetu 2. typu. Možným mechanismem může být trvalá aktivace signální dráhy proteinu mTOR. Jedná se o protein patřící do skupiny kináz, který zvyšuje produkci inkreatinu GLP-1 a signalizuje tak tělu pocit nasycení [2, 17, 18].

Dráha mTOR má klíčový význam pro intracelulární procesy spojené s diferenciací a buněčným růstem. Při nesprávném fungování může dojít k odpojení inzulinového receptoru od jeho substrátu [6, 18, 20]. Dalším možným mechanismem je vznik a akumulace toxických metabolitů BCAA způsobenou nadměrným příjmem těchto aminokyselin. Byl také prokázán pozitivní vliv na funkci střev, kde se také velká část BCAA oxiduje [6, 18].

Z rozvětvených aminokyselin se jako nejdůležitější zástupce jeví leucin [2]. Leucin je jednou z nejdůležitějších esenciálních aminokyselin pro tvorbu svalové tkáně, také snižuje katabolismus bílkovin a hromadění tuku v těle a chuť k jídlu [2, 6, 20, 25]. Postranní řetězec je tvořen isobutylovou skupinou zajišťující jeho hydrofobní charakter [1]. Vyskytuje se ve dvou enantiomerech, ovšem v přírodních bílkovinách se nachází pouze v L-formě [2]. Bohatým zdrojem leucinu jsou zejména mléčné produkty [26]. Reguluje protein mTOR, který také ovlivňuje syntézu svalových bílkovin nebo aktivaci T a B lymfocytů. Jeho nedostatkem by tak mohlo dojít k výraznému narušení imunitních reakcí organismu [2, 18]. Leucin absorbovaný do svalové tkáně se z 20 % zabuduje do svalu, dalších 40 % je akumulováno v aminokyselinovém rezervoáru a zbylých 40 % je oxidováno [18, 20]. Byl prokázán přímý stimulační účinek pro sekreci inzulinu [2, 18, 27], kdy byl po infuzi leucinu do svalu sledován vzestup hladiny inzulinu v plazmě a zvýšené uvolňování glutaminu ze svalu [20]. Obecně leucin nezpůsobuje závažné vedlejší účinky, pokud je užíván v doporučených dávkách. Uvádí se, že jeho nadměrnou suplementací může dojít ke zhoršení dostupnosti valinu a isoleucinu do organismu, neboť aktivita enzymu dehydrogenáza (BCKD) je v přítomnosti leucinu vysoce stimulována [2].

Příjem BCAA se doporučuje také pro prevenci úbytku svalů při lehkých i těžkých onemocnění. Byly zjištěny pozitivní účinky při podání BCAA pacientům s těžkými popáleninami, sepsí či pooperačními traumaty. Zvýšil se také počet periferních lymfocytů, což svědčí o pozitivním vlivu na imunitní funkci [20]. Dále je doporučena suplementace BCAA pro pacienty s chronickým selháním ledvin, poruchami močovinového cyklu, ale také při léčbě obezity. Ohledně použití BCAA v klinické praxi existuje mnoho kontroverzí a otázek, proto je nutné provést další důkladné studie [2, 17, 20, 25].

1.2.2 *Metabolismus BCAA*

Na rozdíl od ostatních aminokyselin, které se primárně odbourávají v játrech, se většina BCAA (75 %) dostává do systémového oběhu [20] a proces metabolismu probíhá extrahepatálně v kosterním svalu [17, 18, 20, 28]. Ve svalech mohou být BCAA zabudovány do dalších proteinů nebo využity jako zdroj energie. Prvním krokem metabolismu (Obrázek 5) je reverzní transaminace katalyzovaná specifickým enzymem aminotransferázou (BCAT), který se v těle vyskytuje ve dvou isoformách. Zatímco mitochondriální BCAT je široce distribuována v organismu, cytosolická forma je koncentrována hlavně v mozku [2, 20, 27]. Jelikož se jedná o reverzibilní reakci, je možná zpětná syntéza ketokyselin na aminokyseliny. Transaminací BCAA vznikají příslušné ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCKA) – z leucinu vzniká kyselina α -ketoisokapronová (KIC), z isoleucinu kyselina α -keto- β -methylvalerová (KMV) a z valinu kyselina α -ketoisovalerová (KIV) [17, 18, 20, 28]. Přesunem aminoskupiny dochází zároveň k přeměně α -ketoglutarátu na kyselinu glutamovou a vzniklý glutamát může být využit k tvorbě alaninu nebo glutaminu [17]. Syntéza glutaminu probíhá v játrech, kde glutamát reaguje s amoniakem a tato reakce také slouží k regulaci hladiny amoniaku v těle [20].

BCKA jsou dále uvolňovány do krevního oběhu a putují do tělních orgánů, kde pomáhají zlepšit retenci dusíku a slouží jako důležitý energetický substrát [2]. Jedná se hlavně o srdeční svalovinu, ledviny, mozek nebo játra [20].

Dalším krokem metabolismu je irreverzibilní oxidativní dekarboxylace ketokyselin. Reakce je katalyzována enzymem dehydrogenázy α -ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCKD), což je multienzymový komplex, který se nachází uvnitř mitochondriální membrány [17, 20]. Dekarboxylací vznikají příslušné thioestery koenzymu A, které jsou enzymatickými reakcemi metabolizovány za vzniku konečných derivátů koenzymu A. Například z KIC vzniká acetyl-CoA a acetoacetát, KIV se přemění na sukcinyl-CoA a KMV se katabolizuje na acetyl-CoA a sukcinyl-CoA. Vzniklé produkty následně vstupují do citrátového cyklu, kde jsou přeměněny na oxid uhličitý a vodu [2, 17, 18].

Metabolismus BCAA může být ovlivněn katalyzujícími enzymy (BCAT, a BCKD), neboť jejich přítomnost v jednotlivých orgánech vykazuje různé hodnoty aktivit. Uvádí se, že aktivita BCAT je nejvyšší v srdci, zatímco pro BCKD je aktivita nejvyšší v játrech [20, 27].

Nedostatkem komplexu BCKD dochází k akumulaci α -ketokyselin s rozvětveným řetězcem v moči, BCAA a allo-isoleucinu v plazmě, který může vyvolat závažný neurotoxický stav

s mentální retardací, nazývaný jako onemocnění javorového sirupu. Jedná se o vrozenou poruchu, která se projevuje již u novorozeneých dětí. Typickým příznakem nemoci je zápach moči připomínající javorový sirup, letargie, opožděný vývoj a problémy s výživou dítěte. Při neposkytnutí včasné léčby může dojít až k nevratným neurologickým komplikacím nebo smrti. Léčba probíhá především omezením přísunu BCAA a důkladným sledováním metabolismu [12, 20, 29].

1.3 BÍLKOVINY

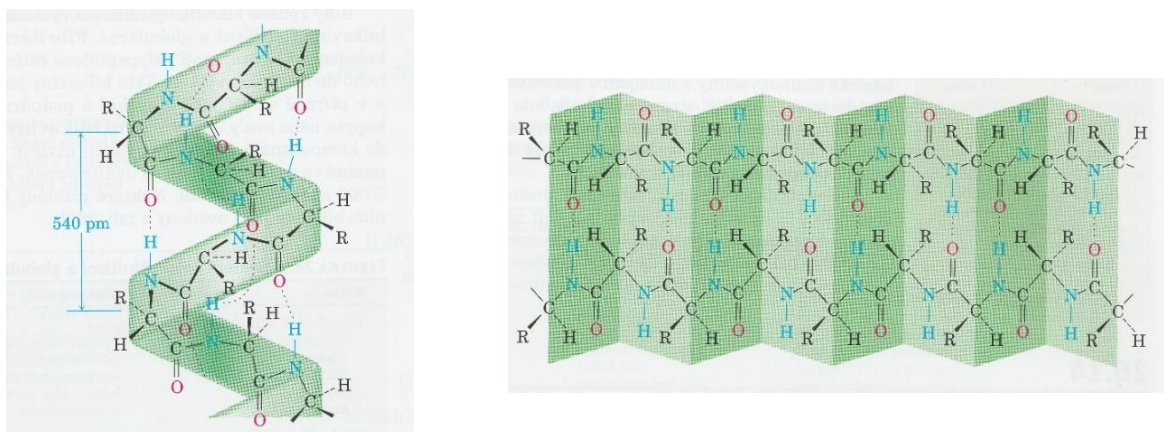
Bílkoviny jsou přírodní makromolekuly nacházející se v každém živém organismu [1]. Skládají se z aminokyselin, které jsou spojeny peptidovými vazbami [6, 2, 10] a tvoří dlouhé lineární řetězce [1, 10]. Jejich biologická aktivita a vlastnosti jsou dány pořadím, druhem AK a jejich prostorovým uspořádáním [2, 7, 30]. Z celkové hmotnosti lidského těla připadá na bílkoviny přibližně 18 % a podílí se na každém biologickém procesu [2]. Jsou nejvýznamnější skupinou makromolekul, nejsou důležité pouze pro tvorbu svalové hmoty, ale hrají důležitou roli i při údržbě tělesných tkání a při hubnutí [10, 13, 15, 31]. Slouží k eliminaci hladu, chutí na sladké a podporují zdravý metabolismus [3].

1.3.1 Klasifikace bílkovin

Bílkoviny lze rozdělit do několika kategorií. Podle počtu zapojených aminokyselin je lze klasifikovat do několika skupin. Řetězce obsahující více než 100 AK nazýváme proteiny a řetězce s počtem do 100 AK se označují jako peptidy [2]. Podle chemického složení se dělí na jednoduché bílkoviny, které hydrolýzou poskytují pouze aminokyselinové jednotky. Naproti tomu složené bílkoviny obsahují také nebílkovinné látky, jako jsou například nukleové kyseliny, sacharidy a tuky. Dále se bílkoviny klasifikují na základě tvaru jejich molekuly, a to na fibrilární (vláknité) a globulární bílkoviny. Fibrilární jsou pevné, ve vodě nerozpustné bílkoviny s dlouhým polypeptidickým řetězcem a jsou známé také jako skleroproteiny. Disponují podpůrnou funkcí při tvorbě pojivové tkáně, šlach, svalů, či kůže. Typickými zástupci skleroproteinů jsou kolageny, elastiny, keratiny, myosiny a fibrinogen [1]. Globulární bílkoviny jsou obecně rozpustné ve vodě a tvoří klubkovité útvary. Řadíme mezi ně většinu enzymů [1, 32], insulin, hemoglobin, ribonukleázu nebo imunoglobuliny. [1]

Struktura proteinů vychází z uspořádání aminokyselin v řetězci a je velmi důležitá pro jejich funkci. Celkem rozlišujeme primární, sekundární a terciární strukturu, a u některých složitých proteinů i kvartérní strukturu. Primární struktura je definována přesnou sekvencí AK

v polypeptidovém řetězci [1, 3]. Sekundární strukturou rozumíme prostorové uspořádání jednotlivých úseků peptidového řetězce (3-30 zbytků) a rozlišujeme 2 nejběžnější typy: α -helix a β -skládaný list. Řetězec α -helixu (Obrázek 6) se stáčí do pravotočivé šroubovice a je stabilizován vodíkovými vazbami mezi amidovými a karbonylovými skupinami. Prostorové uspořádání proteinů vyžaduje tvorbu maximálního počtu vodíkových můstků. Spousta α -helixů má hydrofobní skupiny na jedné straně osy šroubovice a hydrofilní na druhé straně. Délka jednoho závitu šroubovice je tvořena 3,6 aminokyselinovými zbytky [1, 4, 32]. Struktura β -skládaného listu (Obrázek 6) je tvořena rovnoběžně a antiparalelně uspořádanými řetězci, které připomínají složený list papíru a lze ji pozorovat v některých úsecích globulárních bílkovin. Antiparalelní uspořádání je energeticky výhodnější [1]. Stejně jako α -helix získává svoji stabilitu z vodíkových vazeb mezi karbonylovými kyslíky a amidovými vodíky peptidových vazeb [32].



Obrázek 6: Struktura α -helixu (vlevo) a β -skládaného listu (vpravo) [1].

Terciární struktura je dána uspořádáním sekundární struktury do konečného prostorového tvaru molekuly bílkoviny [4]. Kromě vodíkových vazeb se na její stabilitě podílejí také disulfidické vazby mezi cysteinovými zbytky, hydrofobní interakce nebo iontové vazby (tzv. solné můstky) mezi pozitivně a negativně nabitými skupinami v postranních řetězcích AK [1, 3, 4]. Kvartérní struktura vzniká u proteinů složených ze dvou nebo více polypeptidových řetězců, které jsou spojené nekovalentními vazbami. Typickým příkladem tohoto uspořádání je molekula hemoglobinu, která je tvořena ze dvou α a dvou β -podjednotek [1, 4, 32].

1.3.2 Zdroje bílkovin

Dle původu je můžeme rozdělit na živočišné a rostlinné. Mezi rostlinné bílkoviny patří například mandle, fazole, čočka či vlašské ořechy [10]. Obsahují hodně vlákniny a mají

antioxidační účinky. Jsou vhodnou alternativou suplementace pro vegetariány nebo vegany, kteří odmítají konzumovat potraviny živočišného původu [13]. Bohaté zdroje živočišných bílkovin nacházíme zejména ve vejcích, červeném mase, nebo v mléku a mléčných produktech. Jejich příjem je důležitý, neboť obsahují všechny esenciální kyseliny [10, 13] a jsou lépe stravitelné než rostlinné bílkoviny [11]. Mléčné proteiny pochází z mléka koz, krav, ovcí nebo buvolů a mají rozsáhlé spektrum účinků na lidský organismus. Regulují imunologické, gastrointestinální a neurologické reakce, což hraje významnou roli při prevenci osteoporózy, hypertenze nebo nádorového onemocnění [30].

1.3.3 Denaturace bílkovin

Aby mohl být protein biologicky aktivní a účastnit se biochemických reakcí, musí dosáhnout stabilního, trojrozměrného tvaru, který je dán interakcemi mezi různými částmi molekuly [2, 14, 33]. Denaturace je proces, kdy dochází k narušení a změně prostorové struktury bílkovin a fyzikálních i biologických vlastností [1, 14]. Primární struktura zůstává zachována, ale porušením intramolekulárních vazebných interakcí polypeptidové řetězce ztrácí svoji sekundární nebo terciární prostorovou strukturu a začnou se měnit v neuspořádané klubko [1, 3]. Denuraci může způsobit vysoká teplota, změna pH prostředí [14, 33], ionty těžkých kovů (Hg^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+}) interagující se skupinami $-\text{SH}$ nebo $-\text{COOH}$ [3], rentgenové záření, UV světlo nebo k denuraci dochází působením enzymů, kyselin nebo zásad [1, 2, 14]. Nejčastějším příkladem je denaturace vaječné bílkoviny za působení vyšší teploty [1]. Po ochlazení nezískáme původní bílek, proto se tento děj nazývá nevratná (ireverzibilní) denaturace. Obecně je denaturace nevratný proces, ale za určitých podmínek může být reversibilní. Vysolování je metoda separace proteinů, kdy dojde k denuraci a koagulaci proteinu z roztoku, který lze následně izolovat nebo znovu rozpustit v roztoku s nižší koncentrací solí [14, 33].

1.3.4 Rychlost obratu proteinů

Rychlost obratu nebo také délka života proteinů vyjadřuje, jak rychle se bílkoviny degradují a syntetizují. Pomocí radioaktivních aminokyselin bylo možné přibližně stanovit biologický poločas rozpadu lidských bílkovin. Například poločas jaterních proteinů je přibližně 10 dní, zatímco poločas hemoglobinu 120 dní a svalové bílkoviny dokonce 180 dní. Enzymové a polypeptidové hormony mají mnohem kratší poločasy, a to řádově v minutách. Častý obrat bílkovin je pro tělo výhodný, neboť umožní tělu rychle reagovat na změny v organismu a obnovit důležité molekuly [3].

1.4 POTRAVINOVÉ DOPLŇKY

Doplňky stravy jsou potraviny, které obsahují vysoké množství minerálů, vitamínů, bylinných extraktů či dalších látek s fyziologickým účinkem, který příznivě ovlivňuje zdravotní stav jedince. Suplementy s obsahem aminokyselin nebo proteinů se staly nedílnou součástí jídelníčku dnešní populace. Jedná se o širokou škálu přípravků zahrnující formy v podobě tablet, prášků, pastilek nebo tekutin [5, 15, 22, 34, 35]. Proteinové doplňky stravy, nejčastěji užívané sportovci, lze rozdělit podle typu obsaženého proteinu na syrovátkové, kaseinové, a sójové [13].

Syrovátkové proteiny tvoří okolo 20 % obsahu mléčných bílkovin kravského mléka [30, 36] s obsahem biologicky aktivních látek jako jsou vitamíny, minerály nebo enzymy [22, 30]. Jedná se o velmi kvalitní protein s rychlou vstřebatelností. Po požití dochází ke strmému nárůstu hladin AK, což způsobuje stimulaci syntézy svalové hmoty [13, 21, 37, 38]. Kasein je hlavní mléčná bílkovina savců a tvoří přibližně 80 % mléčných proteinů. Chemicky se jedná o nerozpustné micely složené ze 4 proteinových podjednotek a každá podjednotka se od sebe liší strukturou, molekulovou hmotností a chováním při interakci s vodou [30, 39, 40]. Kaseinové proteiny vyvolávají pomalejší vstřebání do organismu, pozvolný růst plazmatické koncentrace AK a silně blokují degradaci bílkovin [26, 37]. V porovnání se syrovátkou kasein neobsahuje takové množství aminokyselin a do organismu se vstřebává pomaleji [13, 21, 26, 37]. Optimální je užívání obou druhů bílkovin – syrovátka podpoří tvorbu a kasein zabraňuje odbourání bílkovin [13, 21]. Sójové proteiny patří mezi kvalitní a plnohodnotné bílkoviny díky vysokému obsahu esenciálních aminokyselin (zejména lysinu), které jsou potřebné pro růst a údržbu tkání. Naopak jsou chudé na aminokyseliny obsahující síru (např. methionin). Bohatým zdrojem jsou hlavně obiloviny a luštěniny, proto jsou vyhledávanou složkou vegetariánské stravy [37, 41].

Obecně však platí, že kvalitní a vyváženou stravou lze aminokyseliny snadno získat z přírodních potravin a doplňky stravy tak není potřeba užívat [22, 31, 42].

1.4.1 *Denní příjem*

Je zcela logické, že díky pravidelnému cvičení mají sportovci vyšší denní potřebu bílkovin než sedaví jedinci [5]. Doporučený denní příjem (DDP) bílkovin u dospělých je 0,8 g/kg, u aktivních sportovců je to v rozmezí 1,2-1,8 g/kg. Kulturisté a siloví sportovci konzumují potravinové doplňky i v daleko vyšších dávkách [19, 22, 31, 43, 44], a to až okolo 4 g/kg. Přebytké množství však nemusí být využito na tvorbu svalové tkáně a organismus jej

transformuje a ukládá ve formě sacharidů a tuků, což může být nežádoucím efektem [7, 11]. Potřeba bílkovin je pro každého jedince velmi individuální a závisí na prováděné činnosti nebo výsledném efektu [10]. Některé studie tvrdí, že by DDP u silových sportovců měl být až o 50-100 % vyšší [45, 46]. Výzkumy také ukazují, že vytrvalostní sportovci trávící déle než 100 minut při střední až vysoké intenzitě potřebují 1,2 až 1,4 g/kg bílkovin, aby došlo k vyrovnání rozpadu proteinů během cvičení [11]. U vyvážené stravy se podíl bílkovin pohybuje mezi 10-15 % z celkového energetického příjmu, ovšem u kulturistů se může tato hodnota pohybovat okolo 50 % a více [2, 46].

1.4.2 Kvalita a bezpečnost suplementů

Trh nabízí široký výběr proteinových doplňků, které nejsou z hlediska čistoty a inzerované účinnosti nijak regulované [11]. Jak tedy poznat, že se jedná o kvalitní výrobek? Kvalitu proteinu obecně určují faktory, jako je zdroj bílkoviny (složení esenciálních kyselin) nebo stravitelnost. Nejvyšší jsou živočišné bílkoviny, neboť obsahují všechny esenciální kyseliny [13, 41]. Nazývají se jako plnohodnotné proteiny a ty, které jsou o některé esenciální AK ochuzeny, se nazývají neplnohodnotné proteiny [21, 37]. Hodnocení kvality proteinů se nejčastěji provádí pomocí *indexu vstřebatelnosti podle složení aminokyselin* (PDCAAS). Ideální hodnota je 1,00 a čím víc se této hodnotě skóre blíží, tím je bílkovina kvalitnější. Z tabulky 2 lze vyčíst, že bílkoviny živočišného původu, jako je maso, vejce a mléko, jsou vysoce kvalitní [13, 26].

Tabulka 2: Hodnoty PDCAAS u vybraných zdrojů bílkovin [13, 41].

Zdroj bílkovin	PDCAAS
Sójové boby	0,92
Kasein a syrovátka	1,00
Hovězí maso	0,91
Kravné mléko	1,00
Ryby	1,00
Vejce	1,00
Čočka (konzervovaná)	0,52
Ovesné vločky	0,57

Na rozdíl od léčivých přípravků, které před uvedením na trh podléhají přísné legislativě, u doplňků stravy není posuzována jejich farmakologická účinnost, biologická dostupnost nebo farmakokinetika a neexistuje ani záruka skutečného obsahu účinných látek. Pro uvedení doplňku stravy na trh je potřeba pouze prohlášení o bezpečnosti [48, 49]. Ač výrobci zaručují kvalitu svých produktů, zřídka se z obalu dozvíme o potenciální škodlivosti, toxicitě nebo přítomnosti vedlejších účinků [47]. Neověřené suplementy mohou obsahovat stopy zakázaných látek, které do nich výrobci nelegálně přidávají za účelem zvýšení požadovaných schopností. Jedná se například o anorektické, stimulační látky nebo diuretika, která mohou být nejen příčinou pozitivních dopingových testů, ale zejména zvyšují riziko poškození zdraví jedince [34, 11, 15, 48, 50]. I přes to, že některé výrobky obsahují certifikáty o nezávadnosti, není zajištěna 100% jistota, že výrobek neobsahuje žádné stopy zakázaných látek [48]. Výsledky studie [11] ukázaly, že 15-20 % ze 600 vzorků doplňků stravy obsahovalo neoznačené látky. Právě kvůli nedostatečné kontrole kvality těchto produktů doporučuje mezinárodní olympijský výbor sportovcům, aby se před užíváním suplementů nejdříve poradili se svým lékařem nebo nutričním specialistou.

1.5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Termín chromatografie byl poprvé uveden ruským botanikem M. S. Tswettem, který v letech 1899-1901 prováděl experimenty s rostlinnými pigmenty a později publikoval článek o nové technice adsorpční analýzy popisující separaci chlorofylů v rostlinách [51]. Největšího rozmachu chromatografie došlo počátkem 30. let 20. století [52, 53] a nyní patří k celosvětově nejrozšířenějším separačním a analytickým metodám [54, 55].

1.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

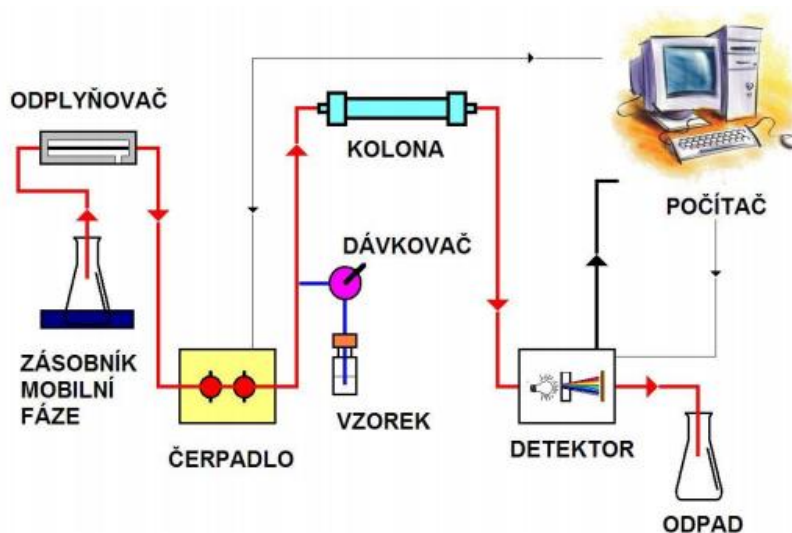
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je chromatografická technika, která slouží k separaci jednotlivých složek ve směsi. Základním principem je rozdělování složek mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi. Vzorek je unášen mobilní fází (MF) a sleduje se jeho interakce se stacionární fází (SF), která je umístěna v koloně. Analyty, které silně interagují se stacionární fází, jsou zadržovány déle a pohybují se pomaleji než analyty, které se na stacionární fází tolik nezadržují [32, 54, 56, 57, 58].

HPLC se oproti klasickému sloupcovému provedení kapalinové chromatografie liší zejména v přítomnosti vysokotlakého čerpadla, které umožní průtok mobilní fáze kolonou. Díky tomu dosahuje HPLC vysoké účinnosti separace za krátkou dobu [57, 58].

Podle typu mobilní a stacionární fáze rozlišujeme systémy HPLC s normálními a obrácenými fázemi [58, 59]. V systému s normálními fázemi (NP-HPLC) probíhá separace mezi nepolární mobilní fází a polární stacionární fází. Mezi účinná rozpouštědla v NP-HPLC patří nepolární rozpouštědla jako hexan nebo heptan ve směsi s nízkým mísitelným alkoholem (např. 2-propanol). Stacionární fáze je tvořena silikagelem nebo aluminou [58, 60]. V systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) se používá polární mobilní fáze a nepolární fáze stacionární. Jako stacionární fáze se nejčastěji využívá silikagel s chemicky vázanou nepolární fází, například oktadecylsilikagel (C₁₈) nebo oktylsilikagel (C₈) a jako mobilní fáze směs organického rozpouštědla (acetonitril nebo metanol) a vody. Volba rozpouštědel, a především volba stacionární fáze má vliv na selektivitu separace [57].

1.5.1.1 *Instrumentace*

Kapalinový chromatograf (Obrázek 7) se skládá ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovacího zařízení, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího ventilu (především šesticestného), chromatografické kolony, detektoru a přístroje s příslušným softwarem pro záznam a zpracování dat [56, 57, 61].



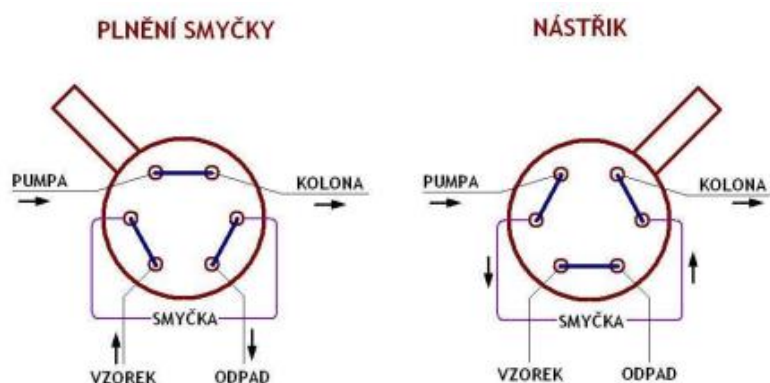
Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu [56].

1.5.1.2 Dávkovací ventil

Dávkování do chromatografického systému je možné provádět ručně nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru) [56].

V současnosti jsou nejčastěji používány šesticestné dávkovací ventily s vyměnitelnou smyčkou (Obrázek 8), které slouží k zavedení přesného objemu vzorku do kolony. Plnění smyčky se provádí pomocí injekční stříkačky a po nadávkování vzorku do smyčky je ventil otočen a analyty jsou unášeny mobilní fází na kolonu, kde dochází k separaci. Tato zařízení mohou být ovládána mechanicky nebo elektricky. Automatické dávkovače jsou vybaveny robotickým systémem, který sám vybere požadovanou vialku se vzorkem a provede nástřik pomocí integrované jehly [56, 57, 59, 61].

Existují také deseticestné i čtrnácticestné dávkovací ventily, které umožňují současné dávkování vzorku pro 2-3 různé kolony [56].



Obrázek 8: Schéma šesticestného dávkovacího zařízení [56].

1.5.1.3 Mobilní fáze

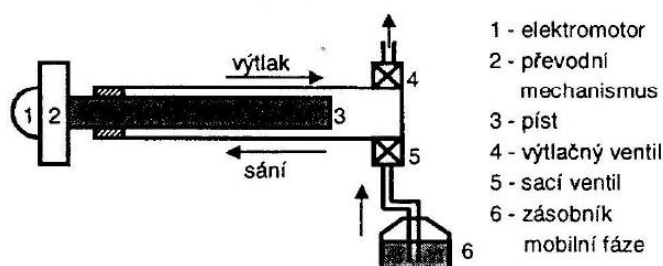
Mobilní fáze unáší analyzované látky kolonou, kde dochází k jejich separaci [58]. Mezi základní požadavky na MF patří vysoká čistota, chemická inertnost, kompatibilita s detektorem, cenová dostupnost či nízká toxicita. [56].

Před vstupem do kolony je nutné provést odplynění mobilní fáze z důvodu eliminace tvorby bublinek rozpuštěného plynu, které mohou způsobit problémy projevující se nestabilitou základní linie nebo špatnou opakovatelností a reprodukovatelností. V praxi se používá helium nebo vakuové odplyňovače [56, 59, 62]. Po odplynění je MF vedena do vysokotlakého čerpadla. V případě zachování stálého složení mobilní fáze se jedná o izokratickou eluci. Pokud se složení mobilní fáze během eluce mění, jedná se o gradientovou eluci. Tvorba gradientu mobilních fází se provádí buď za nízkého nebo za vysokého tlaku. Při nízkotlakém gradientu

jsou složky mobilní fáze přiváděny do směšovače a po smísení jsou vedeny vysokotlakým čerpadlem na kolonu. Jedná se o levnější variantu, kde postačí pouze jedno čerpadlo pro více složek mobilní fáze. Naproti tomu vysokotlaký gradient vyžaduje nejméně 2 čerpadla a k mísení složek dochází až ve vysokotlaké části. Volbou optimálních podmínek gradientu můžeme docílit zrychlení analýzy a lepšího rozlišení [55, 56, 59].

1.5.1.4 Čerpadla mobilní fáze

V současné době se používají zejména dvoučinná pístová čerpadla s malým objemem činné části, kde dochází k současnému plnění a vytlačování kapaliny do systému. Princip jednoduchého pístového čerpadla je znázorněn na obrázku (Obrázek 9). Hlavními požadavky na kvalitní čerpadlo je stabilní průtok MF, chemická inertnost materiálů (ocel, keramika, plast), minimální tlakové pulsy a přesná tvorba gradientu [56, 57, 59].



Obrázek 9: Schéma pístového čerpadla [56].

1.5.1.5 Kolony pro HPLC

Kolony pro HPLC tvoří trubice (kovová, skleněná, plastová nebo křemenná), která je naplněna vhodnou stacionární fází. Nejčastěji se používají náplňové kolony, které jsou plněny porézními nebo povrchově porézními částicemi o průměru částic 2-7 μm . Jako nosič se tradičně využívá silikagel, nebo oxid hlinitý či polymerní materiály. U RP-HPLC je polární silikagel modifikovaný pomocí nepolárních skupin (-C₈, C₁₈, -alkyl, -aryl a další varianty), zatímco u NP-HPLC je možné použít samotný silikagel, či chemicky modifikovaný pomocí polárních skupin (-OH, -NH₂, -CN) [56, 57, 60, 61]. Velikost částí a jejich distribuce mají velký vliv na účinnost separace. Čím jsou částice menší, tím je separace účinnější [58]. Dalším typem stacionárních fází jsou monolitické SF, které jsou tvořeny jedním kusem porézního materiálu. Jejich výhodou je odolnost vůči vysokým průtokům a tlakům. Podle způsobu přípravy se dělí na anorganické, polymerní nebo stlačitelné [63].

Dnes jsou kolony pro HPLC konstruovány především z nerezové oceli, aby odolaly vysokým pracovním tlakům (až 100 MPa). Délka kolony dosahuje 5-25 cm s vnitřním průměrem cca 2,1–4,6 mm. Krátké kolony (cca 3 cm) jsou vhodné především pro rychlé separace. Disponují malou spotřebou mobilní fáze a jsou relativně levné [56, 58, 59, 61].

K ochraně kolony se používají předkolony, což jsou velmi krátké kolony, které se umísťují těsně před analytickou kolonu a slouží k zachycení nečistot. Náplň je obvykle tvořena stejnou SF jako samotná analytická kolona [56].

1.5.1.6 Detekční systémy

Detektory jsou zařízení umístěná za kolonou, která na základě fyzikálně chemických principů monitorují změny ve složení eluátu procházejícího kolonou [56]. Detektory se dělí na několik skupin podle různých hledisek. Destrukční detektory způsobí ireverzibilní změnu analytu, zatímco v nedestruktivních detektorech nedochází ke změně detekované látky. Univerzální detektory reagují na všechny analyty a měří vlastnost systému jako celku. Selektivní detektory poskytují odezvu pouze na určité skupiny látek nebo vybrané analyty a řadíme mezi ně spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, či vodivostní detektory. Selektivní detekce disponuje vyšší citlivostí, což umožňuje analýzu vzorků i v komplikovaných maticích. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky eluentu do detektoru (dm/dt), zatímco koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu (dm/dV). [56, 58, 59].

Detektory v HPLC by měly disponovat vysokou citlivostí a malým vnitřním objemem, aby nedocházelo k velkému rozmývání elučních zón. Dalšími důležitými parametry je dobrá odezva, široký lineární rozsah, selektivita, univerzálnost, nedestruktivnost, spolehlivost, či nezávislost na složení MF [57-59].

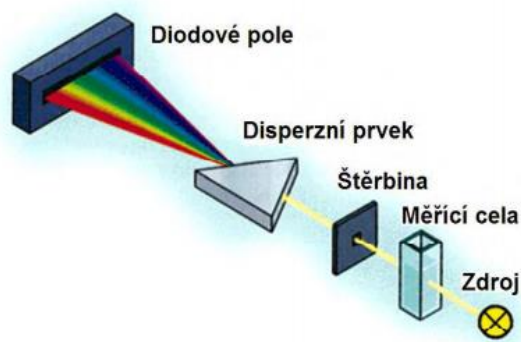
Mezi nejčastěji používané detektory v HPLC patří spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický, elektrochemický a hmotnostní spektrometr [58].

- **Spektrofotometrický detektor (UV/VIS)**

Spektrofotometrické detektory patří dnes mezi nejběžněji používané detektory v HPLC [56]. Principem je měření absorbance eluátu vycházejícího z kolony v oblasti vlnových délek 190-800 nm. Základním vztahem pro kvantitativní spektrofotometrické stanovení je Lambert-Beerův zákon, který vyjadřuje lineární závislost absorbance na koncentraci absorbující složky, přičemž závisí na tloušťce absorbující vrstvy a molárním absorpčním koeficientu [56, 59].

Jednoduché detektory mohou měřit při jedné vlnové délce (fixní detektory) a jako zdroje záření obvykle používají rtuťovou, kadmiovou nebo zinkovou výbojku. [56]. Existují i detektory se složitějším uspořádáním, kterými lze nastavit libovolné vlnové délky pomocí monochromátoru. Například detektor s diodovým polem (DAD – diode array detector) dokáže v reálném čase snímat celé spektrum vlnových délek, a to i bez přerušení chromatografické separace. Díky záznamu celého spektra můžeme získat více informací o složení vzorku. Ze zdroje záření prochází světlo měřicí celou, ve které je umístěn vzorek, a poté přes štěrbinu (monochromátor) dopadá na disperzní prvek, který rozptýlí paprsek na pole fotodiód (Obrázek 10). Limit detekce může dosahovat až $10^{-10} \text{ g ml}^{-1}$ [52, 57, 59].

Spektrofotometrické detektory jsou selektivní a mají vysokou citlivost, která je závislá na délce optické dráhy [56, 59].



Obrázek 10: Schéma detektoru diodového pole (DAD) [56].

- **Fluorescenční detektor (FLD)**

Principem fluorescenčního detektoru je měření sekundárního (emisního) záření, které vyzáří látka po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření [56, 59]. Absorpcí elektromagnetického záření se látka dostává ze základního elektronového stavu na různé vyšší hladiny. Při návratu na základní hladinu může excitovaná látka absorbovanou energii vyzářit ve formě fluorescence nebo ji předat jiným molekulám. Jedná se o selektivní detektor, který lze kombinovat se spektrofotometrickými detektory [57]. Detektory využívají jako zdroj excitačního záření rtuťové výbojky, lasery, wolframové či xenonové lampy. Dnešní moderní přístroje dovolují nastavit vlnové délky excitačního i emitovaného záření a k dosažení maximální citlivosti lze vlnové délky v průběhu eluce programovat [56, 57, 59].

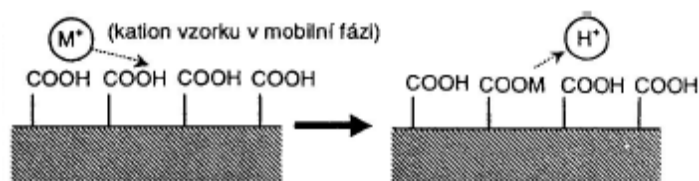
- **Hmotnostní spektrometr (MS)**

Hmotnostní spektrometr (MS) je iontově-optické zařízení, které detekuje ionty v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Mobilní fáze obsahující analyt je nejprve odpařena a poté dochází k ionizaci molekul. Vzniklé ionty putují do analyzátoru, kde jsou separovány podle hodnoty m/z a detekovány. Běžný MS sestává z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [57]. Jedná se o vysoce citlivou a rychlou metodu poskytující reprodukovatelné kvalitativní i kvantitativní výsledky [58].

Mezi nejběžnější hmotnostní analyzátoři patří kvadrupólový analyzátor, iontová past či analyzátor doby letu. V případě zapojení dvou analyzátorů za sebou mluvíme o hybridních hmotnostních spektrometrech, které se využívají především pro tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS) [56].

1.5.2 Ionově-výměnná chromatografie (IEC)

Stacionární fází je v IEC měnič iontů [64]. Jedná se o makromolekulární matici, většinou na bázi polystyrenu nebo celulózy obsahující funkční skupiny zásadité nebo kyselé povahy. Katexy jsou iontoměniče s kyselou skupinou (karboxylová nebo sulfonová kyselina) a slouží k výměně kationtů. Anexy mají navázanou bazickou funkční skupinu (aminoskupinu) a slouží k výměně aniontů. Při průtoku mobilní fáze kolonou pak dochází k zachycení a výměně ekvivalentního množství iontů vázaných na stacionární fázi (Obrázek 11). Jako mobilní fáze se používají pufrů a retence je závislá na změně pH nebo iontové síly pufru. Využívá se pro separaci léčiv, nukleových kyselin, aminokyselin a anorganických iontů [32, 57, 65].



Obrázek 11: Výměna iontů na iontoměniči [56].

1.6 DERIVATIZACE

Většina volných AK neobsahuje ve své molekule chromofor, a proto je nelze detekovat s využitím spektrofotometrického detektoru. Při jejich analýze je tedy nutné využít univerzální

detekci nebo aminokyseliny nejprve derivatizovat s využitím vhodného derivatizačního činidla. Podle typu činidla je pak možné vzniklý derivát detekovat spektrofotometrickým či fluorescenčním detektorem. Derivatizace je rychlá, citlivá a účinná metoda a lze ji využít pro analýzu primárních a sekundárních aminokyselin v proteinových hydrolyzátech [62, 66-68].

Výběr derivatizačního činidla závisí na několika aspektech, mezi které patří kvantitativní průběh reakce a reprodukovatelnost. Dále musí činidlo reagovat rychle se všemi AK (nejlépe jak s primárními, tak sekundárními), reakce by měla být jednoduchá a měla by probíhat za mírných podmínek. Vzniklé produkty by měly vykazovat dobrou stabilitu. Vítaná je i možnost automatizace reakce [12, 67, 71].

Jako derivatizační činidla se užívají například ninhydrin, fenylisothiokyanát (PITC) [69], naftalen-2,3-dikarboxaldehyd, 9-fluorenylmetoxychlorformiát (FMOC) [62, 70], 6-aminochinoly-N-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC) [12, 32], benzoylchlorid, dabsylchlorid (DBS) [67], dansylchlorid (Dns-Cl) [71] nebo o-ftaldialdehyd (OPA) [62, 69]. Porovnání nejčastěji používaných derivatizačních činidel je uvedeno v tabulce 3.

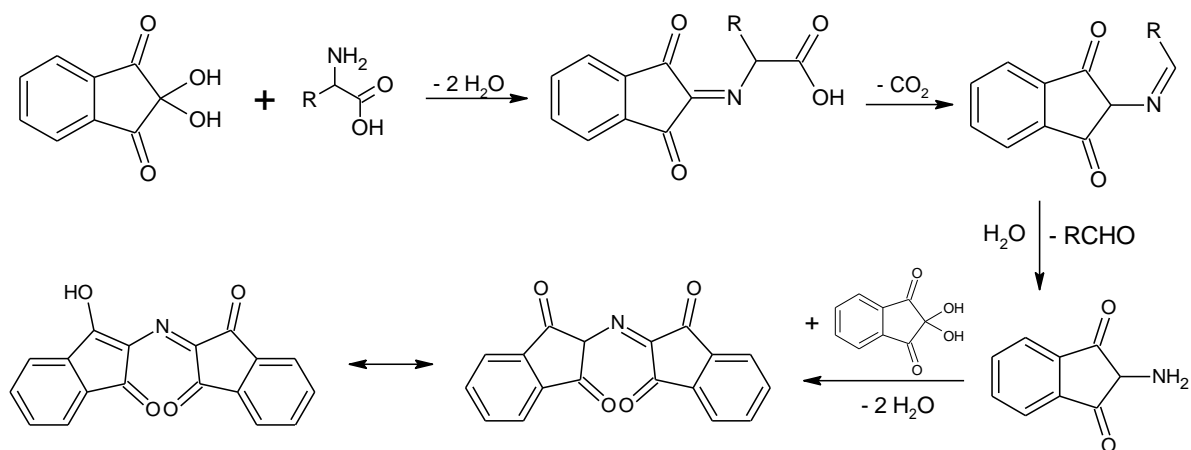
Tabulka 3: Porovnání vybraných derivatizačních činidel [12, 67, 69, 77].

Parametr	OPA	FMOC	PITC	Dns-Cl	Ninhydrin	AQC
Citlivost	fmol	fmol	pmol	pmol (nmol)	μmol	pmol (fmol)
pH reakce	9,5	8,5	10,5	9,5	6,0	8,2- 10,0
Rychlost	rychlá	rychlá	střední	Malá	Malá	rychlá
Stabilita derivátů	špatná 24 hod. (ve tmě)	dobrá	střední	Dobrá	----	střední
Interference reagentu	ne	ano	ano	Ano	Ne	ano
Sekundární AK	ne	ano	ano	Ano	Ano	ano
Detekce	FLD, UV	FLD	FLD, UV	UV, FLD	UV	UV, FLD

FLD = fluorescenční detektor, UV = spektrofotometrický detektor

1.6.1 Ninhydrin

Ninhydrin tvoří s α -aminokyselinami fialové deriváty, které absorbují při vlnových délkách 570 nm a s iminokyselinami (prolin a hydroxyprolin) tvoří žluté komplexy absorbující při 440 nm. Při reakci dochází k dekarboxylaci a deaminaci primárních a sekundárních AK (Obrázek 12). Jako nejpoužívanější postkolonové činidlo se používá při identifikaci AK separovaných iontoměničovou nebo tenkovrstvou chromatografií. Nevýhodou je dlouhá doba analýzy, nižší citlivost detekce, interference s maticí vzorku a nestabilita ninhydrinu [12, 32, 64, 72-76].

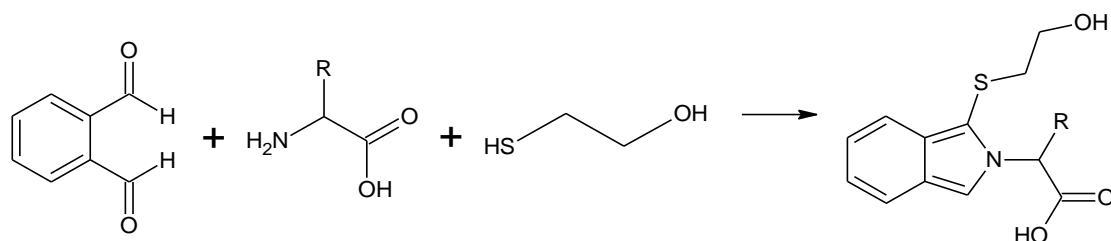


Obrázek 12: Schéma reakce AK s ninhydrinem [71].

1.6.2 O-ftaldialdehyd (OPA)

OPA reaguje s aminokyselinami v přítomnosti 2-merkptoetanolu, ethanthiolu nebo 3-merkptopropionové kyseliny (Obrázek 13) již při pokojové teplotě. Volba merkaptanu může mít vliv na stabilitu derivátů nebo intenzitu fluorescence. Derivatizace probíhá při pokojové teplotě v bazickém pufru (např. boritan sodný) o pH 9,5. Velmi rychle (1-3 min) vznikají fluorescenční deriváty, které se sledují při excitačních vlnových délkách 230-340 nm a emisních vlnových délkách 450-470 nm. OPA deriváty lze sledovat také spektrofotometricky při vlnové délce 338 nm [12, 62, 69, 75, 77-80] nebo amperometricky [74].

Metoda OPA nabízí vysokou citlivost a je jednou z nejoblíbenějších současných technik pro HPLC analýzu AK. Poskytuje stabilnější deriváty než ninhydrin, ale mají omezené použití pouze pro primární AK a u lysinu a cysteinu je pozorovaná nízká výtěžnost. Ke zvýšení výtěžnosti těchto AK je nutný přídavek dalších oxidačních reagentů. OPA je vhodný pro stanovení AK jak v živočišných tkáních, tak v potravinách [12, 62, 64, 67, 69, 76, 81].

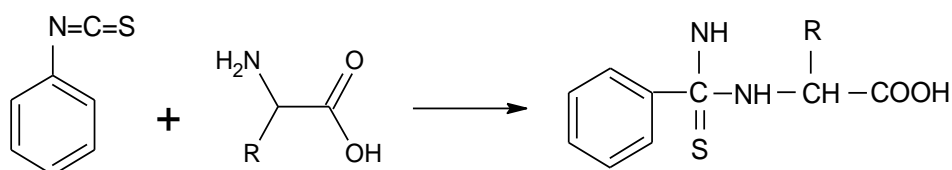


Obrázek 13: Schéma reakce OPA s primárním aminem v přítomnosti merkptoethanolu [71].

1.6.3 Fenyliothiokyanát (PITC)

Fenyliothiokyanát (PITC) reaguje s primárními a sekundárními AK za vzniku fenylothiokarbamylových derivátů (Obrázek 14) [12, 69, 82]. Reakce probíhá již při laboratorní teplotě a pH 10,5 po dobu přibližně 10-20 minut. Derivatizační směs se připravuje z etanolu, fenyliothiokyanátu, vody a triethylaminu v poměrech 7:1:1:1 [12, 73, 76, 82-85]. Před chromatografickou separací je nutné odstranit přebytečné činidlo, které může snižovat životnost kolony. To se obvykle provádí v rotační vakuové odparce [67, 69, 76, 82].

PITC deriváty absorbují při vlnové délce 254 nm [12, 73, 84, 85] a lze je uchovat suché nebo zmrazené i po dobu několika týdnů, aniž by došlo k jejich degradaci. Ovšem ponechání PITC derivátů na světle při pokojové teplotě po dobu 10 hodin způsobuje jejich degradaci. Bylo zjištěno, že delší reakční doba, větší objem činidla nebo vyšší teplota nemá vliv na výtěžnost reakce, ba naopak dochází ke ztrátám kyselých AK jako je kyselina glutamová a asparagová [69, 76, 83]. Chromatografická separace hydrolyzovaných AK trvá přibližně 20 minut, zatímco u derivátů fyziologických AK dosahuje až 50 minut [12, 69].



Obrázek 14: Schéma reakce PITC s AK [71].

1.6.4 9-fluorenylmethoxycarbonylformiát (FMOC)

9-fluorenylmethoxycarbonylformiát byl vyvinut pro derivatizaci AK a peptidů pro chirální i nechirální separaci pomocí LC nebo CE. Výsledkem jsou stabilní deriváty primárních i sekundárních aminokyselin schopné fluorescence a měřitelné při excitační vlnové délce 263 nm a emisní vlnové délce 313 nm [67, 75, 86]. Reakce probíhá v prostředí acetonu nebo acetonitrilu a pro derivatizaci je nutné použít nadbytek činidla [67, 70, 87]. Nadbytek však musí

být před chromatografickou analýzou odstraněn extrakcí s pentanem, jinak může dojít k nežádoucím interferencím a nedokonalé separaci AK [67, 69, 75, 78]. Extrakcí ovšem hrozí riziko ztráty hydrofobních derivátů [81, 87]. FMOc reaguje nejen s aminoskupinami, ale také s alkoholy, fenoly, thioly a sekundárními aminy, což ukazuje na jeho nízkou selektivitu [67].

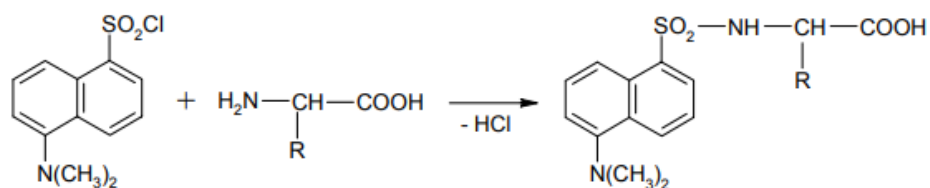
1.6.5 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC)

AQC reaguje s primárními i sekundárními AK za vzniku velmi stabilních derivátů [12, 74, 88] detekovatelných fluorescenčně při excitačních a emisních vlnových délkách 250 a 395 nm nebo spektrofotometricky při 254 nm (tryptofan). Reakce probíhá rychle v prostředí borátového pufru a v rozmezí pH 8,2-10,0. Nadbytek činidla se v průběhu reakce spotřebuje vlastní hydrolyzou na aminochinolon, který má velmi slabé fluorescenční vlastnosti, takže netvoří interferující pík v chromatogramu. Nevýhodou této metody je špatné rozlišení při identifikaci fyziologických vzorků [12, 67, 74].

1.6.6 Dansyl-chlorid (Dns-Cl)

Dansyl-chlorid neboli 1-dimethylamino-naftalen-5-sulfonylchlorid (Dns-Cl) je jedno z nejstarších předkolonových derivatizačních činidel pro aminokyseliny a peptidy. Reaguje s primárními i sekundárními AK (Obrázek 15) v mírně alkalickém prostředí vodného acetonu a fluoridu draselného [71, 75]. Derivatizace standardně probíhá bez přístupu světla při pokojové teplotě a pH 9,5 po dobu jedné hodiny, nebo 15 minut při teplotě 60 °C [12, 75]. Literatura uvádí [12], že lze reakci provést i během dvou minut při teplotě 100 °C. Vzniklé vysoce fluoreskující dansylsulfonamidy absorbují při excitačních vlnových délkách 350-370 nm a emitují záření o vlnových délkách 490-530 nm [12, 71, 75, 79, 86].

Deriváty je možné uchovávat ve tmě 7 dní při -4 °C. Výhodou je jednoduchý derivatizační krok a vynikající linearita pro cystein [12]. Nevýhodou je tvorba interferenčního píku v chromatogramu, který vzniká hydrolyzou činidla na vysoce fluoreskující kyselinu dansylsulfonovou. Dalším problémem je tvorba více derivátů s histidinem, lysinem a tyrosinem, které mohou způsobit špatnou reprodukovatelnost výsledků [12, 71, 79].



Obrázek 15: Schéma reakce Dns-Cl s aminokyselinami [71].

1.6.7 Dabsyl-chlorid (DBS)

Dabsyl-chlorid, chemicky 4-dimethyl-aminoazobenzen-4'-sulfonyl chlorid, tvoří s primárními i sekundárními AK stabilní deriváty detekovatelné v rozsahu vlnových délek 448-468 nm. Reakce trvá přibližně 15 minut při teplotě 70 °C a probíhá v bazickém prostředí s přebytkem činidla. Účinnost reakce je silně ovlivněna přítomností chloridových solí a dalších interferujících látek. Různé vedlejší produkty reakce absorbující při stejné vlnové délce jako cílové deriváty mohou ztížit interpretaci chromatografických dat [12].

1.6.8 N-hydroxysukcinimidyl- α -(9-acridin)-acetát (HSAA)

HSAA je relativně nové, ale účinné derivatizační činidlo, jehož amidové deriváty jsou vysoce selektivní, citlivé a stabilní i po dobu několika dní v neutrálním roztoku. Reakce probíhá v roztoku borátového pufru o pH 8,0-9,0. Jedná o jednoduchou metodu poskytující dobré výsledky a použitelnou pro AK a peptidy v různých matricích. Fluorescenční detekce derivátů se provádí při vlnových délkách 385 a 435 nm [67].

1.7 ANALÝZA AMINOKYSELIN

Aminokyseliny se vyskytují v různých matricích buďto jako volné nebo jsou přítomné ve formě bílkovin. Z bílkovin je před analýzou nutné aminokyseliny nejprve uvolnit, a proto příprava vzorku zahrnuje kvantitativní převedení vázaných aminokyselin do jejich volné formy. Uvolněné AK jsou poté derivatizovány a analyzovány zvolenou instrumentální technikou [71, 75, 89].

Rychlý rozvoj výzkumu v biochemii a fyziologii bílkovin vyžaduje přesné, rychlé a reprodukovatelné metody stanovení AK. Navzdory širokému spektru použitelných metod neexistuje taková, která by byla nejvýhodnější [62, 68, 88]. Stanovení aminokyselin se provádí v různých vzorcích potravin a potravinových doplňků [74], živočišných tkání [62, 78, 89], krmiv [74], rostlinných tkání [70, 84] nebo léčiv [89]. Analýzou vzorků tělních tekutin je možné diagnostikovat onemocnění metabolismu AK, tyrosinémie, fenylketonurie, onemocnění javorového sirupu [28, 90, 91], rakoviny, či diabetu 2. typu [88].

Mezi nejčastěji používané techniky analýzy aminokyselin patří iontově-výměnná chromatografie s postkolonovou derivatizací nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi s před- nebo postkolonovou derivatizací [64, 66, 67, 69, 71, 78, 80, 88, 92]. Dále je možné pro stanovení AK využít plynovou chromatografie (GC) [88, 93-

95], tenkovrstvou chromatografií (TLC) s postkolonovou derivatizací ninhydrinem [51, 71, 73], či kapilární elektroforézou (CE) [72, 86, 88, 96].

1.7.1 Hydrolýza

Prvním krokem analýzy aminokyselin vázaných v bílkovinách je hydrolýza, která slouží k rozrušení peptidových vazeb a uvolnění volných aminokyselin. Hydrolýza je kritickým krokem analýzy, proto je správnost jejího provedení předpokladem úspěšné analýzy AK. Jedná se o časově náročnou metodu závislou na teplotě, reakční době nebo volbě činidla. Podle typu použitých činidel se hydrolýza dělí na chemickou a enzymatickou. Enzymatická hydrolýza probíhá za použití enzymů, zatímco chemická za použití různých chemických činidel. Chemická hydrolýza se dále dělí na kyselou nebo alkalickou [32, 62, 71, 75].

Nejběžnějším způsobem uvolnění AK z bílkovin je kyselá hydrolýza, kde se používá 6 M kyselina chlorovodíková při 110 °C po dobu 12-70 hodin v prostředí plynného dusíku nebo vakua (Tabulka 4) [32, 62, 75, 87, 89]. Po dokončení hydrolýzy je přebytečná část činidla odpařena [89]. Ve většině případů dochází k uvolnění AK přibližně z 80-100 %. Asparagin, glutamin a tryptofan jsou však hydrolýzou deaminovány nebo zcela zničeny. Jejich zachycení se provádí selektivními enzymatickými reakcemi [62] nebo se do roztoku přidávají ochranná činidla, jako je fenol, indol, merkaptoethanol nebo kyselina thioglykolová [89]. Rychlost hydrolýzy je závislá na druhu přítomných aminokyselin a jejich struktuře. Například k dosažení kvantitativního uvolnění valinu a isoleucinu je nutná hydrolýza po dobu 70 hodin [75] nebo dokonce až 120 hodin [89], neboť tyto AK se z peptidických vazeb uvolňují velmi obtížně. Threonin a serin může vykazovat ztráty 3-16 % a tyrosin 1-14 % [75].

Simpson a spol. [97] použili jako hydrolyzní činidlo kyselinu methansulfonovou (MSA) s přídavkem 3-(2-aminoethyl) indolu. Výhoda tohoto činidla spočívá v tom, že při jeho použití nedochází k degradaci tryptofanu a methioninsulfoxidu (produkt oxidace methioninu), jako je tomu u hydrolýzy s HCl [97]. Naproti tomu Inglis ve své práci [98] popisuje způsob hydrolýzy všech AK včetně tryptofanu a cysteinu najednou. U této metody je nejprve provedena alkylace kyselinou jodoctovou nebo 4-vinylpyridinem a poté hydrolýza derivátů pomocí MSA v přítomnosti tryptaminu. Tento přístup je však pro sériové analýzy nepraktický a používá se jen ve výjimečných případech [98]. MSA je netěkavá kyselina, tudíž ji po hydrolýze nelze odpařit a pro následnou chromatografickou separaci je třeba hydrolyzát zředit a upravit pH na hodnotu 2,3 [99]. Chiou a Wang [100] zjistili, že po hydrolýze pomocí MSA při 160 °C bylo dosaženo za 45 min obdobných výsledků jako po hydrolýze při 110 °C po dobu 24 h. Další

čínidla, jako je například kyselina p-toluensulfonová nebo směs kyseliny propionové a chlorovodíkové, se příliš neujala [99]. Nejčastěji používaná čínidla a jejich podmínky jsou uvedeny v tabulce 4. Významného zkrácení celkové doby hydrolýzy bylo dosaženo využitím energie mikrovlnného záření. Mikrovlnná zařízení jsou odolná vůči vysokým teplotám a tlakům [101, 102, 84].

Tabulka 4: Příklady čínidel používaných pro kyselou hydrolýzu [97-100, 102-104]

Čínidlo	Podmínky hydrolýzy	Přídavné látky	Specifikace metody
6 M HCl	110 °C, 24 h	0,02 % fenol	všechny AK kromě cysteinu a tryptofanu
6 M HCl nebo 4 M MSA	110 °C, 24 h	0,2 % azid sodný	Cystein
6 M HCl	110 °C, 18 h	5 % kys. thioglykolová, 0,1% fenol	Cystein
4 M MSA	110 °C, 24 h	3-(2-aminoethyl) indol	tryptofan, methioninsulfoxid
4 M MSA	115 °C, 22 h	0,02 % tryptamin	všechny AK
3 M kys. p-toluensulfonová	110 °C, 22 h	-	methioninsulfoxid

Alkalická hydrolýza se používá zejména k selektivnímu stanovení tryptofanu. Jako čínidlo se zde používají silné hydroxidy (NaOH, Ba(OH)₂, LiOH nebo KOH) s možným přidáním thiodiglykolu, přičemž hydrolýza probíhá při 110 °C po dobu alespoň 18 hodin. Tohoto postupu se využívá zejména ve vzorcích potravin s vysokým procentem sacharidů (např. obiloviny). Omezení této metody spočívá v destrukci serinu, threoninu, cysteinu nebo argininu [12, 62, 89].

Enzymatická hydrolýza se provádí pomocí proteolytických enzymů, jako je například chymotrypsin, trypsin, karboxypeptidáza, termolysin nebo papain. Používá se pro analýzu jednotlivých AK i pro analýzu specifických aminokyselinových sekvencí [12, 62]. Touto metodou byl stanoven obsah tryptofanu v potravinových doplňcích na bázi sóji a mléka [105]. D'Aniello a kol. ve své práci [106] popisuje metodu zahrnující tři po sobě následující kroky. Nejprve byla provedena hydrolýza pomocí HCl při 80-90 °C po dobu 15 minut, poté enzymatické štěpení pronázou při teplotě 50 °C po dobu 12-16 hodin a na konec enzymatická

hydrolyza pomocí leucinaminopeptidázy a hydrolázy peptidyl-D-aminokyseliny. Metodu lze použít na vzorky zvířecí nebo rostlinné tkáně, ale je velice zdlouhavá a komplikovaná.

1.7.2 Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací

První metoda v oblasti chromatografické analýzy aminokyselin je uvedena v publikaci Moora a kol. z roku 1958 [91]. Kompletní analýza trvala přibližně 72 hodin a zahrnovala separaci na iontoměničových kolonách se sulfonovanou polystyrenovou prskyřicí s následnou postkolonovou derivatizací pomocí ninhydrinu [91]. Separační mechanismus je založen na iontové interakci s kyselým činidlem. Nejprve dochází k eluci kyselých AK, poté hydroxylových, neutrálních a nakonec zásaditých [72]. Od té doby je analýza AK stále důležitou oblastí výzkumu, a to zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [77].

První automatický analyzátor aminokyselin byl vyvinut společností Spackman, čímž se rychlost analýzy výrazně zkrátila [1, 99] a dnes trvá i méně než 2 hodiny [64].

Využití postkolonové derivatizace se uplatnilo pouze u derivatizačních činidel OPA/2-merkptoethanolu, ninhydrinu a fluoreskaminu. Výhodou této metody je odstranění interferujících látek před derivatizací [62, 68, 74, 75, 91, 107, 108]. Ačkoli je separace AK na ionexech v různých modifikacích užívaná dodnes, kvůli omezené citlivosti a dlouhé době přípravy vzorku či jednotlivých analýz, bývá nahrazena HPLC [64, 68, 72].

1.7.3 RP-HPLC s předkolonovou derivatizací

Díky vysoké spolehlivosti se metoda RP-HPLC stala jednou z nejčastějších metod pro analýzu AK [51, 73, 76, 78, 84, 102]. Ve srovnání s IEC poskytuje RP-HPLC nižší detekční limity, kratší retenční časy a stabilnější základní linií [62, 65, 72, 76].

Při separaci aminokyselin pomocí RP-HPLC s předkolonovou derivatizací se jako mobilní fáze používá nejčastěji vodný roztok methanolu [28, 50, 67, 73, 76, 80], acetonitrilu (ACN) [70, 76, 79, 84, 85, 87, 92, 102] nebo jejich směsí [69, 71, 76, 82, 109]. V literatuře se často uvádí použití 60 % [65, 76, 83, 84] nebo 80 % ACN [85] jako silnějšího elučního solventu. Do vodné složky mobilní fáze se přidávají pufrý či jiná aditiva pro úpravu pH a iontové síly. Nejčastěji se setkáme s fosfátovým pufrem [69, 73, 80, 92], mravenčanem amonným [28], či octanovým pufrem [70, 76, 79, 82, 83, 85, 87, 102] často i s přídatkem triethylaminu (TEA) [76, 85]. pH mobilních fází vhodné pro separaci AK se nejčastěji pohybují v rozmezí od 6,35 do 6,8 [69, 76, 82-85], ale bylo použito i pH 5,5 [73].

Pro chromatografickou separaci lze využít speciálně vyvinutých kolon Pico Tag [76, 78, 83-85, 110], ale jejich použití je pro rutinní stanovení AK příliš nákladné [109]. Proto separace probíhá především na nepolárních silikagelových kolonách s chemicky vázanou C₈ [78, 82] nebo C₁₈ stacionární fází [62, 67, 70, 73, 78, 82, 85, 87, 109]. V poslední době se také využívají monolitické kolony s oxidem křemičitým [88]. Při analýze fyziologických vzorků se při separaci může objevit řada nežádoucích píků z matrice, proto je nutné pečlivě zvolit vhodnou kolonu a optimalizovat separaci. V případě jednodušších vzorků hydrolyzátů lze využít kratších kolon [12]. Teplota kolony při chromatografické analýze se standardně pohybuje v rozmezí 37-40 °C [69, 73, 83, 84], 45 °C [85] nebo 52 °C [82].

Protože se většina studií zabývá separací širokého spektra aminokyselin, často trvají analýzy déle než 30 minut [12, 69, 73, 82]. Délka separace je rovněž ovlivněna způsobem derivatizace a tvorbou různých degradačních či hydrolyzních produktů, které ztěžují separaci. Separace PITC derivátů 23 aminokyselin byla s úspěchem provedena do 30 minut [85]. Zkrácení doby separace na 21 minut [111], 13 minut [110] nebo 12 minut [76, 83, 84] bylo dosaženo použitím kratších analytických kolon Pico Tag, kde však nebylo možné stanovit stopová množství některých AK [110].

Jako vnitřní standardy se používají například norvalin, norleucin, kyselina α -aminomáselná, β -aminomáselná, γ -aminomáselná [75], etanolamin [62, 75] nebo homoarginin [28, 70].

Kvůli rozdílným polaritám jednotlivých AK se v průběhu separace využívá gradientové eluce [50, 69-73, 76, 80, 82-85, 87]. Na začátku separace se volí mobilní fáze s nízkým obsahem organického rozpouštědla pro eluci velmi polárních AK a postupným zvyšováním organické složky dochází k vymytí nepolárních látek [109]. V případě stanovení pouze BCAA lze zvolit i podmínky izokratické eluce [92].

Detekce derivátů probíhá nejčastěji pomocí fluorescenčního [67, 80, 87] nebo spektrofotometrického detektoru [69, 73, 84, 85, 92], a to v závislosti na použitém derivatizačním činidle [72, 79]. Mezi činidla používaná u RP-HPLC s předkolonovou derivatizací patří FMOC [70, 79, 102], Dns-Cl, AQC, HSAA [67, 86], OPA [78, 102] nebo PITC [73, 76, 82-85, 110].

Ve studii [69] zkoumající použití různých derivatizačních činidel při analýze fyziologických tekutin došli autoři k závěru, že vhodným činidlem pro separaci AK je z hlediska jednoduchosti

a rychlosti OPA. V případě současného stanovení i sekundárních AK je preferována derivatizace s PITC [69, 78].

Kromě aminokyselin se v potravinových doplňcích mohou vyskytovat vitamíny, minerální látky nebo různé kontaminanty, které nemusí být uvedeny na obalu. Protože doplňky stravy také nepodléhají kontrolám a klinickým studiím před uvedením na trh, může jejich analýza sloužit také k odhalení neoznačených a nedovolených látek. Pro přesnou identifikaci a kvantifikaci kontaminantů se užívá například kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC-MS) [50, 112].

Kvantitativní stanovení leucinu a isoleucinu pomocí RP-HPLC může být velmi komplikované, protože se jedná o polohové izomery s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a jejich kompletní separace je tedy velmi náročná. Při použití PITC jako derivatizačního činidla došlo v několika pracích k překryvu píků obou AK nebo k jejich nedokonalému rozlišení [63, 83, 84]. V některých studiích [69, 76] došlo ke zlepšení separace, ale píky Ile a Leu nebyly stále zcela odděleny až na základní linii. Dostačujícího rozlišení obou izomerů bylo dosaženo v několika pracích [73, 82, 85]. Ve studii [73] se uplatnilo použití metanolu a fosfátového pufru při teplotě 40 °C. Heinrichson a Meredith [82] testovali vliv typu a složení organické MF na separaci AK a uvádí, že lepšího rozlišení a ostřejších píků těchto izomerů lze dosáhnout použitím 50% ACN nebo kombinace ACN a metanolu při teplotě 52 °C. Janssen a kol. [85] dosáhli kvalitní separace píků Ile a Leu za použití vodné MF sestávající z 0,7 M octanu sodného a přídavku TEA. Organickou část MF pak tvořil 80% ACN a separace probíhala při teplotě 45 °C. Nevýhoda metod všech tří zmiňovaných metod [73, 82, 85] spočívala v dlouhém čase analýzy (přibližně 30 minut).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla optimalizace a validace metody pro stanovení rozvětvených aminokyselin přítomných v potravinových doplňcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi a předkolonovou derivatizací.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a vybavení

Analýza vybraných aminokyselin byla provedena pomocí kapalinového chromatografu LC-30AD složeného z degaseru DGU-20 A5, vysokotlakých čerpadel LC-30AD a spektrofotometrického detektoru s diodovým polem SPD-M30A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Pro separaci byly použity kolony Zorbax SB-Aq o rozměrech 150 x 3 mm, velikost částic 3,5 μm (Agilent, USA) a Ascentis Express F5 o rozměrech 150 x 3 mm a velikostí částic 2,7 μm (Sigma-Aldrich, USA), které byly umístěny v termostatu kolon LCO 102 Single (ECOM, ČR). Dávkovací zařízení bylo tvořeno šesticestným ventilem s vnější dávkovací smyčkou o objemu 2 μl . Vzorby byly dávkovány mikrostríkačkou Hamilton o objemu 10 μl (Hamilton CO., Nevada, USA).

Přesné navážky chemikálií byly váženy na analytických vahách Sartorius (Goettingen, Německo)

Filtrace mobilní fáze probíhala na vakuové filtrační aparatuře složené z vakuové jednotky Labobase SBC 860 (KnF, Stockholm, Švédsko) a regulátoru vakua CVC 3000 (Vacuubrand, Wertheim, Německo), kde byl použity membránové filtry Nylon o velikosti pórů 0,2 μm a průměru 47 mm (Supelco, USA). Homogenizace mobilní fáze se prováděla v ultrazvukové lázni (Kraintek, Podhájska, Slovensko) nebo pomocí magnetického míchadla Color Squid White (IKA, Německo). Hodnota pH mobilní fáze byla měřena pomocí pH metru 827 pH Lab (MetrOhm, Praha, ČR). Deionizovaná voda používaná pro ředění mobilní fáze byla čištěna pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Německo).

Derivatizační reakce standardů a vzorků byly provedeny v 1,5 ml mikrozkuvkách Eppendorf (Hamburg, Německo). Pro smísení reagujících činidel byla použita třepačka REAX top (Heidolph, Schwabach, Německo). Připravené deriváty byly poté odstředěny v centrifugačním zařízení Centrifuge 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) a přefiltrovány pomocí PTFE stríkačkových filtrů (0,45 μm , 4 mm, Labicom, Olomouc, ČR).

Dále byly používány pipety s nastavitelným objemem a běžné laboratorní pomůcky.

3.2 Použité chemikálie

- Standardy aminokyselin

Pro optimalizaci metody byly použity standardy aminokyselin L-isoleucinu, L-leucinu a L-valinu s čistotou ≥ 98 % (všechny Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

- Mobilní fáze

Pro přípravu mobilní fáze byl použit acetonitril s čistotou pro HPLC použití (gradient grade, Sigma-Aldrich, USA), octan amonný p. a. (Lachema n.p., Brno, ČR), octan sodný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR) a deionizovaná voda přečištěná na zařízení Mili-Q (Merck, Německo). Úprava pH mobilní fáze byla provedena roztokem 1 M hydroxidu sodného (Penta s.r.o., Praha, ČR) nebo kyselinou octovou 99 % p. a. (Penta s.r.o., Praha, ČR)

- Derivatizace

Jako derivatizační činidlo byl použit fenylisothiokyanát (Sigma-Aldrich, USA). Pro vytvoření derivatizační směsi byl dále použit metanol s čistotou pro HPLC (gradient grade, Sigma-Aldrich, USA) a triethylamin (Lachema n.p., Brno, ČR).

3.3 Pracovní roztoky

Zásobní roztoky standardů aminokyselin

Do 10 ml odměrných baněk bylo naváženo 10 mg jednotlivých aminokyselin a po rozpuštění byly baňky doplněny destilovanou vodou po rysku. Tyto roztoky sloužily k optimalizaci metody a byly uchovávány v lednici při teplotě 5-8 °C.

Zásobní roztoky vzorků potravinových doplňků

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo přesně 25 mg potravinového doplňku s obsahem BCAA a po rozpuštění látek v ultrazvukové lázni byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

Mobilní fáze – složka A

Jako vodná složka mobilní fáze byl testován roztok octanu amonného ($c = 70$ mmol/l a 0,1 mol/l) nebo octanu sodného ($c = 70$ mmol/l). Do kádinky bylo naváženo vypočítané množství octanu sodného nebo amonného a rozpuštěno v odpovídajícím množství redestilované vody. Po rozpuštění byla mobilní fáze zfiltrována na vakuové filtrační aparatuře a pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu pomocí kyseliny octové.

3.4 Vzorky

Analyzováno bylo celkem 10 vzorků potravinových doplňků s obsahem BCAA komerčně dostupných na trhu (Tabulka 5). Jako optimální složení BCAA se udává poměr Leu:Ile:Val 2:1:1 nebo 4:1:1. Tento poměr je dán tím, že právě leucin má na syntézu svalových buněk největší vliv. Pouze u vzorku č. 8 je obsaženo dvojnásobné množství valinu, pravděpodobně proto, že tento přípravek není cíleně určen pro sportovce. Pro získání reprezentativních výsledků byly zahrnuty také vzorky od zahraničních výrobců.

Tabulka 5: Přehled vzorků potravinových doplňků pro analýzu BCAA.

Číslo vzorku	Výrobce	Poměr BCAA (Leu:Ile:Val)	Deklarovaný obsah AK v 1 g [mg]		
			Leucin	Isoleucin	Valin
1	Nutri Works (Helsinki, Finsko)	2:1:1	350 mg	175 mg	175 mg
2	Myprotein (Manchester, Anglie)	2:1:1	384,6 mg	192,3 mg	192,3 mg
3	Ober Nutritions (Ostrava, ČR)	2:1:1	420 mg	210 mg	210 mg
4	Nutrend (Chválkovice, Olomouc, ČR)	4:1:1	400 mg	100 mg	100 mg
5	Extrifit (Dolní Újezd, ČR)	2:1:1	384,6 mg	192,3 mg	192,3 mg
6	BioTech USA (USA)	2:1:1	333 mg	166 mg	166 mg
7	Amix Nutrition (Manchester, Velká Británie)	2:1:1	350 mg	175 mg	175 mg
8	Vital Max (Praha, ČR)	1:1:2	245 mg	245 mg	490 mg
9	GymBeam (Berlín, Německo)	2:1:1	330 mg	165 mg	165 mg
10	Prom-In (Toužim, ČR)	2:1:1	250 mg	125 mg	125 mg

3.5 Pracovní postup analytického stanovení BCAA ve vzorcích potravinových doplňků pomocí RP-HPLC s PITC derivatizací

3.5.1 Příprava vzorků

Vzorky 1-7 a 10 byly zakoupeny ve formě instantních prášků, které se konzumují po rozpuštění v uvedeném objemu vody. Vzorek 8 obsahoval krystalické AK v želatinových kapslích. Obsah jedné kapsle byl kvantitativně převeden do Eppendorfovy mikrozkušavky, ze které byl poté odebírán pro další zpracování. Vzorek 9 byl získán ve formě lisovaných tablet, které byly v třecí misce rozemlety na jemný prášek. Všechny vzorky byly po dobu měření uchovávány v Eppendorfových mikrozkušavkách ve tmě a suchu.

3.5.2 Příprava zásobních roztoků vzorků

Do 50 ml odměrné baňky bylo na analytických vahách naváženo 25 mg potravinového doplňku s obsahem aminokyselin a po jeho rozpuštění byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Zásobní roztoky vzorků byly uchovávány v lednici při teplotě 5-8 °C.

3.5.3 Derivatizace

Pro derivatizaci standardů aminokyselin i vzorků byl jako derivatizační činidlo vybrán fenylisothiokyanát. Derivatizace aminokyselin vycházela z již optimalizovaného postupu vyvinutém na pracovišti [113,114].

První metoda derivatizace AK spočívala v přípravě dvou čerstvých derivatizačních činidel a zahrnovala kroky sušení vzorku. Nejprve bylo do Eppendorfovy mikrozkušavky převedeno 150 μ l standardních roztoků aminokyselin (od každé AK 50 μ l) a ponecháno k vysušení pod proudem plynného dusíku. Poté je k vysušenému vzorku přidáno 10 μ l směsi, která je tvořena metanolem, 1 M octanem sodným a TEA (2:2:1, v/v). Po řádném promísání a opětovném vysušení pod proudem dusíku bylo do mikrozkušavky přidáno 25 μ l čerstvě připravené směsi složené z metanolu, destilované vody, TEA a PITC v poměrech 7:1:1:1 (v/v) a směs se nechala reagovat 20 minut při laboratorní teplotě. Po derivatizační reakci byl roztok opět vysušen pod proudem dusíku. Po rozpuštění v 250 μ l redestilované vody a promísání na třepačce byla směs zfiltrována přes stříkačkový PTFE filtr (0,45 μ m, mm) a takto připravený derivát byl pomocí Hamiltonovy stříkačky nadávkován do kapalinového chromatografu a proměřen.

Druhým postupem byla novější metoda derivatizace AK z roztoku [113] a probíhala následovně. Ze zásobního roztoku vzorku ($c = 0,5$ g/l) bylo do Eppendorfovy mikrozkušavky odpipetováno 300 μ l vzorku. Poté bylo přidáno 30 μ l destilované vody, 50 μ l octanu sodného

($c = 1 \text{ mol/l}$), 50 μl triethylaminu a 50 μl fenylisothiokyanátu. Po důkladném promísení fází na třepačce se derivatizační směs nechala reagovat při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Směs byla poté centrifugována po dobu 3 minut a 10 000 otáčkách, aby došlo k oddělení vodné a organické fáze. Vodná fáze byla odebírána pomocí automatické pipety a filtrována přes stříkačkový PTFE filtr do Eppendorfovy mikrozkušavky.

3.6 Optimalizované podmínky pro stanovení aminokyselin v potravinových doplňcích

Separace a identifikace derivátů AK byla provedena pomocí kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi ve spojení se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem. V případě gradientové eluce byla po každé analýze kolona regenerována a ekvilibrována na počáteční podmínky po dobu alespoň 10 minut. Deriváty byly do kapalinového chromatografu dávkovány pomocí Hamiltonovy stříkačky a každý vzorek byl proměřen nejméně třikrát za následujících podmínek:

- Mobilní fáze A: 70 mM octan amonný; pH 4,55
- Mobilní fáze B: 100% acetonitril
- Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm)
- Teplota kolony: 40 °C
- Objem dávkovaného vzorku: 2 μl
- Průtok: 0,6 ml/min
- Detekce: 254 nm
- Eluce: Gradientová (tabulka 6)

Tabulka 6: Podmínky gradientové eluce pro separaci aminokyselin BCAA v potravinových doplňcích.

Čas [min]	Mobilní fáze B [%]
0	15
6,5	23
7	100
8	15

Profil optimalizované gradientové eluce je znázorněn v tabulce 6. Na základě znalostí retenčních charakteristik aminokyselin bylo po analýze možné identifikovat jednotlivé aminokyseliny. Valin eluoval v čase 4,41 minut, isoleucin v čase 6,63 minut a leucin v čase 6,81 minut. Mimo aminokyseliny byly v chromatogramu přítomny také píky hydrolyzních produktů činidla. Výsledný chromatogram separace derivátů standardů je uveden v kapitole 4.2.4 (Obrázek 20).

3.7 Kvantitativní stanovení BCAA v potravinových doplňcích

Pro kvantitativní stanovení obsahu vybraných aminokyselin v potravinových doplňcích byla použita metoda kalibrační přímky.

3.7.1 Příprava standardů aminokyselin pro sestavení kalibrační přímky

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo po 25 mg od každé AK (Ile, Leu, Val). Pomocí ultrazvukové lázně byl zásobní roztok zhomogenizován a poté doplněn destilovanou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku ($c = 1 \text{ g/l}$) bylo do 10 ml odměrných baněk ředěním připraveno devět standardních roztoků v koncentračním rozsahu 0,01 – 0,3 g/l. Kalibrační roztoky byly derivatizovány pomocí PITC činidla dle postupu derivatizace uvedeného v kapitole 3.5.3. Vzniklé deriváty byly následně proměřeny pomocí optimalizované RP-HPLC metody (kap. 3.6). Každý kalibrační roztok byl změřen nejméně pětkrát.

3.8 Statistické zpracování experimentálních dat

Na základě znalosti retenčních časů vybraných aminokyselin získaných proměřením standardních roztoků AK bylo možné stanovit jejich obsah ve vzorcích vybraných potravinových doplňků. Pro záznam a vyhodnocení chromatogramů byl využit softwarový program LabSolutions.

Statistická analýza dat a zpracování získaných výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2016 a QC Expert 2.9. (Trilobyte, Pardubice, ČR).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Pro předkolumnovou derivatizaci aminokyselin byl jako derivatizační činidlo vybrán fenylisothiokyanát, který rychlou derivatizační reakcí poskytuje stabilní deriváty. Z hlediska optimalizace derivatizace byly testovány dva odlišné derivatizační kroky.

První derivatizační metoda zahrnovala nutnost přípravy dvou čerstvých derivatizačních směsí a také kroky sušení pod proudem dusíku, čímž se proces derivatizace značně prodlužoval. Proto bylo od této metody upuštěno a pro derivatizaci byl použit nový rychlejší postup, který byl vyvinut Klikarovou a kol. [113]. Postup obou metod je popsán v experimentální části v kapitole 3.5.3. Výhodou metody derivatizace z roztoku, s vynecháním sušicích kroků, byla rychlost reakce (20 min. při laboratorní teplotě) a jednoduchost provedení. Nevýhodou této metody byla přítomnost interferujících píků v chromatogramu způsobených hydrolyzními produkty činidla a menší citlivost reakce. Z hlediska úspory času byl pro tuto práci vybrán postup derivatizace aminokyselin z roztoku.

4.2 Optimalizace podmínek separace PITC derivátů aminokyselin pomocí RP-HPLC

Za účelem přesné a citlivé analýzy AK obsažených v potravinových doplncích byly optimalizovány jednotlivé chromatografické parametry jako jsou složení, koncentrace a pH mobilní fáze, dále typ kolony a eluční podmínky. Cílem bylo dosáhnout co nejlepšího rozlišení v co nejkratším čase. Kritickým parametrem bylo rozlišení píků isoleucinu a leucinu, které patří mezi polohové izomery a jejich separace byla problematická. Z důvodu kontroly vlivu matrice vzorků na analýzu byly optimalizace prováděny s roztoky po derivatizaci standardů i vzorků.

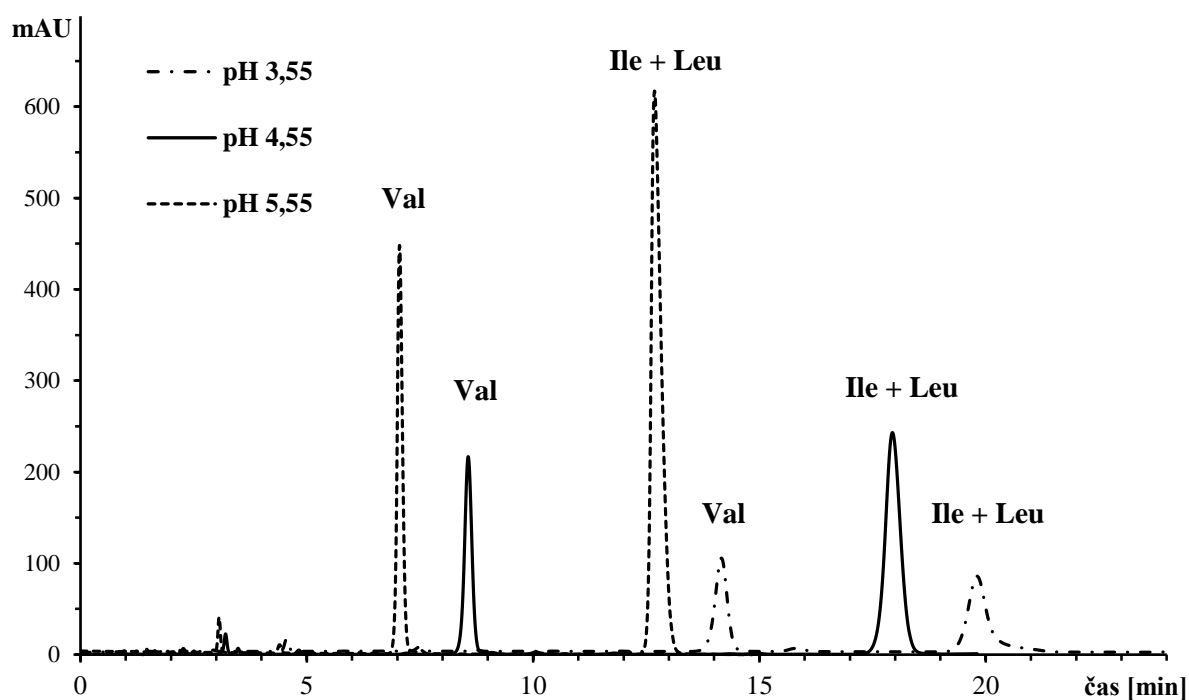
4.2.1 Vliv mobilní fáze

Nejprve byl pro optimalizaci mobilní fáze vybrán octan amonný, který byl pro separaci aminokyselin v literatuře používán nejčastěji. Díky schopnosti amonných iontů tvořit stabilní iontové páry, byly pozorovány symetrické píky AK. Na základě poznatků z literatury byl testován rovněž octan sodný. Při použití octanu sodného však na oktadecylové koloně došlo k prodloužení celkové doby analýzy a při větším přiblížení píků na chromatografickém záznamu byla pozorována asymetričnost jednotlivých píků, což není žádoucí zejména pro citlivou kvantitativní analýzu. V rámci testování vlivu typu vodné složky mobilní fáze na separaci derivátů AK byla také použita voda okyselená kyselinou octovou na pH 4,55 bez

přídavku soli. Použití okyselené vody se ukázalo být naprosto nevhodné, neboť kvůli nepřítomnosti iontů tvořících iontové páry s AK nedocházelo k jejich zadržení na nepolární stacionární fázi a pouhé okyselení mobilní fáze disociaci, a tedy eluci derivátů zásadním způsobem neovlivnilo (Obrázek P1).

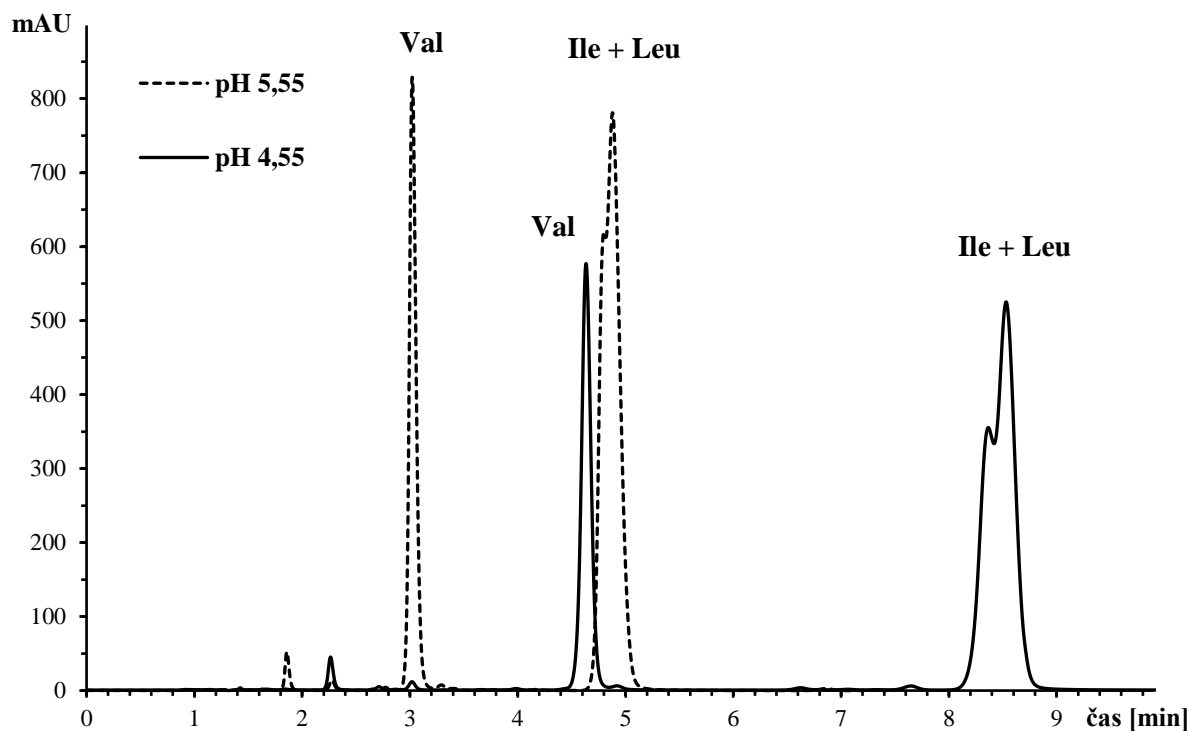
Zároveň s testováním dvou typů solí byl sledován vliv pH vzniklého pufru na separaci BCAA, především na rozlišení leucinu a isoleucinu. pH bylo upraveno kyselinou octovou na hodnoty 6,55; 5,55; 4,55 a 3,55. Bylo prokázáno, že pH mobilní fáze má na separaci aminokyselin značný vliv. Jak je patrné z obrázků 16 a 17, retence derivátů jednotlivých aminokyselin se s klesajícím pH zvyšuje.

Na základě experimentálních dat byla jako vodná složka mobilní fáze vybrán octan amonný okyselený na pH 4,55, protože při použití tohoto pufru bylo dosaženo ostrých a symetrických píků a lepšímu rozlišení derivátů Leu a Ile (obrázek 17).



Obrázek 16: Chromatografická separace vzorku BCAA za použití mobilní fáze 70 mM octanu sodného při vybraných hodnotách pH.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μm); MF-A: 70 mM octan sodný; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; izokratická eluce: 30 % B, derivatizace: 150 μl AK + 10 μl směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μl směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



Obrázek 17: Chromatografická separace vzorku BCAA za použití mobilní fáze 70 mM octanu amonného při vybraných hodnotách pH.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 $^{\circ}$ C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce: 30 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).

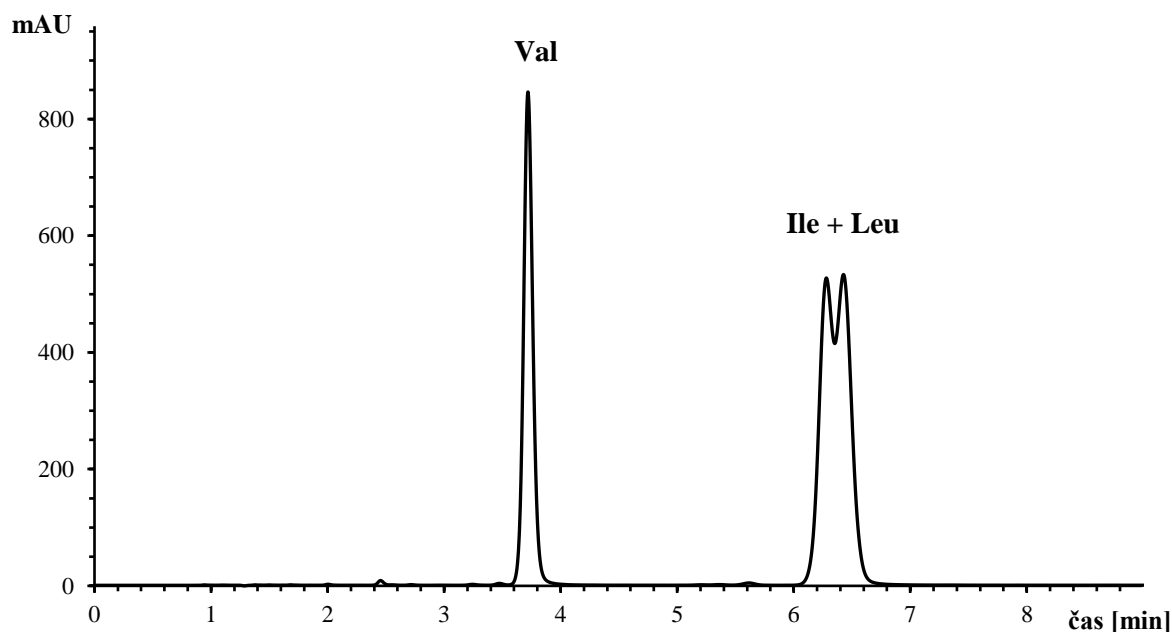
4.2.2 Vliv koncentrace

Dále byla testována různá koncentrace octanu amonného, a to 70 a 100 mmol/l. Bylo zjištěno, že změna koncentrace soli neměla vliv ani na retenci derivátů BCAA ani na kvalitu separace Ile a Leu (Obrázek P2 a P3). Aby se předešlo zatížení kolony, byla pro analýzu aminokyselin vybrána mobilní fáze s nižší koncentrací amonných iontů.

Kromě optimalizace vodné složky mobilní fáze byl sledován vliv koncentrace acetonitrilu na separaci derivátů BCAA. Na základě informací z literatury [65, 76, 83, 84] byl pro analýzu nejprve vybrán 60% ACN. Protože všechny deriváty BCAA jsou méně polární, bylo možné 60% ACN nahradit 100% acetonitrem, což usnadnilo vymytí méně polárního nezreagovaného činidla z kolony a navíc byla jednodušší příprava mobilní fáze.

4.2.3 Vliv stacionární fáze

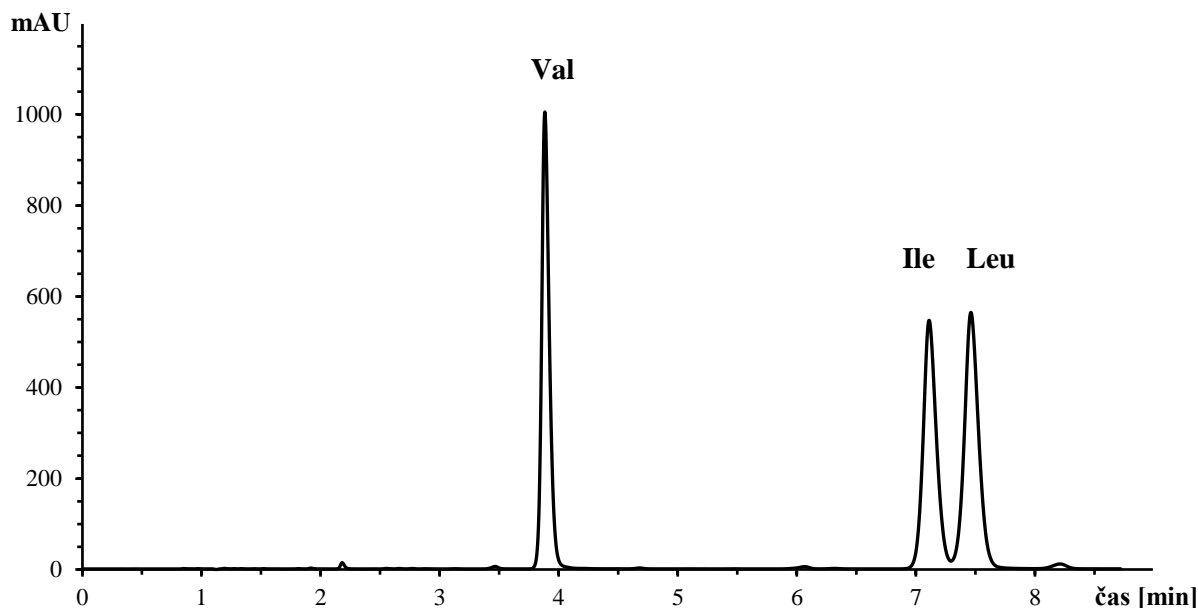
Při optimalizaci RP-HPLC separace byly testovány dvě různé stacionární fáze. V literatuře se nejčastěji uvádí jako vhodná stacionární fáze chemicky vázaná oktadecylsilikagelová či oktylsilikagelová fáze. Na základě literatury [62, 67, 70, 73, 78, 82, 85, 87, 109] byla proto nejprve vybrána kolona Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m) s oktadecylovým řetězcem, která je upravená pro použití mobilních fází s vysokým obsahem vody, což je u separací aminokyselin nutností. Deriváty AK byly proměřeny pomocí izokratické eluce s měnící se koncentrací acetonitrilu, pH a typu soli, jak bylo diskutováno v předchozí kapitole. Při nižším pH mobilní fáze byly pozorovány ostřejší píky (Obrázek 16 a 17), ale Ile a Leu se nepodařilo kvalitně rozseparovat za žádných z testovaných podmínek. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo za podmínek uvedených na obrázku 18. Proto byla zvolena kolona Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m) s chemicky fázaným pentafluorfenylpropylem, která je vhodná především pro separaci polohových izomerů. Navíc tato kolona obsahovala povrchově porézní částice s menším průměrem, takže se jednalo o kolonu s vyšší účinností separace. Deriváty AK byly na této stacionární fázi proměřeny za stejných podmínek jako v případě oktadecylsilikagelové stacionární fáze. Dle očekávání se zlepšila účinnost separace i rozlišení píků Ile a Leu a jak je patrné z obrázku 19 jejich rozlišení se blížilo $R = 1,5$.



Obrázek 18: Chromatografická separace standardů BCAA za podmínek izokratické eluce s kolonou C₁₈ Zorbax SB-Aq.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce:

35 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



Obrázek 19: Chromatografická separace derivátů standardů BCAA za podmínek izokratické eluce s kolonou Ascentis Express F5.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce: 35 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).

4.2.4 Gradientová eluce

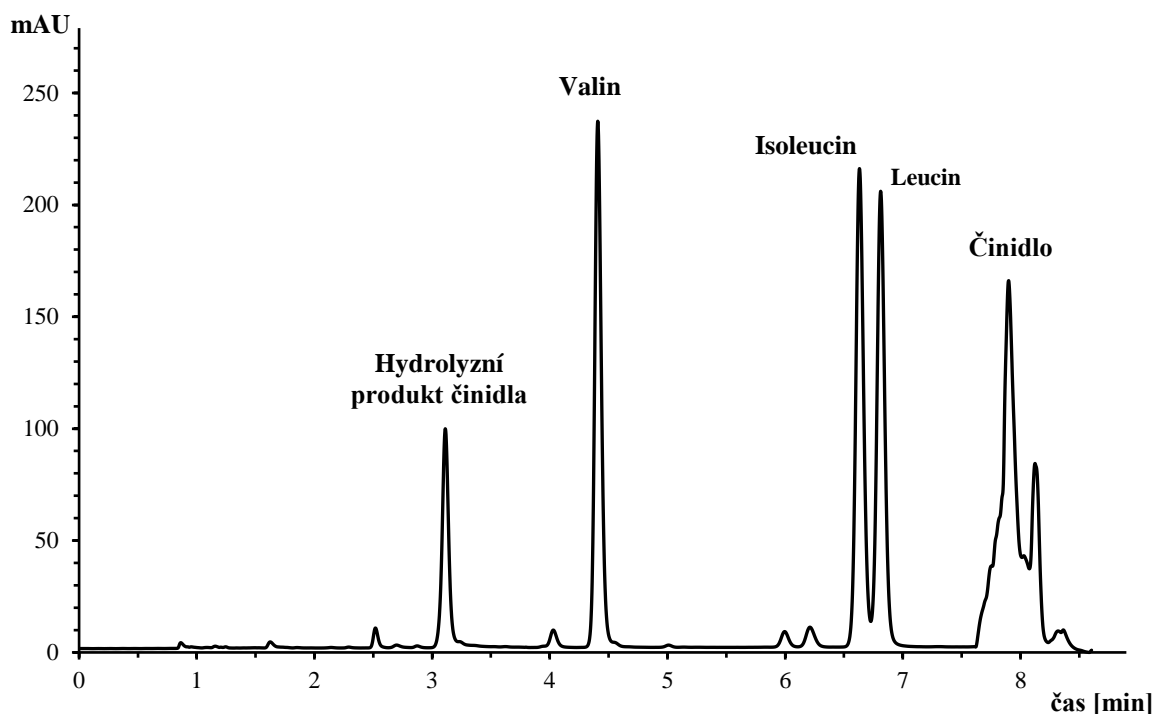
Po úspěšném rozseparování píků Ile a Leu pomocí izokratické eluce bylo testováno několik profilů gradientové eluce. Sledovanými kritérii při výběru vhodného gradientu byla doba analýzy a rozlišení těchto izomerů. Rozlišení je vyjádření míry kvality separace dvou sousedních píků a je dáno vztahem:

$$R_{1,2} = 2 \cdot \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

- kde $t_{R,1}$, $t_{R,2}$ jsou eluční časy sousedních píků a w_1 , w_2 šířky píků při základně [115]

Rozlišení téměř na základní linii nabývá hodnoty 1,5. Optimalizací gradientové eluce bylo dosaženo rozlišení píků izomerů 1,45, což bylo považováno za vyhovující. Finální optimalizovaná chromatografická separace derivátů AK je zobrazen na obrázku 20. Testování

gradientů s větší strmostí sice nabízelo zkrácení celkové doby analýzy, ale také docházelo ke zmenšení rozlišení Ile a Leu, což je pro kvantitativní analýzu nežádoucí.



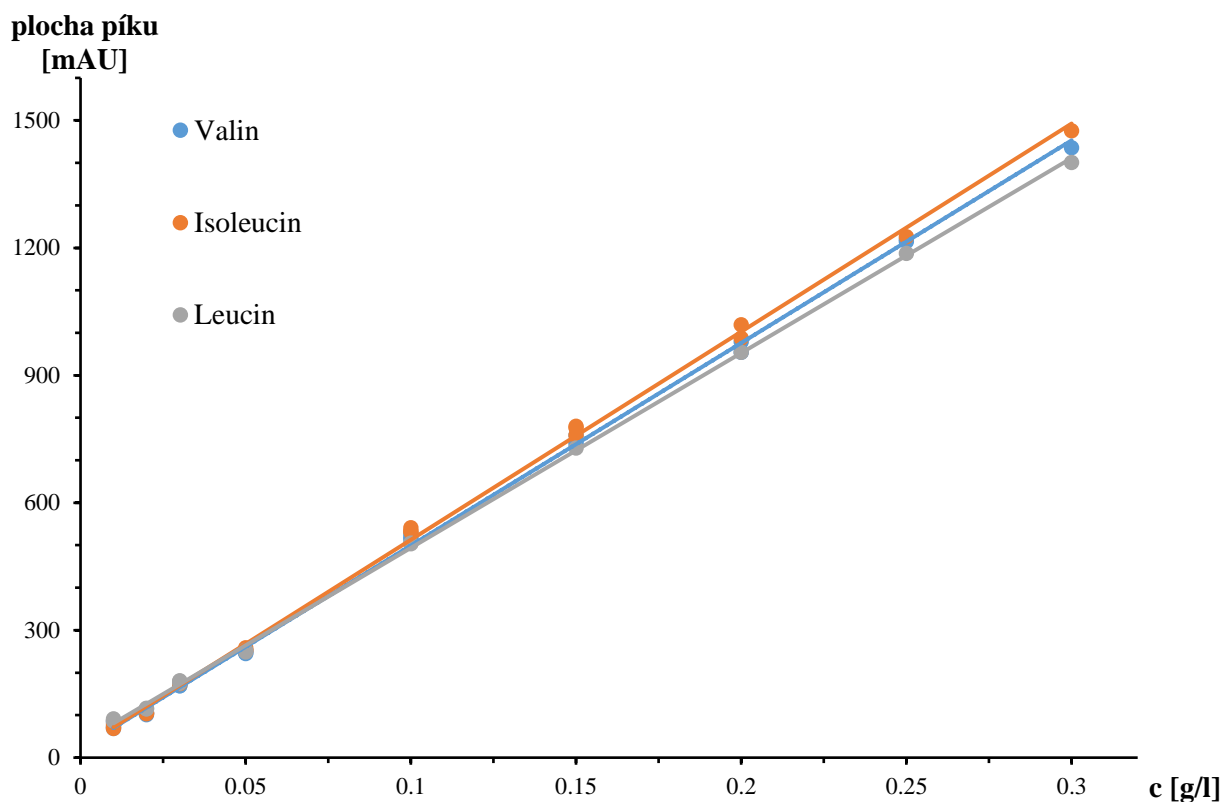
Obrázek 20: Optimalizovaná chromatografická separace standardů BCAA aminokyselin.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μl vzorku + 30 μl destilované vody + 50 μl 1 M octanu sodného + 50 μl TEA + 50 μl PITC.

4.3 Kvantitativní stanovení BCAA v potravinových doplňcích

4.3.1 Kalibrace

Kvantitativní analýza BCAA byla provedena metodou vnějšího standardu pomocí kalibrační přímky. Pro konstrukci kalibrační přímky byla na osu x vynesena koncentrace c (g/l) a na osu y byly vyneseny hodnoty ploch píků derivátů aminokyselin. Ve statistickém programu QC Expert byla experimentálně naměřená data proložena lineární regresí a poté byly pomocí grafických diagnostik (Pregibonův, Williamsův a L-R graf) odstraněny odlehlé hodnoty.



Obrázek 21: Kalibrační přímky vybraných aminokyselin.

Ve všech případech bylo dosaženo dostačující linearity, což dokazují korelační koeficienty pohybující se v rozsahu 0,9986 až 0,9995. Z kalibračních závislostí zobrazených v obrázku 21 je patrné, že citlivost detekce je u všech analyzovaných AK téměř shodná. Všechny parametry kalibračních přímek a intervaly spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Parametry kalibračních přímek vybraných aminokyselin.

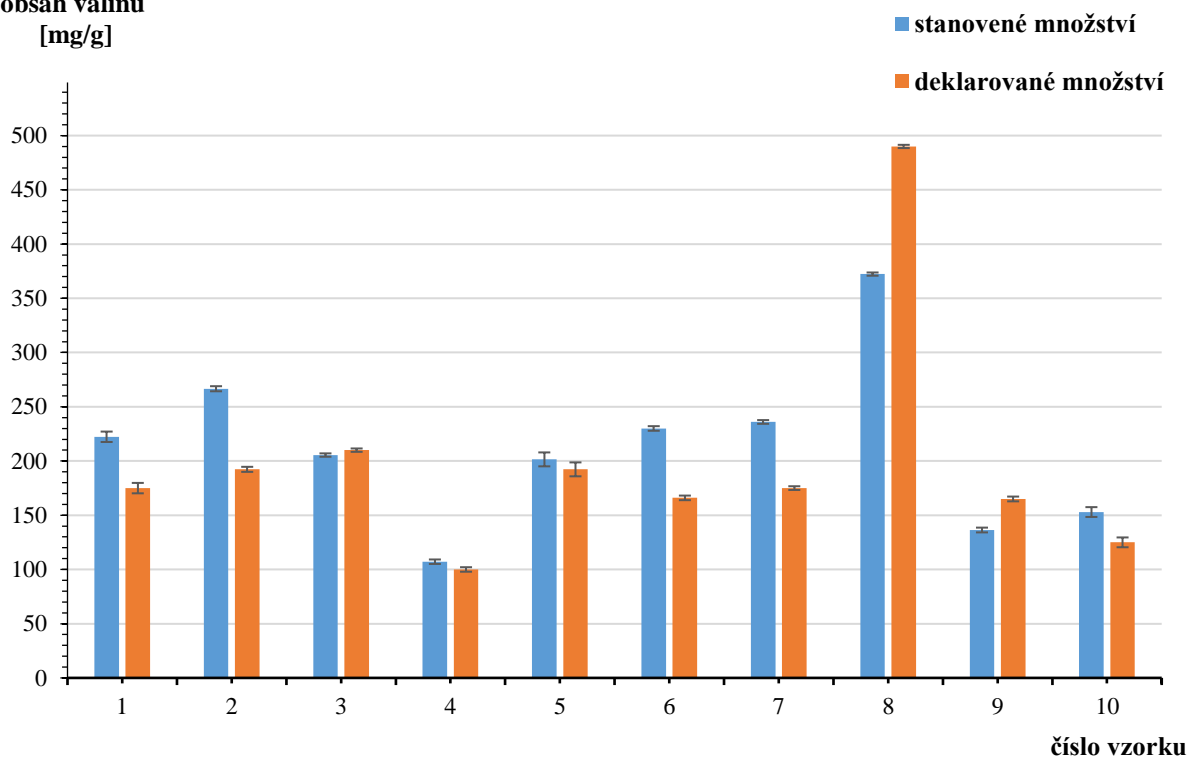
AK	Směrnice ± interval spolehlivosti	Úsek ± interval spolehlivosti	Koeficient determinace R ²
Valin	4768 ± 66	22,52 ± 8,72	0,9990
Isoleucin	4899 ± 80	22,86 ± 9,94	0,9986
Leucin	4588 ± 53	34,95 ± 6,39	0,9995

4.3.2 *Analýza vzorků*

Na základě kalibračních závislostí a experimentálně získaných hodnot ploch píků byly vypočteny koncentrace všech BCAA přítomných v potravinových doplňcích a následně byly porovnány s deklarovaným množstvím uváděným na obalu. Chromatografické separace získané při měření jednotlivých vzorků jsou zobrazeny v příloze (Obrázky P4-P11) a vzorky 7 a 9 v kapitole 4.5 (Obrázky 23 a 25). Kvantitativní zastoupení jednotlivých BCAA je uvedeno v tabulkách P1-P3. Z hlediska lepší přehlednosti byly také sestrojeny grafy, kde jsou porovnány deklarované hodnoty s množstvím stanoveným metodou RP-HPLC s PITC derivatizací (Grafy 1-3). Protože doplňky stravy nejsou před vstupem na trh podrobeny důkladným kontrolám bezpečnosti a jakosti, není možné s jistotou říct, zda je obsah uvedený na obalu pravdivý. Množství aminokyselin by však nemělo být menší než toto deklarované množství na obalu.

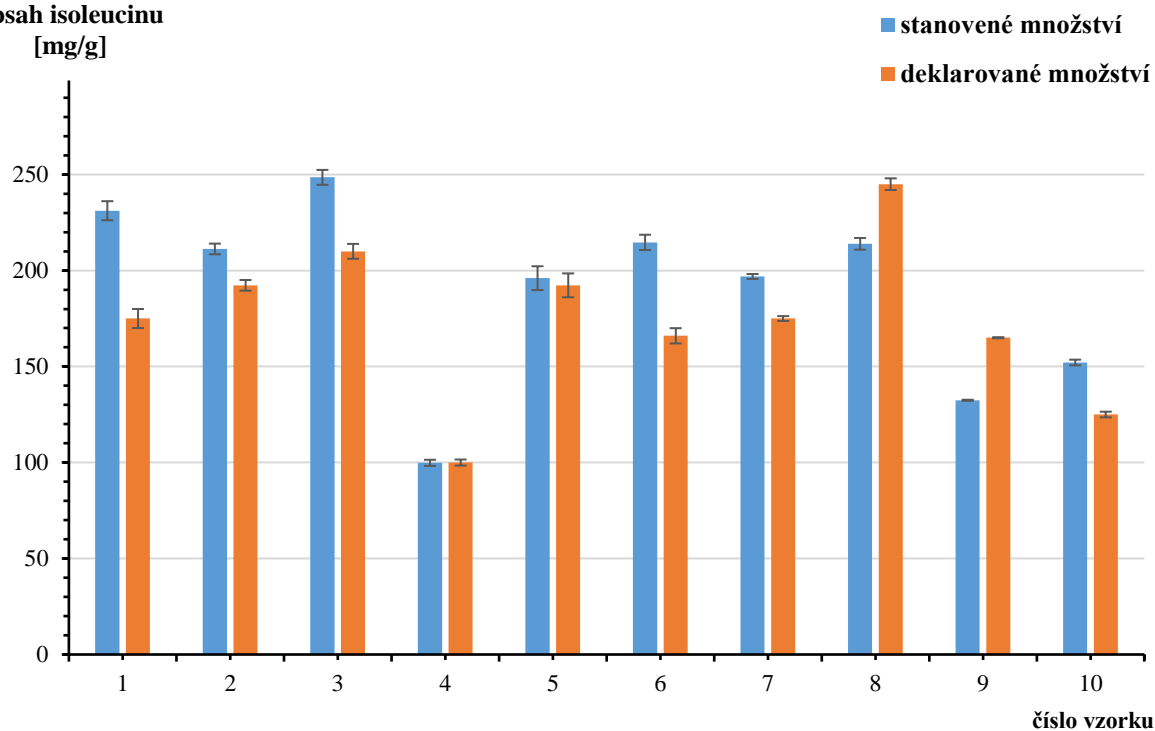
Z výsledků měření je patrné, že kromě vzorků 3, 8 a 9 bylo udávané množství valinu ve vzorcích splněno (Graf 1, Tabulka P1). Nejvyššího podílu valinu bylo dosaženo u vzorků 2, 6 a 7, kde bylo stanoveno dokonce o 30 % více oproti obsahu uvedenému na etiketě. V případě isoleucinu (Graf 2, Tabulka P2) nesplnily deklarované množství vzorky 8 a 9, přibližně o 12 a 20 %. Výsledky měření poslední studované AK ukazují (Graf 3, Tabulka P3), že deklarovaný obsah leucinu nebyl splněn u 4 vzorků doplňků stravy. Konkrétně se jednalo o vzorky 4, 5, 7, 9 a rozdíly nepřekročily 20 %. Nejnižší obsah leucinu byl nalezen ve vzorku 9, kde bylo oproti uváděným 330 mg/g stanoveno pouze 271 mg/g. Vzorek 8 se pohyboval těsně nad hranicí deklarované hodnoty. Nejvyšší množství leucinu bylo detekováno u vzorků 1 a 6 a činilo přibližně 120 % deklarovaného množství. U vzorku 9 byl stanoven nejnižší obsah všech sledovaných aminokyselin, a to téměř o 20 % oproti obsahu uvedenému na obalu. V tomto případě se jednalo o kapsli potravinového doplňku a rozdíl mezi deklarovaným a naměřeným množstvím mohl být způsoben nedokonalým rozpuštěním rozemleté kapsle. V případě vzorku 8 bylo stanoveno velmi nízké množství valinu 372 mg/g oproti deklarovaným 490 mg/g, což činí přibližně 76 %. Ostatní aminokyseliny jsou již ve větší shodě s deklarovaným obsahem.

obsah valinu
[mg/g]

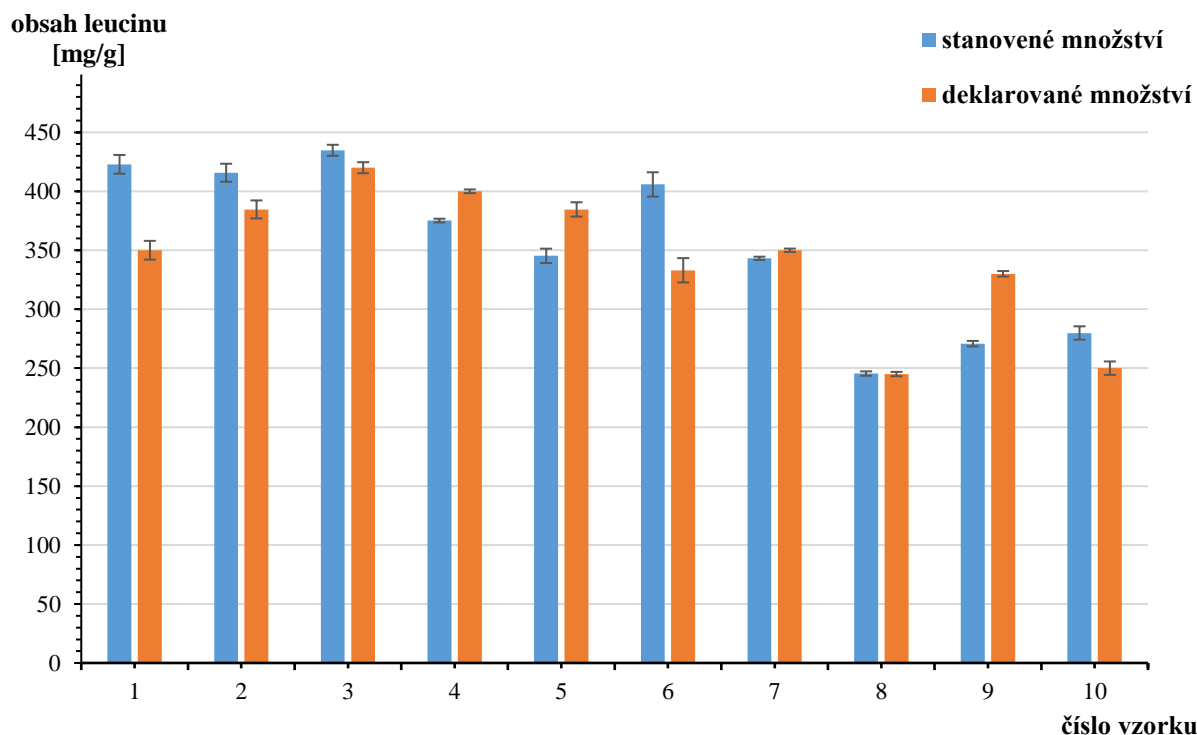


Graf 1: Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím valinu uvedeným na obalu vzorku.

obsah isoleucinu
[mg/g]



Graf 2: Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím isoleucinu uvedeným na obalu vzorku.



Graf 3: Grafické srovnání experimentálně zjištěného obsahu s deklarovaným množstvím leucinu uvedeným na obalu vzorku.

4.4 Validace analytické metody

Validace metody je důležitá pro ověření, zda jsou parametry analytické metody natolik validní, aby bylo možné získat přesné a správné výsledky. V této diplomové práci byly k verifikaci metody vybrány následující validační parametry: mez stanovitelnosti, mez detekce, správnost (návratnost) a opakovatelnost (intradenní i mezidenní).

4.4.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) se rozumí nejmenší signál poskytující analyt, který lze odlišit od šumu či jiných rušivých signálů. LOD se stanovuje jako koncentrace rovna trojnásobku šumu základní linie. Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které je možné kvantitativně stanovit s vymezenou přesností a správností. LOQ odpovídá koncentraci, která je rovna desetinásobku šumu základní linie.

K určení meze detekce a stanovitelnosti byl naředěním standardního kalibračního roztoku připraven roztok o koncentraci 0,001 g/l. Po proměření vzorku byl z chromatogramu odečten šum základní linie a výšky píků vybraných AK. Na základě předchozích definic byly vypočteny příslušné hodnoty LOD, které činily 0,0945 µg/ml pro valin, 0,0997 µg/ml pro isoleucin a

0,0764 µg/ml pro leucin. Vypočtené koncentrace LOQ činily 0,3151 µg/ml pro valin, 0,3332 µg/ml pro isoleucin a 0,2547 µg/ml pro leucin. Pro ověření byly tyto výsledky porovnány s hodnotami LOD a LOQ vypočítanými z kalibračního roztoku o koncentraci 0,01 g/l. Měřením na obou koncentračních hladinách bylo dosaženo téměř identických výsledků. Zatímco LOD i LOQ valinu a isoleucinu nabývaly téměř shodných hodnot, pro leucin byly získány hodnoty ještě nižší.

4.4.2 Návratnost metody

Dalším sledovaným parametrem byla návratnost, kde byly ověřeny odchylky mezi známou koncentrací aminokyselin v připravených roztocích a experimentálně zjištěnou koncentrací na základě výpočtu s využitím kalibračních závislostí. Ověření návratnosti bylo provedeno na dvou koncentračních hladinách. Byly vybrány koncentrace z počátku a konce kalibrační řady, 0,02 g/l a 0,3 g/l. Z každé koncentrační hladiny byly v jeden den připraveny tři deriváty, které byly za stejných podmínek dvakrát proměřeny a spočítána relativní směrodatná odchylka. Relativní směrodatná odchylka (RSD) je vhodná pro srovnávání vzájemné variability dat. Je charakterizována jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru a výsledek se obvykle uvádí v procentech. Čím je její hodnota nižší, tím je metoda přesnější. RSD byla vyjádřena ze šesti měření provedených pro každou aminokyselinu a koncentraci. Z výsledků uvedených v příloze (Tabulky P4-P6) lze konstatovat, že návratnost ve všech případech přesahovala 100 %. V případě stanovení leucinu při koncentraci 0,02 g/l dokonce 120 %. Pro lepší přehlednost jsou průměrné hodnoty koncentrací a návratnosti jednotlivých aminokyselin uvedeny v tabulce 8. Dle validačních protokolů [116] by se hodnoty návratnosti kalibrační řady měly pohybovat v rozsahu 90-107 % u koncentrace 0,3 g/l a 80-110 % u koncentrace 0,02 g/l, což nebylo splněno ani v jednom případě. Důvodem vzniku větších odchylek mohl být nedokonalý průběh derivatizace aminokyselin, či vliv okolních podmínek na průběh derivatizace. Během měření totiž došlo k velkému oteplení a teplota v laboratoři se změnila o více než 5°C.

Hodnoty RSD všech aminokyselin se pro koncentraci 0,02 g/l pohybovaly okolo 4,2 % a pro koncentraci 0,3 g/l v rozmezí 2,93 až 3,07 %. Z toho vyplývá, že větších odchylek bylo dosaženo na nižší koncentrační hladině.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty koncentrací, návratnosti a získané relativní směrodatné odchylky jednotlivých AK na vybraných koncentračních hladinách.

Kalibrační roztok 0,02 g/l	Průměrná koncentrace [g/l]	Návratnost [%]	RSD
Valin	0,0222	110,93	4,23
Isoleucin	0,0224	112,57	4,29
Leucin	0,0233	116,69	4,24
Kalibrační roztok 0,3 g/l	Průměrná koncentrace [g/l]	Návratnost [%]	RSD
Valin	0,3281	109,37	2,99
Isoleucin	0,3277	109,22	2,93
Leucin	0,3293	109,76	3,07

RSD = Relativní směrodatná odchylka

4.4.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody neboli preciznost je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami, které byly získány opakovaným měřením vzorků na stejném přístroji, stejným pracovníkem a za identických pracovních podmínek. Tímto způsobem byly provedeny analýzy v určitém časovém úseku (intradenní a mezidenní opakovatelnost). Pro zjištění intradenní opakovatelnosti analytické metody byl vybrán vzorek, z něhož byly v jeden den připraveny tři deriváty. Každý derivát byl za stejných podmínek třikrát změřen. RSD získaná z devíti měření činila pro valin 3,67 %, pro isoleucin 3,95 % a pro leucin 4,62 % (Tabulka P7).

Po několika dnech bylo ze stejného vzorku identickým postupem připraveno pět derivátů a každý byl opět třikrát analyzován. Z naměřených hodnot byly vypočteny příslušné koncentrace AK a intradenní opakovatelnost metody byla vyjádřena jako RSD z patnácti opakování. Pro valin činila hodnota RSD 6,01 %, pro isoleucin 7,01 % a pro leucin 7,41 % (Tabulka P8).

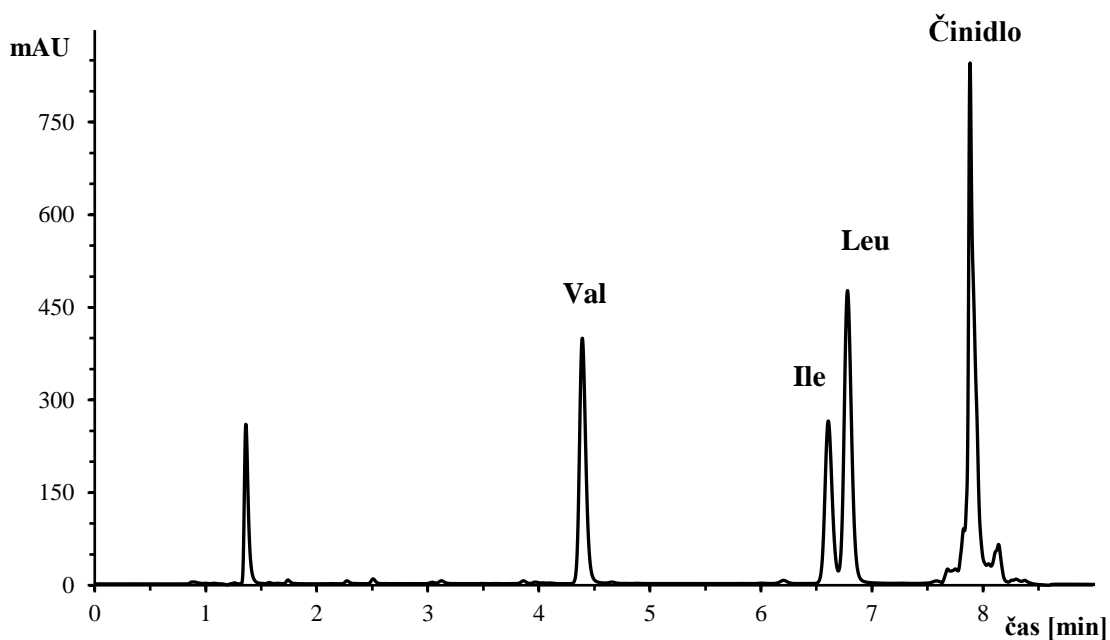
Z celkového počtu 24 opakování měření jednoho vzorku v různých dnech, ale za stejných podmínek, byla získána mezidenní opakovatelnost. RSD ze všech získaných hodnot pro valin byla rovna 9,37 %, pro isoleucin 9,89 % a pro leucin 6,66 %. Dle validačních protokolů [116] by pro danou koncentrační hladinu neměla RSD překročit hodnotu 3 %. Rozdíly v měření uskutečněných v jiné dny mohou být způsobeny jednak matričními efekty vzorků jednak také

chybami způsobenými při úpravě vzorku nebo samotným měřením. Významný vliv na tyto odchylky měl také jednoznačně průběh derivatizace aminokyselin. Bylo pozorováno, že opakovaným měřením po několika dnech dosahovaly koncentrace AK vyšších hodnot než při prvním měření. V laboratoři, kde byla realizována všechna měření, není zajištěna klimatizace, díky které by laboratorní teplota byla temperována na konstantní hodnotu. Zejména ke konci měření docházelo k častým změnám počasí, a tedy i kolísání teplot v laboratoři, což mělo negativní dopad na některé výsledky měření. Z důvodu nedostatku času nemohl být vliv teploty na průběh derivatizace aminokyselin podrobněji prozkoumán.

4.5 Porovnání derivatizačních metod

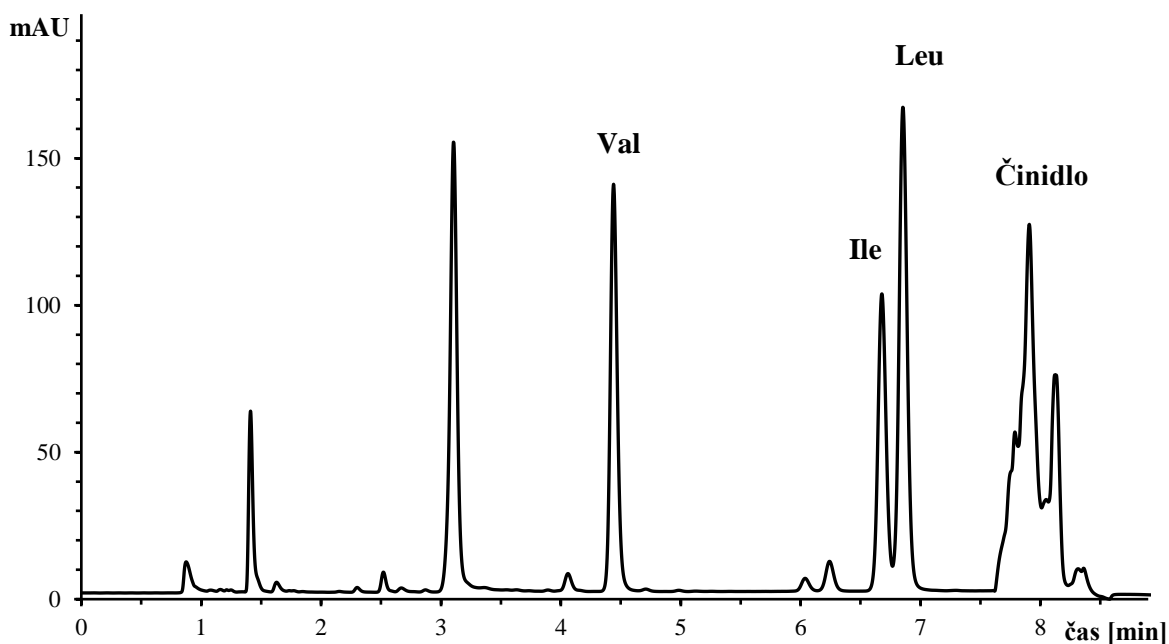
Ve zbývajícím čase byly vybrány vzorky 7 a 9, které byly podrobeny derivatizaci metodou se sušicími kroky, jejíž postup je uveden v experimentální části (kapitola 3.5.3) a výsledné deriváty byly proměřeny za identických podmínek. Z chromatogramů obou vzorků (Obrázek 22, Obrázek 24) je patrné, že v případě derivatizace se sušicími kroky bylo dosaženo vyšších intenzit píků, a to i v případě, že dávkovaný objem vzorku pro derivatizaci byl poloviční. V porovnání s chromatogramy vzorků, které byly derivatizovány metodou z roztoku (Obrázek 23 a 25), lze u derivatizace se sušicími kroky zaznamenat absence píků v retenčních časech 1,55, 1,75 a 3,11 min, což jsou zřejmě produkty hydrolýzy činidla. Přítomnost interferenčních píků může při stanovení většího množství analytů rušit odezvu a ztížit tak jejich identifikaci. V případě derivatizace zahrnující sušení derivatizační směsi dochází k eliminaci tvorby hydrolyzních produktů a větší výtěžnosti derivatizační reakce. Tento postup je však časově velmi náročný vlivem dlouhodobého a několikanásobného sušení derivatizační směsi.

Podle informací uvedených na obalu vzorku 9, byla v tomto potravinovém doplňku obsažena také aminokyselina lysin. V závěru práce jsme se tedy pokusili o jeho identifikaci, ale vzhledem k rozdílné retenci oproti stanovovaným BCAA nebyla námi optimalizovaná metoda vhodná pro jeho kvantifikaci. Z obrázku 24 je však patrné, že u separace vzorku 9 je před píkem činidla pozorován velký pík, který nebyl přítomen u ostatních vzorků (Obrázek P4-P11 a Obrázek 23). Jedná se právě o lysin, který koeluuje s píkem derivatizačního činidla, což bylo potvrzeno analýzou derivátu standardu a slepého pokusu (derivatizace bez aminokyseliny).



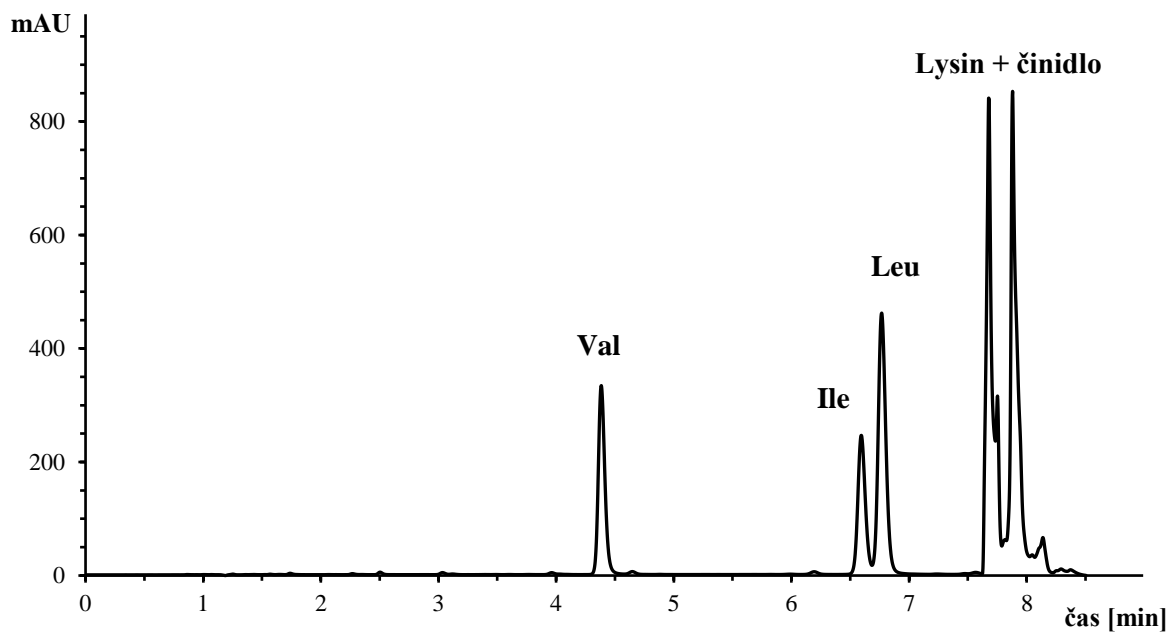
Obrázek 22: Chromatografický záznam vzorku 7 za podmínek předkolumnové derivatizace s PITC sušící metodou.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



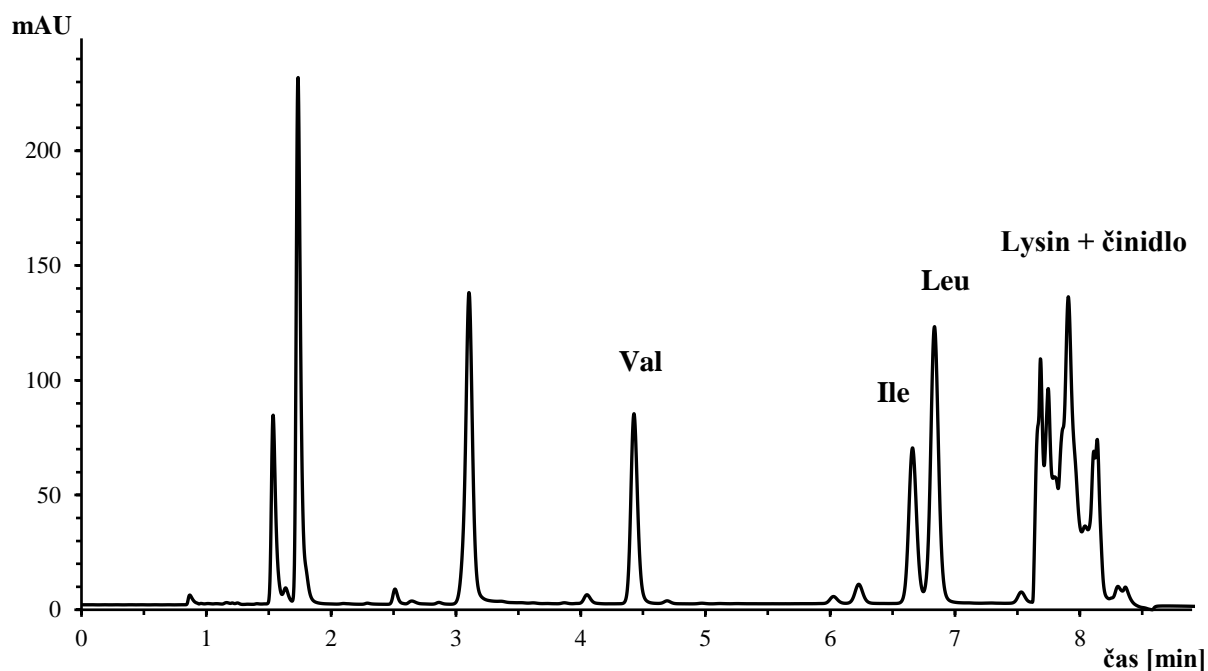
Obrázek 23: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 7 za podmínek předkolumnové derivatizace s PITC metodou z roztoku.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



Obrázek 24: Chromatografický záznam vzorku 9 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC sušící metodou a koeluce lysinu s činidlem.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



Obrázek 25: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 9 za podmínek předkolonové derivatizace s PITC metodou z roztoku.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μl vzorku + 30 μl destilované vody + 50 μl 1 M octanu sodného + 50 μl TEA + 50 μl PITC.

5 ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem v potravinových doplncích vhodných zejména pro sportovce. Aminokyseliny byly identifikovány metodou kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi po předchozí derivatizaci fenylisothiokyanátem. Fenylisothiokyanát poskytuje rychlou derivatizační reakcí stabilní deriváty, které lze uchovávat v chladu několik týdnů. Pro optimalizaci chromatografických podmínek bylo testováno složení, koncentrace a pH mobilní fáze, typ stacionární fáze či gradientový profil. U optimalizované metody byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu a octanu amonného o pH 4,55. Analyzované látky byly separovány pomocí gradientové eluce na koloně Ascentis Express F5, která byla naplněna částicemi s chemicky vázaným pentafluorfenylpropylem a pro separaci polohových izomerů Ile a Leu se jevila jako nejvhodnější. Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 254 nm.

Vyvinutá metoda byla validována pro všechny studované aminokyseliny z hlediska přesnosti, návratnosti a opakovatelnosti (intradenní a mezidenní). Linearita standardů aminokyselin byla ověřena v rozsahu koncentrací 0,01 až 0,3 g/l. Průběh derivatizace AK byl pravděpodobně ovlivněn teplotou v laboratoři, která v průběhu měření značně kolísala, a proto nebyly při validaci metody splněny některé parametry dány validační příručkou.

Po vypočtení koncentrací jednotlivých AK byl jejich obsah porovnán s deklarovaným množstvím uvedeným na etiketě potravinového doplňku. Nejnižších hodnot bylo zaznamenáno u aminokyseliny leucinu, kde obsah uvedený na obalu nesplnily 4 vzorky.

Porovnáním obou derivatizačních kroků bylo zjištěno, že derivatizace využívající v postupu sušicí kroky by z hlediska citlivosti byla pro stanovení AK vhodnější. Pro velkou časovou tíseň však byla pro stanovení rozvětvených aminokyselin využita metoda derivatizace z roztoku, která je daleko rychlejší a vzhledem k velkému obsahu aminokyselin v doplncích stravy ji lze s úspěchem využít. Nakonec byla ve vzorku 9 identifikována také aminokyselina lysin, ale z důvodu koeluce s derivatizačním činidlem nemohla být kvantifikována.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] McMURRY, J. *Organická chemie*. Brno: VUTIUM, **2007**. Překlady vysokoškolských učebnic, svazek 2. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [2] DI PASQUALE, M. G. *Amino Acids and Proteins for the Athlete: The Anabolic Edge*. 2nd edition. New York: CRC Press, **2008**. 456 s. ISBN 978-1-4200-4380-8.
- [3] SEAGER, S. L.; SLABAUGH, M. R. *Chemistry for Today: General, Organic, and Biochemistry*. 8th edition. Belmont: Brooks/ Cole, **2014**. 960 s. ISBN 1-133-60227-4.
- [4] KOOLMAN, J.; RÖHM, K-H. *Barevný atlas biochemie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, **2012**. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [5] HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N. A.; KANG, J.; FALVO, M. J.; FAIGENBAUM, A. D. Effects of Protein Supplementation on Muscular Performance and Resting Hormonal Changes in College Football Players. *Journal of Sports Science & Medicine*, **2007**, 6 (1). 85-92 s. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3778704/>.
- [6] WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. **2013**, 45. 407–411 s. ISSN 1438-2199. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-013-1500-6>.
- [7] VILIKUS, Z. a kol. *Výživa sportovců a sportovní výkon*. Praha: Karolinum, **2015**. 178 s. ISBN 978-80-246-3152-3.
- [8] BARRET, G.; C., ELMORE, D. T. *Amino acids and peptides*. 2nd. edition. Cambridge University Press, **2004**, 224 s. ISBN 0-511-03952-2.
- [9] LOPEZ, M. J.; MOHUIUDDIN, S. S. *Biochemistry, Essential Amino Acids*. In: StatPearls. [online]. **2020**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [cit. 2. 12. 2020] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>.
- [10] MANDELOVÁ, L., HRNČIŘÍKOVÁ, I., *Základy výživy ve sportu*, Masarykova univerzita, **2007**. 72 s. ISBN 978-80-210-4281-0.
- [11] ARMSEY, T. D.; GRIME, T. E. Protein and Amino Acid Supplementation in Athletes. *Current Sports Medicine Reports*. **2002**, 4. 253-256 s. ISSN 1537-890X. Dostupné z: <https://journals.lww.com/acsm->

csmr/Abstract/2002/08000/Protein_and_Amino_Acid_Supplementation_in_Athletes.0.aspx.

- [12] NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Food*. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, **2012**. 956 s. ISBN 978-1-4398-1590-8.
- [13] MACH, I. *Doplňky stravy*. Praha: Grada Publishing, **2012**. ISBN 978-80-247-4353-0.
- [14] BHUTANI, S. P. *Chemistry of Biomolecules*. 2nd edition. New York: CRC Press, **2020**, 452 s. ISBN 978-0-367-20855-4.
- [15] MAUGHAN, R. J.; KING, D. S.; LEA, T. Dietary supplements. *Journal of Sport Sciences*. **2007**, 22 (1). 95-113 s. ISSN 0264-0414. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/0264041031000140581>.
- [16] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing, **2006**. 286 s. ISBN 978-80-247-1562-9.
- [17] HOLEČEK, M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements [online]. *Nutrition & Metabolism*. **2018**, 15(33). 1-12 s. ISSN 1743-7075. [cit. 5.12. 2020]. Dostupné z: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-018-0271-1>.
- [18] ZHANG, S.; ZENG, X.; REN, M.; MAO, X.; QIAO, S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. **2017**, 8, 10. ISSN: 2049-1891. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40104-016-0139-z>.
- [19] JUHN, M. S. Popular Sports Supplements and Ergogenic Aids. *Sports Medicine*. **2003**, 33. 921-939 s. ISSN 1179-2035. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2165/00007256-200333120-00004>.
- [20] PLATELL, C.; KONG, S.-E.; McCAULEY, R.; HALL, J. C. Branched-chain amino acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **2000**, 15. 706-717 s. ISSN 2692-7942. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1440-1746.2000.02205.x>.

- [21] KERKSICK, C. M.; RASMUSSEN, C. J.; LANCASTER, S. L. et al. The Effects of Protein and Amino Acid Supplementation on Performance and Training Adaptations During Ten Weeks of Resistance Training. *Journal of Strength and Conditioning Research*. **2006**, 20 (3). 643-653 s. ISSN 1533-4287. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Conrad_Earliest/publication/6850668_The_Effects_of_Protein_and_Amino_Acid_Supplementation_on_Performance_and_Training_Adaptations_During_Ten_Weeks_of_Resistance_Training/links/5a4a45f6a6fdcce1971f7d54/The-Effects-of-Protein-and-Amino-Acid-Supplementation-on-Performance-and-Training-Adaptations-During-Ten-Weeks-of-Resistance-Training.pdf.
- [22] WILLIAMS, M. Dietary Supplements and Sport Performance: Amino Acids. *Journal of the Society of Sports Nutrition*. **2005**, 2 (2). 63-67 s. ISSN: 1550-2783. Dostupné z: <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/1550-2783-2-2-63>.
- [23] BLOMSTRAND, E.; SALTIN, B. BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **2001**, 281 (2). 365-374 s. ISSN 1522-1555. Dostupné z: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.2001.281.2.E365>.
- [24] HARGREAVES, M.; SPRIET, L. L. *Exercise Metabolism*. 2nd edition. Champaign, IL: Human Kinetics, **2006**. 301 s. ISBN: 0-7360-4103-4.
- [25] CROWE, M.J.; WEATHERSON, J.N.; BOWDEN, B.F. Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance. *European Journal of Applied Physiology*. **2006**, 97. 664–672 s. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0036-1>.
- [26] PHILLIPS, S. M.; VAN LOON, L. J. C. Dietary protein for athletes: From requirements to optimum adaptation. *Journal of Sport Sciences*. **2011**, 29. 29-38 s. ISSN 1466-447X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02640414.2011.619204>.
- [27] SWEATT, A. J.; WOOD, M.; SURYAWAN, A.; WALLIN, R.; WILLINGHAM, M. C.; HUTSON, S. M. Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *The American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, **2004**, 286(1). 64-76 s. Dostupné z: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpendo.00276.2003>.

- [28] WANG, T.; XIE, H.; CHEN, X.; JIANG, X.; WANG, L. Simultaneous determination of leucine, isoleucine and valine in Beagle dog plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. **2015**, 114. 426-432 s. ISSN 0731-7085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708515300315>.
- [29] BLACKBURN, P. R.; GASS, J. M. et al. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *The Application of Clinical Genetics*. **2017**, 10. 57-66 s. ISSN 1178-704X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593394/#>.
- [30] MOHANTY, D. P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P. S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **2016**, 23 (5). 577-583 s. ISSN 1319-562X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X15001382?via%3Dihub>.
- [31] TIPTON, K. D.; WOLFE, R. R. Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sport Sciences*. **2004**, 22. 65-79 s. ISSN 1466-447X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0264041031000140554?src=recsys>.
- [32] MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th edition. New York: McGraw-Hill Companies, **2003**. 693 s. ISBN 0-07-138901-6.
- [33] DE GRAAF, L. A. Denaturation of proteins from a non-food perspective. *Journal of Biotechnology*. **2000**, 79 (3). 299-306 s. ISSN 0168-1656. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002455>.
- [34] MAUGHAN, R. J. Quality Assurance Issues in the Use of Dietary Supplements, with Special Reference to Protein Supplements. *The Journal of Nutrition*. **2013**, 143 (11). 1843-1847 s. ISSN 1541-6100. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/143/11/1843S/4571739?login=true>.
- [35] Státní ústav pro kontrolu léčiv. [online]. Praha: SÚKL. [cit. 2. 6. 2021]. © 2010. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-lecivych-pripravku?highlightWords=dopl%C5%88ky+stravy>.

- [36] SKOLNIK, H.; CHERNUS, A. *Výživa pro maximální sportovní výkon: správně načasovaný jídelníček*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, **2011**. 240 s. ISBN 978-80-247-3847-5.
- [37] MACH, I.; BORKOVEC, J. *Výživa pro fitness a kulturistiku*. 1. vyd. Praha: Grada, **2013**, 128 s. ISBN 978-80-247-4618-0.
- [38] VOLEK, J. S.; VOLK, B. M.; GÓMEZ, A. L.; KUNCES, L. J.; KUPCHAK, B. R.; et al. Whey Protein Supplementation During Resistance Training Augments Lean Body Mass. *Journal of the American College of Nutrition*. **2013**, 32 (2). 122-135 s. ISSN 1541-1087. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07315724.2013.793580?%20scroll=top&needAccess=true>.
- [39] GHOSH, A.; ALI, M. A.; DIAS, G. J. Effect of Cross-Linking on Microstructure and Physical Performance of Casein Protein. *Biomacromolecules*. **2009**, 10 (7). 1681-1688 s. ISSN 1526-4602. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm801341x>.
- [40] PATEL, K. *Casein*. In: Examine.com [online]. © 2011-2020. Examine.com team, 11.6. 2020 [cit 15. 11. 2020]. Dostupné z: https://examine.com/supplements/casein-protein/research/#source-and-components_source.
- [41] ENDRES, J. G. *Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization*. Champaign, Illinois: AOCS Press, **2001**. 53 s. ISBN 1-893997-27-8.
- [42] GOSTON, J. L.; CORREIA, M. I. T. D. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. *Nutrition*. **2010**, 26 (6). 604-611 s. ISSN 0899-9007. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900709002937?via%3Dihub>.
- [43] LEMON, P. W. R. Beyond the Zone: Protein Needs of Active Individuals. *Journal of the American College of Nutrition*. **2000**, 19 (5). 513-521 s. ISSN 1541-1087. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2000.10718974>.
- [44] LEMON, P. W. R. Effect of exercise on protein requirements. *Journal of Sports Sciences*. **1991**, 9. 53-70 s. ISSN 1466-447X. Dostupné z: <https://shapeamerica.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02640419108729866?needAccess=true>.

- [45] TARNOPOLSKY, M. Protein and amino acid needs for training and bulking up. In: *Clinical Sports Nutrition*, **2006**. 3rd edition. Roseville, Australia: McGraw Hill. 90–123 s. ISBN 978-0074716021.
- [46] LEMON, P. W. R.; PROCTOR, D. N. Protein Intake and Athletic Performance. *Sports Medicine*. **1991**, 12. 313-325 s. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2165/00007256-199112050-00004>.
- [47] LAWRENCE, M. E.; KIRBY, D. F. Nutrition and Sports Supplements: Fact or Fiction. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **2002**, 35 (4). 299-306. ISSN 1539-2031. Dostupné z: https://journals.lww.com/jcge/Abstract/2002/10000/Nutrition_and_Sports_Supplements__Fact_or_Fiction.5.aspx.
- [48] *Antidopingový výbor ČR*. [online]. Praha: Antidopingový výbor ČR. © 2011–2020. [cit. 19.1. 2021]. Dostupné z: https://www.antidoping.cz/documents/doplňky_stravy.pdf.
- [49] VÉGH, V. Doplnky stravy vs. Léčivé přípravky ve sportovní medicíně – praktické a právní aspekty. *Medicina sportiva Bohemica & Slovaca*, **2012**, 21 (3), 120-128 s. ISSN 1210-5481.
- [50] STRANO-ROSSI, S.; ODOARDI, S.; CASTRIGNANÓ, E.; SERPELLONI, G.; CHIAROTTI, M. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*. **2015**, 106 (15). 144-152 s. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514002994>.
- [51] ISSAQ, H. J. *A Century of Separation Science*. New York: CRC Press, **2002**. 776 s. ISBN 978-0-8247-0576-3.
- [52] DEYL, Z. *Separation methods*. New York, NY, USA: Sole distributors for the U. S. A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., **1984**. ISBN 0-444-80527-3.
- [53] DEAN, J. A. *Chemical separation methods*. New York: Van Nostrand Reinhold Co., **1969**. 411 s. ISBN 978-0442020200.

- [54] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd edition. New Jersey: John and Wiley Sons, Inc., **2011**. 960 s. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [55] FANALI, S.; HADDAD, P. R.; POOLE, C. F.; SCHOENMAKERS, P.; LLOYD, D. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Volume 1 [online]. 2nd edition. Amsterdam, Netherland: Elsevier, **2013**. 520 s. [cit. 5. 12. 2020]. ISBN 978-0-12-415807-8. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=1gPAUzhkoqWC&printsec=frontcover&dq=Liquid+Chromatography:+Fundamentals+and+Instrumentation&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwipoInF7MjuAhWllosKHeMWA8Q6AEwAHoECAYQA#v=onepage&q=Liquid%20Chromatography%3A%20Fundamentals%20and%20Instrumentation&f=false>.
- [56] CVAČKA, J. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie: Instrumentace* [přednáška]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 19.10. 2020 In: web.natur.cuni.cz [online]. [cit. 1. 2. 2021] Dostupné z: http://www.mujiweb.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC%20instrumentace_2020-21.pdf.
- [57] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 3rd edition. Ostrava: Pavel Klouda-nakladatelství Pavko, **2016**. 131 s. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [58] KIZEK, R. et al. *Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek* [pdf]. Mendelova univerzita v Brně, 10. 7. 2013. In: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ [online]. [cit. 1.2. 2021] Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20ruznymi%20typy%20detekce%20pro%20analyzu%20biologicky%20vyznamnych%20latek.pdf.
- [59] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, **2013**. 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [60] FISCHER, J.; ČESLA, P. *Kapalinová chromatografie – Interaktivní návod* [pdf]. Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice. In: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT> [online]. [cit. 9. 2. 2021]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapalinova-chromatografie.pdf>.

- [61] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury, **1981**. ISBN 541 183 (075 8).
- [62] DAI, Z.; WU, Z.; JIA, S.; WU, G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. **2014**, 964. 116-127 s. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214002153>.
- [63] DOUŠA, M. *Monolitické kolony*. In: <http://www.hplc.cz> [online]. © 1999-2004 [cit. 16.4. 2021]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic_columns.htm.
- [64] CYNOBER, L. A. *Metabolic & Therapeutic aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition*. 2nd edition. CRC Press, **2003**. 776 s. ISBN 978-0-203-01026-6.
- [65] BÜTIKOFER, U.; FUCHS, D.; BOSSET, J. O.; GMÜR, W. Automated HPLC-Amino Acid Determination of Protein Hydrolysates by Precolumn Derivatization with OPA and FMOc and Comparison with Classical Ion Exchange Chromatography. *Chromatographia*. **1991**, 31. 441-447 s. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02262386>.
- [66] RAIMBAULT, A.; NOIREAU, A.; WEST, C. Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry—application to food supplements. *Journal of Chromatography A*. **2020**, 1616. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967319312208>.
- [67] YOU, J.; FAN, X.; ZHU, Q.; SU, Y. Liquid chromatographic determination of amino acids and peptides by pre-column fluorescence derivatization with N-hydroxysuccinimidyl- α -(9-acridine)-acetate. *Analytica Chimica Acta*. **1998**, 367 (1-3). 69-79 s. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267098001810>.
- [68] PETRITIS, K.; DE PERSON, M.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Validation of an Ion-Interaction Chromatography Analysis of Underivatized Amino Acids in Commercial Preparation Using Evaporative Light Scattering Detection. *Chromatographia*. **2004**, 60. 293-298 s. ISSN 1612-1112. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-004-0347-0>.

- [69] FÜRST, P.; POLLACK, L.; GRASER, T. A.; GODEL, H.; STEHLE, P. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *Journal of Chromatography A*. **1990**, 499. 557-569 s. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300970006>.
- [70] CARRATÚ, B.; BONIGLIA, C.; GIAMMARIOLI, S.; MOSCA, M.; SANZINI, E. Free Amino Acids in Botanicals and Botanical Preparations. *Journal of Food Science*. **2008**, 73. 323-328 s. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18576976/>.
- [71] FISCHER, Jan. *Aminokyseliny* [pdf]. [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická UPCE, 14.12. 2020.
- [72] CALLEJÓN, R. M.; TRONCOSO, A. M.; MORALES, M. L. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta*. **2010**, 81. 1143-1152 s. ISSN 0039-9140. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010001372>.
- [73] DIMOVA, N. RP-HPLC analysis of amino acids with UV-detection. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. **2003**, 56 (12). 75-78 s. ISSN 1310–1331. Dostupné z: <http://adsabs.harvard.edu/pdf/2003crabs..56l..75d>.
- [74] KASPAR, H.; DETTMER, K.; GRONWALD, W.; OEFNER, P. J. Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, 393. 445-452 s. ISSN Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-008-2421-1>.
- [75] DOUŠA, M. *Aminokyseliny*. In: News from HPLC analysis [online]. © 1999-2004. [cit. 22. 1. 2021]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/Amk/amk.htm>.
- [76] BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1984**, 336 (1). 93-104 s. ISSN 0378-4347. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700851336?via%3Dihub>.
- [77] SCHULZOVÁ, V. *Využití HPLC v analýze potravin* [prezentace]. Praha: Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, 26.3. 2019. In: <https://web.vscht.cz> [online]. [cit. 3. 2. 2021]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/>.

- [78] FEKKES, D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1996**, 682. 3-22 s. ISSN 0378-4347. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378434796000576>.
- [79] SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1988**, 431. 271-284 s. ISSN 0378-4347. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700830960>.
- [80] JOSEPH, M. H.; DAVIES, P. Electrochemical activity of o-phthalaldehyde—mercaptoethanol derivatives of amino acids: Application to high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1983**, 277. 125-136 s. ISSN 0378-4347. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843470084829X>.
- [81] ZHAO, X.; SUO, Y. LC Determination of Amino Acids in Rat Plasma with Fluorescence Detection: Application to Exercise Physiology. *Chromatographia*. **2008**, 67. 375-382 s. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-008-0522-9>.
- [82] HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. **1984**, 136 (1). 65-74 s. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269784903075?via%3Dihub>.
- [83] KWANYUEN, P.; BURTON, J. W. A Modified Amino Acid Analysis Using PITC Derivatization for Soybeans with Accurate Determination of Cysteine and Half-Cystine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2010**, 87 (2). 127-132 s. ISSN 1558-9331. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-009-1484-2>.
- [84] SHANG, S. F.; WANG, H. Sensitive Determination of Amino Acids in Kelp by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Precolumn

- Derivatization Using Phenylisothiocyanate. *Chromatographia*. **1996**, 43. 309-312 s. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02271001>.
- [85] JANSSEN, P. S. L.; NISPEN, J. W.; MELGERS, P. A. T. A.; VAN DEN BOGAART, H. W. M.; HAMELINCK, R. L. A. E.; GOVERDE, B. C. HPLC Analysis of Phenylthiocarbamyl (PTC) Amino Acids. I. Evaluation and Optimization of the Procedure. *Chromatographia*. **1986**, 22. 7-12 s. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02268788>.
- [86] FUKUSHIMA, T.; USUI, N.; SANTA, T.; IMAI, K. Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2003**, 30 (6). 1655-1687 s. ISSN 0731-7085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502005113?via%3Dihub>.
- [87] HAYNES, P. A.; SHEUMACK, D.; KIBBY, J.; REDMOND, J. W. Amino acid analysis using derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1991**, 540. 177-185 s. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301888075?via%3Dihub>.
- [88] SONG, Y.; XU, Ch.; KUROKI, H.; LIAO, Y.; TSUNODA, M. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, 174 (5). 35-49 s. ISSN 0731-7085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708517314796>.
- [89] FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 826 (2). 109-134 s. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398007213>.
- [90] MEESTERS, R. J. W. Bioanalytical LC separation techniques for quantitative analysis of free amino acids in human plasma. *Bioanalysis*. **2013**, 5 (4). 495-512 s. ISSN 1757-6180.
- [91] MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*. **1958**, 30 (7). 1185-1190 s. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60139a005>.

- [92] GIOIA, M. G.; ANDREATTA, P.; BOSCHETTI, S.; GATTI, R. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2007**, 45 (3). 456-464 s. ISSN 0731-7085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708507004086>.
- [93] MAYADUNNE, R.; NGUYEN, T.-T.; MARRIOTT, P. J. Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2005**, 382. 836-847 s. ISSN 1618-2650. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-005-3083-x>.
- [94] VANCOMPERNOLLE, B.; CROES, K.; ANGENOM, G. Optimization of a gas chromatography–mass spectrometry method with methyl chloroformate derivatization for quantification of amino acids in plant tissue. *Journal of Chromatography B*. **2016**, 1017-1018. 241-249 s. ISSN 1570-0232. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002321630099X>.
- [95] KHUHAWAR, M. Y.; MAJIDANO, A. GC Analysis of Amino Acids Using Trifluoroacetylacetone and Ethyl Chloroformate as Derivatizing Reagents in Skin Samples of Psoriatic and Arsenicosis Patients. *Chromatographia*. **2011**, 73. 701-708 s. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-011-1957-y>.
- [96] FORTESCHI, M.; SOTGIA, S.; ASSARETTI, S. et al. Simultaneous determination of aromatic amino acids in human blood plasma by capillary electrophoresis with UV-absorption detection. *Journal of Separation Science*. **2015**, 38. 1794-1799 s. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25736071/>.
- [97] SIMPSON, R. J.; NEUBERGER, M. R.; LIU, T. Y. Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *Journal of Biological Chemistry*. **1976**, 251 (7). 1936-1940 s. ISSN: 0021-9258. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817336372>.
- [98] INGLIS, A. S. Single hydrolysis method for all amino acids, including cysteine and tryptophan. *Methods in Enzymology*. **1983**, 91. 26-36 s. ISSN 0076-6879. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687983910078>.

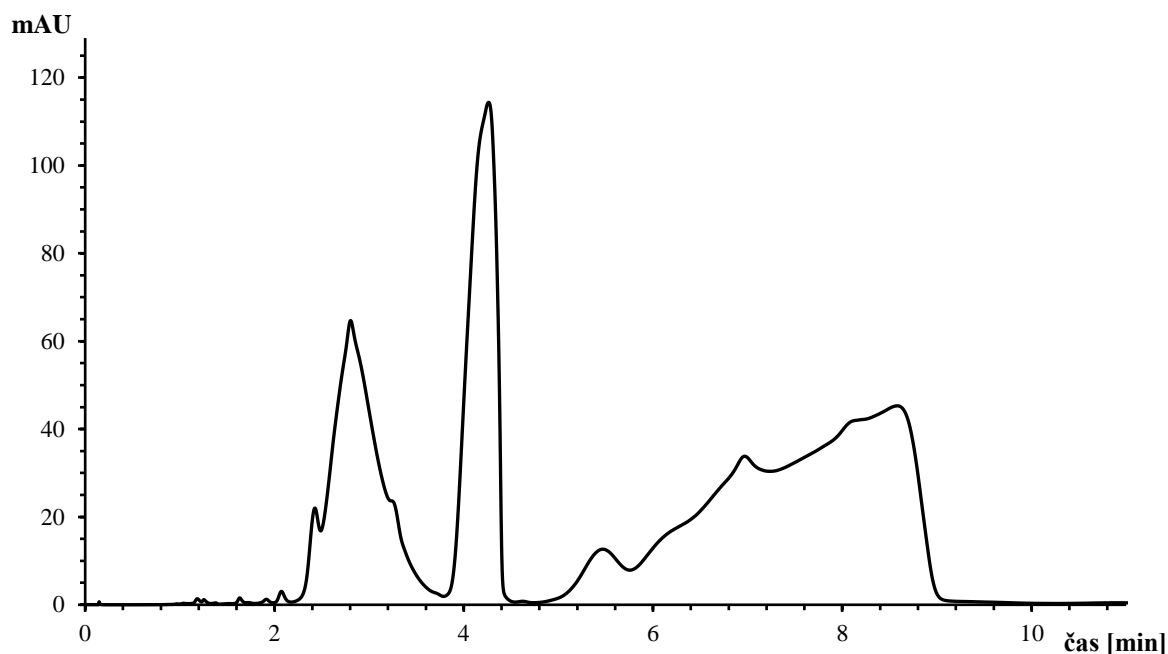
- [99] SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Analytical Chemistry*. **1958**, 30 (7). 1190-1206 s. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60139a006>.
- [100] CHIOU, S.-H.; WANG, K.-T. Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. **1988**, 448. 404-410 s. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301846033>.
- [101] FISCHER, L. B. Microwave dissolution of geologic material: application to isotope dilution analysis. *Analytical Chemistry*. **1986**, 58. 261-263 s. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00292a066>.
- [102] WEISS, M.; MANNBERG, M.; JURANVILLE, J.-F.; LAHM, H.-W.; FOUNTOULAKIS, M. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 795 (2). 263-275 s. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967397009837?via%3Dihub>.
- [103] MANNEBERG, M.; LAHM, H.-W.; FOUNTOULAKIS, M. Quantification of Cysteine Residues Following Oxidation to Cystic Acid in the Presence of Sodium Azide. *Analytical Biochemistry*. **1995**, 231 (2). 349-353 s. ISSN 0003-2697.
- [104] HAYASHI, R.; SUZUKI, F. Determination of methionine sulfoxide in protein and food by hydrolysis with p-toluenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*. **1985**, 149 (2). 521-528 s. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785906086>.
- [105] GARCIA, S. E.; BAXTER, J. H. Determination Of Tryptophan Content In Infant Formulas And Medical Nutritionals. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. [online]. **1992**, 75 (6). 1112-1119 s. [cit. 4.2. 2021]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/75/6/1112/5686602>.
- [106] D'ANIELLO, A.; PETRUCCELLI, L.; GARDNER, C.; FISHER, G. Improved Method for Hydrolyzing Proteins and Peptides Without Inducing Racemization and for Determining Their True D-Amino Acid Content. *Analytical Biochemistry*. **1993**, 213 (2). 290-295 s. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269783714235?via%3Dihub>.

- [107] STEIN, S.; UDENFRIEND, S. A picomole protein and peptide chemistry: Some applications to the opioid peptides. *Analytical Biochemistry*. **1984**, 136. 7-23 s. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269784903026?via%3Dihub>.
- [108] UDENFRIEND, S.; STEIN, S.; BÖHLEN, P.; et. al. Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science*. **1972**, 178 (4063). 871-872 s. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <https://science.sciencemag.org/content/178/4063/871>.
- [109] GHESHLAGHI, R.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; DOUGLAS, P. L. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. *Analytical Biochemistry*. **2008**, 383 (1). 93-102 s. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326970800506X>.
- [110] FIERABRACCI, V.; MASIELLO, P.; NOVELLI, M.; CYNOBER, L. Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1991**, 570 (2). 285-291 s. ISSN 0378-4347. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843479180531G>.
- [111] SARWAR, G.; BOTTING, H. G. Rapid Analysis of Nutritionally Important Free Amino Acids in Serum and Organs (Liver, Brain, and Heart) by Liquid Chromatography of Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatives. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. **1990**, 73 (3). 470-475 s. ISSN 0004-5756. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/73/3/470/5691836?redirectedFrom=fulltext>.
- [112] KIM, H. J.; LEE, J. H.; PARK, H. J.; CHO, S.-H.; KIM, W. S. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2014**, 31 (5). 777-783 s. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2014.888497?scroll=top&needAccess=true>.

- [113] KLIKAROVÁ, J.; ČESLOVÁ L.; FISCHER, J. Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in Czech meads. *Journal of Chromatography A*. 2021, 1644. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967321002582>.
- [114] KLIKAROVÁ, J. *Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek* [online]. Pardubice, 2020 [cit. 7. 6. 2021]. Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická. Ing. Lenka Česlová, Ph.D. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/76789/Disertacni_prace_Klikarova_Jitka.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- [115] TESAŘOVÁ, E. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie* [pdf]. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze. In: <https://www.natur.cuni.cz/fakulta> [online]. [cit. 10. 6. 2021]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>.
- [116] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Journal of AOAC International*. 2016. 1-16 s. ISSN 1060-3271.

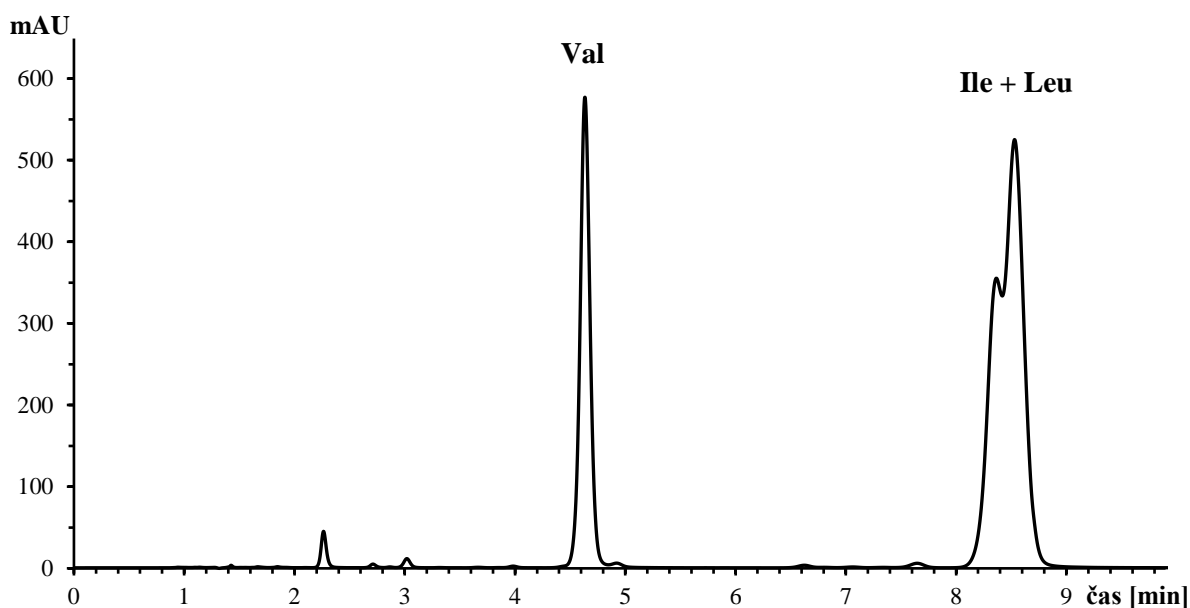
7 PŘÍLOHY

OBRÁZKY



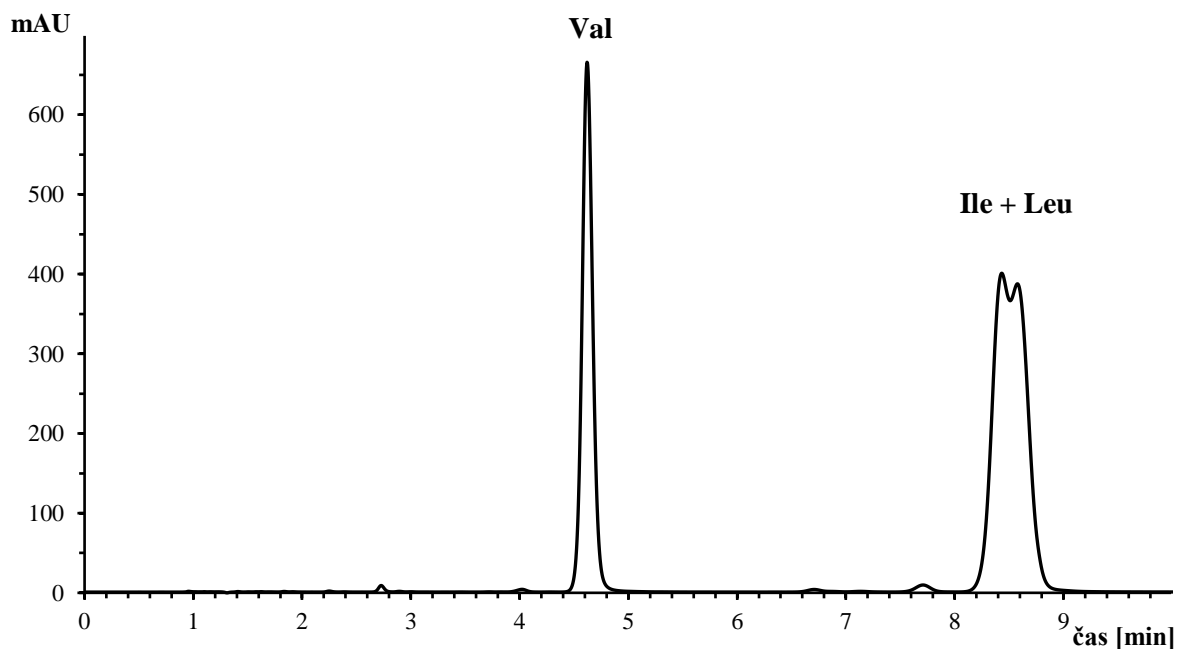
Obrázek P1: Chromatografická separace standardů BCAA za použití okyselené redestilované vody jako mobilní fáze bez přídavku soli.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); MF-A: redestilovaná voda o pH 4,55; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce: 30 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



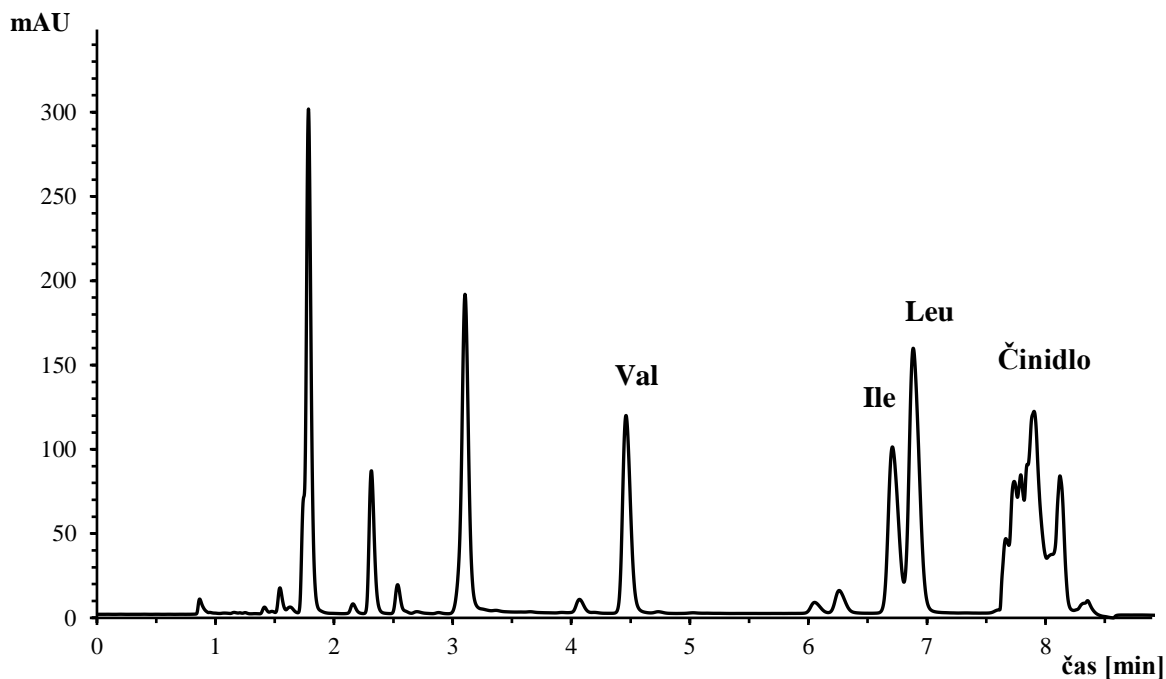
Obrázek P2: Chromatografická separace vzorku BCAA za podmínek izokratické eluce a při použití mobilní fáze octanu amonného o koncentraci 70 mM.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce: 30 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



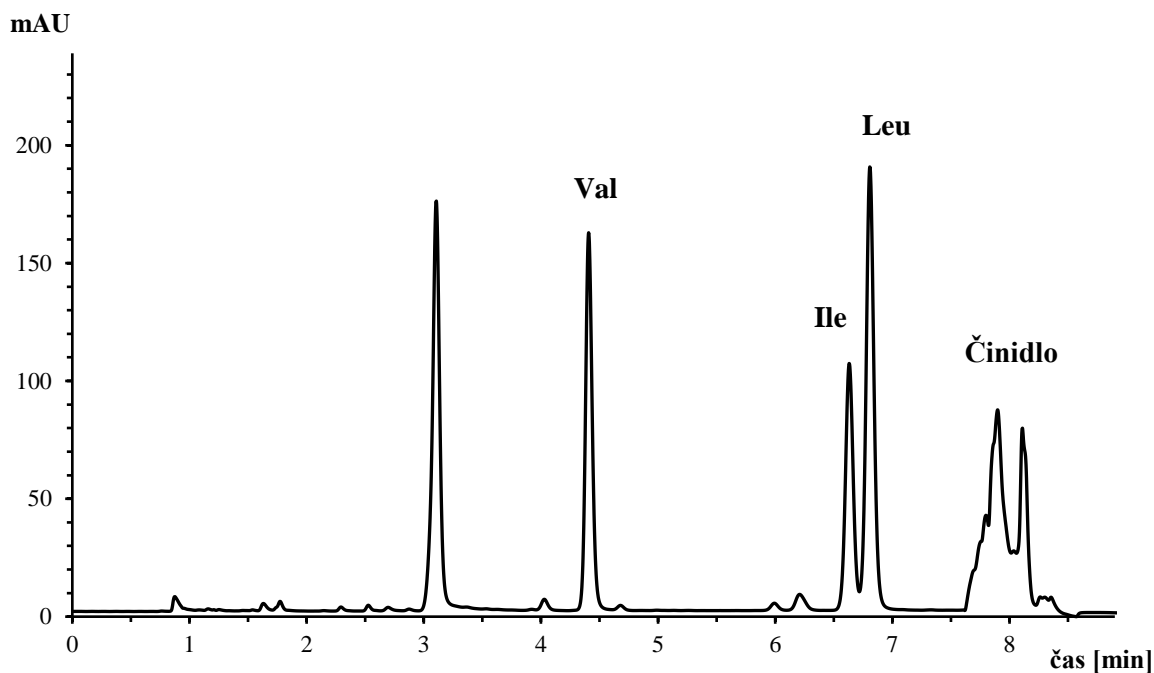
Obrázek P3: Chromatografická separace standardů BCAA za podmínek izokratické eluce a při použití mobilní fáze octanu amonného o koncentraci 0,1 M.

Kolona: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); MF-A: 0,1 M octan amonný o pH 4,55; MF-B: 60% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; izokratická eluce: 30 % B, derivatizace: 150 μ l AK + 10 μ l směsi metanol, 1 M octan sodný, TEA (2:2:1) + 25 μ l směsi metanol, voda, TEA, PITC (7:1:1:1).



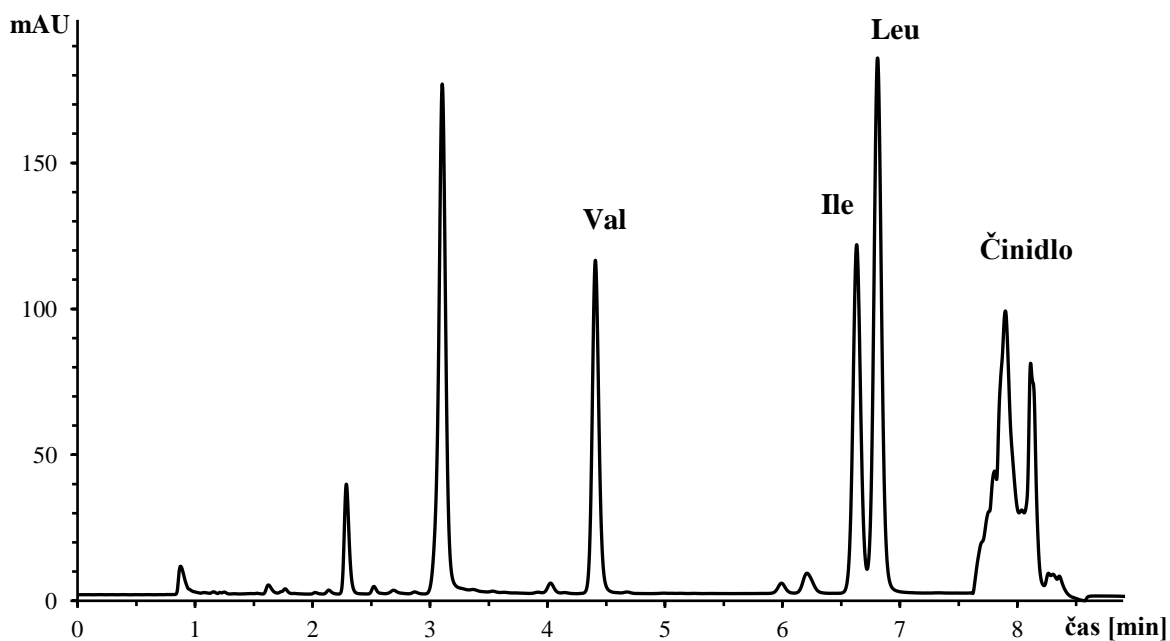
Obrázek P4: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 1.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



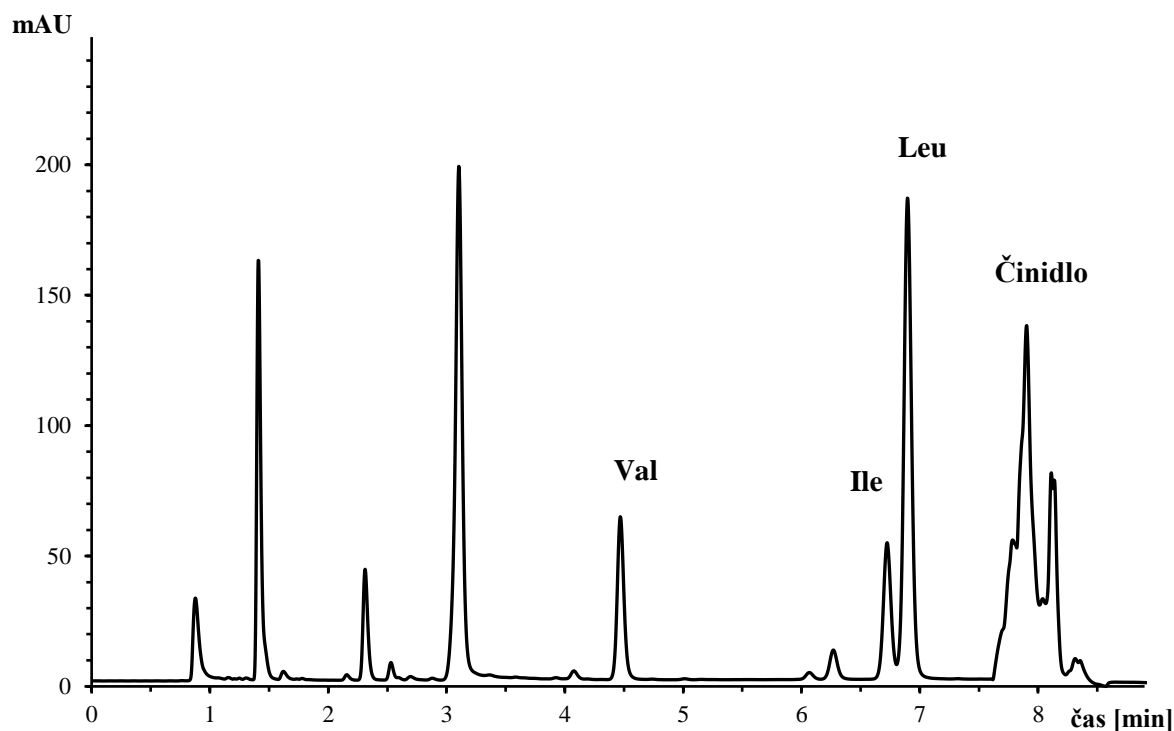
Obrázek P5: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 2.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



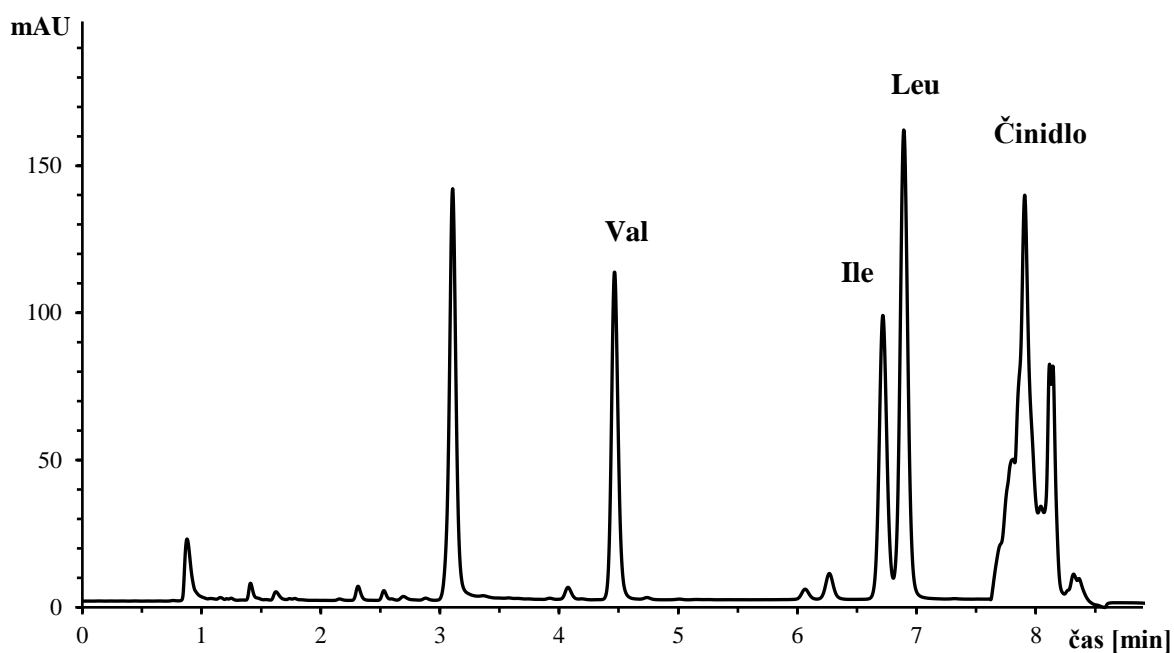
Obrázek P6: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 3.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



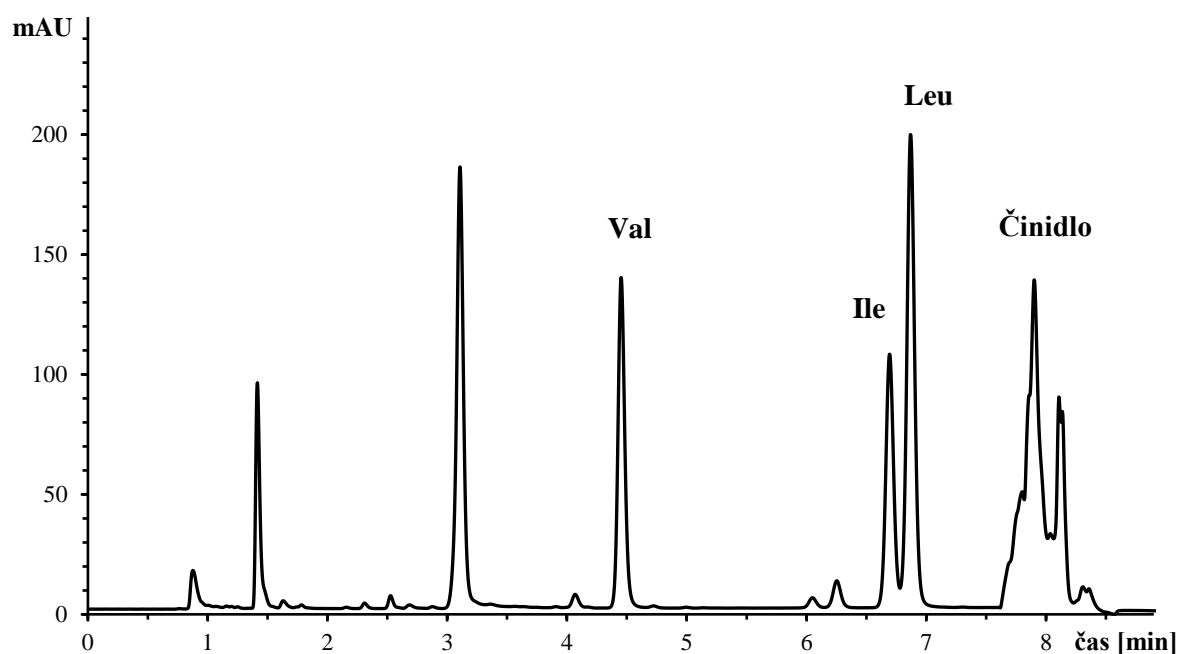
Obrázek P7: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 4.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



Obrázek P8: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 5.

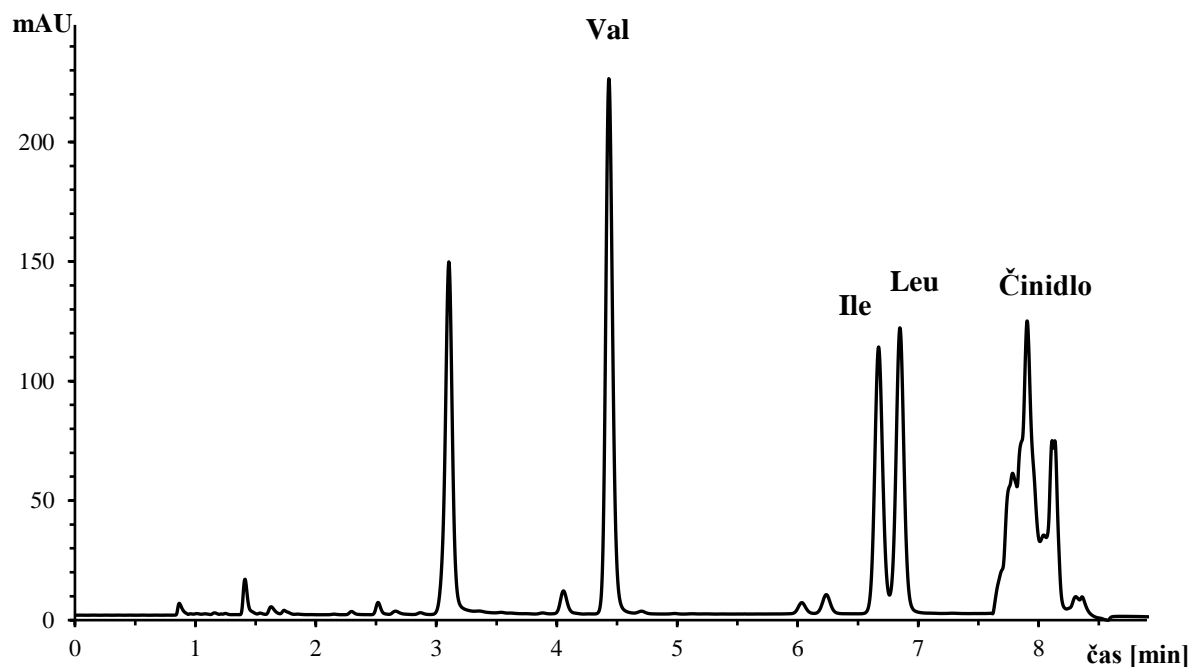
Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μl vzorku + 30 μl destilované vody + 50 μl 1 M octanu sodného + 50 μl TEA + 50 μl PITC.



Obrázek P9: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 6.

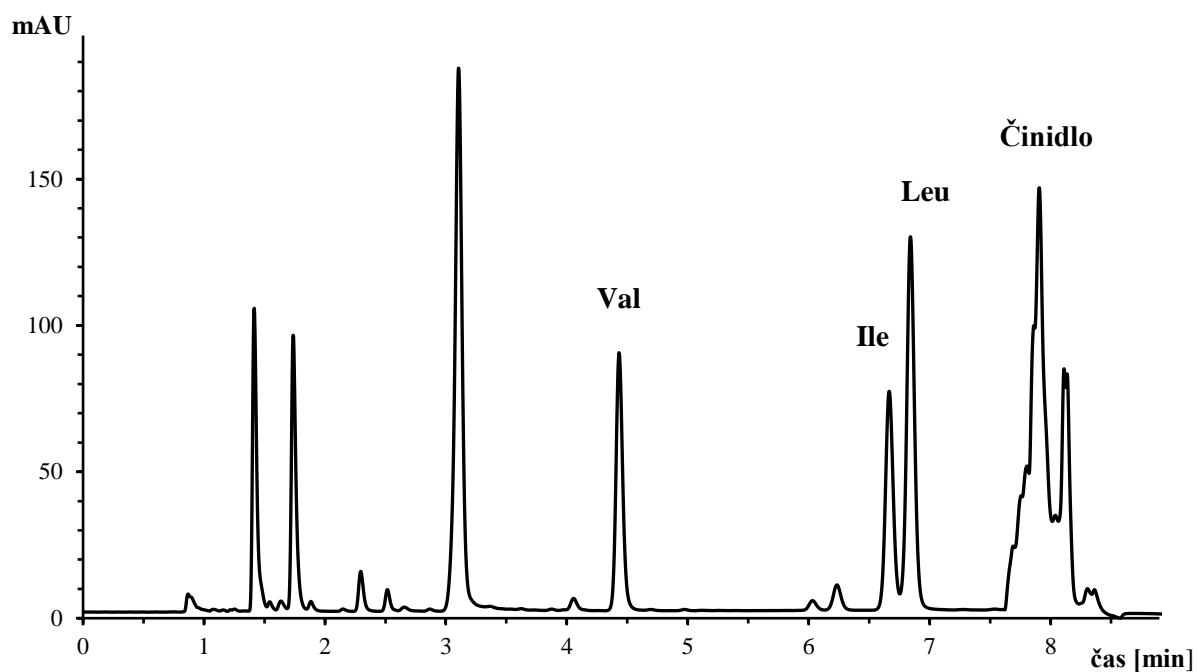
Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; gradientové

eluze: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



Obrázek P10: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 8.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μ m); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μ l; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μ l vzorku + 30 μ l destilované vody + 50 μ l 1 M octanu sodného + 50 μ l TEA + 50 μ l PITC.



Obrázek P11: Chromatografický záznam stanovení aminokyselin BCAA ve vzorku č. 10.

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7 μm); MF-A: 70 mM octan amonný o pH 4,55; MF-B: 100% ACN; průtok MF: 0,6 ml/min; teplota: 40 °C; detekce: 254 nm, dávkování: 2 μl; gradientové eluce: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B, 8 min – 15 % B, derivatizace: 300 μl vzorku + 30 μl destilované vody + 50 μl 1 M octanu sodného + 50 μl TEA + 50 μl PITC.

TABULKY

Tabulka P1: Kvantitativní stanovení valinu v potravinových vzorcích.

Vzorek	Stanovená koncentrace [mg/l]	Přepočet na mg/g ± interval spolehlivosti	Deklarované množství [mg/g]	Splnění deklarovaného množství [%]
1	111,16	222,33 ± 4,8	175	127,05
2	133,31	266,62 ± 2,33	192,3	138,65
3	102,73	205,46 ± 1,55	210	97,84
4	53,57	107,14 ± 2,07	100	107,14
5	100,74	201,49 ± 6,42	192,3	104,78
6	115,00	230,00 ± 2,11	166	138,55
7	117,99	235,99 ± 1,72	175	134,85
8	185,91	372,31 ± 1,48	490	75,98
9	68,19	136,37 ± 2,21	165	82,65
10	76,47	152,94 ± 4,52	125	122,35

Tabulka P2: Kvantitativní stanovení isoleucinu v potravinových vzorcích.

Vzorek	Stanovená koncentrace [mg/l]	Přepočet na mg/g ± interval spolehlivosti	Deklarované množství [mg/g]	Splnění deklarovaného množství [%]
1	115,58	231,16 ± 4,96	175	132,09
2	105,62	211,25 ± 2,78	192,3	109,85
3	124,27	248,54 ± 3,88	210	118,35
4	49,92	99,84 ± 1,58	100	99,84
5	98,01	196,02 ± 6,21	192,3	101,94
6	107,33	214,66 ± 3,98	166	129,32
7	98,45	196,91 ± 1,27	175	112,52
8	106,96	213,92 ± 3,04	245	87,31
9	66,21	132,42 ± 0,28	165	80,26
10	76,05	152,09 ± 1,48	125	121,67

Tabulka P3: Kvantitativní stanovení leucinu v potravinových vzorcích.

Vzorek	Stanovená koncentrace [mg/l]	Přepočít na mg/g ± interval spolehlivosti	Deklarované množství [mg/g]	Splnění deklarovaného množství [%]
1	211,427	422,85 ± 7,95	350	120,82
2	207,849	415,70 ± 7,65	384,6	108,09
3	217,375	434,75 ± 4,68	420	103,51
4	187,584	375,17 ± 1,58	400	93,79
5	172,630	345,26 ± 6,09	384,6	89,77
6	202,901	405,80 ± 10,31	333	121,86
7	171,563	343,13 ± 1,41	350	98,04
8	122,719	245,44 ± 1,84	245	100,18
9	135,388	270,78 ± 2,35	330	82,05
10	139,904	279,81 ± 5,69	250	111,92

Tabulka P4: Experimentálně zjištěná koncentrace, návratnost a relativní směrodatná odchylka derivátů valinu proměřených v jeden den za stejných podmínek.

VALIN	Stanovená koncentrace [g/l]	Návratnost [%]	RSD [%]
Kalibrační roztok 0,02 g/l	0,0220	110,05	4,23
	0,0203	101,64	
	0,0232	116,07	
	0,0230	115,13	
	0,0222	110,97	
	0,0223	111,74	
Průměr	0,0222	110,93	
Kalibrační roztok 0,3 g/l	0,3436	114,54	2,99
	0,3384	112,81	
	0,3266	108,85	
	0,3242	108,06	
	0,3161	105,36	
	0,3198	106,60	
Průměr	0,3281	109,37	

RSD = relativní směrodatná odchylka

Tabulka P5: Experimentálně zjištěná koncentrace, návratnost a relativní směrodatná odchylka derivátů isoleucinu proměřených v jeden den za stejných podmínek.

ISOLEUCIN	Stanovená koncentrace [g/l]	Návratnost [%]	RSD [%]
Kalibrační roztok 0,02 g/l	0,0225	112,63	4,29
	0,0204	102,14	
	0,0230	114,89	
	0,0235	117,57	
	0,0227	113,32	
	0,0225	112,57	
Průměr	0,0224	112,57	
Kalibrační roztok 0,3 g/l	0,3307	110,24	2,93
	0,3448	114,94	
	0,3271	109,02	
	0,3259	108,64	
	0,3253	108,43	
	0,3122	104,06	
Průměr	0,3277	109,22	

Tabulka P6: Experimentálně zjištěná koncentrace, návratnost a relativní směrodatná odchylka derivátů leucinu proměřených v jeden den za stejných podmínek.

LEUCIN	Stanovená koncentrace [g/l]	Návratnost [%]	RSD [%]
Kalibrační roztok 0,02 g/l	0,0244	122,09	4,24
	0,0243	121,68	
	0,0242	121,01	
	0,0221	110,67	
	0,0224	112,20	
	0,0226	112,49	
Průměr	0,0233	116,69	
Kalibrační roztok 0,3 g/l	0,3382	112,73	3,07
	0,3447	114,91	
	0,3236	107,88	
	0,3277	109,25	
	0,3283	109,42	
	0,3132	104,40	
Průměr	0,3293	109,76	

Tabulka P7: Výsledky měření vzorku po trojnásobné derivatizaci v jeden den za identických podmínek.

Aminokyselina	Valin	Isoleucin	Leucin
Obsah [mg/g]	184,75	175,60	328,18
	183,89	180,76	328,38
	184,29	162,93	319,73
	170,59	174,47	284,51
	166,01	158,93	295,07
	170,78	162,34	304,57
	176,52	168,58	314,56
	179,65	171,47	316,53
	180,96	171,69	299,21
Průměr	177,49	169,64	310,08
RSD [%]	3,67	3,95	4,62

Tabulka P8: Množství aminokyselin, průměr a jejich RSD získané opakovaným měřením pěti derivátů vzorku v jiný den za stejných podmínek.

Aminokyselina	Valin	Isoleucin	Leucin
Obsah [mg/g]	153,29	140,79	267,20
	155,55	149,54	314,17
	157,76	149,27	313,37
	144,57	135,13	288,26
	146,24	135,55	297,96
	145,52	135,29	265,33
	142,72	136,82	288,51
	146,40	142,57	303,85
	145,28	140,61	301,76
	168,71	164,84	329,53
	168,91	161,49	338,15
	163,61	162,49	340,22
	145,62	135,43	305,09
	144,10	137,66	301,35
	141,79	138,89	271,99
Průměr	151,34	144,42	301,78
RSD [%]	6,01	7,1	7,49