

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

**STANOVENÍ AMINOKYSELIN  
V POTRAVINOVÝCH DOPLŇCÍCH  
METODOU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY  
S DUÁLNÍ DETEKČÍ**

**Diplomová práce**

Magisterské studium: analytická chemie

Praha 2007

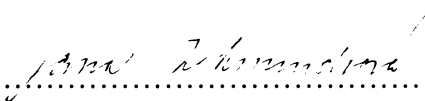
Jana Zikmundová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Františka Opekara, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. 4. 20007.

  
.....  
podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Františkovi Opekarovi, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky k mé práci a všestrannou pomoc. Současně bych ráda poděkovala RNDr. Petrovi Tůmovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace, dále děkuji své rodině a přátelům za podporu a pochopení během mého studia.

Poděkování za finanční podporu diplomního projektu též patří MŠMT ČR, výzkumný projekt MSM 0021620857.

# Obsah

	<b>Seznam použitých zkratk</b>	6
	<b>Seznam použitých symbolů</b>	7
	<b>Předmluva a cíl práce</b>	8
<b>1</b>	<b>Úvod</b>	10
1.1	Význam aminokyselin pro lidský organismus	10
1.2	Metody stanovení aminokyselin	11
1.2.1	Kapilární elektroforéza	12
1.2.1.1	Detekce aminokyselin v CE	12
1.3	Hydrolýza	20
1.3.1	Chemická hydrolýza	20
1.3.2	Enzymatická hydrolýza	22
<b>2</b>	<b>Experimentální část</b>	23
2.1	Elektroforetická aparatura	23
2.1.1	Duální detektor	24
2.2	Experimentální podmínky	26
2.3	Další používané přístroje a pomůcky	28
2.4	Zdroje a čistota používaných chemikálií	28
2.5	Úprava vzorku před analýzou	29
2.5.1	Vzorky minerálních vod	29
2.5.2	Mineralizace aminokyselinového potravinového doplňku	30
2.6	Způsob vyhodnocování experimentálních výsledků	31
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	33
3.1	Ověření funkce jednotlivých částí detektoru na modelové směsi	33
3.2	Stanovení vybraných kationtů v minerálních vodách	33
3.2.1	Detekce vybraných kationtů v modelových vzorcích	33

3.2.2	Analýza jednotlivých minerálních vod	36
3.3	Analýza aminokyselinového potravinového doplňku AminoMAX	39
3.3.1	Optimalizace detekce a separace s použitím modelových vzorků	39
3.3.2	Analýza vzorku AminoMAX – orientační měření	42
3.3.3	Stanovení aminokyselin v nerozdělené směsi	46
3.3.4	Stanovení vybraných složek potravinového doplňku AminoMAX	48
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>54</b>
	<b>Literatura</b>	<b>55</b>

## Seznam použitých zkratek

Ala	alanin
AMK	aminokyselina
AMP	2-amino-2-methyl-1-propanol
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
CAPS	3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová kyselina
CATB	cetyltrimethylamonium bromid
CCD	bezkontaktně vodivostní detektor
CE	kapilární elektroforéza
CL	chemiluminiscenční detekce
Cys	cystein
CZE	kapilární zónová elektroforéza
Dns	5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonyl chlorid
DTAF	5-(4,6-dichloro-s-triazin-2-yl-amino) fluorescein
ECD	elektrochemická detekce
FID	plamenově ionizační detektor
FITC	fluorescein isothiokyanát
GC	plynová chromatografie
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
HEC	hydroxyethylcelulóza
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
Ile	isoleucin
ITP	kapilární izotachoforéza
Leu	leucin
LIF	laserem indukovaná fluorescence
Lys	lysin
Met	methionin

MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní detektor
MSA	methansulfonová kyselina
NBD-F	7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazol
NDA	naftalen-2,3-dialdehyd
OPA	<i>o</i> -fthaldialdehyd
Phe	fenylalanin
PITC	fenylisothiokyanát
Pro	prolin
PTH	fenylthiohydantoin
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
Ser	serin
SDS	dodecylsírán sodný
SP	separační pufr
Thr	threonin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

## Seznam použitých symbolů

$H$	výška teoretického patra
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
$n$	počet teoretických pater kolony
$R$	rozpětí
$s$	směrodatná odchylka
$t_R$	retenční čas látky
$u$	hodnota Lordova testu
$\tilde{x}$	medián
$Y_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky

# Předmluva a cíl práce

Kapilární elektroforéza je v současnosti často používanou analytickou metodou. Od svého vzniku prošla rozsáhlými změnami, které umožňují rozšířit aplikační možnosti této separační metody na nové skupiny látek, které donedávna patřily zejména pod patronát kapalinové chromatografie. Předmětem analýzy kapilární elektroforézou se tak postupně staly malé anorganické látky, peptidy, proteiny, aminokyseliny, léčiva, pesticidy, nukleové kyseliny a mnoho dalších. V současné době tedy kapilární elektroforéza našla uplatnění v oblastech jako je kontrola kvality a čistoty léčiv a potravinových doplňků, sledování znečištění životního prostředí, v medicíně pro stanovování látek v lidském organismu, biologii, genetice a molekulární biologii pro studium struktury a složení nukleových kyselin a proteinů, nezastupitelnou úlohu sehrává při výzkumu lidského genomu.

Při analýzách multikomponentních vzorků obsahujících jak malé anorganické ionty, tak i ionty organických látek metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) vzniká problém, jak současně detekovat oba typy iontů. Valná většina komerčních elektroforetických sestav je vybavena spektrofotometrickým dektorem. UV detekce je vhodná pouze pro některé organické látky mající v molekule chromofory a není vhodná pro malé anorganické ionty. Pro látky, které jsou pro UV záření transparentní, lze použít nepřímé techniky nebo derivatizaci analytů zavádějící do molekuly analytu chromofor, což prodlužuje dobu analýzy a komplikuje separační proces. Mezi další detekční metody používané v CZE patří fluorescence, hlavně laserem indukovaná fluorescence, vhodná pro látky mající ve své molekule fluorofor, elektrochemická detekce, jež vyžaduje, aby daná látka byla elektrochemicky aktivní. Jako univerzální se jeví bezkontaktně vodivostní detektor, jež je vhodný jak pro organické, tak i anorganické ionty. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že jeden typ detektoru často neumožní detekovat všechny složky multikomponentního vzorku. Problém lze do určité míry vyřešit kombinací dvou detektorů založených na různých principech.

V literatuře bylo publikováno několik typů kombinovaných detektorů využívaných v CZE. Například ampérometrický detektor byl kombinován s fluorescenčním, spektrofotometrickým či bezkontaktním vodivostním dektorem.



Nepřímá UV detekce byla použita v kombinaci s přímou vodivostní či hmotnostní detekcí, detektor s diodovým polem byl kombinovaný s hmotnostním detektorem. Jejich nevýhodou je zapojení jednotlivých detektorů v sérii, takže záznamy z obou detektorů jsou časově posunuty a zachycují zóny separovaných látek v jiném stádiu separace <sup>1</sup>.

Detektor, který umožňuje spektrofotometrickou a bezkontaktně vodivostní detekci v jednom místě separační kapiláry byl publikován v práci <sup>2</sup>, v pracích <sup>1,3</sup> bylo publikováno jeho zlepšené konstrukční upořádání. Detailnější popis detektoru je uveden v kap.2.1.1. Výhodou tohoto duálního detektoru je, že umožňuje současnou detekci anorganických i organických látek a také usnadňuje identifikaci látek v multikomponentním vzorku podle toho, jaká část detektoru poskytuje odezvu na danou látku. Tento detektor byl doposud testován především na uměle připravených směsích.

**Hlavním cílem této práce je ověřit použitelnost duálního detektoru s bezkontaktně vodivostní a spektrofotometrickou detekcí při analýze reálného vzorku a ukázat výhodnost duální detekce. Pro tento účel byl vybrán potravinový doplněk pro sportovce AminoMAX (Max Muscle, USA), který obsahuje jak anorganické ionty, které poskytují signál při vodivostní detekci, tak i organické látky – aminokyseliny. Aminokyseliny jsou při nízkém pH ve formě kationů, a tak poskytují signál při vodivostní detekci, některé aminokyseliny také absorbují v UV/VIS oblasti, a proto duální detekce usnadňuje identifikaci píků látek v elektroferogramu.**

**Před řešením hlavního cíle práce byla laboratorně sestavená aparatura pro provádění kapilární elektroforézy testována analýzou jednoduších vzorků, jímž byly běžné minerální vody. Při těchto analýzách byla využívána pouze vodivostní část detektoru.**

# 1 Úvod

## 1.1 Význam aminokyselin pro lidský organismus

Aminokyseliny jsou stavebními kameny bílkovin. Jsou nezbytné při tvorbě a udržování výkonnosti svalů, šlach, kůže, vaziva, žláz, nehtů a vlasů. Účastní se tvorby hormonů, látek přenášejících nervový vzruch a různých enzymů. Aminokyseliny jsou tedy nutné pro správné fungování nervového, hormonálního a imunitního systému i pro výstavbu a regeneraci organismu. Zvýšená potřeba aminokyselin je zejména při těžších a dlouhodobých onemocněních, dlouhodobém stresu, rekonvalescenci a dlouhotrvající fyzické zátěži. Mnohé se proto doporučují k vnitřnímu užívání ve formě potravinových doplňků, jež jsou zejména používané sportovci k: ochraně bílkovin svalů před jejich rozkladem, snížení rizika poškození svalové hmoty, urychlení doby regenerace, zvýšení absolutní síly, podpoře tvorby svalové hmoty a jako zdroj energie. Jedná se většinou o částečné hydrolyzáty bílkovin obsahující řadu peptidů či samotné aminokyseliny. Vedle aminokyselin jsou přidávány ještě další látky jako minerální látky (hořčík, vápník, fosfor) a vitamíny <sup>4</sup>.

Základních aminokyselin je v lidském organismu 20, jsou to aminokyseliny, které jsou součástí proteinů, tzv. proteinogenní aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou také výchozími látkami pro tvorbu všech typů biologických sloučenin dusíku. Rozdělujeme je podle toho, jestli si je tělo umí vytvořit samo nebo je musí přijímat z potravy na aminokyseliny esenciální, které musíme přijímat v potravě a neesenciální, které si tělo umí vytvořit samo.

Mezi esenciální aminokyseliny patří větvené aminokyseliny valin (Val), leucin (Leu), isoleucin (Ile), dále methionin (Met), fenylalanin (Phe), lysin (Lys), threonin (Thr) a tryptofan (Trp) <sup>5</sup>. Pro sportovce jsou důležité a hojně používané v kombinaci s jinými aminokyselinami nebo samotné větvené aminokyseliny (BCCA, z anglického Branched-chain amino acids). Organismus je v situaci celkového vyčerpání používá jako zdroj energie a chrání svalovou hmotu a myokard před poškozením. Tryptofan je výchozí látkou neurotransmiteru serotoninu. Lysin a threonin jsou důležité pro tvorbu kolagenu.

K neesenciálním aminokyselinám patří glycin (Gly), alanin (Ala), cystein (Cys), kyselina asparagová (Asp), kyselina glutamová (Glu), serin (Ser), glutamin (Gln), asparagin (Asn), prolin (Pro), tyrosin (Tyr), histidin (His) a arginin (Arg), který je esenciální pro děti <sup>5</sup>. Poslední jmenovaný, arginin, je důležitou aminokyselinou v období růstu a pro sportovce. Podporuje tvorbu růstového hormonu, je nezbytný pro tvorbu spermatu, podporuje tvorbu kolagenu, zvyšuje imunitu (stejně jako glutamin), podporuje novotvorbu bílkovin, a tím urychluje regeneraci po fyzickém výkonu. Tyrosin je prekurzorem katecholaminů (dopamin, adrenalin, noradrenalin) a hormonů štítné žlázy. Kyselina glutamová, cystein a glycin spolu tvoří tripeptid glutathion, který je jeden z nejúčinnějších antioxidantů v těle. Glycin je výchozím metabolitem pro syntézu purinových bází a hemu. Prolin je hojně zastoupen v kolagenu.

## 1. 2 Metody stanovení aminokyselin

Stanovení aminokyselin v různých vzorcích jako například v tělních tekutinách <sup>6-8</sup>, biologických tkáních <sup>9</sup>, potravinách <sup>10-12</sup>, lécích a potravinových doplncích <sup>8, 13</sup>, kmivu pro zvířata a surovin <sup>14</sup>, rostlinách <sup>8, 15</sup> je důležitá oblast analytické chemie. Stanovení aminokyselin je také důležité z hlediska proteomiky a analýzy DNA <sup>16</sup>.

Pokud vzorek obsahuje více látek nebo pokud je v nějaké složité matici je nutné nejdříve směs rozdělit. Ke stanovení aminokyselin byla dříve používaná tenkovrstvá chromatografie (TLC) <sup>17</sup>, kapalinová chromatografie jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s obrácenými fázemi (RP-HPLC) a iontově výměnná chromatografie (IEC). Jako detektce v kapalinové chromatografii je používána spektrofotometická detekce (UV, fluorescence, laserem indukovaná fluorescence-LIF) po předchozí derivatizaci aminokyselin vhodným chromoforem nebo flouroforem (před kolonou nebo za kolonou, některé aminokyseliny lze detekovat volné, bez derivatizace), ampérometrická detekce, hmotnostní detekce (MS), bezkontaktně vodivostní detekce (CCD), chemiluminiscenční detekce (CL) <sup>18</sup>. Příklady stanovení aminokyselin kapalinovou chromatografií jsou uvedeny

v tab. 1.1. Aminokyseliny je možné stanovit také plynovou chromatografií (GC) s hmotnostní detekcí nebo plamenově ionizačním detektorem (FID) <sup>19</sup>.

V poslední době je pro analýzu aminokyselin používáno elektromigračních metod <sup>17, 20-22</sup> jako je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a v současné době především kapilární zónová elektroforéza (CZE) <sup>17</sup>. Rozšíření kapilární elektroforézy pro stanovení aminokyselin je dáno hlavně řadou jejích výhod oproti kapalinové chromatografii. Jde o kratší dobu analýzy, k analýze je zapotřebí menšího množství vzorku, je také menší spotřeba mobilní fáze, je také dosahována vyšší selektivita, vyšší rozlišení enantiomerů a vyšší citlivost oproti kapalinové chromatografii <sup>20</sup>.

### **1.2.1 Kapilární elektroforéza**

Pro analýzu aminokyselin jsou používány především dva typy kapilární elektroforézy (CE). První, MEKC, kde separační pufr obsahuje iontový tenzid (nejčastěji aniontový tenzid dodecylsírán sodný, SDS) v množství větším než je jeho kritická micelární koncentrace. Nad touto koncentrací dochází ke vzniku micel a v kapiláře tak vznikají dvě fáze - vodná mobilní fáze a micelární fáze označovaná jako pseudostacionární fáze. Druhá, CZE, je v současné době nejpoužívanější technikou v kapilární elektroforéze. CZE dělí molekuly s nábojem na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Separované ionty jsou tedy děleny na základě jejich rozdílného náboje při daném pH a jejich velikosti. Na separaci se podílí i elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř křemenné kapiláry.

#### **1. 2. 1. 1 Detekce aminokyselin v CE**

Dříve se používala výhradně UV, později fluorescence a LIF detekce. Protože většina aminokyselin neabsorbuje v UV oblasti, pouze aromatické aminokyseliny absorbují, proto musí stanovení předcházet derivatizace aminokyselin vhodným chromoforem nebo fluoroforem. Derivatizace se stejně jako v kapalinové chromatografii provádí buď před, za separační kapilárou nebo na kapiláře,

**Tab. 1.1 Příklady stanovení aminokyselin kapalinovou chromatografií.**

<b>Metoda</b>	<b>Detekce</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Činidlo</b>	<b>Cit.</b>
RP-HPLC	MS/MS	Před kolonou	7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazol (NBD-F)	23
RP-HPLC	CCD	Volné aminokyseliny	-	24
RP-HPLC	Fluorescenční detekce	Před kolonou	4,7-fenanthrolin-5,6-dion	25
RP-HPLC	UV detekce, 220 nm	Volné aminokyseliny	-	26
IEC	Ampérometrická detekce	Volné aminokyseliny	-	15, 27, 28
IEC	Fluorescenční detekce	Za kolonou	<i>o</i> -ftaldialdehyd (OPA)	29, 30
RP-HPLC	UV detekce, 254 nm	Před kolonou	fenylisothiokyanát (PITC)	14, 31

kdy je nejdříve hydrodynamicky nadávkován vzorek (volných aminokyselin), poté hydrodynamicky nadávkovaná zóna derivatizačního činidla a obě tyto zóny jsou elektrokineticky promíchány vloženým napětím po určitou dobu. Po promíchání spolu aminokyseliny a derivatizační činidlo zreagují a poté je na elektrody vloženo separační napětí a aminokyseliny jsou již separovány derivatizované<sup>32</sup>. Příklady derivatizačních činidel pro UV a fluorescenční detekci jsou uvedeny v tab. 1.2.

Přímá elektrochemická detekce (ECD) na uhlíkové pastové elektrodě, měděné elektrodě či uhlíkové mikroelektrodě<sup>33</sup> je u většiny aminokyselin také možná pouze po předchozí derivatizaci, protože většina aminokyselin není elektrochemicky aktivní. Po vhodné derivatizaci je možné aminokyseliny stanovit též chemiluminiscenční detekcí (CL). Nevýhodou derivatizace je nedostatečná reprodukovatelnost derivatizační reakce, ne vždy reagují všechny aminokyseliny ve vzorku s derivatizačním činidlem kvantitativně. Derivatizace může tedy poskytovat nesprávný kvantitativní výsledek<sup>13,34</sup>. Derivatizace je také časově náročná a některé deriváty jsou nestálé<sup>7</sup>. Z tohoto důvodu je vhodnější stanovovat aminokyseliny volné, bez předchozí derivatizace. Takový je i trend posledních let<sup>13</sup>.

**Tab.1. 2 Příklady derivatizačních činidel pro UV a fluorescenční detekci<sup>17, 29, 34</sup>.**

Derivatizační činidlo	Zkratka	UV detekce	Fluorescence
fenylisothiokyanát	PITC	ano	ne
5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid	Dns	ano	ano
o-phthaldialdehyd	OPA	ano	ano
naftalen-2,3-dialdehyd	NDA	ano	ano
fluorescein isothiokyanát	FITC	ne	ano
fenylthiohydantoin	PTH	ano	ne

Díky amfoternímu charakteru aminokyselin může být separace volných aminokyselin v CZE prováděna v separačním pufru o nízkém pH, kdy jsou aminokyseliny ve formě kationtů nebo v separačním pufru o vysokém pH nad 10, kdy jsou aminokyseliny ve formě aniontů. Pro detekci volných aminokyselin je používána přímá UV detekce při nízkých vlnových délkách<sup>6, 8, 13</sup>, lze také použít elektrochemickou detekci. Obě tyto detekce, jak už bylo uvedeno výše, jsou vhodné

pouze pro některé aminokyseliny. Ve spojení s CZE se pro stanovení volných aminokyselin dále používá MS detekce<sup>35</sup>, nepřímá UV<sup>36</sup> nebo LIF detekce. Při nepřímé fotometrické detekci se do separačního pufru přidává absorbující co-ion, který zvyšuje absorbanční základního elektrolytu. Tímto se zvyšuje šum a snižuje lineární dynamický rozsah. V poslední době je hojně používána CZE ve spojení s bezkontaktně vodivostním detektorem (CCD), kde je možné stanovit všechny aminokyseliny ve formě iontu bez jakékoliv předchozí derivatizaci či přidávání co-ionu do separačního pufru jako je tomu u nepřímé UV nebo LIF detekce.

### **Bezkontaktně vodivostní detektor**

První bezkontaktní vodivostní detektor byl zkonstruován v osmdesátých letech B. Gašem a J. Vacíkem pro kapilární izotachoforézu (ITP)<sup>37, 38</sup>. V roce 1998 byl nezávisle dvěma skupinami autorů navržen bezkontaktně vodivostní detektor pro CZE s dvěma tubulárními elektrodami<sup>39, 40</sup>. Detektor se semitubulárními elektrodami byl navržen v práci<sup>41</sup>. Výhodou tohoto uspořádání je velmi snadná a rychlá výměna separační kapiláry.

Výhodou CCD je, že vodivostní elektrody jsou umístěny vně kapiláry, čímž se zamezí kontaktu elektrod s analyzovaným roztokem a eliminuje se vliv separačního pole na signál z detektoru. Bezkontaktně vodivostní detekce je vhodná jak pro malé anorganické ionty, tak i větší organické ionty. V současné době je CZE–CCD hojně využívána ke stanovení anorganických i organických iontů například v minerálních vodách, odpadních vodách, ovocných džusech, víně, pivu, mléku, tělních tekutinách atd., viz referát<sup>42</sup>. CCD byla K. Kubáňem a spol. v roce 2006 poprvé také použita ve spojení s RP–HPLC k rozdělení směsi 12 aminokyselin a směsi di- a tri-peptidů<sup>21</sup>.

Aminokyseliny jsou stanovovány CZE ve spojení s CCD nejčastěji jako kationty. Jako separační pufr byla použita kyselina mléčná<sup>6, 43</sup>, kyselina octová<sup>6, 8, 44</sup>, kyselina chloroctová<sup>6, 45</sup>, kyselina  $\alpha$ -hydroxyisomáselná<sup>43</sup>, kyselina glykolová<sup>43</sup>. pH separačního pufru se pohybuje v rozmezí 1,7 – 2,4. Aby se zabránilo adsorpci aminokyselin na stěnu separační kapiláry, tak se do separačního pufru přidává povrchově aktivní látka, nejčastěji 0,1 % (hmot.) hydroxyethylcelulóza (HEC)<sup>6, 8</sup>. Přidáním HEC se také sníží elektroosmotický tok a směs aminokyselin se

lépe rozdělí. Dojde ale samozřejmě k prodloužení doby analýzy. Úplné separace 20 aminokyselin bylo dosaženo pouze v separačním pufru, který byl složen z kyseliny octové a 0,1 % (hmnot.) HEC<sup>6,8</sup>. Aminokyseliny byly pomocí CZE–CCD stanoveny jak v umělých směsích, tak i v reálných vzorcích například v pivu, moči, rostlinném extraktu, v plazmě, tkáních zvířat. Příklady stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou jsou v tab. 1.3. V kyselých pufrech jsou píky aminokyselin záporné, tj. zóna s aminokyselinou má nižší vodivost než pufr.

Byla také publikována práce, kdy byl použit zásaditý pufr (2-amino-2-methyl-1-propanol; AMP) na uměle připravené směsi aminokyselin, ale nebylo dosaženo separace všech aminokyselin, pouze po přidavku 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonové kyseliny (CAPS), kdy byly píky aminokyselin kladné<sup>43</sup>.

CCD detektor je v principu univerzálním detektorem ve spojení s CZE, nicméně kombinace s jiným typem detektoru může být s výhodou využita pro analýzu složitých vzorků obsahující jak anorganické ionty, tak i organické ionty či velké polymerní molekuly. Bylo zkonstruováno a publikováno několik typů kombinovaných detektorů<sup>1</sup>, ale jejich nevýhodou je zapojení jednotlivých detektorů v sérii, takže záznamy z obou detektorů jsou časově posunuty a zachycují zóny separovaných látek v jiném stádiu separace. Detektory, které mají mezi dvěma elektrodami vytvořené okénko pro UV<sup>1,3</sup> či fluorescenční detekci<sup>46</sup>, tak umožňují detekci zón separovaných látek v jednom místě, tedy ve stejném stádiu separace.



**Tab. 1.3 Příklady stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou.**

<b>Typ vzorku</b>	<b>CE mód</b>	<b>Detekce</b>	<b>Typ derivatizace</b>	<b>Elektrolyt</b>	<b>Cit.</b>
Plazma, makrofágy	CZE	Nepřímá UV, 254 nm	Volné aminokyseliny	<i>p</i> – aminosalicilová kyselina s Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 10,2	36
Rybí a kostní moučka (Lys, Met, Thr, Cys-Cys)	CZE	Přímá UV, 190 nm	Volné aminokyseliny	10 mmol·dm <sup>-3</sup> tetraboritan sodný + 10 mmol·dm <sup>-3</sup> β-cyklohextrin, pH 9,18	14
Krmivo, rybí a kostní moučka (19 proteinogenních AMK (ne Trp))	CZE	Přímá UV, 254 nm	Před kolonou, PITC	30 mmol·dm <sup>-3</sup> fosfátový pufr, + 4 mmol·dm <sup>-3</sup> β-cyklohextrin, pH 7,4	14
Kreatin, sojové boby, mléko (16 proteinogenních AMK)	CZE	Nepřímá UV, 254 nm	Volné aminokyseliny	10 mmol·dm <sup>-3</sup> 3,5-dinitrobenzoát sodný + 0,2 mmol·dm <sup>-3</sup> cetyltrimethylamonium bromid (CATB); 7,5 mmol·dm <sup>-3</sup> 3,5- dinitrobenzoát sodný + α-cyklohextrin	47
Dětské jídlo (20 proteinogenních AMK)	CZE	MS	Volné aminokyseliny	300 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina mravenčí	12
Hovězí sérový albumin (20 proteinogenních AMK)	MECK	Přímá UV, 200 nm	Před kolonou, PITC	29 mmol·dm <sup>-3</sup> fosfátový pufr, pH 7,4 + 168,3 mmol·dm <sup>-3</sup> SDS	48

Pokračování tab. 1.3

Potkaní mozek, opičí plazma (Glu, Asp)	CZE	CL	Za kolonou, NaBrO v Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 mmol·dm <sup>-3</sup> tetraboritan sodný, pH 9,4 + 10 mmol·dm <sup>-3</sup> luminol	49
AMK neurotransmitery v potkaním hypotalamu (Arg, Lys, Gln, GABA, Ala, Gly, Glu, Asp)	CZE	LIF	Před kolonou, FITC	10 mmol·dm <sup>-3</sup> tetraboritan sodný, pH 10	9
Pivo (19 proteinogenních AMK, ne Pro), jen 10 rozděleno	CZE	ECD	Před kolonou, NDA	Borátový pufr, pH 7 - 10	33
Umělá směs (20 proteinogenních AMK)	MECK	Přímá UV, 214 nm	Před kolonou, Dns	20 mmol·dm <sup>-3</sup> borátový pufr, pH 9,2 + 102 mmol·dm <sup>-3</sup> SDS	50
Infuzní roztok (Arg, Ornitin, Val, Ile, Leu, Asp, B <sub>6</sub> )	CZE	MS	Volné aminokyseliny	300 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina mravenčí	13
Infuzní roztok (Arg, Ornitin, Val, Ile, Leu, Asp, B <sub>6</sub> )	CZE	Přímá UV, 195 nm	Volné aminokyseliny	50 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina fosforečná + 25 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina oktansulfonová	13
Pivo, moč, sliny, rostlinný extrakt, Pangamin tbl.(20 proteinogenních AMK)	CZE	CCD	Volné aminokyseliny	2,3 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octová + 0,1 % (hmot.) HEC, pH 2,1	8

Pokračování tab. 1.3

Plazma (18 proteinogenních AMK, ornitin, citrulin, kreatin)	CZE	CCD	Volné aminokyseliny	1,7 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octová + 0,1 % (hmot.) HEC, pH 2,2	6
Umělá směs 12 či 20 proteinogenních AMK	CZE	CCD	Volné aminokyseliny	6 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina mléčná, pH 2,4 nebo 50 mmol·dm <sup>-3</sup> AMP + 10 mmol·dm <sup>-3</sup> CAPS, pH 10,8	43
Plodová voda (20 proteinogenních AMK + dalších 12 biogenních látek)	CZE	CCD	Volné aminokyseliny	1,7 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octová + 0,1 % (hmot.) HEC, pH 2,15; do vzorku přidán acetonitril	44
Umělá směs 10 AMK (Phe, Arg, Lys, Val, His, Ala, Pro, Gly, Glu, Asp)	CZE	LIF	Na koloně, 5-(4,6-dichloro-s-triazin-2-yl-amino) fluorescein (DTAF)	50 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina boritá, pH 9,5	32
Umělá směs 10 AMK (Phe, Arg, Lys, Val, His, Ala, Pro, Gly, Glu, Asp)	MECK	LIF	Na koloně, DTAF	50 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina boritá, pH 9,5 + 12 mmol·dm <sup>-3</sup> Brij-35 (polyoxyethylen dodecyl ether)	32
Vaječný bílek, kasein, kolagen (14 proteinogenních AMK)	CZE	CCD	Volné aminokyseliny	51,9 mmol·dm <sup>-3</sup> kyselina chloroctová + LiOH, pH 2,26	45

## 1.3 Hydrolýza

Pokud se aminokyseliny ve vzorku, který chceme stanovit, nevyskytují volné, ale vázané v peptidech či proteinech, musí vlastnímu stanovení předcházet hydrolýza. Stanovení aminokyselin v peptidech či proteinech je komplexní analytický proces, skládající se ze dvou kroků: kompletní hydrolýzy vzorku na volné aminokyseliny, následné separaci a stanovení jednotlivých volných aminokyselin. Hydrolýza je důležitý krok a její správné provedení je nezbytná podmínka úspěšné analýzy. Cílem každé hydrolýzy je kvantitativní uvolnění všech aminokyselin z peptidu či proteinu a také jejich kvantitativní obnova z hydrolyzátu. Bohužel, při každé hydrolýze dochází současně i k částečné destrukci uvolněných aminokyselin. Mnoho faktorů ovlivňuje úplnost hydrolýzy jako je teplota, čas hydrolýzy, hydrolyzační činidlo a další přidané látky. Protože neexistuje ideální metoda hydrolýzy, která by vyhovovala všem různorodým peptidům či proteinům, tak konkrétní výběr metody záleží na cíli analýzy.

Hydrolýza může být chemická, provedena pomocí chemických činidel nebo hydrolýza enzymatická, prováděná pomocí enzymů. Chemická hydrolýza může být navíc provedena v kyselých nebo zásaditých podmínkách.

### 1.3.1 Chemická hydrolýza

#### Kyselá hydrolýza

V současné době jde o nejčastěji používaný typ hydrolýzy. Nejčastěji používaným hydrolyzačním činidlem je kyselina chlorovodíková (HCl). Její použití má mnoho výhod: hydrolýza může být provedena v kapalně nebo plynné fázi, po proběhnutí hydrolýzy může být z hydrolyzátu veškerá HCl odpařena a tudíž neovlivňuje následnou separaci a stanovení. Hydrolýza může být tedy provedena s malým množstvím vzorku, což je obzvláště výhodné pokud ho máme jen malé množství. Klasická kyselá hydrolýza používá  $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl po dobu 24 hodin při  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>51</sup>. Při kyselé hydrolýze je asparagin kompletně hydrolyzován na kyselinu asparagovou a glutamin na kyselinu glutamovou, dochází k rozkladu tryptofanu a

sirných aminokyselin a tyrosin je částečně zničen stopami nečistot přítomných v hydrolyzačním činidle<sup>52</sup>. Ke stanovení tryptofanu se používá  $4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  methansulfonová kyselina (MSA). Její nevýhodou oproti HCl je, že není těkavá a tudíž ji nelze po skončení hydrolyzy odstranit. Pro účely separace musí být proto hydrolyzát zředěn a musí být upraveno pH, čímž dochází k výraznému zředění vzorku a je tedy nutné brát k hydrolyze více analyzovaného materiálu. Jako další hydrolyzační činidlo se používá  $3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  *p*-toluensulfonová kyselina,  $3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  merkaptosulfonová kyselina, směs kyseliny chlorovodíkové a propionové, ale tyto metody hydrolyzy se příliš neujaly. Pro zabránění ztrát některých aminokyselin se někdy přidávají ochranná činidla jako například fenol, indol, thioglykolová kyselina<sup>52</sup>. Čas hydrolyzy může být významně zkrácen použitím tzv. mikrovlnné hydrolyzy, která pro ohřev směsi využívá energii mikrovlnného záření. Příklady kyselé hydrolyzy jsou uvedeny v tab. 1.4.

**Tab. 1.4 Příklady provedení kyselé hydrolyzy.**

Činidlo	Podmínky	Přidané látky, poznámky	Cit.
$6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	110 °C, 24 h	–	51, 53
$6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	110 °C, 24 h	0,02 % fenol	48
$6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	110 °C, 14 – 16 h	–	14
$6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	160 – 180 °C, 15 – 60 min	–	53
$7,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	390 W, 12 min	Mikrovlnná hydrolyza	54
$6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl	155 °C, 4 min	0,02 % fenol, mikrovlnná hydrolyza	55
$4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MSA	110 °C, 24 h nebo 115 °C, 22 – 72 hodin	0,2 % 3-(2-aminoethyl) indol	55 nebo 56
$4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MSA	155 °C, 4 min	0,2 % 3-(2-aminoethyl) indol	55
$4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MSA	110 °C, 24 h; 160 °C 45 min	–	57

## **Zásaditá hydrolýza**

Zásaditá hydrolýza se většinou používá jen ke stanovení tryptofanu a pro vzorky obsahující mimo proteinů a peptidů také sacharidy. Ostatní aminokyseliny se také hydrolyzují, ale probíhá racemizace a některé se také rozkládají. Jako hydrolyzační činidlo je používá hydroxid sodný ( $4,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$ ,  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $16 - 22 \text{ h}$ )<sup>58</sup>, hydroxid lithný ( $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ LiOH}$ ,  $110 - 120^\circ\text{C}$ ,  $22 - 26 \text{ h}$ )<sup>58</sup>, hydroxid barnatý ( $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Ba(OH)}_2$ ,  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $48 \text{ h}$ )<sup>53</sup>.

### **1.3.2 Enzymatická hydrolýza**

Enzymatická hydrolýza je používána méně často. Je to dáno hlavně relativní specifičností proteáz pro jednotlivé proteiny či peptidy a také tím, že nemusí proběhnout zcela a ve směsi mohou zůstat různě dlouhé peptidy. Je prováděna za mírnější podmíněk. Obvykle je hydrolyzační směs zahřívána při pH 5 – 7 několik minut na  $85 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$ , záleží na optimálních podmínkách konkrétního enzymu. Poté je teplota udržována na  $50 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu  $10 - 24 \text{ hodin}$ <sup>47</sup>.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Elektroforetická aparatura

Aparatura pro měření byla sestavena v laboratoři z vysokonapěťového zdroje Spellman CZE 1000 (Spellman, USA), křemenné kapiláry, pokryté filmem polyimidu, o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$  (Sillica Tubing & Optical Fibers, Slovensko) a duálního detektoru (detaily viz kap. 2.1.1). Vstupní a koncovou nádobkou byly standardní skleněné vialky o objemu 4 ml. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky manuálním zvednutím dávkovacího konce kapiláry o 10 cm po dobu 10 s proti hladině v koncové nádobce.

Ukázalo se, že manuálním dávkováním nebylo možno při stanovení aminokyselin v potravinovém doplňku získat dostatečně opakovatelné výsledky, proto při těchto stanoveních bylo využito dávkovací části komerčního přístroje pro elektroforézu HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) (experimenty s dávkováním za použití komerčního přístroje byly prováděny na 3. Lékařské fakultě UK v Praze).

V místě styku optického vlákna s kapilárou bylo zapotřebí sejmout z jejího povrchu polyimidový film a vytvořit detekční okénko. Film byl odstraněn horkou koncentrovanou kyselinou sírovou a otřením kapiláry acetonem.

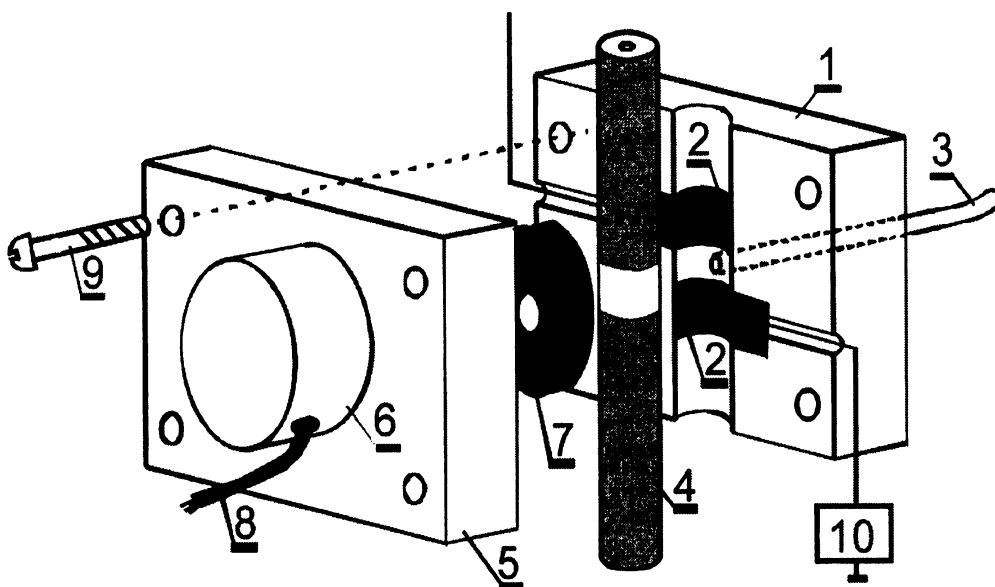
Vnitřní povrch kapiláry byl dle potřeby aktivován roztokem 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaOH po dobu 10 min, po této době byla kapilára promývána několik minut vodou a poté separačním pufrem.

Při ověřování funkce aparatury a při stanovování kationtů v minerálních vodách byla používána kapilára o celkové délce 74 cm, délka k detektoru byla 61 cm. Při detekci a stanovení komponent v aminokyselinovém potravinovém doplňku byla používána kapilára o celkové délce 70,5 cm a délce k detektoru 57,5 cm.

Vzorky byly dávkovány rozpuštěné ve vodě nebo ve zředěném separačním pufre.

### 2.1.1 Duální detektor

Jako detektor byla používána kombinovaná detekční cela navržená v práci <sup>1</sup>. Detekční cela obsahuje dva na sobě nezávislé detekční systémy, optický a bezkontaktně vodivostní. Konstrukční uspořádání kombinovaného spektrofotometrického a bezkontaktního vodivostního detektoru umožňuje detekci látek v jednom místě kapiláry. Celkové mechanické uspořádání je znázorněné na obr. 2.1.



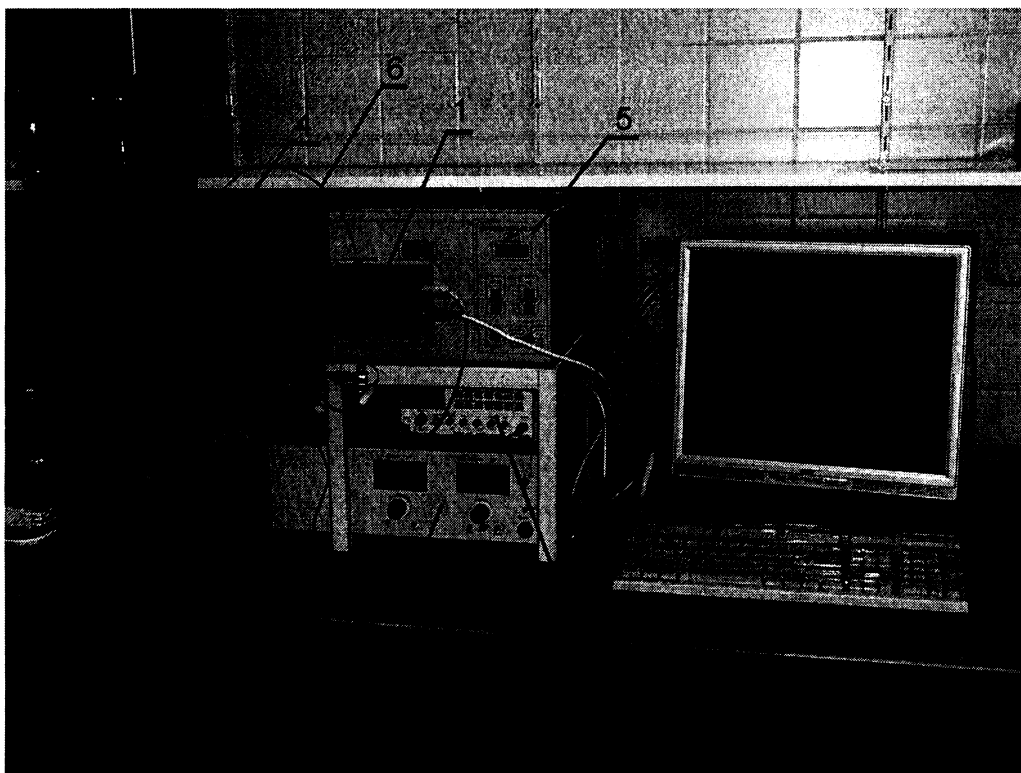
**Obr. 2.1 Schéma mechanického uspořádání kombinovaného detektoru <sup>1</sup>** (jednotlivé komponenty nejsou pro přehlednost zakresleny v měřítku): 1 – pevná plexisklová destička, 2 – elektrody bezkontaktního vodivostního detektoru, 3 – světlovodné vlákno přivádějící záření ze spektrofotometru, 4 – separační kapilára, 5 – pohyblivá plexisklová destička, 6 – fotodioda, 7 – optické stínění, 8 – kabel spojující fotodiodu s elektronikou ve spektrofotometrickém detektoru, 9 – spojovací šroub, 10 – funkční generátor.

**Vodivostní část** detektoru je bezkontaktní vodivostní detektor tvořený semitubulárními hliníkovými elektrodami o tloušťce 10  $\mu\text{m}$  a šířce 3 mm a vzdáleny od sebe 2 mm. Elektrody byly vtištěny do drážky a byly fixovány k povrchu nepohyblivé plexisklové destičky. Signál pro vodivostní detektor byl odebírán z výstupu funkčního generátoru FC 503 (Monotech, International, USA).



Pro **optickou část** detektoru byl využit komerční spektrofotometrický detektor LCD 2082 (Ecom, ČR). Záření od zdroje uvnitř spektrofotometrického detektoru je vedeno světlovodným vláknem k separační kapiláře a záření po průchodu kapilárou dopadá na velkoplošnou fotodiodu, která je bez úprav použita z komerčního detektoru.

Celý detektor sestavený na desce s plošným spojem obsahujícím elektroniku vodivostní části detektoru je umístěn v kovové krabici, zajišťující jeho elektrické i optické odstínění od vnějšího prostředí. Krabice je připevněna k čelnímu panelu spektrofotometrickému detektoru Ecom. Detailní popis konstrukce detektoru je uveden v pracích <sup>1,3</sup>. Celá elektroforetická aparatura sestavená v laboratoři je na obr. 2.2. Elektroforetická vstupní nádobka v níž je vysokonapěťová elektroda, byla z bezpečnostních důvodů při zapnutém vysokém napětí za ochranným plexisklem. Signály z obou částí detektoru byly registrovány počítačem vybaveným universální měřicí kartou PCI – 6024E a programem LabView (National Instruments, USA).



**Obr. 2.2 Elektroforetická aparatura.** 1 – duální detektor, 2 – funkční generátor, 3 – vysokonapěťový zdroj, 4 – dávkovací zařízení, 5 – komerční spektrofotometr, 6 – separační kapilára, 7 – ochranné plexisklo

## 2.2 Experimentální podmínky

Kromě základních experimentálních parametrů elektroforetické separace, viz výše, byla jednotlivá měření prováděna za podmínek uvedených v následujících tabulkách.

**Tab. 2.1 Experimentální podmínky při ověřování funkce duálního detektoru.**

<b>Parametr</b>	
Separáční pufr (SP1)	20 mmol.dm <sup>-3</sup> kyselina borit� a 10 mmol.dm <sup>-3</sup> hydroxid lithn�, pH 9,2
Vzorek (v závorkách koncentrace v mmol.dm <sup>-3</sup> )	K <sup>+</sup> (0,1), Na <sup>+</sup> (0,1), tyramin (0,2), histidin (0,3), kyselina salicylov� (0.3)
Separáční napětí/proud	20 kV/9 �A
Dávkování hydrodynamick�	10 cm /10 s
Pracovn� frekvence vodivostního detektoru	200 kHz
Vlnov� délka optick� detekce	210 nm

**Tab. 2.2. Experimentální podmínky pro stanovování kationtů – využívána pouze vodivostní část duálního detektoru.**

<b>Parametr</b>	
Separáční pufr (SP2)	20 mmol.dm <sup>-3</sup> MES/HIS
Separáční napětí/proud	20 kV/9 �A
Dávkování hydrodynamick�	10 cm /10 s
Pracovn� frekvence vodivostního detektoru	200 kHz

**Tab. 2.3 Experimentální podmínky při optimalizaci detekce a separace s použitím modelových vzorků aminokyselin a při orientační analýze aminokyselinového potravinového doplňku.**

<b>Parametr</b>	
Separáční pufr (SP3)	2,3 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octov�
Separáční napětí/proud	20 kV/30 �A
Dávkování manu�ln�	10 cm /10 s
hydrodynamick�	
Pracovn� frekvence vodivostního detektoru	200 kHz
Vlnov� délka optick� detekce	195 nm

**Tab. 2.4 Experimentální podmínky při stanovení prolinu a tyrosinu vedle sebe v uměle p ipraven  směsi.**

<b>Parametr</b>	
Separáční pufr (SP3)	2,3 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octov�
Separáční napětí/proud	20 kV/25,5 �A
Dávkování automatick�	200 mbar s
hydrodynamick�	
Pracovn� frekvence vodivostního detektoru	1200 kHz
Vlnov� délka optick� detekce	195 nm

**Tab. 2.5 Experimentální podmínky při analýze aminokyselinového potravinového doplňku.**

<b>Parametr</b>	
Separáční pufr (SP3)	2,3 mol·dm <sup>-3</sup> kyselina octov�
Separáční napětí/proud	20 kV/30 �A
Dávkování automatick�	200 mbar s
hydrodynamick�	
Pracovn� frekvence vodivostního detektoru	200 kHz
Vlnov� délka optick� detekce	195 nm

## 2.3 Další používané přístroje a pomůcky

Při tlakové mineralizaci byla používána k udržení teploty bloková lázeň QBH2 (Grant Instruments, Anglie).

Centrifuga Minispin plus (Eppendorf, Německo).

Mikrovlnná mineralizace byla prováděna v mikrovlnném rozkladném zařízení MDS 2000 (CEM, USA).

Spektrální měření byla prováděna na diode-array spektrofotometru HP-8453 (Hewlett Packard, USA).

K sonikaci vzorků minerálních vod byla použita ultrazvuková lázeň Elmaconic S15H (P-LAB, ČR).

## 2.4 Zdroje a čistota používaných chemikálií

V průběhu práce byly použity tyto chemikálie:

deonizovaná voda, Milli-Q Plus, Millipore, USA

Glycin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Alanin,  $\geq 99$  %, ROTH, Německo

Asparagová kyselina,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Cystein,  $\geq 98$  %, ROTH, Německo

Glutamová kyselina,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Serin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Threonin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Valin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Leucin,  $\geq 98,5$  %, ROTH, Německo

Izoleucin,  $\geq 98,5$  %, ROTH, Německo

Methionin,  $\geq 99$  %, ROTH, Německo

Lysin-monohydrát,  $\geq 98,5$  %, ROTH, Německo

Arginin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Prolin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo

Fenylalanin,  $\geq 99$  %, ROTH, Německo

Tyrosin,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo  
Histidin,  $\geq 99$  %, MERCK, Německo  
Tryptofan,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo  
Kyselina boritá, pro elektroforézu, SIGMA-ALDRICH, Německo  
Hydroxid lithný-monohydrát, p.a., MERCK, Německo  
Kyselina salicylová, p.a., FERAK, Německo  
Chlorid draselný, p.a., MERCK, Německo  
Chlorid barnatý-dihydrát, p.a., LACHEMA a.s., ČR  
Hydroxid sodný,  $\geq 98$  %, SIGMA-ALDRICH, Německo  
Chlorid vápenatý, p.a., LACHEMA a.s., ČR  
Chlorid hořečnatý-heptahydrát, p.a., LACHEMA a.s., ČR  
Chlorid sodný, p.a., LACHEMA a.s., ČR  
Kyselina octová,  $\geq 99$  %, FLUKA, Německo  
Kyselina chlorovodíková – 35 %, p.a., Lach-ner, ČR

## **2.5 Úprava vzorků před analýzou**

### **2.5.1 Vzorky minerálních vod**

Analyzované minerální vody byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Pro analýzu byla vybrána Magnesia, Mattoni a Vincentka. Rozpuštěné plyny byly odstraněny v ultrazvukové lázni, sonikace byla prováděna po dobu 15 minut. Takto upravený vzorek minerální vody byl dávkován v množství 10  $\mu$ l (Magnesia), 20  $\mu$ l (Mattoni), 10  $\mu$ l (Vincentka, kvalitativní analýza) a 60  $\mu$ l (Vincentka, stanovení lithia) do 3 ml pětkrát zředěného pufru SP2 v dávkovací vialce a poté dávkován do separační kapiláry.

## 2.5.2 Mineralizace aminokyselinového potravinového doplňku

Analyzovaný vzorek, AminoMAX firmy Max Muscle, USA, byl zakoupen v obchodě s potravinovými doplňky. Dle etikety obsahuje typicky 20 aminokyselin, viz tab. 2.7. Aminokyseliny jsou v přípravku ve formě krátkých syrovátkových proteinů, některé aminokyseliny jsou přidány volné. Přípravek obsahuje ještě další složky podporující vstřebávání a využití aminokyselin, jde o vitamíny B<sub>6</sub> a B<sub>12</sub>, fosfor, kationty vápenaté, hořečnaté a chrom. Potravinový doplněk je ve formě kapslí.

Protože přípravek obsahoval většinu aminokyselin ve formě proteinů bylo nutné pro získání volných aminokyselin provést hydrolyzu vzorku. Pro porovnání byly vybrány dvě metody mineralizace. Jednak klasická tepelná mineralizace (metoda č. 1), tak i mikrovlnná mineralizace (metoda č. 2). V obou případech byla kapsle vysypána a homogenizována v achátové třecí misce. Při metodě č. 1 bylo 10 mg vzorku mineralizováno 4 ml 6 mol·dm<sup>-3</sup> HCl po dobu 24 hodin při 110 °C. Poté byl mineralizát odpařen do sucha a rozpuštěn v 1 ml vody a filtrován na centrifuze. Takto upravený vzorek byl uchováván v chladničce a poté po zředění vodou dávkován. Jako metoda č. 2. byla použita mikrovlnná mineralizace, která byla provedena v mikrovlnném rozkladném zařízení MDS 2000 (CEM, USA), podle práce<sup>59</sup>. Bylo dáno 50 mg vzorku na 4 ml 6 mol·dm<sup>-3</sup> HCl, podmínky dvoustupňové mineralizace jsou uvedeny v tab. 2.6. Po skončení mineralizace byl mineralizát odpařen do sucha a rozpuštěn ve 3 ml vody a filtrován na centrifuze. Takto upravený vzorek byl uchováván v chladničce a poté po zředění vodou dávkován do separační kapiláry.

**Tab. 2.6 Podmínky mikrovlnné mineralizace.**

	<b>1. krok</b>	<b>2. krok</b>
<b>Výkon [%]</b>	100	80
<b>Tlak [bar]</b>	5,6	5,6
<b>čas</b>	10 s	5 min

**Tab. 2.7 Obsah aminokyselin v potravinovém doplňku AminoMAX a denní dávka dle etikety na balení přípravku.**

<b>Aminokyselina</b>	<b>Zkratka aminokyseliny</b>	<b>Denní dávka, mg (6 kapslí)</b>
Isoleucin	Ile	148
Leucin	Leu	362
Lysin	Lys	283
Fenylalanin	Phe	105
Threonin	Thr	141
Tryptofan	Trp	56
Valin	Val	153
Methionin	Met	68
Cystein	Cys	71
Alanin	Ala	160
Arginin	Arg	83
Kyselina asparagová	Asp	305
Kyselina glutamová	Glu	491
Glycin	Gly	57
Histidin	His	51
Prolin	Pro	144
Serin	Ser	122
Tyrosin	Tyr	120
Ornitin	-	3
Karnitin	-	3

## **2.6 Způsob vyhodnocování experimentálních výsledků**

Obsah analytů byl stanovován z ploch registrovaných píků vyhodnocovaných programem Origin 6.0. Vzhledem k počtu opakovaných měření (< 7) byl za střední hodnotu brán medián. Směrodatná odchylka byla počítána z rozpětí dle vztahu (2.1) a interval spolehlivosti dle vztahu (2.2).

$$s = k_n \cdot R, \quad (2.1)$$

kde  $k_n$  je tabelovaný koeficient, pro tři měření  $k_3 = 0,5908$  a  $R = x_{max} - x_{min}$  je rozpětí

$$L_{1,2} = K_n \cdot R, \quad (2.2)$$

kde  $K_n$  je tabelovaný koeficient, pro tři měření  $K_3 = 1,3$  a  $R$  je rozpětí.

Pro porovnání získaných výsledků metodou mineralizace č. 1 a č. 2 byl použit Lordův test. Vypočtená hodnota  $u$  dle vztahu (2.3) byla porovnána s kritickou hodnotou Lordova testu  $u_{0,05}$ , která je pro tři stanovení rovna  $u_{0,05} = 0,636$ . Je-li  $u \geq u_{0,05}$  je rozdíl středních hodnot (zde mediánů) statisticky významný.

$$u = \frac{|\tilde{x}_A - \tilde{x}_B|}{R_A + R_B}, \quad (2.3)$$

kde indexy A a B označují porovnávané soubory dat.



## 3 Výsledky a diskuse

### 3.1 Ověření funkce jednotlivých částí detektoru na modelové směsi

Funkce duálního detektoru a činnost laboratorně sestavené aparatury byly ověřeny detekcí směsi obsahující látky poskytující odezvu vodivostní (draselné a sodné ionty), optické (histidin, kyselina salicylová) či oběma částmi detektoru (tyramin, histidin). Elektroferogramy registrované oběma detekčními systémy jsou na obr. 3.1. Pro vodivostní část detektoru je optimální pracovní frekvence 200 kHz, jak vyplývá z vlastních měření i z dat v literatuře<sup>1,3</sup>.

### 3.2 Stanovení vybraných kationtů v minerálních vodách

#### 3.2.1 Detekce vybraných kationtů v modelových vzorcích

Před vlastní analýzou minerálních vod bylo ověřeno, zda lze kationty běžně se vyskytující v minerálních vodách dobře rozdělit, tak aby mohly být spolehlivě stanoveny (kromě nich byl do vzorku přidán ještě barnatý ion). Elektroferogram modelové směsi je na obr. 3.2.

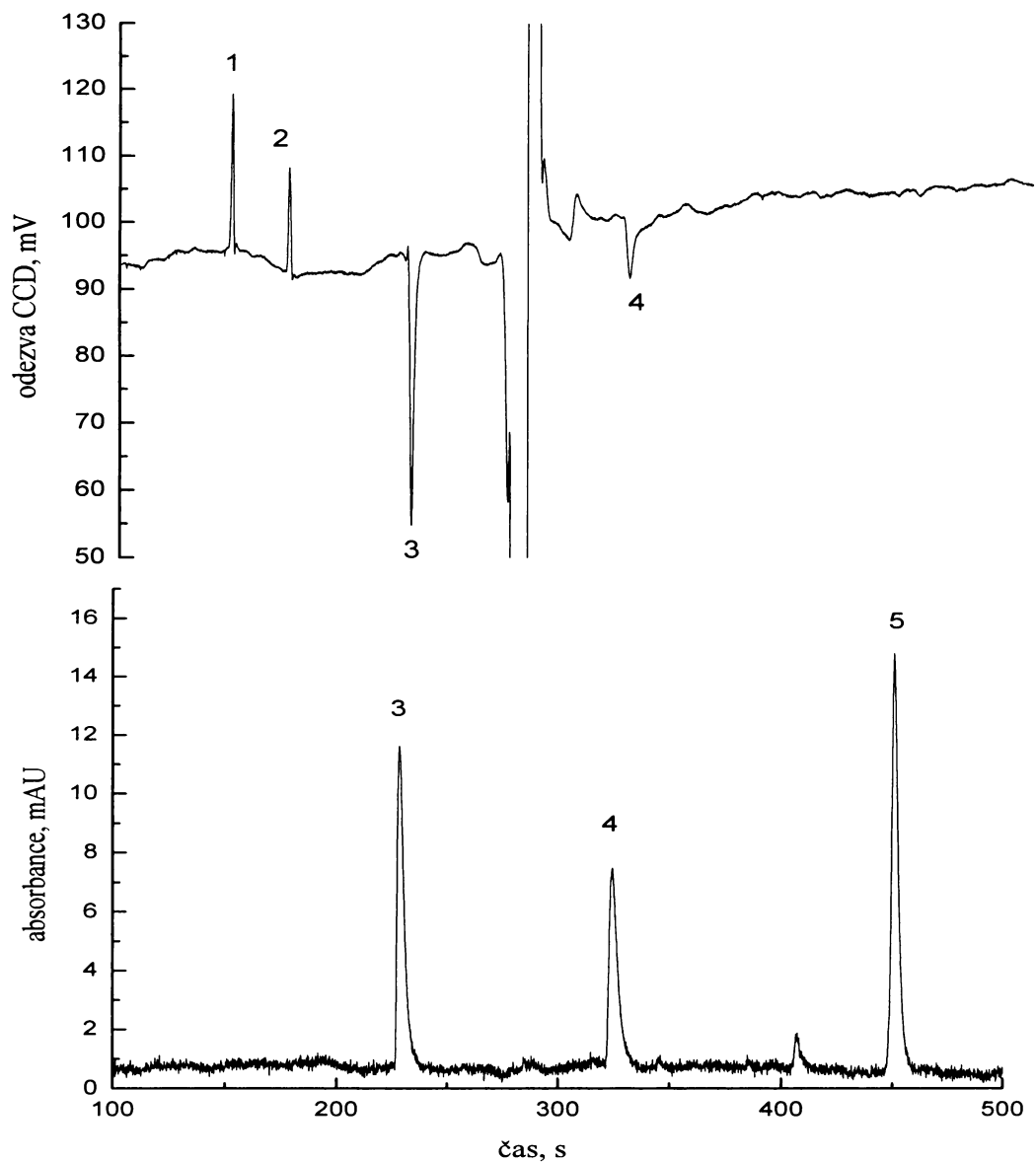
Z obrázku je zřejmé, že kationty jsou dobře odděleny. Z parametrů píku draselného, vápenatého a hořečnatého iontu byla určena separační účinnost, viz tab. 3.1. Účinnost byla počítána ze vztahů pro výpočet počtu teoretických pater kolony,  $n$  (3.1) a výšky teoretického patra,  $H$  (3.2).

$$n = 5,54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2, \quad (3.1)$$

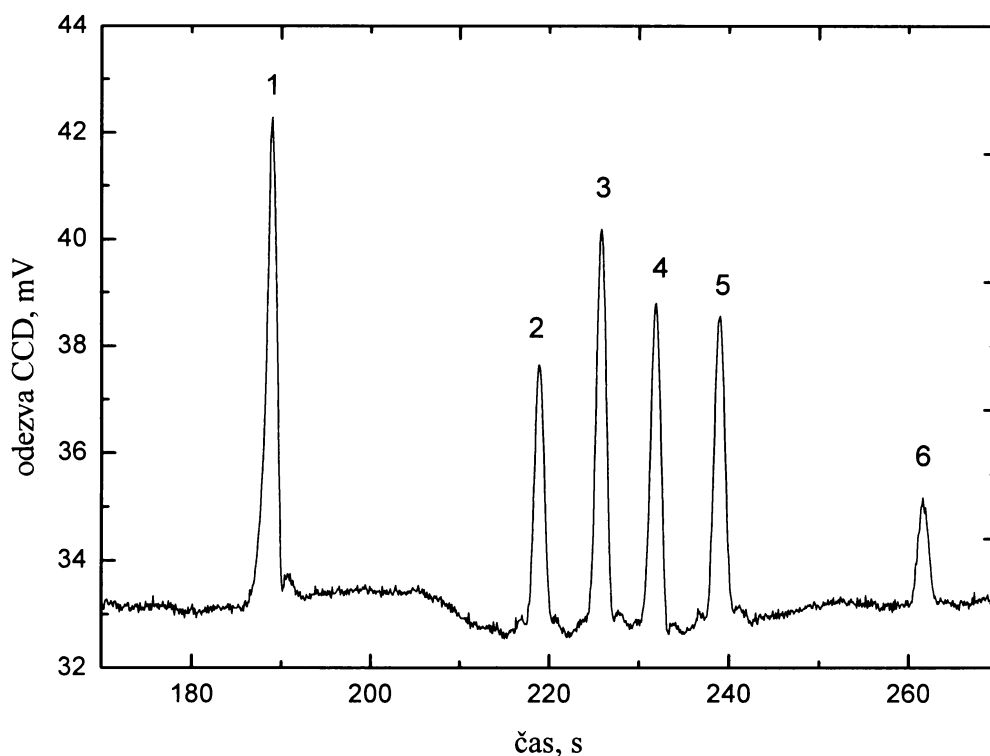
kde  $t_R$  je retenční čas látky,  $Y_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky.

$$H = \frac{L}{n}, \quad (3.2)$$

kde  $L$  je délka křemenné kapiláry k detektoru v  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 3.1 Elektroferogram modelové směsi uvedených iontů, experimentální podmínky viz tab. 2.1. Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Na}^+$ , 3 - tyramin, 4 – histidin, 5 - kyselina salicylová**



**Obr. 3.2. Elektroferogram modelové směsi uvedených iontů, experimentální podmínky viz tab. 2.2. Koncentrace všech iontů  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Identifikace píků: 1 -  $\text{K}^+$ , 2 -  $\text{Ba}^{2+}$ , 3 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 4 -  $\text{Na}^+$ , 5 -  $\text{Mg}^{2+}$ , 6 -  $\text{Li}^+$ .**

**Tab. 3.1. Účinnost separace**

Ion	Retenční čas, s	Šířka píku v polovině výšky, s	Počet pater	Výškový ekvivalent, $\mu\text{m}$
$\text{K}^+$	189	1,25	126652	4,82
$\text{Ca}^{2+}$	226	1,25	181095	3,37
$\text{Mg}^{2+}$	239	1,50	140645	4,34

Z dat v tab. 3.1 byla určena střední hodnota výškového ekvivalentu teoretického patra,  $4,34 \pm 1,89 \mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Analýza jednotlivých minerálních vod

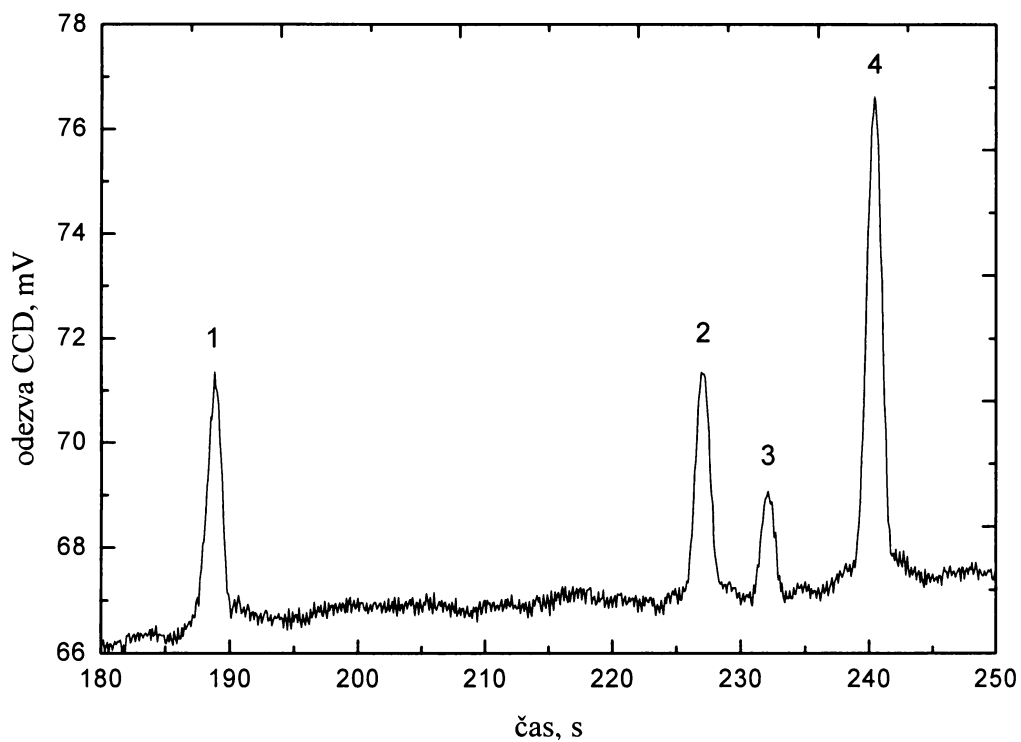
V elektroferogramech každé minerální vody byly identifikovány jednotlivé kationty. Vybrané kationty pak byly stanoveny. Kationty byly stanovovány metodou standardního přídávku. Nalezené množství příslušného kationtu pak bylo porovnáno s hodnotou udávanou na etiketě minerální vody. Jako zásobní roztoky pro standardní přídavek byly připraveny roztoky obsahující  $3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$ . Pro identifikaci jednotlivých píků bylo ke 3 ml vzorku ve vialce postupně přidáváno 10  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku jednotlivých kationtů. Pro stanovení vybraných kationtů byl výše popsáným způsobem změřen vzorek minerální vody a poté k tomuto vzorku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku jednotlivých kationtů.

**Magnesia:** v Magnesii byly nalezeny kation draselný, vápenatý, sodný a hořečnatý, viz obr. 3.3. Pro kvantitativní analýzu byl vybrán kation hořečnatý. Právě Magnesia by měla obsahovat nejvíce hořčíku ze všech minerálních vod dostupných na našem trhu.

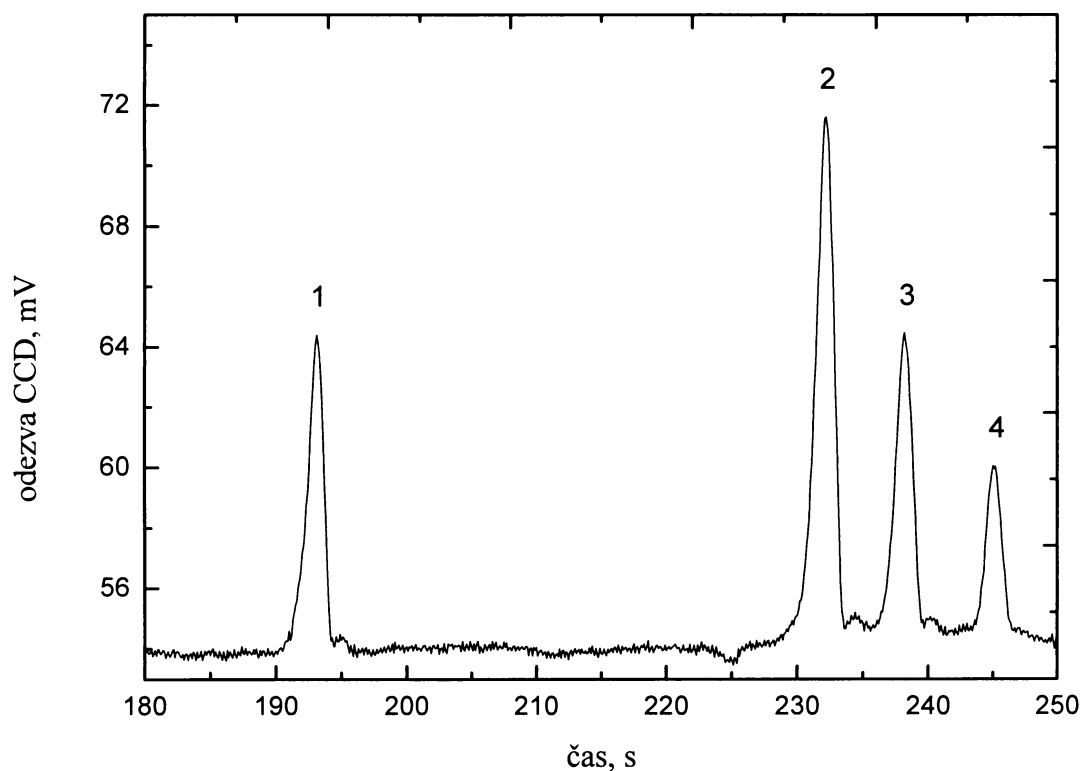
**Mattoni:** Mattoni obsahuje kation draselný, vápenatý, sodný a hořečnatý. Elektroferogram je na obr. 3.4. V minerální vodě Mattoni byl stanovován obsah všech detekovaných kationtů.

**Vincentka:** ve Vincentce byl nalezen kation draselný, vápenatý, hořečnatý a lithný. Pro stanovení byl vybrán lithný kation, protože tato minerální voda obsahuje z testovaných minerálních vod nejvyšší koncentraci tohoto iontu. Jeho obsah je uveden na etiketě jako na jediné z testovaných minerálních vod.

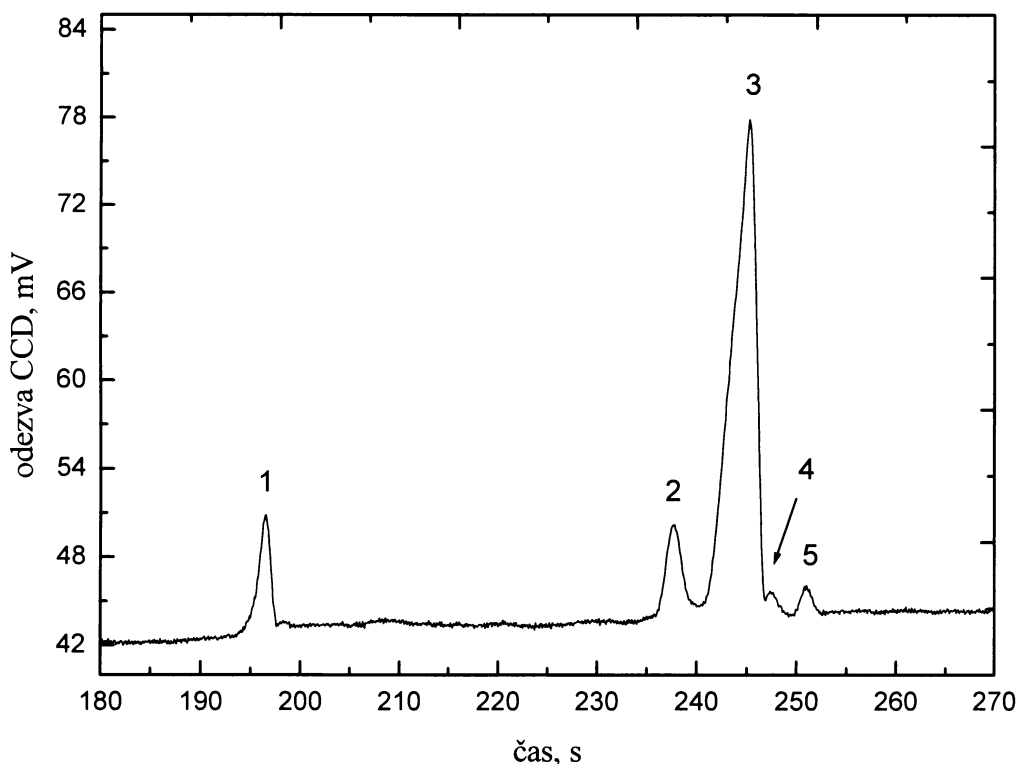
Výsledky stanovení obsahu vybraných kationtů analyzovaných minerálních vod jsou uvedeny v tab. 3.2. Je zde i porovnání nalezených hodnot s množstvím uvedeným na etiketách jednotlivých minerálních vod. Rozdíl ve stanoveném množství a hodnotami udávaných na etiketě může být způsoben proměnlivostí složení minerálních vod v čase. Pokud porovnáme rozbor uvedený na etiketě Mattoni z roku 2005 a 2006 nalezneme u některých kationtů rozdíly v řádu desítek mg/l.



**Obr. 3.3. Elektroferogram Magnésie.** Experimentální podmínky viz tab. 2.2. Identifikace píků: 1 –  $K^+$ , 2 –  $Ca^{2+}$ , 3 –  $Na^+$ , 4 –  $Mg^{2+}$ .



**Obr. 3.4. Elektroferogram minerálky Mattoni.** Experimentální podmínky viz tab 2.2. Identifikace píků: 1 –  $K^+$ , 2 –  $Ca^{2+}$ , 3 –  $Na^+$ , 4 –  $Mg^{2+}$ .



**Obr. 3.5. Elektroferogram minerální vody Vincentka.** Experimentální podmínky viz tab. 2.2. Identifikace píků: 1 – K<sup>+</sup>, 2 – Ca<sup>2+</sup>, 3 – Na<sup>+</sup>, 4 – Mg<sup>2+</sup>, 5 – Li<sup>+</sup>.

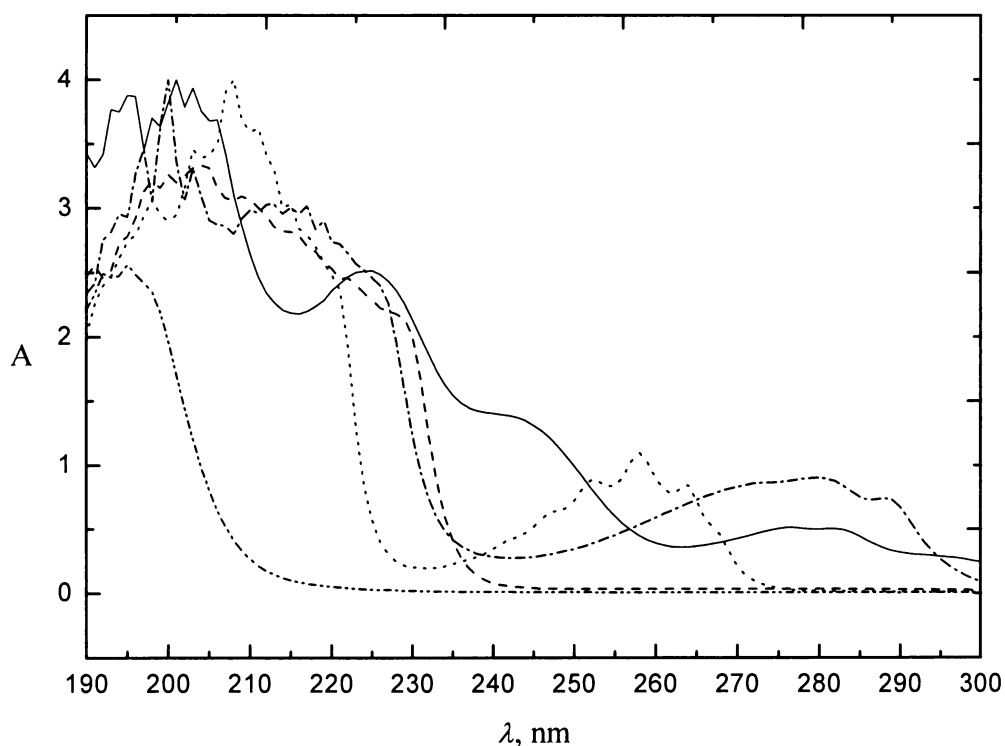
**Tab. 3.2 Porovnání zjištěných obsahů vybraných kationtů analyzovaných minerálních vod s hodnotami uvedenými na etiketách.**

Minerální voda	Kation	Stanovený obsah, mg/l	Obsah uvedený na etiketě, mg/l
Magnesia	Mg <sup>2+</sup>	199,2 ± 5,8	200,0
Mattoni	K <sup>+</sup>	96,2 ± 6,2	-
	Ca <sup>2+</sup>	122,9 ± 3,3	87,6
	Na <sup>+</sup>	96,8 ± 3,0	71,9
	Mg <sup>2+</sup>	34,3 ± 4,0	24,9
Vincentka	Li <sup>+</sup>	7,7 ± 0,5	9,8

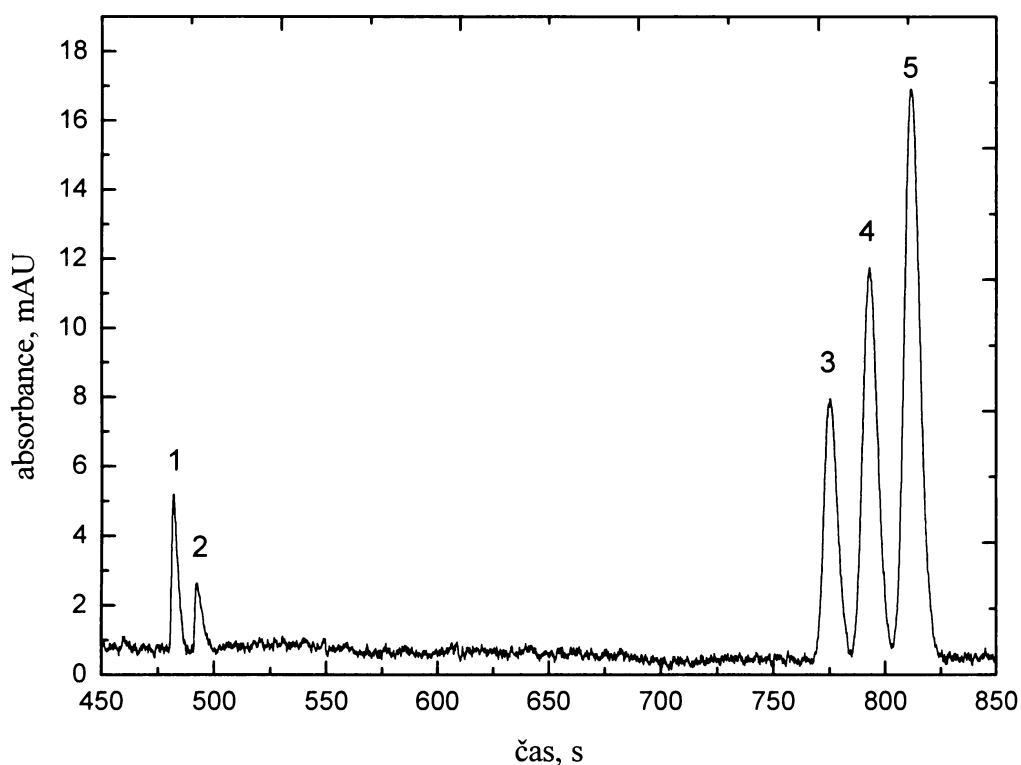
### 3.3 Analýza aminokyselinového potravinového doplňku AminoMAX

#### 3.3.1 Optimalizace detekce a separace s použitím modelových vzorků

Dříve než bylo přistoupeno k analýze, bylo nutno najít vhodné experimentální podmínky pro optickou část detektoru, tj. vhodnou vlnovou délku. Byla proto proměřena absorpční spektra aminokyselin absorbujících UV záření, Arg, His, Trp, Tyr a Phe; spektra jsou na obr. 3.6. Jako optimální vlnová délka pro další měření byla určena vlnová délka 195 nm, ve které sledované aminokyseliny vykazovaly nejvyšší absorpenci; tato vlnová délka byla nastavena ve spektrální části duálního detektoru. Elektroferogram uvedených aminokyselin získaný spektrální částí detektoru při této vlnové délce je na obr. 3.7.



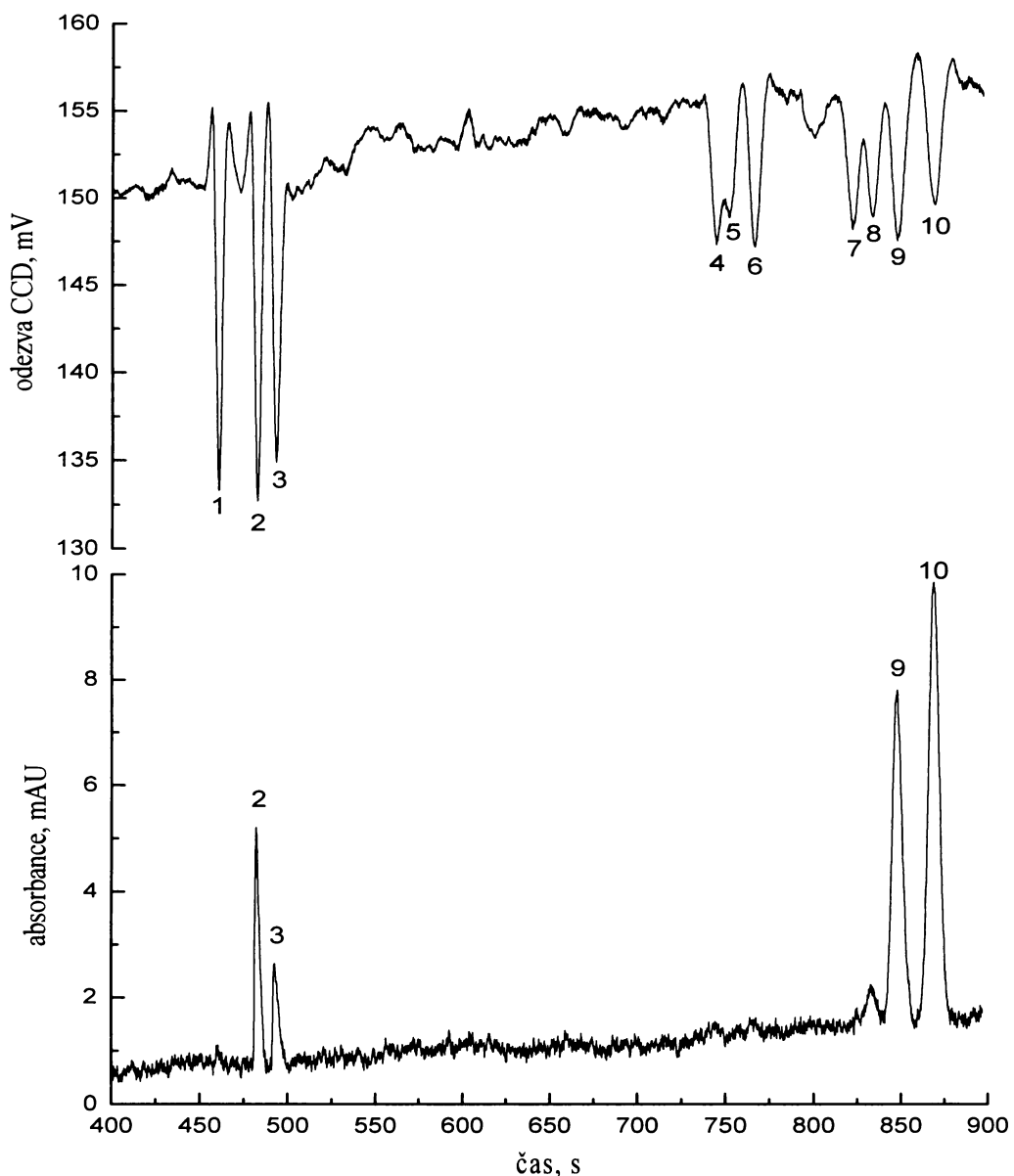
Obr. 3.6. Absorpční spektra aminokyselin Arg (···), His (---), Trp (— · — ·), Phe (··) a Tyr (plná čára) (vodné roztoky, koncentrace 0,25 mmol·dm<sup>-3</sup>).



**Obr. 3.7. Elektroferogram modelové směsi UV záření absorbujících aminokyselin, 1 – Arg, 2 – His, 3 – Trp, 4 – Tyr, 5 – Phe. Koncentrace 0,2 mmol·dm<sup>3</sup>, experimentální podmínky viz tab. 2.3 (záznam pouze ze spektrální části detektoru, 195 nm).**

Rovněž bylo hledáno vhodné separační napětí. Jak již bylo uvedeno v tab. 2.3, používaným separačním prostředím byla čistá kyselina octová bez přídavku povrchově aktivních látek snižujících elektroosmotický tok. Dá se proto očekávat rychlejší migrace aminokyselin kapilárou a tím i méně kvalitní separace. Na modelové směsi deseti vybraných aminokyselin, Lys, Arg, His, Val, Ile, Leu, Thr, Met, Trp a Phe, bylo zkoušeno, nakolik velikost separačního napětí ovlivní separaci. Bylo testováno napětí o velikosti 10, 15 a 20 kV. Jako optimální a pro další práci používané napětí bylo určeno napětí 20 kV. Při tomto napětí byla separace většiny aminokyselin z uvedené směsi dostatečná, pouze Ile a Val se dělí nedostatečně, neúplně rozdělené jsou i Thr a Met, viz obr. 3.8. S nižším napětím došlo k prodloužení doby migrace, ale ne k zlepšení separace.





**Obr. 3.8. Separace modelové směsi aminokyselin za optimalizovaných experimentálních podmínek** uvedených v tab. 2.4. Koncentrace aminokyselin,  $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Identifikace píků: 1 – Lys, 2 – Arg, 3 – His, 4 – Val, 5 – Ile, 6 – Leu, 7 – Thr, 8 – Met, 9 – Trp, 10 – Phe.

Horší separaci některých aminokyselin v separačním pufru bez látek omezujících elektroosmotický tok lze očekávat z výše uvedených důvodů. Separace v čisté kyselině octové snižuje retenční časy, tj. zrychluje analýzu (porovnání retenčních časů změřených v této práci s retenčními časy získanými za srovnatelných experimentálních podmínek, ale v kyselině octové s přidavkem hydroxyethylcelulózy je v tab. 3.3), na druhé straně je však horší separace některých složek vzorku. Metoda

s kyselinou octovou bez modifikátorů elektroosmotického toku proto umožňuje stanovení těch aminokyselin, které jsou v tomto prostředí dobře odděleny od ostatních, přičemž výhodou je menší časová náročnost separace.

**Tab. 3.3 Porovnání migračních časů některých aminokyselin při elektroforetické separaci v roztoku čisté kyseliny octové a v roztoku kyseliny octové s přidavkem 0,1% hydroxyethylcelulózy (HEC) <sup>2</sup>**

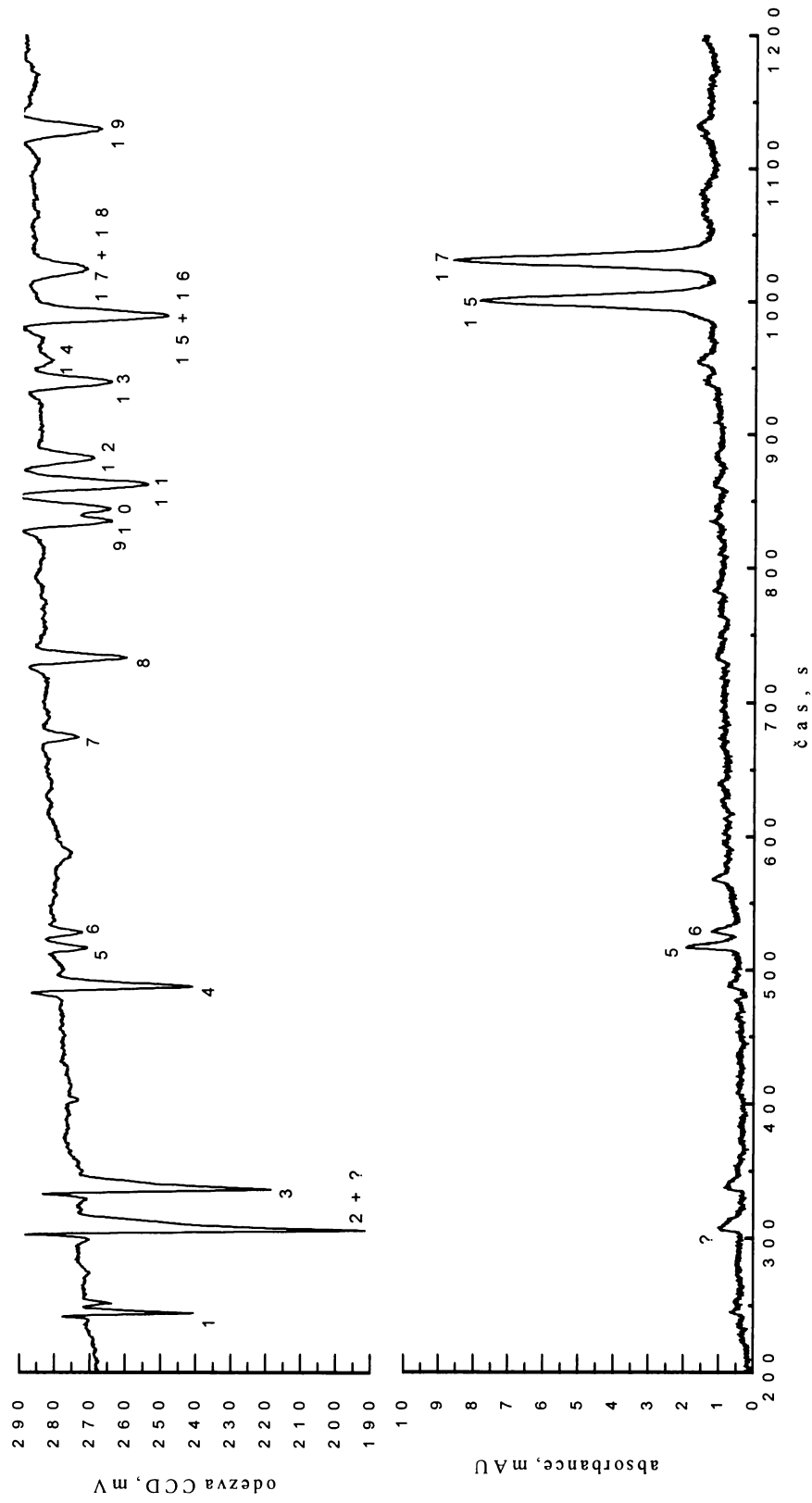
Aminokyselina	Migrační čas v HAc* [s]	migrační čas v HAc+HEC [s]
Lys	460	888
His	494	936
Leu	765	1968
Thr	822	2220
Phe	867	2436

\*) hodnoty migračních časů z elektroferogramů na obr. 3.8

### 3.3.2 Analýza vzorku AminoMAX – orientační měření

Elektroferogram vzorku připraveného mineralizací metodou č. 1 je na obr. 3.9. Nejprve byly identifikovány jednotlivé píky metodou standardního přídávku. Stejně jako v modelovém vzorku se neúplně rozdělil Ile a Val. Zcela nerozdělené byly dvojice Phe – Glu a Tyr – Pro. Určitou výhodou pro identifikaci a stanovení těchto aminokyselin je ta skutečnost, že vždy jedna z nerozdělených aminokyselin absorbuje v UV oblasti a poskytuje tak signál v optické části detektoru. Tryptofan a cystein které jsou také obsaženy v potravinovém doplňku, nemůžou být stanoveny, protože byly pravděpodobně kompletně zničeny kyselou hydrolyzou <sup>52</sup>.

Pro první orientační stanovení byly vybrány aminokyseliny Lys, Ala, Leu, Thr a Phe. Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídávku. Pro kalibraci byly připraveny roztoky obsahující 12 mmol·dm<sup>-3</sup> jednotlivých aminokyselin. 500 µl vzorku mineralizovaného metodou č. 1 (kap. 2.5.2) bylo dávkováno do 2,5 ml vody v dávkovací vialce. Takto zředěný vzorek byl dávkován do separační kapiláry. Pro identifikaci jednotlivých píků bylo k tomuto vzorku postupně přidáváno 50 µl zásobního roztoku jednotlivých aminokyselin. Pro stanovení vybraných aminokyselin



**Obr. 3.9 Elektroferogram vzorku AminoMAX mineralizovaného postupem č. 1 získaný z obou částí duálního detektoru za experimentálních podmínek uvedených v tab. 2.4. Identifikace píků: 1 - K<sup>+</sup>, 2 - Ca<sup>2+</sup>, 3 - Mg<sup>2+</sup>, 4 - Lys, 5 - Arg, 6 - His, 7 - Gly, 8 - Ala, 9 - Ile, 10 - Val, 11 - Leu, 12 - Ser, 13 - Thr, 14 - Met, 15 - Phe, 16 - Glu, 17 - Tyr, 18 - Pro, 19 - Asp.**

byl výše popsaným způsobem změřen vzorek a poté k tomuto vzorku bylo přidáno 50 µl zásobního roztoku vybraných aminokyselin. V případě stanovení Lys, Ala, Leu, Thr byl vyhodnocován signál z vodivostního detektoru a pro Phe byl vyhodnocován signál ze spektrofotometrické části detektoru.

Při manuálním hydrodynamickém dávkování vzorků a vzorků se standardním přídatkem byly získány výsledky uvedené v tab. 3.4. a 3.5. Výsledky v tab. 3.4 byly získány tak, že mineralizovaný vzorek byl pro analýzu připraven v pěti vialkách a každá vialka byla analyzována pouze jednou se vzorkem a jednou po přidání standardního přídatku (postup A). Rozptyl výsledků byl značný. Proto byla testována opakovatelnost stanovení tak, že každá vialka se vzorkem a se standardním přídatkem byla analyzována vždy třikrát po sobě a obsah analytu byl vyhodnocován z průměru z těchto tří měření (postup B); postup B byl opakován dvakrát; výsledky jsou v tab. 3.5. I v tomto případě je rozptyl značný a určené obsahy se liší od těch určených postupem A.

**Tabulka 3.4** Výsledky analýzy vybraných aminokyselin při manuálním hydrodynamickém dávkování – postup A, viz text.

Aminokyselina	Obsah mg/kapsli*	Rozpětí
Lys	56,9	47,1
Ala	28,3	32,3
Leu	41,6	32,4
Thr	28,7	39,7
Phe	13,6	5,8

\*) medián z pěti měření

**Tabulka 3.5** Výsledky analýzy vybraných aminokyselin při manuálním hydrodynamickém dávkování – postup B, viz text.

Aminokyselina	Obsah mg/kapsli*	Rozpětí
Lys	89,8	16,7
Ala	65,4	26,1
Leu	140,1	84,8
Thr	49,8	13,9
Phe	19,3	3,3

\*) průměr ze dvou měření

Protože výsledky stanovení aminokyselin v reálném vzorku měly velký rozptyl, byl postup stanovení ověřován analýzou modelové směsi stanovovaných aminokyselin o známém obsahu. Pro kontrolu bylo do testovací směsi přidáno ještě známé množství draselného iontu. Stanovení bylo opět prováděno metodou standardního přídatku (postup B). Experimentální podmínky jsou stejné jako v případě stanovení aminokyselin, viz. tab. 2.3. Výsledky jsou v tab. 3.6. Jak je vidět, tak je nalezená koncentrace mnohem větší než skutečná, připravená koncentrace. Chyba je zřejmě v manuálním dávkování, proto byl stejný experiment opakován s využitím automaticky pracující dávkovací části komerční elektroforetické aparatury. Experimentální podmínky jsou stejné jako v případě stanovení aminokyselin, viz. tab. 2.3, změněno bylo pouze dávkování na 200 mbar s. Výsledky jsou v tab. 3.7. Akceptovatelná shoda daných a nalezených koncentrací testovaných analytů dokazuje, že problém s rozptylem výsledků byl způsoben zřejmě manuálním dávkováním. Proto pro další práci bylo používáno automatické hydrodynamické dávkování.

**Tabulka 3.6 Výsledky analýzy vybraných aminokyselin a draselného iontu při manuálním hydrodynamickém dávkování.**

<b>Analyt</b>	<b>Koncentrace daná, mmol.dm<sup>-3</sup></b>	<b>Koncentrace určená, mmol.dm<sup>-3</sup></b>	<b>rozdíl, %</b>
K <sup>+</sup>	0,49	1,04	112
Lys	0,39	0,55	41
Ala	0,39	0,49	24
Leu	0,39	0,42	8
Thr	0,39	0,48	22
Phe(CCD)	0,39	0,47	20
Phe(UV)	0,39	0,43	10

**Tabulka 3.7 Výsledky analýzy vybraných aminokyselin a draselného iontu při automatickém hydrodynamickém dávkování.**

Analyt	Koncentrace daná, mmol.dm <sup>-3</sup>	Koncentrace určená, mmol.dm <sup>-3</sup>	rozdíl, %
K <sup>+</sup>	0,30	0,40	33
Lys	0,36	0,38	6
Ala	0,36	0,34	-5
Leu	0,36	0,35	-2
Thr	0,36	0,35	-2,5
Phe(CCD)	0,36	0,40	11
Phe(UV)	0,36	0,39	7

### 3.3.3 Stanovení aminokyselin v nerozdělené směsi

Duální detektor v principu umožňuje stanovení takových aminokyselin (obecně analytů), které vychází ze separační kapiláry nerozděleny, obě poskytují signál vodivostního detektoru, ale pouze jedna signál UV detektoru. Ve studovaném vzorku šlo např. o aminokyseliny Pro a Tyr, jak je vidět na obr. 3.9 píky 17 a 18. Obě poskytují signál vodivostního detektoru, ale pouze Tyr signál UV detektoru. Ověření, zda lze z odezev obou detektorů stanovit obě aminokyseliny v nerozdělené směsi bylo testováno za experimentálních podmínek uvedených v tab. 2.4.

Nejdříve bylo ověřováno zda platí, že celková plocha píku Pro a Tyr je součtem jednotlivých ploch připadající Pro a Tyr. Do vialky bylo dáno 20  $\mu$ l 12 mmol·dm<sup>-3</sup> Pro do 1 ml vody a byla změřena jeho odezva v CCD (plocha píku). Totéž bylo uděláno pro Tyr, kdy do 1 ml vody bylo dáno 15  $\mu$ l 12 mmol·dm<sup>-3</sup> Tyr. Následně byla změřena směs Tyr a Pro, kdy do 1 ml vody bylo dáno 20  $\mu$ l Pro a 15  $\mu$ l Tyr. Naměřené hodnoty ploch píků jsou uvedeny v tab. 3.8.

Jak je vidět z tab. 3.8, platí, že plocha směšného píku Pro a Tyr je součtem jednotlivých ploch obou aminokyselin. Této skutečnosti lze využít pro stanovení Pro a Tyr. Koncentrace Tyr se stanoví na základě kalibrace z UV signálu. Z takto určené koncentrace se z kalibrační rovnice pro CCD určí odpovídající plocha píku, která se odečte od plochy píku, kterou poskytuje směsný pík Tyr a Pro. Tak se získá plocha

**Tabulka 3.8** Ověření, zda plocha píku směsi Pro + Tyr odpovídá součtu ploch jednotlivých aminokyselin při detekci vodivostním detektorem. Hodnoty jsou mediánem ze tří měření.

Parametr	Pro	Tyr
dávkováná koncentrace $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,24	0,18
plocha píku $\text{mV}\cdot\text{s}$	$12,19 \pm 2,08$	$12,43 \pm 0,25$
suma ploch Pro + Tyr	$25,54 \pm 1,94$	

píku z CCD, která odpovídá Pro. Z této plochy se z kalibrační rovnice následně určí i koncentrace Pro.

Toto stanovení Pro vedle Tyr bylo testováno na uměle připravené směsi o známé koncentraci obou aminokyselin. Směs obsahovala Tyr o koncentraci  $0,34 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a Pro o koncentraci  $0,39 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Kalibrace byla opět prováděna metodou vnějšího standardu, tj. pro obě aminokyseliny byla změřena kalibrační závislost. Kalibrační data pro stanovení Pro a Tyr jsou v tab. 3.9. Kalibrační závislosti byly určovány ze čtyř koncentrací, každý bod je průměrem ze tří opakovaných měření. Vzorek byl měřen třikrát, každé stanovení je průměrem ze tří měření. Výsledky stanovení Pro a Tyr jsou v tab. 3. 10.

**Tabulka 3.9** Parametry kalibračních závislostí pro stanovení Pro a Tyr pro vodivostní detekci i detekci optickou (UV):  $y$  je odezva v mV (vodivostní detekce) nebo v mAU (optická detekce),  $c$  je v  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Analyt	Rovnice regresní přímky*	Konc. rozsah, $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	Standardní chyba	Korelační koeficient
Tyr (CCD)	$y = -1,85 (1,59) + 95,20 \cdot 10^3 (3,92 \cdot 10^3) c$	0,24 – 0,63	1,19	0,9983
Tyr (UV)	$y = -78,73 (73,86) + 4,53 \cdot 10^6 (1,83 \cdot 10^5) c$	0,24 – 0,63	55,26	0,9984
Pro (CCD)	$y = -1,65 (6,12) + 68,36 \cdot 10^3 (15,88 \cdot 10^3) c$	0,24 – 0,63	3,18	0,9741

\*) v závorkách jsou standardní odchylky; rozměr hodnoty úseku, směrnice a standardní chyby je mV,  $\text{mV}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{mV}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  (vodivostní část detektoru) či mAu,  $\text{mAU}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{mAU}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  (optická část detektoru).

**Tabulka 3.10 Výsledky stanovení Pro a Tyr v modelové směsi.**

<b>Aminokyselina</b>	<b>Koncentrace daná, mmol.dm<sup>-3</sup></b>	<b>Koncentrace určená, mmol.dm<sup>-3</sup></b>
Tyr	0,34	0,33 ± 0,01
Pro	0,39	0,39 ± 0,03

Jak je patrné z tab. 3.10, tak lze pomocí duálního detektoru stanovit Tyr a Pro, i když se neseperují a vystupují z kapiláry ve společném píku.

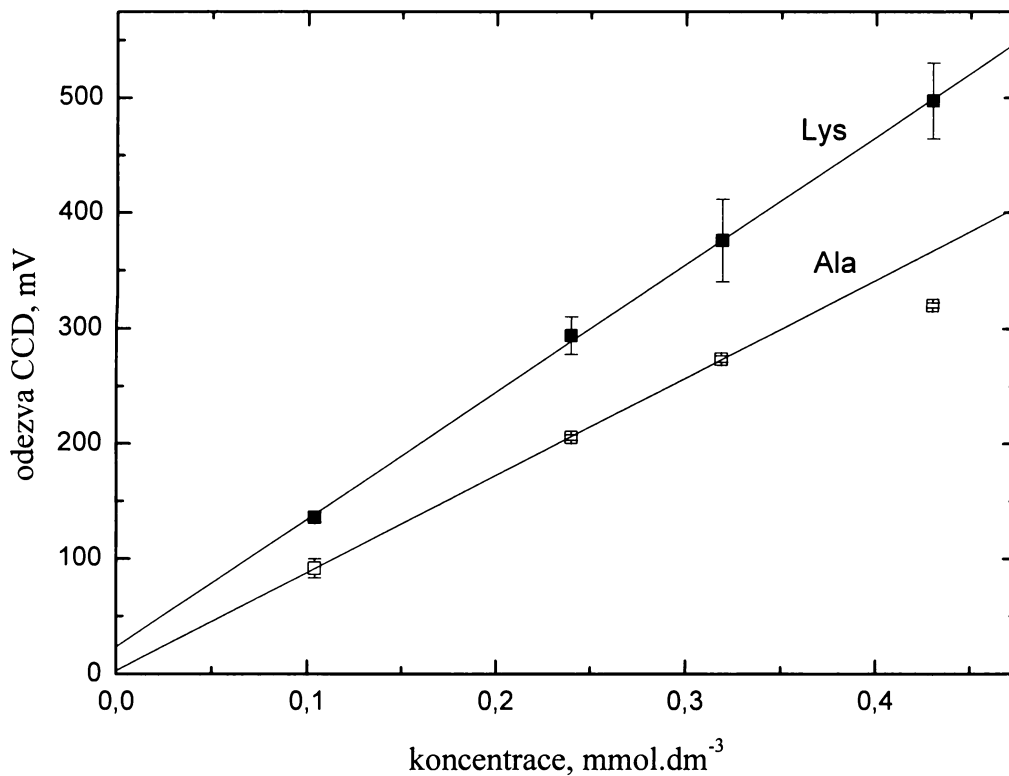
Duální detekce tak umožňuje současnou detekci látek různého typu a přispívá významně k jejich identifikaci, ale umožňuje v určitých případech stanovit i látky, které se za použitých experimentálních podmínek neseperují. Je pouze zapotřebí, aby v nerozdělené směsi jedna z nich poskytovala signal pouze z jednoho detektoru a obě z detektoru druhého.

### **3.3.4 Stanovení vybraných složek potravinového doplňku AminoMAX**

Po vyřešení problémů s dávkováním byly pro stanovení vybrány tyto komponenty vzorku: aminokyseliny Ala, Gly, Lys, Thr, Pro, Phe, Tyr a kationty Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. Stanovení bylo pro srovnání prováděno jak se vzorkem mineralizovaným metodou č. 1 (klasická tepelná mineralizace), tak i metodou č. 2 (mineralizace za působení mikrovln). Kalibrace byla tentokrát prováděna metodou vnějšího standardu, tj. pro každý analyt byla změřena kalibrační závislost. Důvodem pro změnu kalibrační metody byla nejistota, zda všechny analyty poskytují lineární závislost odezvy bezkontaktního detektoru na koncentraci. Při bezkontaktní vodivostní detekci jsou nelineární koncentrační závislosti často pozorovány. Pro ilustraci je na obr. 3.10 ukázán kalibrační graf pro Leu a Ala, z něž je zřejmé, že skutečně, pro některé aminokyseliny, zde pro Ala, je kalibrační graf v testovaném oboru koncentrací nelineární. Kalibrační data pro lineární části kalibračních závislostí všech



stanovovaných analytů jsou v tab. 3.11. Kalibrační závislosti byly určovány ze čtyř koncentrací, každý bod je průměrem ze tří opakovaných měření.



**Obr. 3.10** Kalibrační graf pro Leu a Ala pro vodivostní část detektoru. Experimentální podmínky viz tab. 2.5.

Výsledky stanovení vybraných analytů ve vzorku mineralizovaném metodou č. 1 jsou v tab. 3.12 a mineralizovaném metodou č. 2 v tab. 3.13. Mineralizace v mikrovlnném mineralizátoru byla prováděna dvakrát se stejnou navázkou. Při stanovení vzorku mineralizátu metodou č. 1 i metodou č. 2 byl pro Lys, Gly, Ala, Thr, Pro, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> vyhodnocován signál z vodivostní části detektoru a pro Phe a Tyr byl vyhodnocován signál ze spektrofotometrické části detektoru.

**Tabulka 3.11. Parametry kalibračních závislostí stanovovaných analytů v přípravku AminoMAX pro vodivostní detekci i detekci optickou (UV):  $y$  je odezva v mV (vodivostní detekce) nebo v mAU (optická detekce),  $c$  je v mmol.dm<sup>-3</sup>.**

Analyt	Rovnice regresní přímky*	Konc. rozsah, mmol.dm <sup>-3</sup>	Standardní chyba	Korelační koeficient
Lys	$y = 18,60 (9,52) + 1,13 \cdot 10^6 (72,77 \cdot 10^6) c$	0,10 – 0,43	0,24	0,9997
Gly	$y = 4,85 (0,03) + 70,61 \cdot 10^4 (311,83) c$	0,06 – 0,21	0,02	1,0000
Ala	$y = 0,89 (9,10) + 85,37 \cdot 10^4 (3,38 \cdot 10^4) c$	0,10 – 0,32	0,29	0,9999
Thr	$y = - 14,17 (2,35) + 1,02 \cdot 10^6 (2,03 \cdot 10^4) c$	0,10 – 0,32	0,06	1,0000
Pro	$y = - 52,86 (4,95) + 4,57 \cdot 10^5 (6,31 \cdot 10^3) c$	0,35 – 0,79	0,77	0,9998
Phe(UV)	$y = 16,76 (5,60) + 9,55 \cdot 10^5 (2,99 \cdot 10^4) c$	0,10 – 0,33	1,33	0,9990
Tyr	$y = 11,12 (1,60) + 8,35 \cdot 10^5 (7,66 \cdot 10^3) c$	0,12 – 0,52	0,31	0,9999
Tyr(UV)	$y = 19,83 (8,41) + 1,47 \cdot 10^6 (4,57 \cdot 10^4) c$	0,10 – 0,33	1,54	0,9977
Ca <sup>2+</sup>	$y = 51,15 (3,91) + 5,93 \cdot 10^5 (1,39 \cdot 10^4) c$	0,15 – 0,46	0,57	0,9997
Mg <sup>2+</sup>	$y = 58,62 (4,86) + 7,01 \cdot 10^5 (2,02 \cdot 10^4) c$	0,15 – 0,37	1,44	0,9991

\*) v závorkách jsou standardní odchylky; rozměr hodnoty úseku, směrnice a standardní chyby je mV, mV·dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>, mV·dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup> (vodivostní část detektoru) či mAu, mAU·dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>, mAU·dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup> (optická část detektoru).

**Tabulka 3.12 Výsledky stanovení vybraných analytů v potravinovém doplňku AminoMAX. Vzorek byl mineralizován metodou č. 1, tj. klasickou tepelnou mineralizací. Uváděné hodnoty jsou mediánem ze tří opakovaných stanovení.**

Analyt	Obsah, mg/kapsli		Rozpětí		Standardní odchylka	
	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza
Lys	40,3 ± 2,3		1,77		1,05	
Gly	7,6 ± 0,7		0,54		0,32	
Ala	20,4 ± 1,6		1,26		0,74	
Thr	25,4 ± 1,7		1,28		0,77	
Pro	23,4 ± 4,2		3,21		1,89	
Phe(UV)	15,3 ± 1,0		0,75		0,44	
Tyr(UV)	10,3 ± 1,17		0,90		0,53	
Ca <sup>2+</sup>	–*					
Mg <sup>2+</sup>	12,7 ± 1,4		1,08		0,64	

\*) ve vzorku takto mineralizovaném nemohl být vápník stanoven, jeho pík byl překryt neidentifikovanou komponentou roztoku.

**Tabulka 3.13 Výsledky stanovení vybraných analytů v potravinovém doplňku AminoMAX. Vzorek byl mineralizován metodou č. 2, tj. hydrolýzou v mikrovlnném mineralizátoru. Uváděné hodnoty jsou mediánem ze tří opakovaných stanovení.**

Analyt	Obsah, mg/kapsli		Rozpětí		Standardní odchylka	
	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza
Lys	40,2 ± 4,0	41,1 ± 5,8	3,06	4,45	1,81	2,62
Gly	8,3 ± 1,4	8,7 ± 0,5	1,07	0,35	0,63	0,21
Ala	22,4 ± 1,6	24,0 ± 2,7	1,21	2,07	0,71	1,22
Thr	28,1 ± 0,7	28,9 ± 1,4	0,50	1,05	0,30	0,62
Pro	25,8 ± 4,2	–*	4,2		2,48	
Phe(UV)	15,5 ± 3,1	–*	2,42		1,43	
Tyr(UV)	9,7 ± 1,9	–*	1,52		0,90	
Ca <sup>2+</sup>	44,7 ± 5,9	50,6 ± 2,5	4,52	1,92	2,67	1,13
Mg <sup>2+</sup>	18,4 ± 4,3	18,5 ± 1,2	3,27	0,93	1,93	0,55

\*) nebyl stanovován

Pro porovnání získaných výsledků metodou mineralizace č. 1 či metodou č. 2 (1. analýza) byl použit Lordův test, tab. 3.14. Obě metody jsou srovnatelné, pouze v případě Ala, Thr a  $Mg^{2+}$ , je rozdíl statisticky významný, což je dáno menším rozpětím. Pro mineralizaci vzorku, tak lze použít obě uvedené metody. Mikrovlnná mineralizace je ale časově méně náročná. I s filtrací je vzorek ke stanovení připraven do 30 minut, oproti klasické 24 hodinové mineralizaci.

**Tabulka 3.14 Testování shodnosti výsledků stanovení vybraných aminokyselin po klasické (metoda č. 1) a mikrovlnné (metoda č. 2) mineralizaci. Použit byl Lordův test, jako střední hodnota ze tří měření byl brán medián (kritická hodnota testu  $u_{0,05} = 0,63$ )**

<b>Analyt</b>	<b><i>u</i></b>
Lys	0,021
Gly	0,447
Ala	0,810
Thr	1,461
Pro	0,324
Phe(UV)	0,063
Tyr(UV)	0,248
$Ca^{2+}$	—*
$Mg^{2+}$	1,310

\*) ve vzorku mineralizovaném metodou č. 1 nemohl být vápník stanoven

Porovnání stanoveného obsahu vybraných analytů s jejich obsahem udávaném na etiketě bylo provedeno se vzorkem mineralizovaným v mikrovlnném mineralizátoru, analýza č. 1. Na etiketě je udáván obsah v denní dávce, tj. v šesti kapslích. Porovnání je v tab. 3.15.

**Tab. 3.15 Porovnání výsledků analýzy vybraných analytů s hodnotami uvedenými na etiketě potravinového doplňku (obsahy v mg/6 kapslí = denní dávka).**

<b>Analyt</b>	<b>Obsah na etiketě, mg/6 kapslí</b>	<b>Stanovený obsah, mg/6 kapslí</b>	<b>Rozdíl v %</b>
Lys	283	241	- 15
Gly	57	50	- 12
Ala	160	134	- 16
Thr	141	168	19
Pro	144	154	7
Phe	105	93	- 11
Tyr	120	58	- 52
Ca <sup>2+</sup>	98	588	600
Mg <sup>2+</sup>	80	110	38

Veliký rozdíl mezi stanoveným množstvím Ca<sup>2+</sup> a uvedené hodnotě na etiketě může být způsoben tím, že pík Ca<sup>2+</sup> komigruje s píkem neidentifikovatelné látky jako v případě mineralizace metodou č 1, viz obr. 3.9 pík č. 2. Oproti tomu tyrosinu bylo nalezeno ve vzorku méně než udává etiketa. To je pravděpodobně způsobeno tím, že při kyselé hydrolýze je tyrosin částečně zničen stopami nečistot v hydrolyzační směsi<sup>47</sup>.

## 4 Závěr

Kapilární zónová elektroforéza s duální detekcí se ukázala jako účinná analytická metoda při stanovování aminokyselin i anorganických iontů v reálném vzorku. Bylo též ukázáno, že jako separační elektrolyt může být použita kyselina octová bez přídavku povrchově aktivní látky, což sice vedlo k horší separaci směsi, ale zkrátila se doba analýzy. Problém se zhoršenou separací umožňuje někdy vyřešit použitá duální detekce. Duální detekce se ukázala velmi výhodnou v případě, že jednotlivé píky látek nebyly separovány, obě jsou detekovatelné jednou částí detektoru, ale druhou částí detektoru pouze jedna z nich. To bylo demonstrováno v případě aminokyselin tyrosinu a prolinu. Bylo též ověřeno, že při stanovení aminokyselin ve vzorcích peptidů jsou srovnatelné klasická kyselá mineralizace i mineralizace za použití mikrovln. Celková doba analýzy se však významně zkrátí použitím mikrovlnné hydrolýzy pro rozklad vzorku.

Při analýze aminokyselinového potravinového doplňku se ukázalo, že manuální dávkování je málo reprodukovatelné, výrazně výhodnější je dávkování automatizované. Při analýzách minerálních vod však bylo manuální dávkování použitelné. Důvod, proč tomu tak je, není znám. Lze usuzovat, že příčinou je snad složitost vzorku; manuální dávkování je použitelné v případě jednodušších vzorků, kdežto při dávkování vzorků tvořených komplikovanější směsí většího množství látek je nevyhovující.

**Cíl práce byl splněn. Bylo ukázáno, že duální detektor lze s výhodou použít při analýzách reálných vzorků obsahujících jak anorganické ionty, tak i organické ionty. Duální detekce tak umožňuje současnou detekci látek různého typu a přispívá významně nejen k jejich identifikaci, ale umožňuje v určitých případech stanovit i látky, které se za použitých experimentálních podmínek neseparují.**

# Literatura

1. Novotný, M., Opekar, F., Jelínek, I.: *Chem. Listy* **99**, 132 (2005)
2. Chvojka, T., Jelínek, I., Opekar, F., Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **433**, 13 (2001)
3. Novotný, M., Opekar, F., Jelínek, I., Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **525**, 17 (2004)
4. Fořt, P.: *Sport a správná výživa*, Praha, Ikar 2002
5. Kodíček, M.: *Biochemické pojmy, výkladový slovník*, Praha, Vydavatelství VŠCHT 2004
6. A. Samcová, E., Tůma, P.: *Electroanalysis* **18**, 152 (2006)
7. Oates, M. D, Cooper, B. R., Jorgenson, J. W.: *Anal. Chem.* **62**, 1573 (1990)
8. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 671 (2003)
9. Zhang, D., Zhang, J., Ma, W., Chen, D., Han, H., Shu, H., Liu, G.: *J. Chromatogr. B* **758**, 277 (2001)
10. Frazier, R. A.: *Electrophoresis* **22**, 4197 (2001)
11. Frazier, R. A., Papadopoulou, A.: *Electrophoresis* **24**, 4095 (2003)
12. Klampf, C. W.: *Electrophoresis* **22**, 1579 (2001)
13. G. Klampf, C. W., Diep, T., Vo, T.: *J. Liq. Chromatogr.* **26**, 2783 (2003)
14. Komarova, N. V., Kamenstev, J. S., Salomonova, A. P., Anufrieva, R. M.: *J. Chromatogr. B* **800**, 135 (2004)
15. Ding, Y., Yu, H., Mou, S.: *J. Chromatogr. A* **982**, 237 (2002)
16. Issaq, H. J.: *Electrophoresis* **22**, 3629 (2001)
17. Smith, J. T.: *Electrophoresis* **20**, 3078 (1999)
18. Costin, J.W., Francis, P. S., Lewis, S. W.: *Anal. Chim. Acta* **480**, 67 (2003)
19. Fiamegos, Y. C., Stalikas, C. D.: *J. Chromatogr. A* **1110**, 66 (2006)
20. Prata, C., Bonnafous, P., Fraysse, N., Treilhou, M., Poincon, V., Couderc, F.: *Electrophoresis* **22**, 4129 (2001)
21. Poincot, V., Bayle, C., Couderc, F.: *Electrophoresis* **24**, 4047 (2003)
22. Poincot, V., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G., Feurer, B., Couderc, F.: *Electrophoresis* **27**, 176 (2006)
23. J. Song, Y., Feng, Y., LeBlanc, M. H., Zhao, S., Liu, Y. M.: *Anal. Chem.* **78**, 8121 (2006)
24. Kubáň, K., Hauser, P. C.: *J. Chromatogr. A* **1128**, 97 (2006)

25. Gatti, R., Gioia, M. G., Andreatta, P., Pentassugha, G.: *J. Pharm. Biomed. anal.* **35**, 339 (2004)
26. Papadoyannis, I., Samanidou, V., Theodoridis, G.: *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 1409 (1991)
27. Hanko, V. P., Rohrer, J. S.: *Anal. Biochem.* **324**, 29 (2004)
28. Yu, H., Ding, Y. S., Mou, S. F.: *Chromatographia* **57**, 11 (2003)
29. Darragh, A. J., Garrick, D. J., Moughan, P. J., Hendriks, W. H.: *Anal. Biochem.* **236**, 199 (1996)
30. Molnár – Perl, I.: *J. Chromatogr. A* **913**, 283 (2001)
31. Tatár, N., Kalifa, M., Záray, G., Molnár – Perl, I.: *J. Chromatogr. A* **672**, 109 (1994)
32. Molina, M., Salva, M.: *Electrophoresis* **23**, 2333 (2002)
33. Qian, D., Wenrui, J., Jihao, S.: *Electrophoresis* **23**, 559 (2002)
34. Smith, J. T.: *Electrophoresis* **18**, 2377 (1997)
35. Klampf, C. W., Ahrer, W.: *Electrophoresis* **22**, 1579 (2001)
36. Žunić, G., Jelić–Ivanović, Z., Čolić, M., Spasić, S.: *J. Chromatogr. B* **772**, 19 (2002)
37. Gaš, B., Vacík, J.: *Chem. Listy* **74**, 652 (1980)
38. Gaš, B., Demjanenko, M., Vacík, J.: *J. Chromatogr* **192**, 253 (1980)
39. Zemann, A. J., Schnell, E., Vogel, D., Bonn, G. K.: *Anal. Chem.* **70**, 563 (1998)
40. Fracassi da Silva, A. J., do Lago, C. L.: *Anal. Chem.* **70**, 4339 (1998)
41. Tůma, P., Opekar, F., Jelínek, I., Štulík, K.: *Elektroanalysis* **13**, 989 (2001)
42. Šolínová, V., Kašička, V.: *J. Sep. Sci* **29**, 1743 (2006)
43. Tanyanyiwa, J., Schweizer, K., Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **24**, 2119 (2003)
44. Tůma, P., Samcová, E., Andělová, K.: *J. Chromatogr. B* **839**, 12 (2006)
45. Kaml, I., Včeláková, K.: *J. Sep. Sci.* **27**, 161 (2004)
46. Tan, F., Yang, B. C., Guan, Y. F.: *Anal. Sci.* **21**, 583 (2005)
47. Fujiya, N. M., Tavares, M. F. M.: *J. Sep. Sci.* **26**, 562 (2003)
48. Zahou, E., Jörnvall, H., Bergman, T.: *Anal. Biochem.* **281**, 115 (2000)
49. Zhao, S., Xie, C., Lu, X., Song, Y., Liu, Y.-M.: *Electrophoresis* **26**, 1745 (2005)
50. Skocir, E., Vindevogel, J., Sandra, P.: *Chromatographia* **39**, 7 (1994)
51. Hirs, C. H., W., Stein, W. H., Moore, S.: *J. Biol. Chem.* **211**, 941 (1954)



52. Fountoulakis, M., Lahm, H., W.: *J. Chromatogr. A* **826**, 106 (1998)
53. Csapó, J., Csapó-Kiss, Z., Wágner, L., Tálos, T., Martin, T., Folestad, S., Tivesten, A., Némethy, S.: *Anal. Chim. Acta* **339**, 99 (1997)
54. Morales-Rubio, A., Terezo, J., Salvador, A., de la Guardia. M.: *Microchem J.* **47**, 270 (1993)
55. Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J. F., Lam, H. W., Fountoulakis, M.: *J. Chromatogr. A* **795**, 263 (1998)
56. Simpson, R. J., Neuberger, M. R., Liu, T. Y.: *J. Biol. Chem.* **251**, 1936 (1976)
57. Chiou, S., H., Wang, K., T.: *J. Chromatogr.* **448**, 404 (1988)
58. Molnár-Perl, I.: *J. Chromatogr. A* **763**, 1 (1997)
59. Kroll, J., Radel, H., Kröck, R.: *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* **207**, 202 (1998)