

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**MOŽNOSTI STANOVENÍ BIOLOGICKY  
AKTIVNÍCH LÁTEK V POTRAVINOVÝCH  
DOPLŇCÍCH - GLUKOSAMIN SULFÁT**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Vatahová Lenka

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému Ph.D. za jeho vstřícnost, trpělivost, cenné rady a připomínky, díky kterým byla tato práce napsána.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Dalibora Šatínského Ph.D. K získání informací ke zpracovávanému tématu jsem použila literatury a internetových zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne 2010 v Hradci Králové

.....

## Obsah

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
2. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Chemická struktura a vlastnosti glukosaminu.....	8
3.2 Výskyt.....	8
3.3 Biosyntéza.....	9
3.4 Využití glukosaminu.....	10
3.4.1 Osteoartróza.....	10
3.4.2 Léčba osteoartrózy.....	11
3.5 Farmakokinetika.....	12
3.5.1. Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Exkrece (ADME).....	12
3.5.2 Koncentrace a dávkování.....	12
3.6 Účinky GS.....	13
3.6.1 Účinek GS na degradační enzymy.....	13
3.6.2 Účinek na proteosyntézu.....	13
3.6.3 Účinek na snížení hladiny lipidů.....	13
3.6.4 Antioxidační účinky.....	13
3.6.5 Imunostimulační účinky.....	14
3.6.6 Vedlejší účinky.....	14
3.7 Mechanismus účinku.....	14
3.7.1 Syntéza GAG.....	14
3.7.2 Degradace GAG.....	15
4. ANALYTICKÉ STANOVENÍ GS.....	15
4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
4.1.1 Rozdělení chromatografických metod.....	15
4.1.2 Princip HPLC.....	16
4.1.3 Instrumentace HPLC.....	17
4.2 Možnosti stanovení GS metodou HPLC.....	19

4.2.1 Stanovení GS pomocí HPLC s derivatizací FMOC- Su .....	19
4.2.2 HPLC s refraktometrickou detekcí .....	19
4.2.3 HPLC s fluorescenční detekcí .....	20
4.2.4 HPLC s derivatizací FMOC- Cl .....	21
4.2.5 Stanovení LC s hmotnostní spektrometrií.....	21
4.3 Kapilární elektroforéza .....	22
4.3.1 Princip elektroforézy .....	22
4.3.2 Instrumentace kapilární elektroforézy .....	25
4.4 Možnosti stanovení GS pomocí CE .....	26
4.4.1 Stanovení glukosaminu kapilární elektroforézou po derivatizaci kyselinou antranilovou (AA), s použitím UV detekce .....	26
4.4.2 Stanovení glukosaminu metodou CE s dansylační derivatizací .....	27
4.4.3 Stanovení glukosaminu kapilární elektroforézou s mikročipem. ....	28
4.4.4 Stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích a léčivech metodou CE s bezkontaktním vodivostním detektorem .....	29
4.4.5 Stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích metodou CE po derivatizaci s OPA.....	29
4.4.6 Separace monosacharidů a glykoproteinů značených AMAC metodou CE na mikročipu.....	29
4.4.7 Rychlá analýza aminocukrů metodou CE s mikročipem a LIF detekcí .....	30
5. <b>ZÁVĚR</b> .....	31
6. <b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	32

## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>AA</b>	Antranilová kyselina
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>CE</b>	Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
<b>CEC</b>	Kapilární elektrochromatografie
<b>CGE</b>	Kapilární gelová elektroforéza
<b>CIEF</b>	Kapilární izoelektrická fokusace
<b>COX</b>	Cyklooxygenasa
<b>CZE</b>	Kapilární zónová elektroforéza
<b>Detektor s LIF</b>	Detektor s laserem indukovanou fluorescencí
<b>ER</b>	Endoplazmatické retikulum
<b>F6P</b>	Fruktoza-6 fosfát
<b>FMOC - Su</b>	N-(fluorenylmethoxykarbonyloxy) sukcinimid
<b>G6P</b>	Glukoza-6 fosfát
<b>GA</b>	Golgiho aparát
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykany – (mukopolysacharidy) nevětvené polysacharidy obsahující deriváty uronových kyselin a hexosaminové zbytky. Tvoří mezibuněčnou hmotu v pojivové tkáni- především chrupavky, vazy a šlachy.
<b>GH</b>	Glukosamin hydrochlorid
<b>GNAS</b>	Glukosamin N- acetyl sulfát
<b>GP</b>	Glykoprotein

<b>GS</b>	Glukosamin sulfát
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IL1</b>	Interleukin 1
<b>LOD</b>	Limit detekce
<b>MECC</b>	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
<b>MF</b>	Mobilní fáze
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie
<b>NaOH</b>	Hydroxid sodný
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Uhličitan sodný
<b>NAS</b>	Nesteroidní antirevmatika
<b>OA</b>	Osteoartritida
<b>ODS</b>	Oktadecylsilikagel
<b>OPA</b>	orto-ftalaldehyd
<b>OS</b>	Oktasilikagel
<b>PLA</b>	Fosfolipáza A
<b>RP</b>	Obrácená fáze (reverse phase)
<b>RSD</b>	Relativní směrodatná odchylka
<b>SYSADOA</b>	Symptomatic slow acting drug for osteoarthritis
<b>TG</b>	Triglyceridy
<b>UV</b>	Ultraviolet, ultrafialové spektrum
<b>VIS</b>	Visible, viditelné spektrum

## 2. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Glukosamin sulfát patří mezi aminocukry syntetizovaný chondrocyty. Je součástí šlach a především kloubů, mezi jeho hlavní funkce patří tvorba chrupavky, zpevnění kloubu a potlačení degenerativních změn v kloubech. Pro tyto jeho vlastnosti se používá jako doplněk při léčbě osteoartritidy (OA). Mezi analytické metody umožňující stanovení glukosaminu patří především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE).

Cílem této rešeršní práce bylo shromáždit informace o glukosaminu sulfátu a možnostech jeho stanovení v potravinových doplňcích.

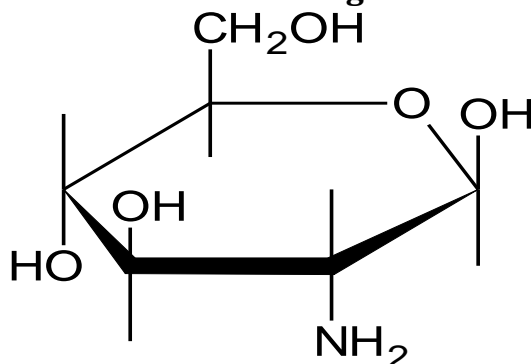
Zaměřuji se na nejvíce používané analytické metody ke stanovení této látky, čímž je výše zmíněná HPLC a elektroforéza.

Jako zdroj informací byl nejvíce vyžíván elektronický informační zdroj Web of Science a Science Direct, dále jsem čerpala z internetových stránek [www.google.com](http://www.google.com) a [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org) Nejčastěji používaná klíčová slova byla: *Glucosamine, Glucosamine sulphate (sulfate), evaluation of glucosamine sulphate, determination of glucosamin sulphate by HPLC, determination of glucosamine sulphate by ELFO and micronutrients.*



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Chemická struktura a vlastnosti glukosaminu



Obrázek č. 1: chemická struktura glukosaminu (1)

Strukturálně je glukosamin přeměněná glukóza, kde  $\text{NH}_2$  skupina nahrazuje OH. Je rozpustný ve vodě. Aminoskupina poskytuje kladný náboj (2). Glukosamin (2- amino-D- glukopyranosa) patří mezi aminocukry, což je tedy zvláštní třída obsahující jak hydrofilní, tak ionizovatelnou funkční skupinu. Mezi nejdůležitější aminocukry patří hexosaminy (glukosamin, galaktosamin a mannosamin). Aminocukry jsou složkou GAG, GP a některých glykolipidů (3). Aminoskupina je vysoce reaktivní a často je acetylována a vzniká tak acetylaminocukr. Jejich acetylovaná forma nejčastěji tvoří polysacharidy- ty se nejvíce skládají z N- acetyl – D- glukosaminových řetězců (4).

#### 3.2 Výskyt

Glukosamin je hlavním aminocukrem, nachází se v mukopolysacharidech, mukoproteinech (GAG), glykoproteinech, a v chitinu. Je produkován zejména v mořských plodech- měkkýších a koryšcích a tvoří klíčovou stavební jednotku ve složkách chrupavky. Každý člověk je schopný produkovat určité množství glukosaminu ve svém těle. S rostoucím věkem se však tato schopnost snižuje a člověk se stává náchylnější k onemocnění postihujícím klouby (5).

Glukosamin se nachází ve třech formách:

- Glukosamin sulfát (GS)
- Glukosamin hydrochlorid (GH)
- Glukosamin NAS (N- acetyl sulfát)

Příčemž GS je z nich nejvíce preferován k léčbě kloubních onemocnění nebo jako potravní doplněk (k prevenci před nimi) pro jeho velkou dostupnost danou díky snadnému přestupu ze střeva do kloubu - zde mluvíme o biologické dostupnosti (bioavailability). Zatímco ostatní 2 jsou absorbovány velmi omezeně a navíc s nižší účinností. Solné formy (sulfát a chlorid), což jsou anionty, neutralizují kladnou molekulu glukosaminu (2).

### 3.3 Biosyntéza

Syntéza aminocukrů je zřejmě spojena s metabolismem glukózy. Glukosamin je produkován chondrocyty z glukózy za přítomnosti glutaminu. Tato přeměna probíhá enzymatickou cestou za účasti glukosamin syntetázy. Bezprostředním předchůdcem je však až fruktosa-6P, která transaminací a příjmem aminoskupiny z glutaminu dá vznik glukosaminu-6P (3). Níže je uvedeno schéma vzniku glukosaminu (4):

Glukosa

↓ Hexokinasa

Glukosa-6P

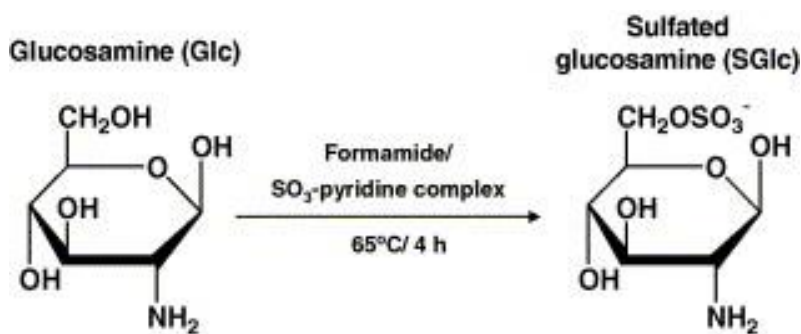
↓ Glukosafosfatisomerasa

Fruktosa-6P

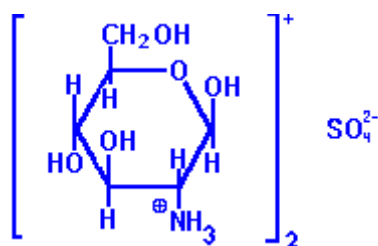
↓ Fruktosa-6P amidotransferasa, glutamin

Glukosamin-6P

Sulfatace aminosacharidu pak probíhá sulfatačním činidlem (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát= PAPS) a nebo z čisté molekuly glukosaminu při reakci s formamidem a  $\text{SO}_3^-$  pyridin komplexu (3).



Obrázek č. 2: Sulfatace glukosaminu(1)



Obrázek č. 3: Glukosamin sulfát (6)

### 3.4 Využití glukosaminu

Jak již bylo výše zmíněno, glukosamin se přirozeně vyskytuje v chrupavčité tkáni, kde přispívá k udržení pevnosti, ohebnosti a elasticity (5). Glukosamin stimuluje správnou funkci a reparaci kloubu. Pro tyto své vlastnosti se používá jako chondroprotektivum při léčbě osteoartrózy (7). Účastní se i tvorby povázek a kůže (8). Dále se může používat při léčbě střevních potíží, při běžných zánětlivých onemocněních a také mírní oxidační stres v buňkách (7).

#### 3.4.1 Osteoartróza

Osteoartróza je degenerativní onemocnění kloubů s významnou zánětlivou komponentou, postihující nejen chrupavku, ale i ostatní kostní tkáň. V popředí příznaků je námahová bolest (v pokročilých stádiích onemocnění i klidová) a porucha funkce kloubu. Postihuje především nosné klouby dolních končetin (kyčelní a kolenní kloub), může však zasáhnout i menší klouby. Onemocnění má multifaktoriální etiologii, v níž kromě opotřebení kloubů a degenerativních změn kloubních struktur hrají významnou roli zánětlivé změny postihující především chrupavku (9).

### **3.4.2 Léčba osteoartrózy**

K léčbě osteoartrózy patří režimová opatření (snížení hmotnosti, cílené cvičení), fyzikální terapie (masáž, elektroterapie, tepelná terapie, léčebné koupele) a farmakoterapie (9).

#### **3.4.2.1 Farmakoterapie**

Léčba má několik možností, mezi které nejčastěji patří paracetamol, nesteroidní antirevmatika (NSA), intraartikulární aplikace kortikosteroidů a kyseliny hyaluronové a v neposlední řadě, poslední dobou stále více využívaná, chondroprotektiva. Značně rozšířené perorální podávání NSA je založeno na jejich protizánětlivém a analgetickém působení, zprostředkovaném bloádou cyklooxygenáz (COX-1, COX-2), enzymů potřebných pro syntézu cytokinů zapojených v procesu zánětu a bolesti. Podávání NSA však nese velké nevýhody, a to jsou rizika v gastrointestinální a kardiovaskulární oblasti. V posledních letech však nabývají na významu chondroprotektiva zařazovaná do skupiny SYSADOA (symptomatic slow acting drug for osteoarthritis) Do této skupiny patří: glukosamin, chondroitin, kyselina hyaluronová a diacerein). Byla publikována řada studií, ve kterých bylo doloženo analgetické a protizánětlivé působení chondroprotektiv, ale i jejich vliv na zpomalení progresu strukturálních změn postižených kloubů. Podle některých doporučení mohou mít přípravky obsahující glukosamin a chondroitin nejen symptomatický, ale i strukturu modifikující účinek (9).

## **3.5 Farmakokinetika**

### **3.5.1. Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Exkrece (ADME)**

V roce 1986 byl proveden výzkum o biologických účincích glukosaminu. Setnikar a spol. intravenózně podávaly radioaktivně značený GH izotopem  $C_{14}$  ředěný neznačeným GS 8 psům a 8 fenkám. Následně byly analyzovány vzorky plasmy, výkalu, moči, a všech orgánů. Ihned po podání značeného GH byl v plazmě tento zjištěn v množství 10%. Plazma byla velmi rychle zbavena glukosaminu játry a ledvinami a dále exkretována do moči. Zbýlých 90% značeného glukosaminu bylo navázáno na plazmatických bílkovinách. Plazmatická aktivita stoupala, až po 8 hodinách dosáhla vrcholu. Během této fáze se radioaktivita rozptylovala do jater a ledvin a následně byla nalezena i v kostní tkáni a kloubní chrupavce. Podobná studie se provedla i na myších a potom i na lidech, přičemž se zjistilo, že psi a myši mají podobná ADME data člověku. Analýza radioaktivity v tkáních a orgánech dokázala, že glukosamin rychle vstupuje do všech tkání, nevyjímaje chrupavky a maxima dosahuje po 8 hodinách (10).

### **3.5.2 Koncentrace a dávkování**

Koncentrace glukosaminu v plazmě u zdravého muže je přibližně 0,04 mmol/l. Intravenózní podání 9,7g glukosaminu ustálí plazmatickou koncentraci na hodnotě zhruba 0,65 mmol/l. Intravenózní podání 30,45 g glukosaminu zvýší plazmatickou koncentraci na 1,42 mmol/l. Z těchto koncentrací stanovil Setnikar a spol. obvyklou denní dávku- 23,1 mg/kg tělesné váhy. Podáváním takovéto dávky do organismu udržuje sérovou koncentraci na hladině kolem 0,06 mmol/l (3).

### **3.6 Účinky GS**

V OA chrupavce probíhají jisté biochemické a metabolické změny, mezi které řadíme např. ztrátu kolagenové sítě v proteoglykanech způsobenou jak zvýšenou degradací kloubní matrix vyvolanou metaloproteinásou, tak sníženou syntézou matrix. Dále v OA chrupavce pozorujeme zvýšenou hladinu receptorů na některé cytokiny a stoupající produkci fosfolipasy A (PLA) a NO<sub>2</sub>. Zvýšená PLA2 aktivita byla objevena jak v OA chrupavce, tak v synoviální tekutině a séru nemocného. PLA2 je známá jako protizánětlivý enzym, jeho přesná funkce však dosud není známa (11). Má tedy protizánětlivé a antioxidační účinky (8).

#### **3.6.1 Účinek GS na degradační enzymy**

Enzymová aktivita byla stanovena v chondrocytech z hustě vláknité OA kolenní chrupavky. Kaseinázová aktivita v buňkách nebyla glukosaminem modifikována. Znatelně ale klesla kolagenolytická aktivita v buňkách, stejně jako klesla buněčná PLA2 (11).

#### **3.6.2 Účinek na proteosyntézu**

Proteosyntéza jednoznačně stoupá v závislosti na koncentraci glukosaminu. Minimální efektivní dávka, která udržuje plazmatickou koncentraci na 0,04 mmol/l je 50 μM. Vzestup proteosyntézy může stoupnout až o 62% při dávkách 500 μM (11).

#### **3.6.3 Účinek na snížení hladiny lipidů**

Glukosamin také ovlivňuje hladinu tuků v krvi. Byl prokázán pokles TG, což je dáno lipolytickou aktivitou glukosaminu a potlačením adipogeneze (12).

#### **3.6.4 Antioxidační účinky**

Redukční účinky GS jsou přímo úměrné koncentraci- se zvyšující koncentrací GS se zvyšují. Redukční vlastnosti jsou spojeny s redukčními skupinami vykazující antioxidační účinky. Hromadění látek vyvolávající oxidační buněčný stres způsobuje např. rychlejší stárnutí, mozkové dysfunkce, srdeční příhody, onemocnění jater, imunodeficienci a karcinogenezi. Redukční skupiny reagují i s prekurzory peroxidů, čímž preventivně zabraňují vzniku volných radikálů (8).

### 3.6.5 Imunostimulační účinky

Podávání GS zvyšuje buněčnou (stimulace fagocytózy makrofágů) a humorální imunitní odpověď projevující se zvýšenou hladinou cirkulujících protilátek. Navíc se zvětšuje relativní hmotnost sleziny a brzlíku, což se projevuje zvýšenou produkcí imunitních buněk (13).

### 3.6.6 Vedlejší účinky

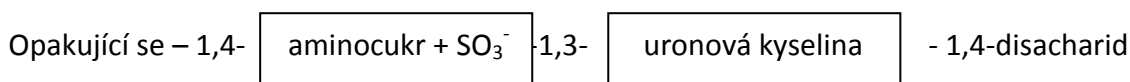
Podávání glukosaminu je všeobecně dobře snášeno, přesto se mohou vyskytnout mírné potíže gastrointestinálního traktu, jako jsou např. zácpa, průjem, nauzea, dyspepsie, nadýmání a nebo břišní křeče. Dále se občas může vyskytnout bolest hlavy nebo vyrážka, vzácně deprese a infekce vylučovacího systému (2).

## 3.7 Mechanismus účinku

Glukosamin je chondrocyty přednostně začleněn do složek glykosaminoglykanových řetězců v chrupavce, kde stimuluje syntézu fyziologických proteoglykanů. V některých tkáních má glukosamin větší afinitu ke glukózovým přenašečům než samotná glukóza a je tak rychleji než glukóza začleněn do glykoproteinů. Tím také inhibuje degradaci kloubní chrupavky způsobené IL1 a lipopolysacharidy. Glukosamin má tedy hlavní roli jako substrát při biosyntéze mukopolysacharidů a biopolymerů kloubů a kostí (2).

### 3.7.1 Syntéza GAG

GAG se skládají z opakujících se disacharidových jednotek složených nejčastěji z aminocukru nebo uronové kyseliny. Východiskem pro syntézu jsou již v 1.1. kapitole zmíněny acetylované aminocukry a uronové kyseliny. Syntéza probíhá v ER a GA.



Syntéza je inhibována glukokortikoidy (především kortizolem).

### 3.7.2 Degradace GAG

Pokud by neprobíhala degradaci GAG, mohlo by docházet ke škodlivé akumulaci těchto látek ve tkáních. Štěpení GAG probíhá za účasti exo a endoglykosidasy ( $\beta$ -glukuronidáza, hyaluronidasa a sulfatasa) (3).

## 4. ANALYTICKÉ STANOVENÍ GS

V této části se budou zmíněny možnosti stanovení GS v potravinových doplňcích a v biologických materiálech. Mezi nejčastější metody analýzy potravinových doplňků se řadí metody HPLC a CE.

### 4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze. Mezi hlavní výhody HPLC patří jejich schopnost separace, identifikace a kvantifikace látek různých koncentračních rozmezí, polarit a těkavosti s vysokou citlivostí. Jelikož většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam.

#### 4.1.1 Rozdělení chromatografických metod

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy:

1. Separačního děje:
  - adsorpční
  - rozdělovací
  - iontovýměnná
  - gelová permeační (vylučovací)
  - superkritická fluidní
2. Použité techniky
  - sloupcová
  - papírová
  - tenkovrstvá



### 3. Způsobu vyvíjení

- eluční
- vytěšňovací
- frontální

### 4. Skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze

- Kapalina - tuhá látka
- Kapalina - kapalina
- Plyn - kapalina
- Plyn - tuhá látka

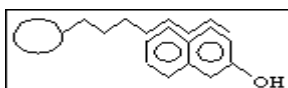
#### 4.1.2 Princip HPLC

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá (stacionární fáze) má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá (mobilní fáze, MF) pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení.

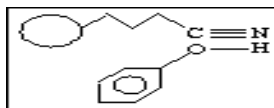
Stacionární fáze může být tuhá (sorbent) nebo kapalná, mobilní fáze může být kapalná (=eluent, eluční činidlo) nebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, který unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně - některá látka je bržděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí na mobilní fázi. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje, tím pomaleji v systému postupuje.

Rozlišujeme následující interakce mezi analytem a stacionární fází: (14), (15).

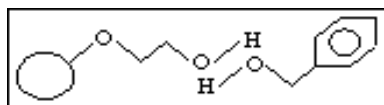
- Hydrofobní interakce



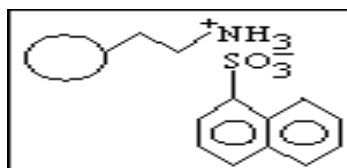
- Interakce dipól- dipól



- Vodíková vazba



- Elektrostatické interakce

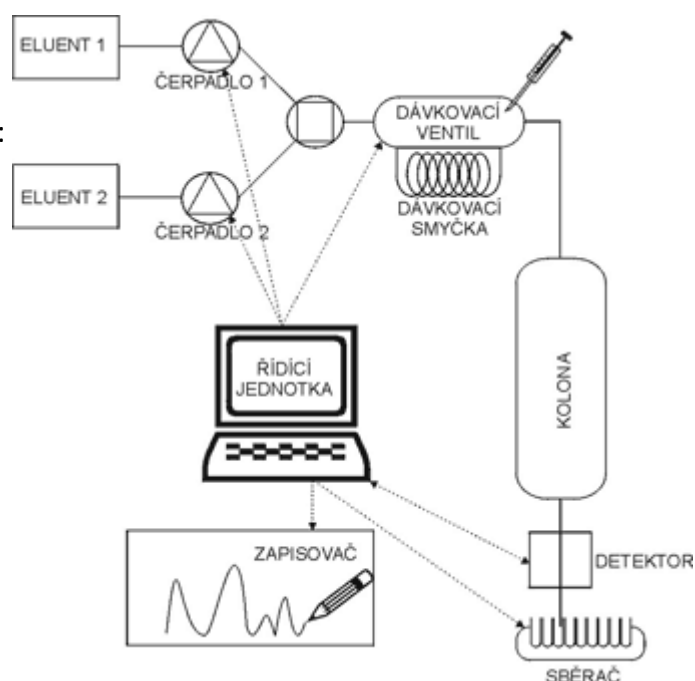


Obrázky č. 4: Znáznornění interakcí mezi analytem a SF (15)

#### 4.1.3 Instrumentace HPLC

HPLC se skládá z těchto základních částí:

- Zásobník mobilních fází
- Degasér
- Čerpadla
- Dávkovací zařízení
- Kolona
- Detektory
- Procesor pro vyhodnocení dat



Obrázek č. 5 Schéma instrumentace HPLC (6)

Zásobník mobilních fází- MF (zpravidla směs organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů) musí být velmi čistá (proto se před použitím filtrují) a zbavená rozpuštěných plynů (probubláváním heliem, degazérem, což je čerpadlo odsávající plyny z rozpouštědel nebo působením ultrazvuku za vakua). Do systému HPLC jsou nejčastěji čerpány ze skleněných lahví. Do lahve zasahuje hadička se skleněnou fritou.

Čerpadlo (pumpa) a směšovač- vysokotlaké čerpadlo vhání rozpouštědla do směšovače MF, který pomocí přepínacích ventilů mísí požadované složení MF před jejím vstupem do dávkovacího zařízení. Čerpadla jsou stavěna tak, aby vydržela vysoký tlak- až 60 MPa. Bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová nebo pístově membránová a nejčastěji jsou vyráběny z nerezové oceli, safíru, titanu nebo keramiky. Rozlišujeme 2 módy čerpadel, a to:

Isokratický mód, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna MF, nemění se tedy eluční síla MF.

Gradientový mód, kdy v průběhu jedné analýzy lze programově měnit složení i průtok MF za účelem rychlejšího vymytí komponent s dlouhými retenčními časy z kolony.

Dávkovací zařízení - má za úkol vnést přesný objem vzorku (10-100 $\mu$ l) do MF vstupující do kolony. Dělíme je na ruční nebo automatické (autosampler). Nástřiková zařízení se musí vyrovnat s relativně vysokým tlakem na koloně, používají se především vysokotlaké ventily se smyčkou.

Kolona- musí být z materiálu, který odolá vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení MF a separovaných složek. Materiálem je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se většinou využívají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3- 10  $\mu$ m a délce 5- 30 cm a vnitřním průměrem 3- 4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Existují i kolony s průměrem menším než 2 mm, tzv. mikrokolonová kapalinová chromatografie, jejíž velkou výhodou je snížení spotřeby MF i vzorku a zvýšení citlivosti detekce.

Chromatografické náplně:

- Stacionární fáze- nejčastěji silikagelová frakce o velikosti 5 $\mu$ m. Na povrchu kuliček jsou silanolové skupiny (=hydroxyly vycházející z křemíku). Nejčastěji se používají stacionární fáze s postranním řetězcem ODS-C18 a OS-C8.

- Mobilní fáze- směs nepolárních, lipofilních rozpouštědel, která jsou seřazena do tzv. eluotropní řady dle rostoucí eluční účinnosti.

Detektor - na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- Vysoká citlivost- detekce látek v roztoku v koncentracích ng- µg/ml
- Reprodukovatelnost a linearita odezvy
- Nezávislost odezvy na změně složení MF při gradientové eluci
- Univerzálnost - detekce všech oddělených složek vzorku (14).

## **4.2 Možnosti stanovení GS metodou HPLC**

### **4.2.1 Stanovení GS pomocí HPLC s derivatizací FMOC- Su**

Tato metoda byla zavedena pro stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích obsahujících GS metodou HPLC. Derivatizační reakce probíhá s N- (9 -fluorenyl - methoxycarbonyloxy) sukcinimidem (FMOC-Su). Testované vzorky obsahovaly různé komerční produkty jako např. tablety, kapsle, nápoje, slepé vzorky a spikované vzorky ke zjištění výtěžnosti. Slepé a spikované vzorky velmi dobře prokázaly spolehlivost metody. Průměrná výtěžnost ve spikovaných úrovních 100 a 150% deklarovala 99% množství s relativní standardní odchylkou (RSD) 2,1%. Výsledky testů mezi jednotlivými laboratořemi byly reprodukovatelné s RSD do 4%, reprodukovatelnost té samé laboratoře měla RSD do 0,7%. Metoda byla testována ve 12 laboratořích, které tímto uspěly a metoda byla přijata AOAC jako 1. oficiální postup (18).

### **4.2.2 HPLC s refraktometrickou detekcí**

Metoda byla vyvinuta ke stanovení GS a jeho polymeru- chitosanu. Zdrojem GS v této studii byly různé preparáty potravních doplňků s jeho obsahem. Separace probíhala na HPLC Shimadzu LC-10 AD, analytická kolona Kromacil 10 NH<sub>2</sub> (250 mm×4,6 mm, 10µm), Phenomenex, USA.

K analýze bylo použito 20 kapslí nebo tablet přípravku s obsahem GS, které byly rozmělněny v prášek. Jedna dávka obsahovala 25mg GS. Vzorek byl rozpuštěn v 25 ml odměrné baňce a důkladně promíchán. MF byl roztok z acetonitrilu, vody a kyseliny octové v poměru (50:50:0,02) - isokratický typ eluce, pH bylo udržováno na 4. Rychlost průtoku byl 1ml/min. Objem dávkovaného vzorku byl 20 $\mu$ l.

Hlavním účelem této práce bylo vyvinout jednoduchou, rychlou, specifickou, přesnou a správnou metodu HPLC s refraktometrickou detekcí, ke stanovení množství GS a chitosanu, která by mohla být rutinně používána v laboratořích. Tento typ detekce nevyžaduje derivatizaci vzorku, je tedy oproti metodám s UV detekcí rychlejší (19).

#### **4.2.3 HPLC s fluorescenční detekcí**

Jednoduchá, rychlá, selektivní a specifická metoda HPLC s fluorescenční detekcí byla vyvinuta ke stanovení GS v lidské plazmě. Vzorky plazmy obsahující GS byly skladovány po 40 dní při -20°C a 24 hod před derivatizací při 4°C. K odstranění interferujících endogenních látek z biomatrice bylo použito srážení plazmy acetonitrilem. Po promíchání a centrifugaci byl supernatant přenesen a derivatizován 9-fluorenylmethoxykarbonyl-chloridem a acetonitrilem v borátovém pufru (pH=8) při 30°C, 30 min. Chromatografická separace byla provedena na koloně Diamonsil™ (150mm×4,6 mm, 5 $\mu$ m) se stacionární fází C<sub>18</sub>. Jako mobilní fáze byla použita směs vody s acetonitrilem – v gradientním typu eluce. Stanovení probíhalo při průtoku 1ml/min. Tato metoda byla validována se splňujícími požadavky na linearitu, přesnost, správnost, výtěžnost a stabilitu. Úspěšně byla aplikována při bioekvivalenčních studiích GS u zdravých volunteerů. Díky nízkým nákladům, rychlé a krátké přípravě vzorku je tato metoda vhodná pro rutinní analýzy (20).

#### 4.2.4 HPLC s derivatizací FMOC- Cl

Jednoduchá, rychlá, citlivá a spolehlivá metoda ke stanovení GS z lidské plazmy je založena na derivatizaci s 9- fluorenylmethyl chlorkarbonátem. Separace probíhala na reverzní fázi HPLC. Poprvé byl FMOC- Cl určen k derivatizaci GS v lidské plazmě. Aminoskupina GS a vertilmicin sulfát- (vnitřní standard) byla odštěpena za vzniku glukosamin- FMOC- Cl a vertilmicin FMOC- Cl, což jsou velmi vhodné látky pro HPLC na reverzní fázi. Po precipitaci plazmatických proteinů acetonitrilem se směs promíchala a centrifugovala. Samotná separace byla provedena na koloně C<sub>18</sub> (DIAMONSIL 150×4 mm, 5µm). MF tvořila směs acetonitrilu a vody za průtoku 1 ml/min. Retenční časy glukosaminu- FMOC- Cl a vertilmicinu- FMOC- Cl byly 8,9 a 21,2 min. Tato metoda se prokázala jako selektivní a citlivá pro GS. Výtěžnost GS z lidské plazmy byla nad 90%. Validovaná metoda byla úspěšně aplikována pro stanovení GS v lidské plazmě (21).

#### 4.2.5 Stanovení LC s hmotnostní spektrometrií

Separační účinnost klasické kapalinové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. MF protéká stacionární fází v koloně samospádem, čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Oproti HPLC má tedy LC pomalejší průtok MF a celková analýza tak trvá déle (14). LC – ESI – MS je metoda, která byla založena a validována ke stanovení GS v lidské plazmě. Po precipitaci plazmatických bílkovin acetonitrilem, následovalo promíchávání a centrifugace. Supernatant byl převeden a derivatizován fenyl – iso – kyanátem v acetonitrilu při 60°C po dobu 40 min. Separace probíhala na ODS koloně (Inertsil ODS-3 150 x 2,1 mm, 5 µm) s MF o složení kyseliny octové a metanolu, při rychlosti průtoku 0,3 ml/min. Jako detektor se použil MS s ionizací elektrosprejem. Výtěžnost GS z plazmy byla v porovnání s HPLC nižší - 73%, přesto se tato metoda prokázala jako jednoduchá, reprodukovatelná a vhodná k farmakokinetickým studiím GS u zdravých volunteerů (22).

### 4.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza - běžně označována jako CE (z anglického capillary electrophoresis) patří spolu s plynovou chromatografií (GC) a HPLC k nejdůležitějším separačním metodám v analytické chemii. CE patří mezi elektromigrační separační metody využívající 2 elektrokinetických metod - elektroforézy a elektroosmózy. Elektroforéza je pohyb elektricky nabitých částic v roztoku vlivem elektrického pole a elektroosmóza znamená pohyb vody v kapiláře k záporně nabitě elektrodě - katodě, opět vlivem elektrického pole. Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny Si-OH, které se v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují na Si-O<sup>-</sup> a H<sup>+</sup>, čímž se vytváří záporný náboj stěny. (23) Tento záporný náboj je kompenzován vrstvičkou (asi 10 nm silnou) opačného náboje v kapalně části dvojvrstvy, která se v elektrickém poli může pohybovat. Napětí vyvolávající elektroforetický pohyb analyzovaných iontů má vzhledem ke kapiláře podélný směr a nemůže způsobit pohyb nabitě pevné části dvojvrstvy (tedy kapiláry). Naproti tomu vrstvička opačného náboje v kapalině blízko stěny podlehne působení hnacího pole a dá se do pohybu směrem k příslušnému pólu, čímž strhne celý průřez kapaliny v kapiláře. Na rozdíl od elektroforézy, při které putují pouze nabitě ionty a zbytek roztoku (voda) je v klidu, při elektroosmóze teče celý roztok najednou, pohybuje se jako píst. Rychlost aktivně elektroosmotického toku je všude stejná- jak u stěny, tak uprostřed kapiláry. Elektroosmózu lze ovlivnit složením roztoku, zejména přísady nepatrných koncentrací povrchově aktivních látek (tenzidů), které pokryjí vnitřní povrch kapiláry a změní rychlost, popřípadě i směr toku. Elektroosmotický tok sám o sobě analyzované ionty nedělí, pouze čerpá roztok elektrolytu z jedné nádoby do druhé (24).

#### 4.3.1 Princip elektroforézy

Obecně je to separační metoda využívající rozdílné pohyblivosti analytů v elektrickém poli. Jedná se o elektroforetickou pohyblivost: jsou-li na začátku separace všechny částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Elektrické pole se vytvoří vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi

elektrody (23). Pokud se do roztoku s nabitými částicemi (ionty) vloží elektrody (většinou inertní z Pt), pak kladně nabitá látka (kation) bude přitahována záporně nabitou elektrodou (katodou) a naopak záporně nabitý anion bude přitahován kladně nabitou anodou, přičemž více nabité a menší ionty budou rychlejší než méně nabité a velké (25). Pokud se provádí elektroforéza ve volném roztoku, difúze by bránila vytvoření zón vyrovnáváním koncentrace složek v celém objemu, proto je nutné složky během separace fixovat a elektroforézu provádět ve vhodném separačním loži, jehož uspořádání může být plošné nebo kapilární.

Elektroforéza v plošném uspořádání: Plošný nosič je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře nasycené parami rozpouštědla. V nejjednodušším případě lze jako nosič použít filtrační papír, který je dvěma konci ponořen v pufru a těmito konci je napojen na zdroj stejnosměrného napětí. Dále se velmi často používají jako nosiče tenké vrstvy gelu na skleněných deskách (gelová elektroforéza). Elektrody se připojují na konce desek přes filtrační papír ponořený do pufru nebo přes gelové mosty napuštěné pufrem. Vzorek nanášíme zpravidla do středu nosiče. Po vložení napětí se oddělí zóny obsahující jednotlivé složky. Zóny se pohybují různou rychlostí. Separace se zakončuje dříve než dojde první zóna ke konci nebo dříve než dojde k jejich přílišnému rozšíření. Toto provedení je manipulačně i časově náročné, zóny se detekují až po separaci. Separaci nelze urychlit použitím vyšších hodnot napětí, protože vznikající Joulovo teplo by mohlo způsobit chemické změny a ohrozit tak separaci.

Kapilární elektroforéza: Transport analytů a jejich separace probíhá v kapiláře, která propojuje 2 nádoby. Kapilára je většinou z taveného křemene, vnitřní průměr bývá řádově desítky či stovky mikrometrů a délka mezi 10 cm až 1 m. Do roztoku základního elektrolytu jsou vnořeny elektrody obstarávající pohyb iontů. Základní elektrolyt se do kapiláry plní přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Potom se jeden konec kapiláry ponoří do nádoby s analytem a malý sloupeček vzorku vnikne na její začátek. Kapilára se pak vrátí do nádoby se základním elektrolytem a zapne se hnací napětí. Na druhém konci kapiláry je detektor zaznamenávající průchod jednotlivých rozdělených látek (24). Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se



nazývá elektroforegram - je podobný chromatogramu: poloha píku určuje kvalitu a výška píku určuje kvantitu. Doba analýzy v kapiláře je oproti plošnému zařízení zkrácena především z těchto důvodů:

- Teplo tvořené uvnitř kapiláry je účinně odváděno jejími stěnami, proto lze použít vysokých napětí (10- 30 kV).
- Kapilára prochází detektorem a je prováděna on- line detekce zón a počítačové vyhodnocování vzorků.
- Kapilární elektroforézu doplňuje elektroosmóza. Elektroosmotický tok má za následek pohyb roztoku kapilárou k detektoru. Jeho výhodou je snížení analytických časů (23).

Existuje řada separačních technik, které doplňují prostou kapilární elektroforézu o další možnosti:

- Kapilární zónová elektroforéza- (CZE), neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku. Je založena na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře (26).
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie - (MECC), slouží k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.
- Kapilární gelová elektroforéza - (CGE), využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- Kapilární izoelektrická fokusace - (CIEF), pro separaci amfolytů při gradientním pH.
- Kapilární elektrochromatografie - (CEC), k pohybu MF využívá elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako SF. Separační selektivita je zde kombinací elektroforetického a chromatografického procesu (23).

### 4.3.2 Instrumentace kapilární elektroforézy

Kapiláry: Jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyamidový povlak (kapilára je křehká). V místě detekce je malý podíl polyamidu odstraněn. Kapilára je dlouhá od 25- do 100 cm s nejčastějšími vnitřními průměry 50 a 75  $\mu\text{m}$ . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, jako např. ke snížení adsorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na kapilární stěně.

Regulace teploty: Regulace teploty kolem kapiláry zajišťuje stálé podmínky separace. Teplota může být regulována vzduchem nebo kapalnou chladicí směsí.

Dávkování vzorku: Roztok vzorku je dávkován do té části kapiláry, která je dále od detektoru. Dávkuje se zpravidla jen velmi nízké objemy vzorku (10- 100 nl) a zóna vzorku tvoří kolem 1 – 2% celkové délky kapiláry. Dávkování lze provádět následujícími způsoby:

- Dávkování tlakem - patří k nejběžnějším. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je aplikován zvýšený tlak.
- Dávkování rozdílem hladin - je založeno na principu spojených nádob.
- Elektrokinetické dávkování - méně používané. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je přivedeno napětí. Nevýhodou je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením po dávkování, protože pohyblivějších částic migruje do kapiláry více než méně pohyblivých.

Detektory: Musí být velmi citlivé, protože průměr kapiláry je velmi malý. Mezi nejčastěji používané detektory patří ty, co jsou založeny na sledování absorpce UV záření. Většinou využívají diodové pole. Další typy detektorů využívají fluorescenci, velmi citlivý je detektor s laserem indukovanou fluorescencí (LIF- Laser Induced Fluorescence). V poslední době se začíná využívat spojení kapilární elektroforézy a hmotnostního spektrometru (MS), které umožňuje snadnou identifikaci analytu a poskytuje informace o struktuře analyzovaných látek. Dále se často využívají bezkontaktní vodivostní detektory- (CCD), patří mezi univerzální detekční techniku pro jakékoliv ionty (23), (27), (28).

#### **4.4 Možnosti stanovení GS pomocí CE**

Vedle metody HPLC je ke stanovení GS v potravinových doplňcích nebo v lidské plasmě často používána CE. CE byla zavedena pro separaci aminocukrů zahrnující glukosamin, galaktosamin, N- metyl- glukamin, N- acetylglukosamin a glukuronovou kyselinu (29). Díky nedostatku chromoforů v molekulách sacharidů je ovšem obtížnější tyto látky detekovat s přímou UV detekcí. Použití silných alkalických borátových pufrů však vede k tvorbě komplexů se zvýšenou absorpcí při 190 nm. Další možností pro detekci glukosaminu je i jeho derivatizace umožňující jak přímou, tak nepřímou UV detekci a také laserem indukované fluorescenční (LIF) stanovení (30).

##### **4.4.1 Stanovení glukosaminu kapilární elektroforézou po derivatizaci kyselinou antranilovou (AA), s použitím UV detekce**

Tato metoda byla vyvinuta pro stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích s použitím snadné derivatizace kyselinou antranilovou - ta je velmi dobře známa pro své využití ve stanovování monosacharidových sloučenin, jako jsou právě různé aminocukry, GP a GAG s vysokou citlivostí pro HPLC nebo CE. Potravinové doplňky dále obsahovaly vitamin C, chondroitin sulfát a MSM. Interference těchto ostatních sloučenin byla odstraněna podmínkami CE, jako jsou: složení pufru, nastavená vlnová délka a specifická derivatizace glukosaminu. CE byla provedena na přístroji Beckman HPCE, vybaven UV detektorem nastaveným na vlnovou délku 214 nm. LOD bylo přibližně 200 pg (33µg/ml). Separace a analýza proběhly v křemenné kapiláře o délce 85 cm, s vnitřním průměrem 50 µm při teplotě 25 °C. Pufr byl připraven ze 150 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, upraven na pH 7 NaOH. Byl odplyněn vakuovou filtrací přes 0,2 µm membránu a promíchán ultrazvukem. Před každým měření byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 1 min, redestilovanou vodou po dobu 5 min a dále připraveným pufrem po dobu 5 min. Vzorby byly automaticky dávkovány tlakovým dávkovačem v objemu 6 nl. Analýza probíhala při napětí 15 kV (35µA). Píky byly převedeny a vypočítány za použití Beckman softwaru systém Gold V810. Glukosamin byl kvantitativně stanoven CE bez speciálních předběžných úprav, jako jsou např. centrifugace nebo odstranění nerozpustných složek. Proto by tato metoda mohla být všeobecně používána ke kvantitativnímu stanovení jiných látek.

Navíc díky fluorescenčním vlastnostem AA se dá předpokládat, že tato citlivá metoda s LIF detekcí by mohla sloužit i ke stanovování glukosaminu v biologických tekutinách, tkáních a buňkách (30).

#### **4.4.2 Stanovení glukosaminu metodou CE s dansylační derivatizací**

Dansylace je derivatizace za použití dansylchloridu (5 (dimethylamin) naftalin -1-sulfonylchlorid). Glukosamin byl rozpuštěn v 80 mM borátovém pufru při pH 9,5. Derivatizace vzorku se prováděla činidlem připraveným rozpuštěním 10,0 mg dansylchloridu v 10,0 ml acetonu. Dansylchlorid byl smíchán s glukosaminem do ampulky v poměru 1:20. Ampulka se dala do mikrovlnné trouby a byla ozařována při 119- 700W po dobu 1- 16 min. Dále byl roztok uchován ve tmě po dobu 5 hodin. Před vlastní CE byl roztok ještě 10x zředěn vodou. Za takovýchto podmínek s přidáním speciálního činidla, jako je triflouromethan sulfonová kyselina, se dansyluje pouze aminoskupina, zatímco, hydroxyskupina dansylaci nepodléhá. Borátový pufr byl před každou separací filtrován přes membránu (póry o velikosti 0,45 $\mu$ m) a následně odplyněn ultrazvukovou vibrací po dobu 2 min. CE byla provedena na Beckmanu Coulter Co, USA, model 2050. Kapilára z taveného křemene o délce 57 cm (detektor byl vzdálen 50 cm), vnitřní průměr 0,75 $\mu$ m. Kapilára byla po každé separaci promývána 0,1 M NaOH, a 0,1 M HNO<sub>3</sub> po dobu 2 minut. Detekce probíhala UV absorpcí při vlnové délce 214 nm. Separace trvala 20 min. LOD byl 1 $\mu$ g/ml. Zavedená metoda byla úspěšně aplikována pro kvantitativní rozbor 2 typů tablet s odlišným obsahem látek pro léčbu OA (29).

#### 4.4.3 Stanovení glukosaminu kapilární elektroforézou na mikročipu.

CE je široce používaná technika pro rychlou analýzu biomolekul, jako jsou cukry, aminy a aminokyseliny. M. Allison a spol. v roce 2006 v Kalifornii vynalezli přenosný mikročip CE s názvem Mars Organic Analyzer (MAO), demonstrovali jeho využití pro analýzu struktury a chiralitu aminokyselinových biomarkerů. AK byly označeny fluoresceinem a analyzovány s vysokou citlivostí. Zde byla využita fluorescaminová derivatizační technika k analýze glukosaminu a mikročipová CE separace k určení  $\alpha$  nebo  $\beta$  anomerů a jejich vzájemné přeměně v čase. Značení aminocukrů probíhalo následujícím způsobem: vodný roztok bioaminů byl připraven v 10 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o pH 9,78 a individuálně byly derivatizovány fluorescaminem (20  $\mu\text{l}$  roztoku s 30  $\mu\text{l}$  fluorescaminu v acetonu). Po 10 minutách reakce při pokojové teplotě, byl aceton odstraněn a roztok zředěn. Glukosamin (0,6 mM, směs  $\alpha$  a  $\beta$  anomerů, 10 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufr, pH jak je uvedeno) byl derivatizován fluorescaminem, tak jak je popsáno výše. Pro identifikaci glukosaminových píků byl  $\alpha$ -glukosamin rozpuštěn na 0.6 mM v 10 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufru o pH 9.51. Po potřebné inkubaci byly roztoky okamžitě značeny a pro analýzu zředěny pH 9.51 puforem. Roztoky byly analyzovány v časových bodech v rozsahu od 140 do 2609 vteřin od počáteční přípravy neznačeného roztoku glukosaminu. Daný reakční čas zahrnuje zhruba 120 vteřin pro značení, ředění a nanášení vzorku do přístroje. Všechny separace měly ve výsledku 2 odlišné píky- 1. pík glukosaminu se nikam neposouval během změn pH, zatímco ten druhý se v závislosti na změnách pH posouval do oblasti s vyšším nábojem. Výška hladin zřejmě nesouvisí se změnou pH, avšak rostoucí plocha mezi píky představuje vzájemnou kvalitativní přeměnu 2 látek související se změnou pH. Pík 1 představoval  $\alpha$  anomer glukosaminu, zatímco ten druhý, který se vzdaloval, byl  $\beta$ . Tomuto procesu se říká mutarotace (31).

#### **4.4.4 Stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích a léčivech metodou CE s bezkontaktním vodivostním detektorem**

Byla objevena nová metoda CE s bezkontaktním vodivostním detektorem vhodná ke stanovení glukosaminu a  $K^+$  v léčivech. Za optimálních podmínek (vodný 30mM acetátový pufr o pH 5,2 elektrické napětí 30 kV, 25°C) glukosamin (migrující jako kation glukosamonia) byl velmi dobře separován od  $K^+$ , který by se mohl vyskytovat v tabletách nebo v mastích. CE probíhala na křemenných kapilárách o délce 75 cm (detektor byl vzdálen 27 cm) s vnitřním průměrem 50 $\mu$ m, celá separace byla kratší než 3 min. Kalibrační křivka byla lineární jak pro glukosamin (100-300 $\mu$ g/ml, korelační koeficient 0,997), tak pro  $K^+$  (15-75 $\mu$ g/ml, korelační koeficient 0,997) za použití etanolaminu (100 $\mu$ g/ml) jako vnitřního standardu. Hodnoty LOD byly 9,3 $\mu$ g/ml pro glukosamin a 2,9 $\mu$ g/ml pro draselné ionty. Tato metoda byla aplikována na analýzu glukosaminu, který je obsažen v různých přípravcích. Spolehlivost CE metody byla potvrzena pomocí porovnávání výsledků získaných zmíněnou CE metodou a referenční HPLC metodou (32).

#### **4.4.5 Stanovení glukosaminu v potravinových doplňcích metodou CE po derivatizaci s OPA**

Glukosamin byl derivatizován *orto*-ftalaldehydem (OPA). (4,5 mM OPA, 4,5 mM 2 - merkaptoethanol rozpuštěno v 20mM borátového pufru, pH= 9,3). Fluoreskující sloučenina OPA glukosaminu byla separována do 3 min. Derivatizační reakce může být provedená přímo v kapiláře následujícím dávkováním sekvence OPA - vzorek - OPA do separační kapiláry. Technika derivatizace přímo v kapiláře zjednodušuje předběžnou úpravu vzorku a zlepšuje reprodukovatelnost metody (33).

#### **4.4.6 Separace monosacharidů a glykoproteinů značených AMAC metodou CE na mikročipu**

Vzorky monosacharidů byly derivatizovány fluoreskujícím 2 - aminoakrydonem (AMAC), separace byla provedena elektroforézou na plastovém mikročipu s diodou emitující světelný paprsek - konfokální fluorescenční detekce. 2 - aminoakrydonem bylo označeno 5 neutrálních sacharidů: D - glukosa, D - manosa, D - galaktosa, L - fukosa, D - xylosa a směs 2 aminocukrů - D - glukosamin

a N - acetyl - D - glukosamin. Všechny byly velmi dobře separovány při pH 8,5 s 200mM borátovým pufrům. Separace byla úspěšně provedena vzhledem k odlišné stabilitě komplexů mezi hydroxylovými skupinami sacharidů a boritými ionty (200 mM borátového pufru a pH 8,5 byla kritická hranice). Vysokorychlostní separace monosacharidů (50s) a aminocukrů (70s) probíhala v elektrickém poli- 400V/cm. LOD - 0,86  $\mu\text{M}$  pro glukosu a < 1 $\mu\text{M}$  pro ostatní monosacharidy byl zvětšen přidáním 0,5% methylcelulosy do pufru. Tyto podmínky jsou plně kompatibilní s běžnou CE. Analýza jemných rozdílů v konformační stabilitě a význam hydroxylových zbytků v boritanovém komplexu umožnili vývoj případného efektivního nástroje k vysoce účinné separaci monosacharidových molekul, které se vyznačují složitými konformacemi navzájem si podobné. Mezi velké výhody mikročipu patří minimální spotřeba vzorku (až fl), umožnění více kroků najednou (dávkování, příprava, separace), dále paralelní analýzy (opakující se motiv na 1 čipu) a v neposlední řadě jejich nízká cena. Separace analytů probíhá v kanálcích vyleptaných do mikročipu. Poté, co jsou na čip nanášeny všechny roztoky, jsou vzorky elektrokineticky vpraveny do injektorové oblasti. Následně probíhá elektroforetická separace vzorků a detekce nejčastěji pomocí LIF (34).

#### **4.4.7 Rychlá analýza aminocukrů metodou CE s mikročipem a LIF detekcí**

D- glukosamin, D- galaktosamin a jejich redukované formy byly derivatizovány 4 – nitro - 2, 1, 3 – benzoxadiazol – 7 - fluoridem (NBD - F) při pH 6 a fluoreskující deriváty byly přečištěny na ODS gelu. Deriváty byly analyzovány na elektroforetickém mikročipu s 33 mm dlouhým kanálkem s argon - LIF detekcí. Za stanovených podmínek tyto deriváty aminocukrů byly dobře separovány (60s). Aminocukry se tak dají detekovat i při velmi nízké koncentraci - 0,5 fmol a plochy píků vykazovaly dobrou linearitu mezi 0,8 a 8 fmol vzorku. RSD byla kolem 4%. Tato metoda byla aplikována k analýze aminocukrů bovinní submaxilární vrstvy mucinu v přítomnosti alkalického hydroboritanu (36).

## 5. ZÁVĚR

Práce je rozdělena na 2 hlavní části, přičemž 1. část nás seznamuje s glukosamin sulfátem, informuje o jeho biologických i chemických vlastnostech a jeho využití. Druhá část se pak zabývá jeho stanovením v potravinových doplňcích, ale i v lidské plazmě.

Mezi nejčastěji používané analytické metody pro stanovení GS patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE). Může se využít například i klasické kapalinové chromatografie (LC), která je sice jednoduchá a vhodná k farmakokinetickým studiím, nicméně běžně se nepoužívá, neboť oproti HPLC má samozřejmě delší čas celé analýzy.

K detekci obou metod se nejvíce využívá UV detektorů, které byly nastaveny na určitou vlnovou délku - většinou 214 nm. U metody HPLC byl jako 1. využit komerčně vyráběný refraktometrický detektor, ten je sice univerzální, ale především neselektivní a registruje všechny látky s odlišným indexem lomu, než má samotná MF. Mezi velmi selektivní a vysoce citlivé detektory HPLC patří fluorescenční a MS detektory - pro jejich využití je však nutné glukosamin derivatizovat. U metody CE je nejčastěji používán LIF detektor, který patří také mezi detektory nejcitlivější. Dále se často používaly bezkontaktní vodivostní detektory, které jsou vhodné zejména pro stanovení látek vykazující nízkou absorpční vlnou v UV oblasti.



## 6. CITOVANÁ LITERATURA

1. **Moon, Moo, Kim, a další.** Glucosamine sulfate promotes osteoblastic differentiation of MG-63 cells via anti-inflammatory effect. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007, Sv. 17, stránky 1938-1942.
2. **Thakral, R., Debnath, U. K. a Dent, C.** Role of glucosamine in osteoarthritis. *Current Orthopaedics*. Dublin :, 2007, Sv.21, stránky 386-389.
3. **Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.** *Biochemie pro studující medicíny 1. díl*. Praha : Karolinum, 2009. stránky 149-151.
4. **Helen, M.I. Osborn, Philipe, E., Gevans a Karel, Bezouška.** Biomedicine of monosacharide. [Online] 2008. [Citace: 4. březen 2010.] č.str-31.
5. Nutrition, Nutri force. Glucosamine, Chondroitin, MSM Plus. [Online] [Citace: 4. březen 2010.] <http://www.orionnatural.com/pdf/Glucosamine.pdf>.
6. Google. *Schéma HPLC*. [Online] [Citace: 25. březen 2010.] [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/figures/chromatografie\\_kapalinova.schema.01.gif](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/figures/chromatografie_kapalinova.schema.01.gif)
7. Wikipedie. *Wikipedie*. [Online] [Citace: 26. duben 2010.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glukosamine>.
8. **Xiaolan Zhu, Jibao Cai a Su, Jun Yang and Qingde.** Determination of glucosamine in impure chitin samples by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research* .13. září 2005, Sv. 340, stránky 1732-1738.
9. **Ronge, Xing, a další.** The preparation and antioxidant activity of glucosamine. [Online] *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, Sv. 27, stránky 283-287, 13. ČERVEN 2008. [Citace: 10. Březen 2010.]

10. **Kostiuk, Pavel.** Chondroprotektiva v léčbě osteoartrózy. [Online] [Citace: 4. březen 2010.] <http://www.edukafarm.cz/soubory/farminews-2009/5/chondroprotektiva.pdf>
11. **Anderson, J., W., Nikolosi, R.J. a Borzelleca, J., F.** Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose. *Food chemical toxicology*. 10. srpen 2004, Sv. 43, stránky 187-201.
12. **Piperno, M., a další.** Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human. *OsteoArthritis Research Society International*. 2000, Sv. 8, stránky 207-212.
13. **Kong, Chang-Suk, b, Jung-Ae Kim a Kim, Se-Kwon.** Anti-obesity effect of sulfated glucosamine by AMPK signal pathway. *Food and toxicology*. 13. duben 2009, Sv. 47, stránky 2401-2406.
14. **Yan, Yang, a další.** The antioxidative and immunostimulating properties of D glukosamin. *International Immunopharmacology* 7. 11. červen 2006, Sv. 7, stránky 29-35.
15. **Karlíček, Rolf, a spol.** *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2009. stránky 267-279.
16. **Šatínský, Dalibor.** Iontově výměnná chromatografie, gelová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie. [Přednáška ]. Hradec Králové: 2010. <http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Katedra%20analytick%C3%A9%20chemie/>
17. **Nobilis, Milan.** HPLC. [Přednáška]. Hradec Králové : 2010.
18. **JZQ, Zhou, T, Waszkuc a F, Mohammed.** Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization: Collaborative study. 4, červen 2005, *Journal of AOAC international*, Sv. 88, stránky 1048-1058.
19. **El-Saharty, Yasser S. a Bary, Ahmed Abdel.** High-performance liquid chromatographic determination next term of nutraceuticals, previous

termglucosaminenext term sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. Cairo, 26. červen 2002, *Analytica Chimica Acta*, Sv. 462, stránky 125-131.

20. **Zhang, Li-jun, a další.** Determination of glucosamine sulfate in human plasma by precolumn derivatization using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 30. duben 2006, Sv. 842, stránky 8-12.

21. **Tao-min, Huang, a další.** High performance liquid chromatography for the determination of glucosamine sulfate in human plasma after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. 15, 18. březen 2006, *Journal of separation Science*, Sv. 15, stránky 2296-2302.

22. **TM, Huang, a další.** Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatography* 3. Shanghai : březen 2006, Sv. 20, stránky 251-256.

23. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody*. stránky 33-39.

24. **Gaš, Bohuslav.** Kapilární elektroforéza, věk mikročipů. [Online] [Citace: 20. duben 2010.] <http://www.vesmir.cz/files/file/fid/1048/aid/4641>.

25. **Plaček, Lukáš.** Základy kapilární elektroforézy. [Online] [Citace: 20. duben 2010.] [http://placek.lukas.sweb.cz/pdf\\_soubory/CEzakl.pdf](http://placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf).

26. Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou detekcí (CE LIF). [Online] [Citace: 25. duben 2010.] <http://chemi.muni.cz/~preisler/courses/Lab%20Cv%20CELIF.pdf>.

27. **Glatz, Zdeněk.** Kapilární elektromigrační metody. [Online] [Citace: 26. duben 2010.] <http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/prednasky/CZE.pdf>.

28. **Opekar, František.** Využití integrovaného obvodu pro středovlnné radiové přijímače v bezkontaktním detektoru pro detekci látek v roztoku. *Chemické listy*. 2009, Sv. 103, stránky 839-842.

29. **Qi, Li; Zhang, Shu-Feng; Zuo, Min; Chen, Yi.** Capillary electrophoretic determination of glucosamine in osteoarthritis tablets via microwave- accelerated dansylation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 28. červenec 2006, Sv. 41, 5, stránky 1620-1624.
30. **Volpi, Nicola.** Capillary electrophoresis determination of glucosamine in nutraceutical. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 5. duben 2009, Sv. 49, stránky 868-871.
31. **Skelle, Alison M. a Mathies, Richard A.** Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation. *Journal of Chromatography A*, 1132. 18. květen 2006, Sv. 1132, stránky 304-309.
32. **Jáč, Pavel, Los, P. Spáčil, Z. a další.** Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. Sv. 29, Stránky 3511-3518, Hradec Králové, Česká republika: září 2008.
33. **Chen, Jong-Jyh, a další.** Determination of glucosamine content in nutraceuticals by capillary electrophoresis using in-capillary OPA labeling techniques. *JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS*. červen 2006, Sv. 14, stránky 203-206.
34. **Maeda, Eiki, a další.** Conformational separation of monosaccharides of glycoproteins labeled with 2-aminoacrydone using microchip electrophoresis. *Electrophoresis*. 10. srpen 2005, Sv. 10, stránky 2002-2010.
35. **Zítka, Ondřej, Křížková, Soňa a Adam, Vojtěch, a spol.** Použití automatizované elektroforézy na čipu pro studium laktoferinu a matrixových metaloproteináz. *Chemické listy*. 2010, Sv. 104, stránky 197-201.
36. **Shigeo, Suzuki, a další.** Rapid analysis of amino sugars by microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 22. říjen 2001. Sv. 18, stránky 4023-4031.

37. **Rovenský, a další.** *Dictionary of Rheumatic Disease*. Piešťany, Slovenská republika : Springer Vienna, 2009. stránky 200-201.

38. **Hua, J., a další.** Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppressed the ADP- mediated platelet activation in humans. *Inflammation Research* [Online] 18. 6 2004. [Citace: 4. březen 2010.], Sv. 53, stránky 680-688.

39. **Agnieszka, M., Janiak, a další.** Hydrophobic Derivatives of 2-Amino-2-deoxy-D-glucitol-6-phosphate:. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17. leden 2003, Sv. 8, stránky 1653-1662.