

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Blanka Vochyánová

ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE SACHARIDŮ,
KOFEINU A TAURINU V KRÁTKÉ KAPILÁŘE

Electrophoretic Separations of Saccharides, Caffeine and
Taurine in Short Capillary

Rigorózní práce

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Poděkování

Srdečně děkuji panu Prof. RNDr. Františku Opekarovi CSc. za podporu a motivaci.

Abstrakt

Byly vyvinuty nové laboratorní postupy pro rychlé elektroforetické separace a stanovení základních složek energetických nápojů – sacharidů, kofeinu a taurinu. Pro separace sacharidů bylo použito krátké křemenné kapiláry o vnitřním průměru 10 μm , celkové délce 10 cm a efektivní délce 4 cm ve spojení s bezkontaktním vodivostním detektorem. Pro společné stanovení kofeinu a taurinu byla využita micelární elektrokinetická chromatografie v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 10,5 cm a efektivní délce 8 cm ve spojení s duálním detektorem. Pro detekci taurinu byl použitý bezkontaktní vodivostní detektor a pro detekci kofeinu UV fotometrický detektor. Sacharidy v energetických nápojích byly stanoveny za méně než 50 s, kofein a taurin byly stanoveny v čase těsně přesahujícím jednu minutu.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, krátká kapilára, bezkontaktní vodivostní detekce, duální detekce, micelární elektrokinetická chromatografie, sacharidy, kofein, taurin, energetické nápoje

Abstract

New laboratory techniques have been developed for rapid electrophoretic separations and determinations of the main components of energy drinks – saccharides, caffeine and taurine. For separations of saccharides, a short fused silica capillary with an inner diameter 10 μm , a total length 10 cm and an effective length 4 cm in combination with a contactless conductivity detector was used. For simultaneous determination of caffeine and taurine a micellar electrokinetic chromatography in a fused silica capillary of an inner diameter 50 μm , total length 10,5 cm and an effective length of 8 cm in combination with a dual detector was used. UV photometric and contactless conductivity detector were used for detection of caffeine and taurine, respectively. Saccharides in energy drinks were determined in less than 50 seconds, caffeine and taurine were determined just shortly over one minute.

Key words: capillary electrophoresis, short capillary, contactless conductivity detection, dual detection, micellar electrokinetic chromatography, saccharides, caffeine, taurine, energy drinks

Obsah

Seznam zkratk	6
Předmluva	7
1. Úvod	8
1.1 Energetické nápoje	8
1.2 Sacharidy	8
1.2.1 Stanovení a separace sacharidů	9
1.3 Kofein	10
1.3.1 Stanovení a separace kofeinu	11
1.4 Taurin	12
1.4.1 Stanovení a separace taurinu	12
2. Výsledky a diskuse	13
2.1 Stanovení sacharidů	13
2.2 Stanovení kofeinu a taurinu	14
3. Závěr	16
4. Použitá literatura	17
Příloha A	20
Příloha B	27

Seznam zkratk

C ⁴ D	bezkontaktní vodivostní detekce (C apacitively C oupled C ontactless C onductivity D etection)
CE	kapilární elektroforéza (C apillary E lectrophoresis)
CHES	<i>N</i> -cyklohexyl-2-aminoethansulfonová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
FID	plamenový ionizační detektor (F lame I onization D etector)
GC	plynová chromatografie (G as C hromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (H igh P erformance L iquid C hromatography)
LIF	laserem indukovaná fluorescenční detekce (L aser I nduced F luorescence)
LOD	detekční limit (L imit O f D etection)
MS	hmotnostní spektrometrie (M ass S pectrometry)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (M icellar E lectro K inetic C hromatography)
PAD	pulsní ampérometrická detekce (P ulsed A mperometric D etection)
RID	refraktometrická detekce (R efractive I ndex D etection)
SDS	dodecylsírany sodný (S odium D odecyl S ulfate)
UV	ultrafialové záření
VIS	záření ve viditelné oblasti

Předmluva

Předkládaná rigorózní práce je souborem dvou monotématických prací publikovaných v odborných časopisech. Zabývá se stanovením základních komponent energetických nápojů, které lze získat v běžné obchodní síti. K jejich stanovení je využito kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie v krátké kapiláře, a to jednak se samostatnou bezkontaktní vodivostní detekcí (v případě stanovení sacharidů) nebo duální optickou absorpční a bezkontaktní vodivostní detekcí (v případě stanovení kofeinu a taurinu). Při vyvíjení obou metod byl kladen důraz především na rychlost separace a jednoduchost přípravy vzorků k separaci. Proto nebylo cílem dosažení velmi nízkých limitů detekce. V případě stanovení základních komponent v energetických nápojích, kde se dané složky vyskytují v poměrně vysokých koncentracích, toho nebylo zapotřebí.

1. Úvod

1.1 Energetické nápoje

Energetické nápoje jsou povzbuzující nealkoholické nápoje, které v dnešní době stále více získávají na popularitě. Od doby, kdy byl poprvé představen Red Bull v Rakousku (1987) a v USA (1997) roste jejich obliba a spotřeba exponenciálně. V roce 2006 bylo po celém světě k dostání téměř 500 různých značek těchto nápojů [1]. Jejich hlavními složkami jsou sacharidy, kofein, různé bylinné přísady, taurin a jiné aminokyseliny a vitamíny. Hlavní důvody, proč je lidé stále častěji využívají, jsou stimulační účinky na nervovou soustavu, potlačování ospalosti a únavy a zvyšování pozornosti a fyzické výkonnosti. Pro tyto svoje účinky bývají energetické nápoje velmi oblíbené především u studentů a řidičů z povolání [2-6]. V následujících kapitolách budou podrobněji rozebrány tři nejdůležitější složky energetických nápojů a to sacharidy, kofein a taurin a metody jejich stanovení.

1.2 Sacharidy

Sacharidy, jejichž název je odvozen z latinského *saccharum* neboli cukr, mají rozsáhlý biologický význam: jsou funkčními složkami glykoproteinů, glykolipidů a nukleových kyselin, tvoří součást enzymů a DNA, jsou zdrojem energie pro rostliny i živočichy a jsou základním stavebním materiálem rostlinných buněk [7].

Studium sacharidů v přírodních produktech jako je například med, ovoce či zelenina, je důležité s hlediska kontroly jejich pravosti, kvality a způsobu skladování [8, 9]. Sacharidy jako například sacharóza, glukóza a fruktóza, bývají často přídatnými látkami v potravinách a jejich sledování je tedy žádoucí pro zjišťování nelegálního doslazování potravin (například medu) [8, 10, 11].

Nejjednoduššími zástupci sacharidů jsou monosacharidy. Ty se dělí jednak podle počtu uhlíkových atomů (tetrózy, pentózy, hexózy atd.) a jednak podle přítomnosti aldehydové či ketonové skupiny (aldózy a ketózy). Dále se monosacharidy dělí dle shody konfigurace na chirálním atomu uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem s koordinací chirálního atomu uhlíku D- či L- glycerinaldehydu na L- a D- řady. Epimery jsou takové sacharidy, které se liší konfigurací pouze na jednom uhlíkovém atomu (např. D-galaktóza a D-glukóza). Intramolekulární reakcí aldehydové či ketonové

skupiny s alkoholovou skupinou vynikají tzv. hemiacetaly či hemiketaly. Ty lze znázorňovat Haworthovými projekčními vzorci. Sacharidy s šestičlenným kruhem se nazývají pyranózy (podle pyranu), sacharidy s pětičlenným kruhem se nazývají furanózy (dle furanu). Nově tedy vzniká chirální centrum na tzv. anomerním uhlíku. Konfiguraci na takto vzniklém anomerním uhlíku označujeme symboly α a β . Monosacharidy tvoří důležitou součást složitých lipidů a základní složku nukleových kyselin. Mezi nejznámější monosacharidy patří glukóza, fruktóza, ribóza, galaktóza a mannóza [12-14].

Další skupinou sacharidů jsou tzv. oligosacharidy. Ty se skládají z několika (dvou až deseti) kovalentně navázaných monosacharidů, které jsou navzájem spojeny glykosidovou vazbou. Oligosacharidy se dále rozdělují na redukující (obsahující volnou anomerní hydroxylovou skupinu) a neredukující. Často se slučují s lipidy za vzniku tzv. glykolipidů či s proteiny za vzniku tzv. glykoproteinů. V těchto sloučeninách mívají regulační či stavební funkci. Nejdůležitějším oligosacharidy jsou sacharóza, laktóza, maltóza či cellobióza.

Poslední skupinou sacharidů jsou polysacharidy. Ty se skládají z velkého počtu (obvykle kolem sta) monosacharidů navzájem spojených glykosidovou vazbou. Mají řadu důležitých funkcí: stavební (celulóza, chitin), zásobní (škrob, glykogen), ochrannou (slizy) a mnoho dalších. Proto jsou to jedny z nejrozšířenějších sloučenin v přírodě [12, 13].

1.2.1 Stanovení a separace sacharidů

Jednou z metod, kterou lze stanovit jednoduché sacharidy v potravinách a nápojích, je plynová chromatografie (GC), obvykle ve spojení s plamenově-ionizačním detektorem (FID) či hmotnostním spektrometrem (MS). Metoda ovšem není často využívána, protože je nutné sacharidy před samotným stanovením vhodně derivatizovat [15, 16]. Pomocí GC byly sacharidy stanovovány například v bramborách, meruňkách, džusech, medu, karamelu, whisky a jablkách [15, 17-20]. Další možností je separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) ve spojení s pulsní ampérometrickou detekcí (PAD) [21] či refraktometrickou detekcí (RID) [22]. RID má ovšem nízkou citlivost a PAD se příliš nehodí pro rutinní analýzy [8, 11]. HPLC byla využita při stanovení sacharidů v pivu, vínu, džusech, likérech, medu, mléku

a nealkoholických nápojích [11, 23-27]. Využití kapilární elektroforézy (CE) k separacím cukrů má mnoho výhod: při analýze se spotřebuje velmi malé množství chemikálií i vzorku (na rozdíl od HPLC), kapilára se poměrně snadno promývá čistým pufrem, takže lze brzy po ukončení analýzy opět dávkovat nový vzorek a ten není třeba před analýzou derivatizovat [8, 10, 11]. Pomocí CE byly sacharidy stanoveny například v mléku, jogurtech, medu, instantní kávě, džusech, vínu, pivu, nealkoholických nápojích, sušeném mléku, bonbónech a žvýkačkách [10, 11, 28-33].

Významnou možností, jak separovat sacharidy kapilární elektroforézou, je separace nederivatizovaných forem. Principem je disociace semiacetalových skupin za vysokého pH. K ionizaci hydroxylových skupin v sacharidech je zapotřebí pH vyšší než 11, protože tyto skupiny mají vysoké pK_a [11, 34]. Dalším způsobem je derivatizace sacharidů vhodným činidlem, například kyselinou 4-aminobenzoovou [35] či tvorba komplexů s kyselinou boritou [32].

Protože sacharidy neabsorbují UV záření, nelze pro jejich detegování použít přímou UV detekci, ale pouze nepřímou. Ta ovšem není příliš citlivá [11]. Po derivatizaci vhodným činidlem, které vytvoří ze sacharidů fluoreskující deriváty, lze použít fluorescenční detektor s laserem indukovanou fluorescencí (LIF) [36]. Při spojení CE s MS se analýzy značně prodražují a k obsluze je třeba vysoce kvalifikovaný personál [37]. Ani přímá elektrochemická detekce za použití měděných elektrod se příliš neosvědčila [38]. Pro elektroforetické separace nederivatizovaných sacharidů se velmi dobře hodí bezkontaktní vodivostní detektor (C^4D). Protože zóny separovaných sacharidů mají nižší vodivost než separační elektrolyt, jsou detegovány jako negativní píky za ukazatelem EOF [9, 10, 39].

1.3 Kofein

Kofein (3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion či 1,3,7-trimethylxanthin) je alkaloid příznivě stimulující centrální nervovou soustavu a srdeční činnost. Patří do skupiny purinových methylových derivátů xanthinu [40]. Jedná se o přírodní látku, která se vyskytuje v semenech, plodech či listech více než stovky rostlin z celého světa. Jeho název je odvozen z latinského názvu rostliny kávovníku arabského (*Coffea arabica*). Nachází se například v kávových a kakaových plodech, čajových listech či guaranových plodech. Čistý kofein je bílý prášek hořké chuti. Pro svoje účinky je také

často využíván ve farmacii, má totiž pozitivní účinky na zmírnění bolesti. Je tedy používán jako přísada do analgetických směsí a ve spojení s paracetamolem či kyselinou salicylovou v lécích proti rýmě a chřipce. Také bývá přidáván do preparátů na snižování hmotnosti. Smrtelná dávka kofeinu pro člověka se pohybuje mezi 150 a 200 mg na kg tělesné hmotnosti (šálek kávy obsahuje přibližně 70-120 mg kofeinu). Při předávkování kofeinem nedochází k povzbuzujícím účinkům, ale naopak dochází k nervovo-svalové podrážděnosti, bušení srdce, nervozitě, třesení, poruchám trávení a nespavosti. Kofein má močopudné účinky a zvyšuje vylučování žluči a žaludečních kyselin [3, 40-45, 62].

1.3.1 Stanovení a separace kofeinu

Káva a nápoje obsahující kofein patří mezi produkty, pro které je vyžadována nejvyšší kvalita i v rámci mezinárodního obchodu. Proto je kladen důraz na vyvíjení rychlých a spolehlivých metod pro jeho kvantitativní i kvalitativní analýzu. Pro stanovení kofeinu v analytických laboratořích dominují separační metody ve spojení se spektrálními metodami (GC-MS, HPLC-MS, HPLC-UV), jejichž výhodami je výborná citlivost a selektivita. Jsou ale finančně a časově náročné a pracné, často je třeba vzorky nejprve zakonzentrovat. Ve srovnání s metodami separačními jsou elektrochemické metody časově i finančně nenáročné, dosahují přijatelné citlivosti i selektivity, jednoduše se obsluhují a lze je velmi dobře miniaturizovat. [40, 44-48, 56]. Pomocí GC-MS byl kofein stanovován například v nealkoholických nápojích jako je Coca Cola, Pepsi a v různých druzích čajů [45, 48]. Pro stanovení kofeinu v energetických nápojích byla použita i derivativní spektrofotometrie [49]. Společné stanovení taurinu a kofeinu v energetických nápojích bylo také realizováno pomocí hydrofilní interakční chromatografie [44]. Vhodnou elektrochemickou metodou pro stanovení kofeinu je například micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), jejíž základy položil v roce 1987 Terabe a spol., když použil jako micelární pseudofázi aniontový tenzid dodecylsírán sodný (SDS) [50]. Analyty jsou separovány na základě rozdílné hydrofobility a elektroforetické mobility. Touto technikou lze separovat nenabité i nabité organické molekuly. [41, 57, 61] MEKC byla úspěšně použita například pro analýzy farmaceutických přípravků [58], biologických vzorků [59] či vzorků z životního prostředí [60]. Velké popularity dosáhla v analýzách malých neutrálních

molekul [57].

1.4 Taurin

Taurin (kyselina 2-aminoethansulfonová) je neesenciální aminokyselina. Jeho název je odvozen z latinského slova Taurus, v překladu býk, protože byl poprvé izolován začátkem devatenáctého století z býčí žluče. V tkáních savců je taurin vlastně všudypřítomný, je to jeden z finálních produktů metabolismu cysteinu a methioninu. Je významnou složkou žluči, podílí na tvorbě žlučových solí. Má vliv na neuroinhibici a hraje významnou roli jako neurotransmitter, antioxidant a reguluje hladinu vápníku. Taurin je často přidáván do dětské výživy, výživových doplňků například pro sportovce a do energetických nápojů. Je využíván jako legální potravinářská přídatná látka v mnoha zemích světa. Kvůli kontrole kvality potravin je vyžadován vývoj spolehlivých analytických metod k jeho stanovení. Taurin je slabá organická kyselina s $pK_a = 4,96$. Je snadno rozpustný ve vodě. [51-54]

1.4.1 Stanovení a separace taurinu

Častou metodou ke stanovení taurinu bývá, stejně jako pro stanovení aminokyselin, HPLC s předkolonovou derivatizací a UV-VIS detekcí [53]. Taurin totiž neobsahuje žádný UV chromofor, proto je derivatizace nezbytnou úpravou při použití UV-VIS detekce [52]. Další možností stanovení taurinu je využití iontové chromatografie s vodivostním detektorem [54], kapilární elektroforézy s elektrochemickým detektorem [53], tenkovrstvé chromatografie (nepříliš využívaná pro nízkou citlivost a reprodukovatelnost) [54], plynové či kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem [54, 63], či separace na skleněném mikročipu s fluorescenčním detektorem [55]. Stanovení taurinu bez derivatizace umožňuje i infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, která byla využita k jeho stanovení v energetických nápojích [64]. Nejčastěji využívanou technikou pro stanovení taurinu je ovšem CE. Byla využita například pro stanovení taurinu v plazmě, v lidském srdečním svalu či v potu [52, 54].

2. Výsledky a diskuse

Detailní informace o pracovních postupech a výsledcích stanovení uvedených analytů byly publikovány ve dvou publikacích [A, B], které jsou přílohou této práce. Z tohoto důvodu jsou zde uvedeny jen krátké souhrny obsahující ty nejdůležitější informace z uvedených publikací.

2.1 Stanovení sacharidů

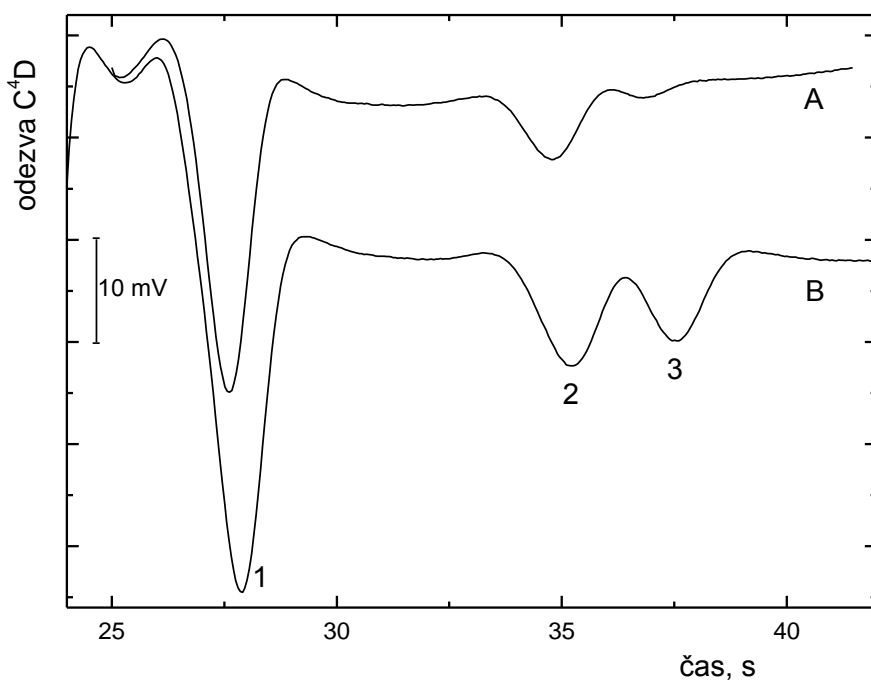
Pro separace sacharidů se nejlépe osvědčila křemenná kapilára s vnitřním průměrem 10 μm , celkovou délkou 10 cm a efektivní délkou 4 cm ve spojení s C^4D a jako separační elektrolyt byl použitý 75 mM NaOH. Sacharidy přítomné v energetických nápojích se za těchto podmínek separovaly za necelých 50 s. Na obrázku 2.1 jsou pro ilustraci uvedeny elektroferogramy separací sacharidů ve dvou energetických nápojích – Red Bull a Burn. V práci nebylo dosaženo závratně nízkých limitů detekce (LOD), ale vzhledem k předpokládaným obsahům sacharidů v potravinářských matricích to nebylo prioritou.

Nalezené hodnoty a jejich srovnání s hodnotami uvedenými na etiketách nápojů jsou v tabulce 2.1.

Tab. 2.1 Výsledky stanovení sacharidů v energetických nápojích metodou standardního přírůdku a hodnoty deklarované výrobcem.

	Sacharóza (g L^{-1})	Glukóza (g L^{-1})	Fruktóza (g L^{-1})	Σ sacharidů (g L^{-1})	Deklarované hodnoty (g L^{-1})
KX	51.9 (10.7)	42.8 (5.6)	19.6 (7.2)	114.5 \pm 4.2 (1.7)	111
Burn	75.0 (2.8)	38.1 (5.7)	31.8 (5.7)	144.9 \pm 5.3 (1.7)	133
Red Bull	59.5 (3.1)	43.1 (8.4)	4.6 (7.7)	106.4 \pm 5.2 (2.2)	110
Kamikaze	56.8 (1.7)	51.0 (2.9)	8.9 (4.6)	116.1 \pm 3.1 (1.1)	113

Uvedené hodnoty jsou mediány tří nezávislých stanovení. Relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v závorkách. Celkový obsah sacharidů byl vypočítán z výsledků třech nezávislých stanovení jednotlivých sacharidů nikoliv jako součet mediánů jednotlivých sacharidů uvedených v tabulce 2.1.



Obr. 2.1. Elektroferogramy separace směsi sacharidů v energetických nápojích Red Bull (A) a Burn (B) zředěných deionizovanou vodou 1:50; 1 – sacharóza, 2 – glukóza, 3 – fruktóza. Experimentální podmínky: křemenná kapilára o vnitřním průměru 10 μm , celkové délce 10 cm a efektivní délce 4 cm, separační elektrolyt – 75mM NaOH, separační napětí 5 kV.

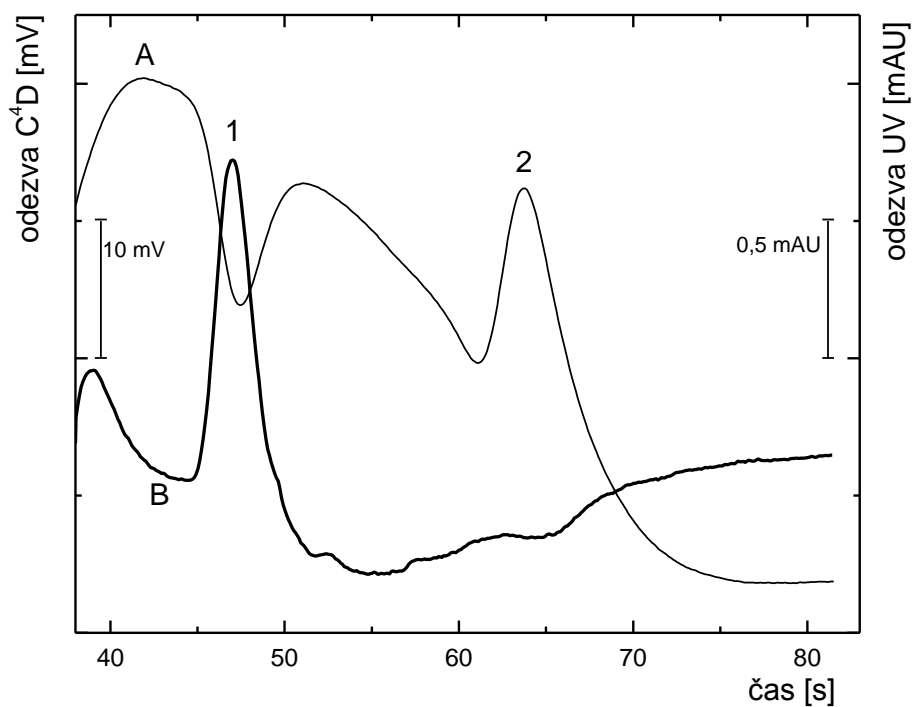
2.2 Stanovení kofeinu a taurinu

Pro společné stanovení kofeinu a taurinu byla využita micelární elektrokinetická chromatografie v křemenné kapiláře o celkové délce 10,5 cm, vnitřním průměru 50 μm a efektivní délce 8 cm. Kofein byl detegován pomocí UV fotometrického detektoru, taurin pomocí C^4D . Za nejvhodnější separační elektrolyt byl po sérii pokusů zvolen 40 mM CHES, 15 mM NaOH a 50 mM SDS. Za těchto podmínek došlo k separaci obou analytů v čase těsně přesahujícím 1 min. Na obrázku 2.2 je vidět společný záznam z C^4D detektoru a UV fotometrického detektoru při stanovení kofeinu a taurinu v desetkrát ředěném Red Bullu.

Nalezené hodnoty a jejich srovnání s hodnotami uvedenými na etiketách nápojů jsou v tabulce 2.2.

Tab. 2.2 Výsledky stanovení kofeinu a taurinu v energetických nápojích a hodnoty deklarované výrobcem.

	Metoda kalibračního grafu		Metoda standardního přídávku		Deklarované hodnoty	
	kofein (mg L ⁻¹)	taurin (mg L ⁻¹)	kofein (mg L ⁻¹)	taurin (mg L ⁻¹)	kofein (mg L ⁻¹)	taurin (mg L ⁻¹)
Red Bull	324.7±1.2 (0.2)	4123.9±139.9 (1.5)	317.0±19.2 (2.7)	3857.0±235.3 (2.8)	320	4000
Kamikaze	459.2±13.5 (1.3)	4178.6±333.9 (3.7)	467.7±11.2 (2.0)	4110.4±224.0 (2.5)	480	4000



Obr. 2.2. Elektroferogram separace kofeinu (1) a taurinu (2) v energetickém nápoji Red Bull zředěném deionizovanou vodou 1:10; A – záznam C⁴D, B – záznam UV fotometrického detektoru (při 216 nm). Experimentální podmínky: křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm, celkové délce 10,5 cm a efektivní délce 8 cm, separační elektrolyt 40mM CHES + 15mM NaOH + 50mM SDS o pH 9,36; separační napětí 5 kV.

3. Závěr

Laboratorně sestavená aparatura pro elektroforetické separace v krátké kapiláře byla využita jak k separacím sacharidů, tak i kofeinu a taurinu v energetických nápojích. Navržené metody nevyžadují téměř žádnou předúpravu vzorků k analýze a stanovení je velmi rychlé. Obě metodiky lze použít jako rychlou, levnou a nenáročnou alternativu dosud uváděných metod pro stanovení sacharidů, kofeinu a taurinu nejen v energetických nápojích, ale i v jiných potravinářských produktech.

4. Použitá literatura

1. Reissig, Ch. J., Strain, E. C., Griffiths, R. R.: *Drug. Alc. Dep.* **99**, 1 (2009)
2. Liotta, E., Gottaro, R., Seri, C., Rimondo, C., Miksik, I., Serpelloni, G., Tagliaro, F.: *For. Sci. Int.* **220**, 279 (2012)
3. Pohler, H.: *J. Nurse Pract.*, **6**, 49 (2010)
4. Smit, H. J., Rogers, P. J.: *Food Qual. Prefer.* **13**, 317 (2002)
5. Peacock, A., Martin, F. H., Carr, A.: *Appet.* **64**, 1 (2013)
6. Giles, G. E., Mahoney, C. R., Brunyé, T. T., Gardony, A. L., Taylor, H. A., Kanarek, R. B.: *Pharm. Biochem. Beh.* **102**, 569 (2012)
7. Guttman, A.: *J. Chromatogr. A* **763**, 271 (1997)
8. Montero, C. M., Dodero, M. C. R., Sánchez, D. A. G., Barroso, C. G.: *Chromatographia* **59**, 15 (2004)
9. Carvalho, A. Z., da Silva, J. A. F., do Lago, C. L.: *Electrophoresis* **24**, 2138 (2003)
10. Tůma, P., Málková, K., Samcová, E., Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **698**, 1 (2011)
11. Soga, T., Serwe, M.: *Food Chem.* **69**, 339 (2000)
12. Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*, Praha, Victoria Publishing a. s., 1995
13. Černý, M., Trnka, T., Buděšínský, M.: *Sacharidy*, Praha, ČSCH, 2010
14. IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature: *Nomenclature of Carbohydrates*. Dostupné z URL: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/>> [cit. 22.9.2014]
15. Tisza, S., Molnár-Perl, I., Friedman, M., Sass, P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 54 (1996)
16. Bassi, D., Bartolozzi, F., Muzzi, E.: *Plant Breeding* **115**, 67 (1996)
17. Katona, Z. F., Sass, P., Molnár-Perl, I.: *J. Chromatogr. A* **847**, 91 (1999)
18. Ratsimba, V., García, J. M., Defaye, J., Nigay, H., Voilley, A.: *J. Chromatogr. A* **844**, 283 (1999)
19. Molnár-Perl, I., Horváth, K.: *Chromatographia* **45**, 321 (1997)
20. Horváth, K., Molnár-Perl, I.: *Chromatographia* **45**, 328 (1997)
21. Cataldi, T. R. I., Margiotta, G., Zambonin, C. G.: *Food Chem.* **62**, 109 (1998)
22. Yuan, J. P., Chen, F.: *Food Chem.* **64**, 423 (1999)
23. Yan, Z., Xingde, Z., Weijun, N.: *Mikrochim. Acta* **127**, 189 (1997)
24. Akiyama, S., Nakashima, K., Yamada, K.: *J. Chromatogr. A* **626**, 266 (1992)

25. Gey, M. H., Unger, K. K., Battermann, G.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **356**, 339 (1996)
26. Huang, X., Pot, J. J., Kok, W. T.: *Chromatografia* **40**, 684 (1995)
27. Mendes, E., Brojo, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M. A.: *Carbohydr. Polym.* **37**, 219 (1998)
28. Klampfl, Ch. W., Buchberger, W.: *Electrophoresis* **22**, 2737 (2001)
29. Ye, J., Baldwin, R. P.: *J. Chromatogr. A* **687**, 141 (1994)
30. Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R., Widmer, H. M.: *J. Chromatogr. A* **680**, 187 (1994)
31. Chen, M. C., Huang, H. J.: *Anal. Chim. Acta* **341**, 83 (1997)
32. Noe, C. R., Freissmuth, J.: *J. Chromatogr. A* **704**, 503 (1995)
33. Zhang, X., Cao, Y., Ye, J.: *Food Chem.* **72**, 385 (2001)
34. Honda, S.: *J. Chromatogr. A* **720**, 337 (1996)
35. Vorndran, A. E., Grill, E., Huber, C., Oefner, P. J., Bonn, G. K.: *Chromatographia* **34**, 109 (1992)
36. Tseng, H.-M., Gattolin, S., Pritchard, J., Barrett, D. A.: *Electrophoresis* **30**, 1399 (2009)
37. Campa, C., Coslovi, A., Flamigni, A., Rossi, M.: *Electrophoresis* **27**, 2027 (2006)
38. Chu, Q. C., Fu, L., Guan, Y. Q., Ye, J. N.: *J. Sep. Sci* **28**, 234 (2005)
39. Zemann, A., Nguyen, D. T., Bonn, G.: *Electrophoresis* **18**, 1142 (1997)
40. Švor, L., Tomčík, P., Svítková, J., Rievaj, M., Bustin, D.: *Chem. Listy* **107**, 530 (2013)
41. Zhao, Y., Lunte, C. E.: *J. Chromatogr. B* **688**, 265 (1997)
42. Heckman, M. A., Weil, J., Gonzalez de Mejia, E.: *J. Food Sci.* **75**, R77 (2010)
43. Injac, R., Srdjenovic, B., Prijatelj, M., Boskovic, M., Karljickovic-Rajic, K., Strukelj, B.: *J. Chromatogr. Sci.* **46**, 137 (2008)
44. Chirita, R.-I., Dascalu, C., Gavrilă, L., Elfakir, C.: *Rev. Chim.* **61**, 1173 (2010)
45. Shrivastava, K., Wu, H.-F.: *J. Chromatogr. A* **1170**, 9 (2007)
46. Srdjenovic, B., Djordjevic-Milic, V., Grujic, N., Injac, R., Lepojevic, Z.: *J. Chromatogr. Sci.* **46**, 144 (2008)
47. Horie, H., Kohata, K.: *J. Chromatogr. A* **881**, 425 (2000)
48. Zou, J., Li, N.: *J. Chromatogr. A* **1136**, 106 (2006)

49. Pieszko, C., Baranowska, I., Flores, A.: *J. Anal. Chem.* **65**, 1228 (2010)
50. Cohen, A. S., Terabe, S., Smith, J. A., Karger, B. L.: *Anal. Chem.* **59**, 1021 (1987)
51. Lombardini, J. B., Schaffer, S. W.: *Amino Acids* **23**, 343 (2002)
52. Da Silva, D. L. P., Rüttinger, H. H., Mrestani, Y., Baum, W. F., Neubert, R. H. H.: *Electrophoresis* **27**, 2330 (2006)
53. Cao, Y., Zhang, X., Chu, Q., Fang, Y., Ye, J.: *Electroanalysis* **15**, 898 (2003)
54. Mou, S., Ding, X., Liu, Y.: *J. Chromatogr. B* **781**, 251 (2002)
55. Götz, S., Revermann, T., Karst, U.: *Lab Chip* **7**, 93 (2007)
56. Castro-Puyana, M., García-Cañas, V., Simó, C., ifuentes, A.: *Electrophoresis* **33**, 147 (2012)
57. El Deeb, S., Abu Iriban, M., Gust, R.: *Electrophoresis* **32**, 166 (2011)
58. Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Terraciano, A.: *Electrophoresis* **29**, 3519 (2008)
59. Yeh, H. H., Yang, Y. H., Chen, S. H.: *Electrophoresis* **27**, 819 (2006)
60. Birungi, G., Yau, L., Sam, F.: *Electrophoresis* **30**, 2737 (2009)
61. Silva M.: *Electrophoresis* **34**, 141 (2013)
62. Vogt, C., Conradi, S., Rohde, E.: *J. Chem. Educ.* **74**, 1126 (1997)
63. Marchei, E., Pellegrini, M., Pacifici, R., Palmi, I., Pichini, S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**, 99 (2005)
64. Triebel, S., Sproll, C., Reusch, H., Godelmann, R., Lachenmeier, D. W.: *Amino Acids* **33**, 451 (2007)