

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



ANALÝZA AMINOKYSELÍN AKO DOPLNKOV STRAVY
Bakalárska práca

Vedúca bakalárskej práce: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Andrea Kohániová

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela pod'akovať mojej školiteľke PharmDr. Ivane Horskotte Šrámkovej, Ph.D. za jej odborné vedenie, cenné pripomienky a trpezlivosť pri písaní tejto bakalárskej práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 11.05.2021

Andrea Kohániová

Obsah

| | |
|--|----|
| Zoznam skratiek..... | 6 |
| 1 Úvod..... | 8 |
| 2 Cieľ práce..... | 9 |
| 3 Aminokyseliny..... | 10 |
| 3.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti..... | 11 |
| 3.2 Rozdelenie..... | 11 |
| 3.3 Funkcie v organizme | 13 |
| 3.4 Jednotlivé aminokyseliny a ich farmaceutické využitie..... | 13 |
| 3.4.1 Alanín..... | 13 |
| 3.4.2 Aminokyseliny s rozvetveným reťazcom (BCAA) | 14 |
| 3.4.3 Arginín | 14 |
| 3.4.4 Cysteín | 15 |
| 3.4.5 Fenylalanín..... | 15 |
| 3.4.6 Glycín..... | 15 |
| 3.4.7 Histidín..... | 16 |
| 3.4.8 Kyselina asparágová a asparagín | 16 |
| 3.4.9 Kyselina glutámová a glutamín | 16 |
| 3.4.10 Lyzín | 17 |
| 3.4.11 Metionín..... | 17 |
| 3.4.12 Prolín..... | 18 |
| 3.4.13 Serín | 18 |
| 3.4.14 Treonín..... | 18 |
| 3.4.15 Tryptofán | 19 |
| 3.4.16 Tyrozín..... | 19 |
| 4 Doplnky stravy..... | 20 |
| 4.1 Legislatíva | 20 |
| 4.1.1 Uvádzanie na trh | 20 |
| 4.1.2 Označovanie..... | 21 |
| 4.1.3 Nové potraviny | 22 |
| 4.2 Liečivý prípravok | 22 |
| 4.2.1 Rozdiel medzi doplnkom stravy a liečivým prípravkom..... | 23 |
| 4.3 Bezpečnosť doplnkov stravy | 24 |
| 4.4 Kontrola kvality | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5 | Metódy používané pri analýze aminokyselín | 26 |
| 5.1 | Základná charakteristika používaných metód | 26 |
| 5.1.1 | Absorpčná spektrofotometria v infračervenej oblasti | 26 |
| 5.1.2 | Hmotnostná spektrometria | 26 |
| 5.1.3 | Kvapalinová chromatografia | 27 |
| 5.1.4 | Nukleárna magnetická rezonancia | 28 |
| 5.1.5 | Odmerná analýza | 28 |
| 5.1.6 | Polarimetria | 29 |
| 5.2 | Liekopisné metódy analýzy aminokyselín | 30 |
| 5.2.1 | Analýza aminokyselín kvapalinovou chromatografiou | 30 |
| 5.2.2 | Liekopisné dôkazy jednotlivých aminokyselín | 32 |
| 5.2.3 | Stanovenie obsahu titračnými metódami | 34 |
| 5.3 | Prehľad publikovaných metód analýz aminokyselín | 35 |
| 5.3.1 | Analýza voľných aminokyselín spojením chromatografie a hmotnostnej spektrometrie – aplikácia pre doplnky stravy | 35 |
| 5.3.2 | Chirálna analýza aromatických aminokyselín použitím superkritickej fluidnej chromatografie | 36 |
| 5.3.3 | Nová metóda hydrofilnej interakčnej chromatografie pre stanovenie aminokyselín v doplnkoch stravy bez derivatizácie | 36 |
| 5.3.4 | Optimalizácia „one pot“ derivatizácie a enantioseparácie cysteínu: aplikácia na doplnky stravy | 37 |
| 5.3.5 | Súčasný stanovenie taurínu, N-acetylcysteínu, glycínu, metionínu v komerčne dostupnom prípravku pomocou HPLC | 38 |
| 5.3.6 | Validačná štúdia protónovej NMR ako metódy stanovenia L-arginínu, L-citrulínu a taurínu v doplnkoch stravy | 38 |
| 5.3.7 | Využitie MS a NMR pre kontrolu doplnkov stravy obsahujúcich aminokyseliny | 39 |
| 6 | Záver | 44 |
| 7 | Zdroje | 45 |
| | Zoznam obrázkov | 50 |
| | Zoznam tabuliek | 50 |

Zoznam skratiek

| | |
|-------|--|
| ACN | acetonitril |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| BCAA | aminokyseliny s rozvetveným reťazcom (branched chain amino acids) |
| CNS | centrálny nervový systém |
| ČR | Česká republika |
| DAD | detektor diódového poľa (diode array detector) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DNF-B | 1-fluór-2,4-dinitrobenzén |
| DOPA | dihydroxyfenylalanín |
| ESI | ionizácia elektrosprejom (electrospray ionization) |
| EÚ | Európska únia |
| FIA | prietoková injekčná analýza (flow injection analysis) |
| IS | vnútorný štandard (internal standard) |
| HILIC | hydrofilná interakčná chromatografia (hydrophilic interaction liquid chromatography) |
| HPLC | vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography) |
| LOD | medza detekcie (limit of detection) |
| LOQ | medza stanoviteľnosti (limit of quantification) |
| MS | hmotnostná spektrometria (mass spectrometry) |
| NMR | nukleárna magnetická rezonancia |
| OTC | voľne predajné liečivá (over the counter) |
| PDA | detektor fotodiodového poľa (photodiode array detector) |

| | |
|---------|---|
| RP-HPLC | vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze (reversed phase high performance liquid chromatography) |
| SFC | superkritická fluidná chromatografia (supercritical fluid chromatography) |
| SÚKL | Státní ústav pro kontrolu léčiv |
| SZPI | Státní zemědělská a potravinářská inspekce |
| SZÚ | Státní zdravotní ústav |
| TLC | tenkovrstvová chromatografia (thin layer chromatography) |
| TSP | sodná soľ 3-(trimethyl)silylpropiónovej kyseliny |
| TMSP-4 | 2,2,3,4-D4 sodná soľ 3-(trimethyl)silylpropiónovej kyseliny |

1 Úvod

Aminokyseliny zohrávajú v organizme významnú úlohu, preto sa nové možnosti ich využitia stali centrom záujmu. Zo strany výrobcov je snaha poskytnúť širokej verejnosti ich výhodné výživové vlastnosti vo forme doplnkov stravy. Analýza doplnkov stravy má tak s rastúcim množstvom nových prípravkov väčší význam v súvislosti s ochranou verejného zdravia.

V prvej časti tejto práce je uvedená charakteristika aminokyselín, funkcie proteínogénnych aminokyselín a ich účinky na organizmus v prípade užívania ako doplnkov stravy alebo ich potenciálne terapeutické využitie. Informácie o aminokyselinách boli získané z odbornej literatúry z oblasti biochémie a poznatky o ich farmaceutickom využití nájdené pomocou databázy PubMed.

Ďalšia časť je zameraná na zhrnutie legislatívnej úpravy, charakteristiky a definovanie pojmu „doplněk stravy“, ktorý je pre potreby tejto bakalárskej práce nahradený termínom doplnok stravy.

Poslednú časť tvorí uvedenie princípov techník používaných pri analýze, analytické hodnotenie aminokyselín metódami uvedenými v platnom Českom lékopise 2017, vrátane doplnkov vydaných v roku 2019 a 2020. Ďalej nasledujú publikované články zamerané na metódy kontroly obsahu doplnkov stravy. K vyhľadávaniu publikovaných článkov v danej problematike bola použitá databáza Web Of Science so zameraním na najnovšie trendy, preto bolo časovo vymedzená na roky 2015 až 2020.

2 Cieľ práce

Cieľom a zadáním predloženej rešeršnej práce je poskytnúť prehľad o aminokyselinách, doplnkoch stravy s ich obsahom a možnostiach ich analýzy. Práca sa zameriava na kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu aminokyselín ako látok čistých a prípravkoch doplnkov stravy.

3 Aminokyseliny

Aminokyseliny sú z chemického hľadiska substitučnými derivátmi karboxylových kyselín obsahujúce najmenej jednu kyslú karboxylovú funkčnú skupinu a bázickú aminoskupinu. Na základe polohy aminoskupiny vzhľadom ku karboxylovej skupine sa aminokyseliny označujú gréckymi písmenami. Najvýznamnejšími aminokyselinami pre organizmus sú tie, ktoré obsahujú na α -uhlíku v uhl'ovodíkovom reťazci naviazanú zároveň aminoskupinu a karboxylovú funkčnú skupinu [1]. Okrem nich poznáme aminokyseliny beta a gama, ktoré majú aminoskupinu naviazanú na v poradí vzdialenejších uhlíkoch. Na uhlíku s označením C-2 u α -aminokyselín sú naviazané štyri rôzne substituenty, uhlík sa stáva chirálnym centrom. Chirálnym centrom je podmienený výskyt aminokyselín ako enantiomérov. Rozlišujeme dve zrkadlové štruktúry, ktoré označujeme L a D-aminokyseliny. Proteinogénne (kódované) α -aminokyseliny sú stavebnými jednotkami bielkovín vyskytujúce sa predovšetkým ako L-enantioméry. Výnimku z chiralít kódovalých aminokyselín tvorí glycín. Aminokyselín zoradených podľa genetického kódu v polypeptidových reťazcoch je 20 a každá z nich má skratku zloženú z troch písmen (viď Tabuľka 1) [2].

Tabuľka 1 Názov a skratka aminokyselín (prevzaté a upravené z [3])

| Názov | Skratka | Názov | Skratka |
|---------------------|---------|--------------------|---------|
| alanín | Ala | kyselina glutámová | Glu |
| arginín | Arg | leucín | Leu |
| asparagín | Asn | lyzín | Lys |
| cysteín | Cys | metionín | Met |
| fenylalanín | Phe | prolín | Pro |
| glutamín | Gln | serín | Ser |
| glycín | Gly | treonín | Thr |
| izoleucín | Iso | tryptofán | Trp |
| histidín | His | tyrozín | Tys |
| kyselina asparágová | Asp | valín | Val |

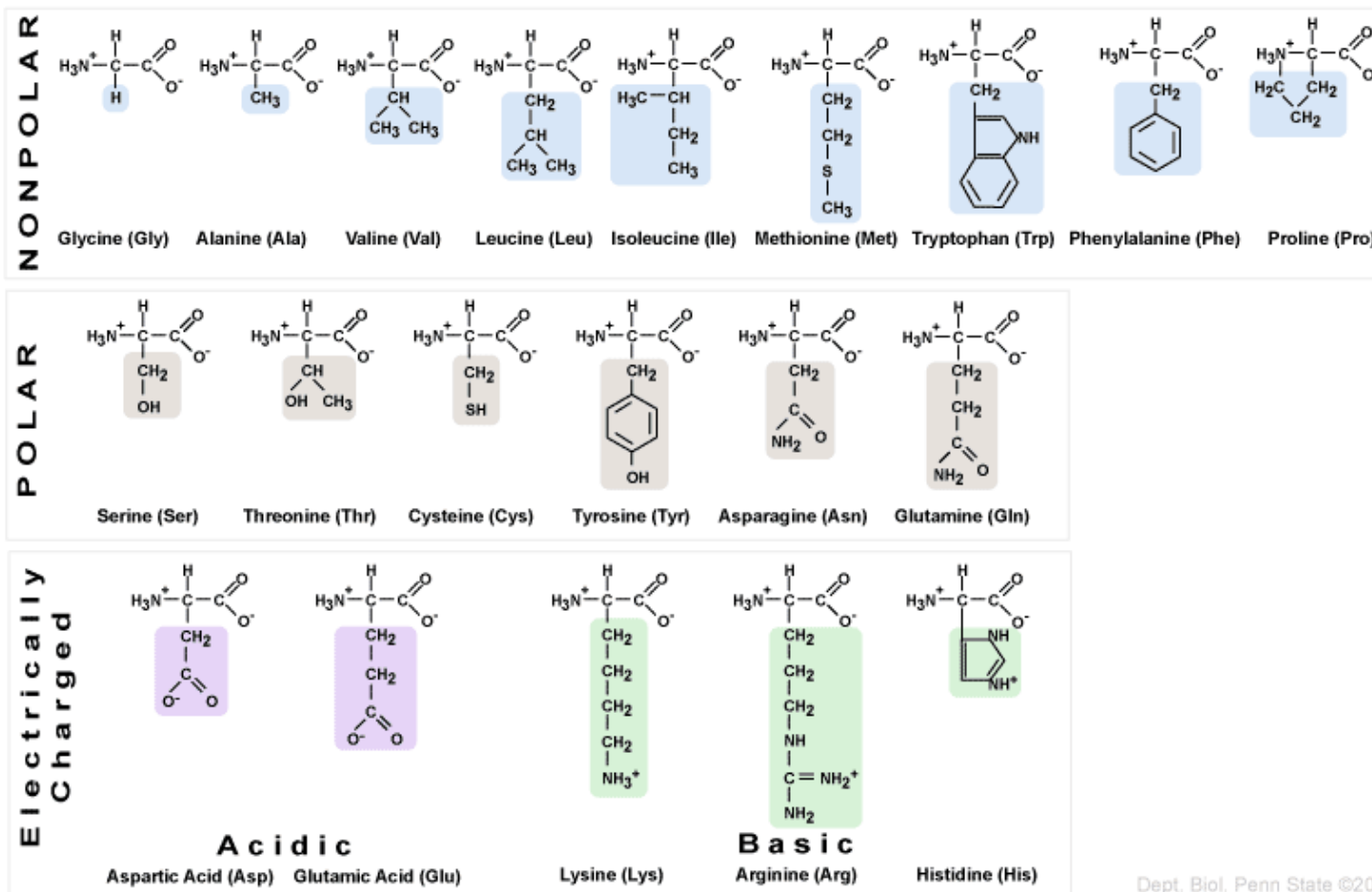
3.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti

Aminokyseliny sú kryštalické látky s vysokou teplotou topenia. Rozpustnosť je daná prítomnosťou funkčných skupín. Aminokyseliny sú väčšinou polárne látky, rozpúšťajú sa vo vode a v iných polárnych rozpúšťadlách, v nepolárnych rozpúšťadlách sú nerozpustné. Vďaka amfotérnemu charakteru sú aminokyseliny schopné tvoriť soli s kyselinami aj so zásadami, tieto soli sú rozpustnejšie ako pôvodná aminokyselina. V roztoku z oblasti kyslého pH je aminokyselina protonizovaná a vyskytuje sa v ňom vo forme kationu, v zásaditom roztoku sa nachádza vo forme aniónu. Pri určitej hodnote pH aminokyselina nesie rovnaký počet kladných a záporných nábojov a stáva sa neutrálnou. Neutrálny dipolárny ión sa nazýva amfión a hodnota pH pri ktorom vzniká je označovaná ako izoelektrický bod pI. Izoelektrický bod je špecifický pre danú aminokyselinu a je možné ho vypočítať pomocou disociačných konštánt [1, 3].

3.2 Rozdelenie

Kódované aminokyseliny sa odlišujú štvrtým substituentom na α -uhlíku, ktorým je postranný uhl'ovodíkový reťazec. Postranný reťazec môže mať aromatický alebo alifatický charakter a na základe jeho polariry rozlišujeme kyslé, bázické a neutrálne aminokyseliny, ako je znázornené na Obrázok 1. Neutrálne obsahujú nepolárny postranný reťazec, kyslé majú postranný reťazec ionizovaný kladne a bázické ho majú ionizovaný záporne. Z dvadsiaticich štandardných aminokyselín, vyskytujúcich sa v bielkovinách, patria medzi kyslé kyselina asparágová a kyselina glutámová, medzi zásadité patrí arginín, histidín a lyzín, zvyšné sú neutrálne [3].

Nie všetky aminokyseliny, potrebné pre syntézu bielkovín, si dokáže živočíšny organizmus vytvoriť. Z tohto hľadiska ich môžeme rozdeliť na esenciálne a neesenciálne. Esenciálne aminokyseliny si človek nedokáže vytvoriť, musia byť prijímané potravou. Medzi esenciálne aminokyseliny patria aminokyseliny s vetveným postranným reťazcom valín, leucín a izoleucín, aromatickým reťazcom fenylalanín a tryptofán, aminokyselina lyzín, a tiež treonín a metionín. Skelet neesenciálnych aminokyselín si môže organizmus syntetizovať z bežných metabolitov. Neesenciálne aminokyseliny sú glycín, alanín, serín, tyrozín, cysteín, kyselina asparágová a glutámová, glutamín, asparagín a prolín. Histidín a arginín si síce človek dokáže vytvoriť, avšak v určitom období sú syntetické procesy pomalšie, preto sa označujú ako poloesenciálne [4, 5].



Dept. Biol. Penn State ©2002

Obrázok 1 Chemická štruktúra kódovaných aminokyselín a rozdelenie na základe polarity ich postranného reťazca [6]

3.3 Funkcie v organizme

Voľné aminokyseliny tvoria v organizme pool (asi 100 g), ktorý je určený pre syntézu peptidov, bielkovín, ďalších dusíkatých látok alebo ako zdroj energie [4]. Geneticky kódované α -aminokyseliny sú základom proteosyntézy a ďalších biochemických procesov v organizme. Deriváty týchto aminokyselín sú menej obvyklé, nie sú stavebnou zložkou peptidov a proteínov, ale vyskytujú sa ako produkty metabolizmu alebo sú to biologicky aktívne zlúčeniny [7]. Neproproteinogénne aminokyseliny a ich deriváty sú východiskovou látkou pre vznik niektorých hormónov, mediátorov a metabolitov ako glukóza, hem, purínové alebo pyrimidínové bázy. Stretávame sa s nimi aj ako s medziproduktmi rôznych metabolických dráh. Nachádzame ich v štruktúre lipidov, fosfolipidov a žľčových kyselín [2]. Nepotrebné aminokyseliny sa metabolizujú procesmi, pri ktorých dochádza k odštiepeniu aminoskupiny a zmene uhlíkovej kostry. Na základe zmien uhlíkovej kostry delíme aminokyseliny na ketogénne a glukogénne. Ketogénne aminokyseliny sa degradujú na acetoacetát alebo acetyl-CoA. Glukogénne aminokyseliny poskytujú pyruvát alebo ďalšie produkty, ktoré vstupujú do citrátového cyklu. Ku glukogénnym patria všetky z kódovaných aminokyselín, s výnimkou leucínu a lyzínu [4].

3.4 Jednotlivé aminokyseliny a ich farmaceutické využitie

3.4.1 Alanín

Alanín sa zúčastňuje významným podielom na procesoch metabolizmu, vrátane energetického metabolizmu v CNS a periférnych nervov. Nachádzame ho v glukózo–alanínovom a Krebsovom cykle, má glykogénny efekt. Podieľa sa na stabilizácii funkcie prostaty a do určitej miery ovplyvňuje imunitný systém. Je hlavnou frakciou aminodusíku krvnej plazmy a jeho zvýšená hodnota poukazuje na poškodenie pečene [1,8].

Použitie L-alanínu v prípravkoch sa v literatúre neuvádza. Populárnym doplnkom stravy medzi športovcami sa stala aminokyselina β -alanín. β -alanín má pri orálnom podaní prínos pri výkonnosti, najmä ak je hlavným obmedzujúcim faktorom výkonu metabolická acidóza. Nežiaducim účinkom pri orálnom podaní je parestézia, ktorej intenzita závisí na dávke. Optimálna dávka β -alanínu závisí od veku, pohlavia a zdravotného stavu. Minimálna dávka s ergogenickým efektom u zdravých mužov sa udáva v rozmedzí 1,2 až 4,8 g na deň [9].

3.4.2 Aminokyseliny s rozvetveným reťazcom (BCAA)

Medzi aminokyseliny označované spoločným názvom BCAA patria aminokyseliny valín, leucín a izoleucín. Sú substrátom pre biosyntézu sterolu, glukózy, proteínov, svalového tkaniva, majú anabolické vlastnosti a regulujú signalizačné dráhy. BCAA súperia s aromatickými aminokyselinami v mozgu, čím ovplyvňujú syntézu neurotransmitterov ako serotonínu, dopamínu, norepinefrínu.

Zvýšená hladina BCAA v plazme vďaka tomuto mechanizmu reguluje správanie a funkcie mozgu. Nedostatok týchto aminokyselín je spojený s nižšou odolnosťou voči patogénom, pretože BCAA po ich oxidácií slúžia ako palivo pre imunitné bunky a ich inkorporácia prispieva k syntéze nových buniek. Štúdie poukazujú na znižovanie chuti do jedla a adipozity tela používaním leucínu a vplyv aminokyselín s rozvetveným reťazcom na laktáciu a kvalitu materského mlieka. Je možné ich mnohostranné využitie vďaka ich anabolickým vlastnostiam, k jednoznačným záverom sa doteraz nedošlo a sú nevyhnutné ďalšie dôkazy pre potvrdenie ich účinnosti. Zvyšovanie syntézy bielkovín a znižovanie ich degradácie sa navrhuje využiť ako terapeutická podpora u chronických pacientov, pri sepe a traumách [10, 11]. Tolerované množstvo pre mladých zdravých dospelých a starších jedincov sa ukázala dávka 500 mg/kg na deň, pričom vedľajšie účinky neboli zaznamenané. Pri vysokých koncentráciách v krvi dochádza k hypotónii, hypoglykémii, ketoacidóze, kóme až edému mozgu [12].

3.4.3 Arginín

Arginín je syntetizovaný u dospelých v obličkách z citrulínu, ktorý je uvoľňovaný predovšetkým tenkým črevom. V organizme sa zúčastňuje mnohých metabolických dráh. Podieľa sa na syntéze močoviny, čím pomáha udržiavať dusíkovú bilanciu a je dusíkovým prekursorom pre oxid dusnatý, molekuly s vazodilatačným účinkom. Participuje na produkcii enzýmov štrukturálnych proteínov, polyamínov, kreatínu a uľahčuje uvoľňovanie rastového hormónu, prolaktínu, inzulínu a glukagónu.

L-arginín sa ako suplement podáva v rámci prevencie ischemickej choroby srdca a zlepšenia mikrocirkulácie, zníženia vysokého krvného tlaku a zlepšenia prekrvenia v tkanivách. Zvýšením prekrvenia tak napomáha pri zvýšení kapacity fyzického cvičenia, zvyšuje hladinu energie a oxygenácie. Uvádza sa, že L-arginín s podaním ďalších látok je možný použiť pri terapii erektilnej dysfunkcie [13, 14]. Podanie L-arginínu dokáže zlepšovať hojenie rán a imunitu. Perorálne podanie v dávkach až do 30 g na deň sú organizmom dobre tolerované [15].

3.4.4 Cysteín

Cysteín sa spolu s ostatnými aminokyselinami obsahujúcimi síru zúčastňuje procesov syntézy a štrukturálnych zmien proteínov, regulácie bunkovej energie a odpovede na oxidatívny stres [16]. Je prekursorom pre telo dôležitých látok vrátane glutathionu, taurínu a sulfánu. Sulfán v nízkych koncentráciách chráni neuróny pred oxidatívnym stresom, je neuromodulátorom, a za pomoci ovplyvnenia ATP senzitívnych draslíkových kanálov pôsobí ako vazodilatans. Cysteín má význam aj pri uvoľňovaní inzulínu.

V dávke 300 mg/kg na deň L-cysteínu sa napomáha zníženiu pečenevých enzýmov a laktátovej acidóze. Podávanie L-cysteínu predpokladá zmiernenie poškodenia DNA, zvýšenie antioxidačnej kapacity, čoho výsledkom by mala byť bunková ochrana pred oxidačným stresom [17, 18].

3.4.5 Fenylalanín

Fenylalanín sa zúčastňuje metabolizmu aminokyselín a tvorby proteínov vo všetkých tkanivách i regulácií neuromediátorov. Okrem týchto funkcií je prekursorom mnohých látok, medzi ktoré patria aj tyrozín, dopamín, norepinefrín a epinefrín, fenyletylamín a fenylacetát [19].

Fenylalanín v dávke v rozmedzí 1 až 10 g na deň je využívaný pri liečbe depresie u dospelých, ale aj u detí a dospievajúcich, kde sa začína s nižším dávkovaním. Je možné dávku postupne zvyšovať vzhľadom k odpovedi pacienta a pri sledovaní nežiaducich účinkov. Fenylalanín by sa mal podávať ráno a vo všeobecnosti je dobre tolerovaný [20].

3.4.6 Glycín

Glycín má dôležitú úlohu vo výžive a metabolizme. V tele je využívaný na syntézu proteínov, tvorbu látok s významnou úlohou vo fyziológii – glutathionu, kreatínu, hemu, purínov, serínu a zúčastňuje sa procesu konjugácie žlčových kyselín. Glycín je neurotransmitter, reguluje okrem iného aj intracelulárne hladiny Ca^{2+} , chloridové kanály v leukocytoch a makrofágoch, tvorbu cytokínov a homeostázu organizmu [21].

Glycín je látkou s protizápalovým a antioxidačným účinkom. Perorálne podanie glycínu sa dá využiť pri terapii hemoragického a endotoxického septického šoku, kardiovaskulárnych ochoreniach a obezite. Uvažuje sa o aplikácii jeho cytoprotektívneho účinku pri vredovom ochorení žalúdka a imunomodulačného účinku pri artritíde [22].

3.4.7 Histidín

Histidín je východiskovou látkou pre syntézu dipeptidov karnozínu a anserínu, ktorých funkcia je spájaná s aktiváciou myozínovej ATP-asy v svalstve [1]. Zabezpečuje metyláciu proteínov a je súčasťou štruktúry hemoglobínu, kde má istý podiel na jeho správnom fungovaní [21]. Bola popísaná úloha histidínu pri chelatácii kovových iónov, jeho antioxidantný účinok a pôsobenie ako pufru v svale pri anaeróbnom cvičení.

Pre užívanie histidínu ako podpory terapie sú potrebné štúdie, ktoré by dokázali jeho dostatočnú účinnosť pri anémiách, urémiách, metabolickom syndróme, atopickú dermatitídu, neurologických ochoreniach, kde sa z doterajších informácií ukazuje jeho potenciálny kladný prínos. Neboli hlásené žiadne známky toxicity, mutagenity ani alergických reakcií, ale podávanie histidínu môže byť nevhodné u pacientov s poškodením pečene [23].

3.4.8 Kyselina asparágová a asparagín

Kyselina asparágová sa zúčastňuje bunkového metabolizmu a bunkovej fyziológie, reguluje expresiu génov a imunitného systému [21]. Asparagín je úzko prepojený v organizme s kyselinou asparágovou. V tele vzniká pri detoxikácii amoniaku a z hľadiska jeho použitia pre podporu výživy a priaznivých účinkov je nevýznamný.

L-asparágová kyselina znižuje syndróm chronickej únavy a je možné ju využiť pre zlepšenie činnosti mozgu. Pôsobí chemoprotektívne na pečeň a regeneračne na kostrové svalstvo. Dávkovanie sa uvádza do 1 g denne [8].

D-izomér kyseliny asparágovej sa vyskytuje v CNS a v endokrinných žľazách človeka. Má neuromodulačný efekt na os hypothalamus-hypofýza vedúce k párovým reprodukčným orgánom. D-kyselina asparágová sa používala ako suplement na povzbudenie tvorby testosterónu pri cvičení. Na základe doterajších zistení však nie je možné potvrdiť vplyv tejto aminokyseliny ako suplementu na zvýšenie svalovej hmoty a hladiny testosterónu [24].

3.4.9 Kyselina glutámová a glutamín

Kyselina glutámová sa zúčastňuje pri syntéze citrulínu, arginínu, glutamínu, spája močovínový a Krebsov cyklus. Je účastná pri procese transaminácie a detoxikácie dusíku, slúži ako metabolické palivo [21].

Hladina L-glutamínu v svale a plazme predstavuje väčšinový podiel celkových voľných aminokyselín v ľudskom tele. Je hlavným zdrojom energie v slizničných

bunkách, fibroblastoch, lymfocytov a makrofágov. Podieľa sa na imunitnej reakcii organizmu, podpore metabolizmu, syntéze a degradácii proteínov, funguje ako prekursor nukleových kyselín a nukleotidov [25]. Doplnky pre športovcov sú dostupné vo forme kapsúl alebo prášku s obsahom 250, 500 alebo 1000 mg L-glutamínu. Pri užívaní zdravými športovcami neboli hlásené žiadne nepriaznivé účinky ani pri dávke 20 až 30 g denne. Táto aminokyselina sa neodporúča ľuďom s poruchami obličiek. Klinické použitie ako parenterálnej výživy je možné pri kritických stavoch pacientov na jednotkách intenzívnej starostlivosti, onkologických pacientoch, za dávkovania prispôsobeného plazmatickým hladinám. Účelom podávania výživy je skrátenie doby strávenej na jednotke intenzívnej starostlivosti, skrátenie celkovej doby hospitalizácie, ale aj mortality. Predmetom výskumu je použitie pri gastrointestinálnych problémoch, HIV, AIDS a aktuálne aj jeho využitie pri liečbe COVID-19. Viaceré štúdie venujúce sa tejto problematike majú limitácie a sú nutné rozsiahlejšie štúdie pre dôkaz jednoznačného prínosu [26, 27].

3.4.10 Lyzín

L-lyzín je nevyhnutným stavebným prvkom predovšetkým svalových bielkovín. V tele plní dôležitú funkciu pri vstrebávaní vápnika, pri produkcii hormónov, enzýmov, protilátok a úlohu zohráva aj pri zotavovaní sa z chirurgických alebo športových zranení.

Medzi užívaním L-lyzínu a zníženej frekvencií výskytu infekcií spôsobenej Herpes simplex vírusom bola zistená súvislosť. Jeho funkcia pri vstrebávaní vápnika bola podkladom pre výskumy, ktoré sa zaoberali využitím tejto aminokyseliny v súvislosti s prevenciou vzniku osteoporózy. Ďalšími možnosťami využitia lyzínu je jeho potenciál pri terapii migrény, kardiovaskulárnych ochoreniach, úzkostiach a pri poruchách nálad. Existuje hypotéza, ktorá vraví o spojení medzi prijímaním lyzínu spolu s malým množstvom arginínu a nižšou prevalenciou Alzheimerovej choroby. Pre presvedčivý dôkaz a spoľahlivý záver pri všetkých možnostiach je však nevyhnutné vykonať rozsiahlejšie a dlhodobejšie štúdie. Najčastejšie používaná dávka lyzínu je v množstve jedného gramu denne, pri herpesovej infekcii je odporúčané dávkovanie 1 g lyzínu trikrát denne po dobu 6 mesiacov [28, 29].

3.4.11 Metionín

Metionín je esenciálna aminokyselina obsahujúca vo svojej molekule síru, ktorá podporuje normálny rast, reguluje bunkový metabolizmus a funguje ako antioxidant. Zlepšuje tón a pružnosť pokožky, rast nechtov a vlasov a opravy telesných tkanív.

Uľahčuje proces detoxikácie, exkrécie ťažkých kovov a pomáha pri vstrebávaní látok ako selén a zinok. Zvýšením produkcie lecitínu v pečeni sa znižuje hladina cholesterolu. Metionín je podávaný parenterálne, orálne podanie sa využíva v dermatológii. Najčastejšie používanou dávkou je 250 mg denne. Medzi najčastejšie vedľajšie účinky pri vyšších dávkach patrí nauzea, zvracanie a bolesť hlavy [30, 31].

3.4.12 Prolín

Prolín je regulátorom biochemických a fyziologických procesov na bunkovej úrovni, vrátane regulácie osmotického tlaku, redoxnej signalizácie, odolnosti voči stresu. Dôležitou funkciou je tiež udržiavanie dusíkovej rovnováhy a stability proteínov. Prolín zvyšuje počet fibroblastov a makrofágov, je zložkou kolagénu. Zabezpečuje správne fungovanie kĺbov a šliach, podporuje reparáciu tkanív u jedincov s ranami a popáleninami. Je substrátom pre syntézu polyamínov v tenkom čreve novorodencov a v placentе u cicavcov. Prolín sa ako samostatný doplnok stravy zväčša nepoužíva, nie sú známe nežiadúce účinky ani toxicita [8, 21].

3.4.13 Serín

L-serín je substrátom pre syntézu signálnych molekúl ceramidu a fosfatidylserínu, aminokyselín cysteínu. Význam má pri proliferácii buniek, metabolizme tukov, raste svalov a zvýšení imunity. V prípravkoch je výskyt samostatného L-serínu ojedinelý, v niektorých mimoeurópskych krajinách je odporúčaná denná dávka 25-250 mg, pri ktorej neuvádzajú ani nežiaduce účinky.

D-serín bol navrhnutý ako farmakoterapia pri liečbe strate pamäti v pokročilom veku a Alzheimerovej choroby, pretože sa ukázalo, že pri tomto ochorení je znížená aktivita práve serín-racemázy, vďaka ktorej prebieha syntéza D-serínu. Okrem toho sa popisuje aj úloha tejto aminokyseliny ako neurotransmitera za účasti glutamátu na N-methyl-D-aspartátovom receptore [8, 21].

3.4.14 Treonín

Treonín je základnou zložkou proteínov, v ktorých dochádza práve na tejto aminokyseline k postranlačným modifikáciám, podieľa sa na tvorbe kolagénu, význam má aj v imunitе a je prekursorom glycínu.

Treonín je dobre tolerovaný, môžu sa vyskytnúť mierne poruchy tráviaceho traktu, bolesť hlavy, výtok z nosu alebo vyrážka. Používa sa pre jeho antispastický efekt pri neurodegeneratívnych ochoreniach akými sú amyotrofická laterálna skleróza a skleróza

multiplex. Dávkovanie je možné v rozmedzí 2 – 6 g denne, častejšie sa môžeme stretnúť s dávkou do 800 mg denne [8, 21].

3.4.15 Tryptofán

Prítomnosť indolového kruhu tryptofánu v polypeptidoch im dáva vlastnosti podporujúce hydrofóbne interakcie. Hydrofóbne interakcie medzi proteínmi, peptidmi a inými biologicky aktívnymi látkami majú významnú úlohu v bunkovej fyziológii. Plazmatické hladiny tryptofánu závisia celkovo od faktorov ako vek, pohlavie, fyzická aktivita a podliehajú regulačným mechanizmom porovnateľne ako ostatné proteínogénne aminokyseliny [32].

Denná odporúčaná dávka L-tryptofánu je 5 mg/kg. Ako suplement sa využíva k úprave spánku a nálady. Toxicita tejto esenciálnej aminokyseliny nebola potvrdená, vedľajšie účinky aj pri vyšších dávkach (70 – 200 mg/kg) boli len mierne - tremor, nauzea a závraty. V súvislosti s užívaním liekov s obsahom serotonínu spolu s tryptofanom sa v zriedkavých prípadoch vyskytuje serotonínový syndróm, ktorý je výsledkom veľkej stimulácie serotonínu a prejavuje sa delíriom, hypertermiou alebo v niektorých prípadoch môže viesť až ku kóme [33].

3.4.16 Tyrozín

Tyrozín je v tele syntetizovaný z fenylalanínu, pričom až 75 % prijatého fenylalanínu je využívaný na tento účel. Tyrozín je prekursorom katecholamínov adrenalínu, dopamínu a noradrenalínu. Katecholamíny majú v organizme regulačnú úlohu, pôsobia na adrenergne receptory, podieľajú sa na stresovej reakcii, dopamín je neuromediátorom. Z tyrozínu vznikajú ďalšie pre telo významné molekuly, medzi ktoré patria DOPA, melanín a tyroxín [1].

Tyrozín bol odporúčaný pri narkolepsii a ako antidepresívum. Účinnosť použitia v týchto prípadoch nie je uzavretá. Používa sa pri fenylketonurii, pretože je obtiažne dosiahnuť optimálne množstvo tyrozínu zo stravy neobsahujúcej fenylalanín. V prípravkoch sa vyskytuje v dávke 100 mg a je dobre tolerovaný. Vo vyššej dávke, ako je odporúčaná, sa môžu vyskytnúť vedľajšie účinky ako nervozita, bolesť hlavy, nauzea a nespavosť. Nesmie sa podávať deťom, v tehotenstve a počas dojčenia [8].

4 Doplnky stravy

Pestrá strava by mala zabezpečiť dostatočné množstvo výživných látok pre správny vývoj a celkový dobrý zdravotný stav jednotlivca. Z rozličných dôvodov, kedy strava nedokáže poskytnúť všetky nutrične významné látky v určitom období života, je pre dosiahnutie ideálneho stavu živín v ľudskom organizme možné v záujme starostlivosti o zdravie využiť doplnky stravy. Doplnky stravy sú zaradené do kategórie potravín, v ktorých sa ako koncentrovaný zdroj vyskytujú vitamíny, minerálne látky, aminokyseliny, mastné kyseliny, je tam aj možná prítomnosť vlákniny, extraktov z rastlín a niektorých ďalších látok. Látky obsiahnuté v doplnkoch napomáhajú svojim nutričným a fyziologickým pôsobením kompenzovať nedostatočné množstvo určitej zložky stravy. Určené sú na spotrebu v odmeraných množstvách vo formách podobným bežným liekovým prípravkom. Dostupné sú ako kapsuly, tablety, pilulky, v práškovej podobe a ako tekutiny vo fľaštičkách s kvapkadlom alebo v ampulkách [34, 35].

4.1 Legislatíva

V rámci Európskej únie (EÚ) nie je právo týkajúce sa doplnkov stravy harmonizované. Rozdiely medzi vnútroštátnymi predpismi členských štátov EÚ sa regulujú pomocou nariadení a smerníc tak, aby nastavené podmienky zabezpečili čo najefektívnejšie fungovanie voľného pohybu a vnútorného trhu. Medzi smernice, ktoré sa zaoberajú problematikou zjednotenia pravidiel doplnkov stravy patrí najmä smernica Európskeho parlamentu a Rady 2002/46/ES. Na národnej úrovni sú doplnky stravy upravené zákonom č.110/1997 Sb., ktorý upravuje povinnosti súvisiace s potravinami a tabakovými výrobkami. Ďalšie pokyny sú zahrnuté vo vyhláškach [35].

4.1.1 Uvádzanie na trh

Zo zákona o potravinách vyplýva informačná povinnosť, a to pre uvedenie na trh, ktorú ukladá prevádzkovateľovi potravinárskeho podniku zaslať Ministerstvu zeméďelstvá označenie výrobku so všetkými informáciami, ktoré budú uvedené na obale podľa platných noriem. Ministerstvo nevyžaduje dôkaz nezávadnosti výrobku ani späťne nezaslať potvrdenie o splnení povinnosti. Zodpovednosť za splnenie právnych predpisov, bezpečnosť a správne označenie nesie prevádzkovateľ potravinárskeho podniku.

Potvrdenie odborného stanoviska vyjadrujúci zdravotnú bezpečnosť na základe českých a európskych právnych noriem vydáva Statní zdravotní ústav (SZÚ) vo forme certifikátu. Certifikát zdravotnej bezpečnosti má platnosť 1 až 3 roky, dĺžka závisí od charakteru výrobku. Podmienkou udelenia certifikátu je vyhovujúce laboratórne vyšetrenie vykonané akreditovaným laboratórnym pracoviskom a splnenie všetkých platných predpisov týkajúce sa formy a množstva zložiek, označenia, zdravotných tvrdení a varovaní [36].

Pred uvedením doplnku stravy na trh prevádzkovateľ potravinárskeho podniku, najneskôr v deň uskutočnenia, musí zaslať údaje písomnou alebo elektronickou formou požadované dozorným orgánom, ktorým je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Ak sa jedná o príjemcu doplnku stravy zo štátu EÚ alebo z inej krajiny, oznamuje sa táto skutočnosť SZPI najneskôr 24 hodín pred príchodom na miesto určenie prostredníctvom webového formulára, pričom miestom určenia sa rozumie miesto príjmu, prvého zaobchádzania a manipulácie na území ČR. Nesplnenie tejto povinnosti je priestupkom, za ktorý hrozí prevádzkovateľovi potravinárskeho podniku finančná sankcia [35].

4.1.2 Označovanie

Vo všeobecnosti na doplnky stravy reagujú spotrebitelia pozitívne, preto je dôležitá úprava a dozor nad označovaním doplnkov stravy. Označenie musí spĺňať všetky požiadavky predovšetkým kvôli ochrane spotrebiteľa, aby údaje uvedené na obale a pri marketingovej komunikácii boli pravdivé, zrozumiteľné a boli v súlade s najnovšími vedeckými poznatkami [35].

Na obale je nutné uviesť, že sa jedná o doplnok stravy, názov látky a údaj o obsahu, ktorý je priemerom kvantitatívnej analýzy. Výrobca musí určiť odporúčanú dennú dávku, ale zároveň aj varovať pred jej prekročením. Spotrebiteľ musí byť oboznámený s faktom, že doplnok stravy nie je náhradou pestrej stravy. Výrobca je povinný uviesť informácie o uložení mimo dosah detí a špecifické upozornenia na nevhodnosť pre niektorú skupinu ľudí. Zakázané je používať tvrdenia, ktoré by nejakým spôsobom naznačovali neposkytnutie dostatočného množstva živín získaných prijímaním vyváženej stravy. Nie je ani povolené uvádzať, že látka obsiahnutá vo výrobku má preventívne alebo liečebné účinky [37]. Ak doplnok stravy má určité význačné vlastnosti, ktoré by chcel na obale výrobku alebo v reklame výrobca uviesť, môže tak urobiť. Z dôvodu rizika uvádzania klamlivých informácií sú vlastnosti a tvrdenia, ktoré je možné

použiť, regulované. Problematiku zdravotných a výživových tvrdení upravuje Nariadenie Európskeho parlamentu a rady (ES) č.1924/2006, kde sa uvádza, akým spôsobom môžu byť tvrdenia použité pri reklame a označovaní potravín. Uvádžanie zdravotných a výživových tvrdení je dobrovoľné. Prevádzkovateľ potravinárskeho podniku ich však smie používať až po predložení podkladov, ktoré potvrdzuje fyziologický alebo výživový účinok na základe vedeckých údajov a po schválení príslušným orgánom [35].

4.1.3 Nové potraviny

V zložení doplnku stravy je povolený aj obsah tzv. novej potraviny. Nová potravina je látka, ktorá nebola v značnej miere používaná na ľudskú spotrebu v niektorom z členských štátov EÚ pred dátumom 15.5.1997. Medzi nové potraviny môžu patriť látky, ktoré už síce používané boli, ale bol vyvinutý nový technologický proces výroby alebo aj také látky, ktoré sú používané v mimoeurópskych krajinách.

Nové potraviny podliehajú schvaľovaciemu procesu, ktorý začína podaním žiadosti Európskej komisii. Schvaľovanie je všeobecné, neslúži len konkrétnemu žiadateľovi. Európska komisia spolu s Európskym úradom pre bezpečnosť potravín overuje okrem bezpečnosti aj to, či zo strany žiadateľa by nemohlo dôjsť k zavádzaniu spotrebiteľa. Následne je nová potravina zaradená na zoznam. Koordináciu pravidelnej vzájomnej informovanosti medzi Európskym úradom pre bezpečnosť potravín a ČR vykonáva Odbor bezpečnosti potravín Ministerstva zemědelství [35].

4.2 Liečivý prípravok

Liečivý prípravok je látka alebo zmes látok využívaná pri ochorení ľudí a zvierat za účelom prevencie, terapie alebo ako prostriedok k určaniu samotnej diagnózy. Látka použitá k príprave liečivého prípravku, ktorá je účinnou zložkou prípravku je pôvodu chemického, živočíšneho alebo rastlinného. Účinok sa prejavuje zmenami fyziologických funkcií bunky, tkaniva alebo orgánu. Liečivý prípravok môže tieto funkcie ovplyvňovať farmakologickým mechanizmom, pôsobením na metabolické pochody v organizme alebo jeho imunitný systém.

Na základe registračného procesu sa určí vydávanie liečivého prípravku, ktoré môže byť viazané na lekárske predpis, bez lekárskeho predpisu alebo bez lekárskeho predpisu s obmedzením. V zákone sú presne stanovené podmienky, za ktorých sa liečivý prípravok musí vydávať len na lekárske predpis. Kompetentnou autoritou v ČR pre registráciu, evidenciu a dohľad nad liečivými prípravkami je Státní ústav pro kontrolu

liečiv (SÚKL). Rozhodujúci v zaradení prípravku do kategórie viazaných na lekársky predpis je faktor priameho alebo nepriameho nebezpečenstva, ktoré by mohlo vyplývať z jeho častého užívania vo väčšom rozsahu [38].

Prípravky vydávané bez lekárskeho predpisu sú bežne označované ako voľne predajné liečivé prípravky a známe sú aj pod skratkou OTC (over the counter). Medzi odbornou verejnosťou však nie je zhoda, ktoré voľne dostupné prípravky môžeme skratkou OTC označiť. Spoločnosť IMS Health sa ako jedna z mnohých subjektov pokúsila tento pojem vymedziť a medzi OTC radí:

- produkty registrované SÚKL-om, ktoré sú vydávané len v lekárňach a ich cena podlieha regulácií. Môžu to byť prípravky viazané na lekársky predpis alebo bez lekárskeho predpisu.
- produkty, ktoré disponujú povolením SZÚ alebo Ministerstva zdravotníctví. Ich cena nie je regulovaná a je povolený ich predaj aj mimo lekární [39].

4.2.1 Rozdiel medzi doplnkom stravy a liečivým prípravkom

Z pohľadu neodbornej verejnosti nemusí byť zreteľný rozdiel medzi doplnkom stravy a voľne predajným liečivom z dôvodu, že niektoré doplnky stravy sa zložením, vzhľadom a charakterom poskytnutých informácií na obale podobajú. Odborne a právne je hranica jednoznačne určená účelom použitia. Doplnky stravy nemajú na rozdiel od liečivých prípravkov byť prostriedkom liečenia alebo prevencie ochorení, ani neovplyvňujú zdravotný stav. Z tohto dôvodu sú na nich kladené rozličné požiadavky čo sa týka regulácie a ďalších aspektov, ktorých súhrn je uvedený v Tabuľka 2.

Tabuľka 2 Rozdiel požiadavok kladených na voľne predajné liečivá a doplnky stravy (upravené a prevzaté z [39])

| | Doplnok stravy | OTC liečivo |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Správna výrobná prax | Nie | Áno |
| Registračná autorita | SZÚ | SÚKL |
| Dôkaz kvality | Dôkaz nezávadnosti | Áno |
| Dôkaz bezpečnosti | Nie | Áno |
| Dôkaz účinnosti | Nie | Áno |
| Vigilancia | Nie | Áno |
| Regulácia distribúcie | Nie | Áno |

Rozsah podmienok a dokumentácia súvisiaca s uvedením na trh je výrazne nižšia. SÚKL môže vstúpiť do registrácie doplnkov stravy v prípade, že sa jedná o hraničné prípravky, napr. parafarmaceutiká. V prípade pochybností, kde prípravok bude zaradený, je v záujme ochrany verejného zdravia uprednostnená kategória liečiv. Prípravok následne musí absolvovať proces registrácie liečivého prípravku [39].

4.3 Bezpečnosť doplnkov stravy

Doplňky stravy sú voľne dostupné bežnej populácii bez obmedzení, preto sú nutné vysoké nároky na ich bezpečnosť. Väčšina látok používaná k výrobe pochádza zo surovín často používaných v potravinárstve, to však neznamená, že neexistujú žiadne riziká spojené s ich užívaním. V doplnkoch stravy sa môžu vyskytnúť nežiadúce látky mikrobiálneho, hubového alebo rastlinného pôvodu, či dokonca kontaminanty, akými sú pesticídy a ťažké kovy. Väčší dôraz by mal klásť prevádzkovateľ potravinárskeho podniku nielen na vstupné a výstupné kontroly, ale aj kontroly medzi jednotlivými operáciami, a týmto spôsobom zabrániť výskytu aj neočakávaných škodlivých látok.

Doplňky stravy ako produkty zaradené medzi potraviny musia byť bezpečné a zdravotne nezávadné. Medzi sledované ukazovatele patria dávky informujúce o chemických zlúčeninách a ich vzťahu medzi množstvom a prejavom efektu na organizme. Akceptovateľný denný príjem je množstvo prídavnej látky uvádzanej v mg na kg telesnej hmotnosti v potravinách. Túto látku prítomnú v potravine je možné konzumovať denne bez ohrozenia zdravia. Dávka bez pozorovaného účinku vyjadruje najvyššie množstvo testovanej látky nespôsobujúcej významnú štatistickú odlišnosť od kontroly vo výskyte toxických účinkov. Ďalším parametrom je najvyššia úroveň dávky, pri ktorej nie je pozorovaný biologicky významný efekt, resp. frekvencia alebo intenzita negatívnych účinkov. V tomto prípade je ale možné zaznamenávať efekty, tie však nesmú byť považované za vedľajšie, ani byť ich základom [8].

4.4 Kontrola kvality

Kontrola kvality doplnkov stravy v ČR je v kompetencii SZPI, možná je aj kontrola ďalšími spotrebiteľskými subjektmi. Dohľad zahŕňa zhodnotenie, či výrobca spĺňa legislatívne požiadavky pri predaji a propagácií, teda správne označenie a dodržanie doby minimálnej trvanlivosti a použiteľnosti. Zameriava sa na mikrobiologické skúšky a na obsah cudzorodých látok, analytické a senzorické rozbor. Vzorok sú hodnotené z hľadiska mikrobiologickej čistoty, obsahu limitovaných či zakázaných látok a kontroly

deklarovaného obsahu hlavných zložiek. Kontrola kvality u doplnkov stravy a liečivých prípravkov nie je porovnateľná. Zo strany inšpekčných autorít aj zo strany samotných spotrebiteľov sa však očakáva, že prípravok bude obsahovať zložky deklarované výrobcom a na vstupné suroviny bude mať vysoké nároky samotný výrobca [34].

5 Metódy používané pri analýze aminokyselín

Nasledujúca kapitola je venovaná opisu princípu metód, ktoré sa pri analýze doplnkov stravy používajú v liekopise a v rešeršovaných článkoch. Analýza doplnkov stravy v tejto bakalárskej práci sa sústreďuje na chemickú analýzu aminokyselín z kvantitatívneho a kvalitatívneho hľadiska, nezaoberá sa celkovou kontrolou kvality, čistoty, prítomnosťou možných kontaminantov, zakázaných látok ani mikrobiologickým skúšaním.

5.1 Základná charakteristika používaných metód

5.1.1 Absorpčná spektrofotometria v infračervenej oblasti

Absorpčná spektrofotometria v infračervenej oblasti nazývaná aj infračervená spektroskopia je založená na absorpcii elektromagnetického žiarenia z blízkej (0,78 – 2,5 μm), strednej (2,50 – 50 μm) alebo vzdialenej (50 – 1000 μm) infračervenej oblasti. Absorpcia ovplyvňuje vibračnú energiu a zmeny hladiny rotačných stavov. Prístrojové vybavenie sa môže líšiť v závislosti od použitého princípu, najčastejšie sa používajú spektrometre s Fourierovou transformáciou. Ako zdroj žiarenia sa používa polychromatické svetlo, ktoré dopadá na polopriepustný delič lúčov. Jedna časť po prechode dopadá na pevné zrkadlo, druhá na zrkadlo pohyblivé. Po odraze sa tieto lúče stretávajú, spolu interferujú a smerujú ku kyvete a detektoru. Pohyblivé zrkadlo sa postupne vzd'ahuje a mení tak vlnové dĺžky znásobeného žiarenia. Signál sa prepočítava Fourierovou transformáciou a výsledkom je absorpčné infračervené spektrum. Infračervené spektrum vyjadruje závislosť transmitancie alebo absorbancie na vlnočte absorbovaného žiarenia. Pásky v spektre zodpovedajú typom vibračných prechodov, ktoré majú špecifickú frekvenciu na základe funkčných skupín prítomných v molekule [40, 41].

5.1.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (MS) je separačná technika poskytujúca veľké množstvo informácie o vzorke a jej zložení. Princípom je prevedenie vzorky na ionizovanú plynnú fázu a akcelerácie iónov do hmotnostného analyzátoru rozdeľujúceho ióny na základe pomeru hmotnosti a náboja m/z . Analýza prebieha za podmienok vysokého vákua, ktoré bráni vzájomnej kolízii častíc v plynnej fáze. Vzorka vstupuje v plynnej fáze do iónového zdroja, kde prebieha ionizácia chemicky alebo prúdom elektrónov. Molekulárny ión, prípadne fragmentový ión vstupuje do hmotnostného

analyzátor (napr. kvadrupól, iónová pasca), kde dochádza k rozdeleniu na základe m/z a nasleduje detekcia, ktorej výsledkom je závislosť relatívnych intenzít jednotlivých iónov na podiele m/z [41].

5.1.3 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia je separačná metóda využívajúca distribúciu látok medzi dve navzájom sa nemiešajúce fázy. Mobilnou fázou je v prípade kvapalinovej chromatografie kvapalina, ktorá pri pohybe systémom vplyvom tlaku unáša analyt, najčastejšie v stĺpcovom usporiadaní, kde je pevne ukotvená stacionárna fáza. Distribúcia látok, a teda podstata separačného procesu, môže byť založená na viacerých princípoch a podľa nich rozlišujeme chromatografiu adsorpčnú, rozdeľovaciu, iónovú, a gélovú. V chromatografickom systéme používajúcom polárnu stacionárnu fázou a nepolárnu mobilnú fázou hovoríme o chromatografii na normálnej fáze. Vzhľadom na vlastnosti bežne stanovovaných analytov sa častejšie používa reverzná chromatografia, kde je mobilná fáza polárna a stacionárna fáza má nepolárny charakter [42, 43].

Klasické kolónové prevedenie nemá postačujúcu účinnosť, preto bola vyvinutá vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Základom je použitie dostatočne malých častíc sorbentu, ktoré však vyvíjajú odpor voči pretekajúcej kvapaline, a preto je nutné zabezpečiť dostatočne vysoký tlak. Detektory používané v HPLC by mali byť dostatočne citlivé voči analytu a málo citlivé na mobilnú fázou. Medzi bežné detektory patrí UV detektor, fluorescenčný, fotometrický, elektrochemické detektory či hmotnostný spektrometer [41].

Hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC) je modifikáciou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, pri ktorej polárnou stacionárnou fázou preteká mobilná fáza obsahujúca zmes acetonitrilu a vody. Polárne hydrofilné analyty sú silno zadržované na stacionárnej fáze a mobilná fáza vytvára elučný gradient, ktorý sa zvyšuje spoločne s rastúcou polaritou [44].

Superkritická fluidná chromatografia (SFC) je ďalšou alternatívou kvapalinovej chromatografie. Ako mobilnú fázou využíva superkritickú kvapalinu a vlastnosti charakterizované viskozitou podobnú plynom a hodnotu hustoty blízku ku kvapaline. Uvedené vlastnosti umožňujú pohyb mobilnej fázy v kapilárnych aj náplňových kolónach bez značného ovplyvnenia tlaku v systéme. Najčastejšie používanou mobilnou fázou je CO_2 z dôvodu jeho nízkej a pomerne ľahko dosiahnuteľnej hodnoty kritickej teploty

a tlaku. Prístrojové vybavenie sa nelíši od štandardného vybavenia používanom pri HPLC [43].

Tenkovrstvová chromatografia (TLC) je technika kvapalinovej chromatografie v plošnom usporiadaní. Stacionárnu fázu tvorí sorbent nanosený v tenkej vrstve na sklenený, kovový alebo plastový podklad (chromatografická doska). Čiastočky sorbentu sú tvorené celulózu, oxidom hlinitým, silikagélom, prípadne modifikovaným silikagélom. Mobilná fáza je tvorená rozpúšťadlom alebo zmesou rozpúšťadiel v závislosti na vlastnostiach analytov. Vzorka sa nanáša na jednom konci tenkej vrstvy označovaný aj ako štart, ponorením do mobilnej fázy dochádza k procesu vyvíjania, ktorý prebieha v chromatografickej komore. Analyty sa rozdelia na základe uplatnenia adsorpčného alebo rozdeľovacieho princípu a vyvíjanie sa ukončí ešte pred dosiahnutím druhého konca chromatografickej dosky nazývanej aj čelo [41, 45].

5.1.4 Nukleárna magnetická rezonancia

Nukleárna magnetická rezonancia je spektrálna metóda založená na schopnosti absorpcie rádiových elektromagnetického žiarenia atómových jadier prvkov umiestnených vo vonkajšom magnetickom poli. Základnou podmienkou je nenulový jadrový magnetický moment, ktorá je splnená u jadier s jadrovým spinovým kvantovým číslom rozličným od 0. Na analyt pri meraní pôsobí vysokofrekvenčné elektromagnetické pole stálej frekvencie a mení sa hodnota magnetickej indukcie, alebo je konštantná magnetická indukcia a mení sa frekvencia elektromagnetického poľa. Ako zdroj žiarenia sa používa rádiový generátor. Detektorom je cievka vinutá okolo kyvety so vzorkou, umiestnená kolmo na smer siločiar magnetického poľa a smer osy cievky zdroja. Rezonančná frekvencia v NMR spektre je ovplyvnená chemickou štruktúrou v okolí sledovaného protónu, preto sa vyhodnocuje závislosť intenzity nameraného signálu na chemickom posune, ktorý vyjadruje rozdiel medzi polohou signálu meranej látky a štandardu [41].

5.1.5 Odmerná analýza

Odmerná analýza (titračné stanovenie) je založená na zisťovaní presného objemu skúmadla o presne známej koncentrácii potrebného na úplné zreagovanie stanovovanej zložky v analyzovanej zložke. Medzi látkou stanovovanou a roztokom skúmadla, prebieha kvantitatívna chemická reakcia, ktorej koniec je charakterizovaný bodom ekvivalencie. Na základe typu prebiehajúcej reakcie rozoznávame acidobázické, komplexotvorné, zrážacie a oxidačno-redukčné titrácie. Acidobázické titrácie sú

podmienené prenosom protónu v sústave dvoch konjugovaných párov kyselín a zásad. Stanovujú sa nimi látky kyslého alebo zásaditého charakteru a na základe toho rozlišujeme alkalimetriu a acidimetriu. Môžu prebiehať vo vodnom a nevodnom prostredí. Komplexometrické titrácie sú charakterizované vznikom komplexných zlúčenín rozpustných v polárnom rozpúšťadle. Často je používaná chelatometria a merkurimetria. Zrážacie titrácie využívajú reakcie medzi iónmi stanovovanej látky a iónmi odmerného roztoku za vzniku prakticky nerozpustných zrazenín. Pri oxidačno-redukčných titráciách dochádza k prenosu elektrónov, preto sa využívajú u látok, ktoré sa ľahko oxidujú, resp. redukujú. Kvantitatívne stanovenie pomocou oxidačno-redukčných titrácií je rozšírené, medzi často používané patrí jodometria, bromatometria, manganometria a cerimetria [42, 43].

5.1.6 Polarimetria

Polarimetria je optická metóda využívajúca schopnosť látok obsahujúcich v molekule asymetrický uhlík stáčať rovinu polarizovaného svetla. Na meranie uhla optickej otáčavosti sa využívajú polarimetre. Polarimetre pomocou filtru vymedzujú interval vlnových dĺžok zo zdroja svetla a po prechode polarizátorom sa dosiahne zmena svetla nepolarizovaného na svetlo lineárne polarizované. Svetlo prechádza kyvetou so vzorkou, kde nastane otočenie roviny polarizovaného svetla, ktoré následne dopadá na analyzátor. Intenzita svetla je zaznamenávaná detektorom. Pri jednoduchších prístrojoch je otáčaním analyzátoru nastavená optická rovnováha polotieňa v zornom poli a odčítaná hodnota zo stupnice ďalekohľadu [41].

5.2 Liekopisné metódy analýzy aminokyselín

5.2.1 Analýza aminokyselín kvapalinovou chromatografiou

Analýza aminokyselín ako kapitola 2.2.56, ktorá je súčasťou časti Fyzikální a fyzikálně-chemické metody Českého liekopisu 2017, sa venuje možnostiam stanovenia voľných aminokyselín vo farmaceutických prípravkoch. Zároveň je možné metódami uvedenými v tejto kapitole aj stanovenie zloženia bielkovín a peptidov po predchádzajúcom hydrolytickom rozštípení ich peptidických väzieb. Kvalitu výsledkov analýzy ovplyvňuje výber zvolenej metódy, ktorá sa predovšetkým určuje na základe požadovanej citlivosti, ako aj manipulácia so vzorkou. Dôležité je zamerať sa najmä na potenciálnu kontamináciu, či už mikrobiálnu alebo cudzími látkami. Všetky používané skúmadla majú mať charakter vysokého stupňa čistoty, odporúča sa aj ich filtrácia pred použitím.

Metódy sú založené na chromatografickej separácii na nízkotlakovom alebo vysokotlakovom kvapalinovom chromatografe, a to buď iónovýmennou chromatografiou a následnou postkolónovou derivatizáciou alebo predkolónovou derivatizáciou nasledovanou HPLC na reverznej fáze s využitím gradientovej elúcie. Metódy predpokladajú možnosť automatizácie a kvantitatívneho vyhodnotenia na základe integrovania plochy píkovej signálu. Odozvu zaznamenáva detektor fluorescenčný alebo spektrofotometrický v UV oblasti.

Metódy postkolónovej derivatizácie sú vo všeobecnosti menej ovplyvnené zložením tlmivých roztokov. V liekopise sú uvedené použitia ninhydrínu a ftalaldehydu ako derivatizačných činidiel. Pri oboch metódach dochádza k separácii na základe zmeny pH a iónovej sily pri elúcii. Pre zložitejšie matrice sa využíva systém založený na výmene Li^+ , pri jednoduchších zmesiach je možné využiť výmenu kationov sodíka. Pre zlepšenie separácie je odporúčané použiť teplotný gradient.

Prvá metóda je postkolónová derivatizácia prostredníctvom ninhydrínu, kde pri reakcii s aminokyselinou sa skúmadlo sfarbí červenofialovo a vykazuje absorpčné maximum pri 570 nm. Výnimku tvoria iminokyseliny, ktoré dávajú sfarbenie žlté a absorpčné maximum, pri ktorom prebieha UV detekcia je 440 nm. Detekčný limit tejto metódy je 10 pmol, pre prolín ako iminokyselinu 50 pmol.

Druhá metóda využíva ftalaldehyd, reakcie prebiehajú za rozdielnych podmienok pre primárne a sekundárne amíny. Primárne amíny reagujú s ftalaldehydom na

izoindolové produkty s podmienkou prítomnosti zlúčenín s thiolovou funkčnou skupinou. Pred derivatizáciou sekundárnych amínov ftalaldehydom je nutná oxidácia chlórnanom sodným alebo chloramínom T. V oboch prípadoch vznikajú zlúčeniny vykazujúce fluorescenciu a intenzita fluorescencie je zaznamenávaná pri excitačnej vlnovej dĺžke 348 nm a emisnej vlnovej dĺžke 450 nm. Detekčný limit sa uvádza do niekoľkých desiatok pmol.

Predkolónové derivatizácie sú citlivejšie na vplyv solí z tlmivých roztokov. Chromatografická separácia sa uskutočňuje na reverznej fáze za použitia oktadecylsilylovej kolóny. Jednotlivé derivatizačné činidlá, používané mobilné fázy a spôsob detekcie sú uvedené v Tabuľka 3 [46].

Tabuľka 3 Predkolónová derivatizácia [46]

| Derivatizačné činidlo | Mobilná fáza | Detektor | Detekčný limit |
|---|--|---|-----------------------------------|
| fenylothiokyanát | zmes ACN a tlmivého roztoku | UV ($\lambda=254$ nm) | 1 pmol |
| 6-aminochinolyI-N-hydroxysukcinyIimidyl-karbamát | zmes ACN a tlmivého vodného roztoku | fluorimetrický ($\lambda_{ex} = 250$ nm $\lambda_{em} = 395$ nm) | 40-320 fmol (cysteín 800 fmol) |
| ftalaldehyd | – | fluorimetrický ($\lambda_{ex} = 348$ nm $\lambda_{em} = 450$ nm) | 1 pmol |
| 4-(dimethylamino)-azo-benzen-4-sulfonyl-chlorid | zmes ACN a tlmivého vodného roztoku | UV ($\lambda=436$ nm) | 2-5 pmol |
| 9-fluorenylmethyl-chlorformiát | gradientová elúcia: zmes ACN, metanolu a tlmivých roztokov (10:40:50; v/v/v) a zmes ACN a tlmivého vodného roztoku (50:50; v/v) | fluorimetrický ($\lambda_{ex} = 260$ nm $\lambda_{em} = 313$ nm) | niekoľko fmol |
| 7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol | zmes ACN a tlmivého vodného roztoku | fluorimetrický ($\lambda_{ex} = 480$ $\lambda_{em} = 530$ nm) | 10 fmol |

5.2.2 Liekopisné dôkazy jednotlivých aminokyselín

Metódy identifikácie látok sa volia tak, aby sa daná látka dokázala pomerne ľahko, dostatočne citlivo a spoľahlivo. Ku kvalitatívnej analýze sa najčastejšie využívajú inštrumentálne metódy optické, chromatografické, ale aj chemické dôkazy sprevádzané vznikom zrazeniny alebo zafarbenia. Pri aminokyselinách, ktoré majú samostatné liekopisné články (alanín, arginín, fenylalanín, glycín, histidín, izoleucín, kyselina asparágová, kyselina glutámová, leucín, metionín, serín, treonín, tryptofán, tyrozín a valín) je využívaná k identifikácii špecifická optická otáčavosť, tenkovrstvová chromatografia, infračervená absorpčná spektrofotometria a chemické dôkazy. Pre jednoznačnú identifikáciu je nutné použiť súčasne viacero metód konkretizovaných v monografiách jednotlivých aminokyselín v časti Zkoušky totožnosti.

Optická otáčavosť sa využíva pri charakterizáciách látok opticky aktívnych, medzi ktoré patria aminokyseliny vďaka prítomnosti chirálneho uhlíka v ich molekule. Optická otáčavosť je meraná polarimetrom a liekopisné údaje sú vždy uvádzané pre spektrálnu líniu D sodíkového svetla (589,3 nm), teplotu $20 \pm 0,5$ °C a hrúbku vrstvy 1 dm. Pravotočivé látky (+) sa otáčajú pri pohľade smerom na dopadajúci lúč polarizovaného svetla v smere hodinových ručičiek, ľavotočivé (–) naopak [40, 42, 45, 46].

Špecifická optická otáčavosť $[\alpha]_D^{20}$ sa vypočíta ako uhol otočenia polarizovaného svetla meraný za vyššie uvedených podmienok. Rozlišuje sa úprava a výpočet pre pevné látky a látky kvapalné. Z pevných látok je k jej určeniu nutná koncentrácia vyjadrená na 1g látky v 1 ml, u kvapalných látok je potrebná k zisteniu hodnoty špecifickej optickej otáčavosti ich hustota. Špecifická optická otáčavosť je charakteristická pre dané rozpúšťadlo a koncentráciu. V danom článku je uvedený postup prípravy skúšaného roztoku. Pri určení špecifickej optickej otáčavosti je nutné zohľadniť aj ďalšie faktory, a presnejšie aj to, či sa jedná o látku bezvodú, zbavenú rozpúšťadla alebo vysušenú [45].

Dôkaz pomocou TLC sa využíva pre identifikáciu čistých látok, substancií aj liečivých prípravkoch na základe vyvíjania chromatogramu roztoku analyzovanej vzorky vedľa roztoku vzorky štandardu [42]. Pri stanovení väčšiny aminokyselín slúži ako stacionárna fáza chromatografická doska so silikagélom a mobilnou fázou je zmes ľadovej kyseliny octovej, vody a butan-1-ol-u (20:20:60; v:v:v). Pri identifikácii glycínu sa používa rovnaká mobilná fáza ako pri väčšine aminokyselín s rozdielom použitia ako

stacionárnej fázy chromatografickej dosky s vrstvou celulózy. Pri arginíne je využívaná chromatografická doska s vrstvou silikagélu ako stacionárna fáza a mobilná fáza je tvorená zmesou koncentrovaného amoniaku a propan-2-ol-u (30:70; v:v). Mobilná fáza pri tyrozíne obsahuje koncentrovaný amoniak a propan-1-ol (30:70; v:v) za použitia chromatografickej dosky s vrstvou silikagélu. Detekcia u všetkých aminokyselín prebieha s využitím ninhydrínu ako detekčného činidla za podmienok zahrievania pri teplote 150 °C počas 15 minút. Hodnotí sa hlavná škvrna chromatogramu, ktorá musí byť zhodná svojou polohou, zafarbením a veľkosťou s hlavnou škvrnou porovnávacieho roztoku [40, 45, 46].

Identifikácia látok pomocou infračerveného spektra je umožnená na základe charakteristických pásov vyskytujúcich sa pri určitých vlnôch, ktoré zodpovedajú funkčným skupinám a väzbám v molekule. K preukázaniu totožnosti sa používa porovnanie s príslušným štandardom.

Chemické dôkazy, teda špecifické chemické reakcie využívajúce prítomnosť charakteristických funkčných skupín, používané pri identifikácii aminokyselín sa prejavajú vznikom zrazeniny, zmenou zafarbenia, prípadne fluorescenciou. Kolorimetrickými reakciami sa dokazujú fenylalanín, metionín, serín, treonín a tryptofán. Fenylalanín sa nitruje dusičnanom draselným a kyselinou sírovou zahrievaním po dobu 20 min. Po ochladení sa pridá hydroxylamín-hydrochlorid a po pridaní koncentrovaného hydroxidu sodného nasleduje chladenie vo vode s ľadom a vznik fialovočerveného až fialovohnedého zafarbenia. Reakcia metionínu s nitroprussidom sodným v alkalickom médiu za zahriatia na 40 °C pokračuje po ochladení acidifikáciou a poskytuje tmavočervené zafarbenie. Nitroprussid sodný ako činidlo sa využíva aj pri dôkaze treonínu, kde za prítomnosti jodistanu sodného a piperidínu sa skúšaný roztok zafarbí na modro a po niekoľkých minútach mení svoje zafarbenie na žlté. Roztok serínu sa zahrieva v prítomnosti jodistanu sodného a zachytená para na navlhčenej skelnej vate sa po zahriatí v reakcii so sodnou soľou chromotropnej kyseliny a kyseliny sírovej zafarbí fialovočerveno. Tryptofán je identifikovaný vďaka vzniku fialovomodrého komplexu po reakcii s dimethylaminobenzaldehydom v prostredí kyseliny chlorovodíkovej a za zahrievania vo vodnom kúpeli. Reakcia glycínu s chlórnanom sodným prebieha v prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej za varu a po pridaní rezorcinolu je charakteristická vznikom fialového roztoku, pričom sa jeho farebnosť mení na oranžovú a žltú. Je zároveň prítomná aj žltozelená fluorescencia. Pre alanín je charakteristický

vznik žltej zrazeniny. Zrazenina vzniká v reakcii s jodidom draselným a jódom v alkalickom prostredí hydroxidu sodného za predošlého rozpúšťania v dusitane sodnom v prostredí kyseliny chlorovodíkovej [40, 42, 45, 46].

5.2.3 Stanovenie obsahu titračnými metódami

Stanovenie obsahu pomocou odmerných stanovení uvedených v liekopisných článkoch je metódou kvantitatívnej analýzy, ktoré sa dajú využiť k priamemu stanoveniu obsahu alebo titráciou stanovovanej látky po predchádzajúcej izolácii z prípravkov [42].

Acidometrické titrácie v nevodnom prostredí sa používajú k stanoveniu slabých zásad a kyselín, ktoré sú vo vodnom prostredí málo rozpustné a nedostatočne ionizované. Liekopis acidometrickú titráciu ako stanovenie obsahu uvádza pri stanovení alanínu, arginínu, glycínu, izoleucínu, leucínu, metionínu, fenylalanínu, treonínu, tyrozínu, tryptofánu a valínu v prostredí bezvodej kyseliny mravčej a bezvodej kyseliny octovej. Odmerným roztokom je kyselina chloristá v koncentrácií 0,1 mol/l. Určenie bodu ekvivalencie prebieha potenciometricky. Potenciometrické stanovenie bodu ekvivalencie zisťujeme meraním zmien potenciálov medzi referenčnou a porovnávacou elektródou ponorených v roztoku skúšanej látky v závislosti na spotrebe odmerného roztoku. Odmerný roztok sa pridáva za hodnotu očakávaného bodu ekvivalencie z dôvodu čo jeho najpresnejšieho určenia. Bod ekvivalencie je v tomto prípade charakterizovaný maximálnou zmenou potenciálu.

Acidometrická titrácia vo vodnom prostredí je vhodná pre stanovenie látok s dostatočnou bazicitou a rozpustnosťou vo vode. Požadované vlastností má z aminokyselín histidín. Titruje sa odmerným roztokom 0,1 M kyseliny chlorovodíkovej za potenciometrického stanovenia bodu ekvivalencie.

Alkalimetrické titrácie sa využívajú pri stanovení kyseliny asparágovej a kyseliny glutámovej. Navážka aminokyselín sa rozpustí vo vode zbavenej oxidu uhličitého, rozpúšťanie je možné aj miernym zahriatím. Po vychladnutí sa titruje 0,1 mol/l hydroxidom sodným. Indikácia bodu ekvivalencie sa určuje vizuálne použitím acidobázického indikátoru bromthymolovej modrej, a to prejavením zmeny sfarbenia roztoku zo žltej na modrú [40, 42, 45, 46].

5.3 Prehľad publikovaných metód analýz aminokyselín

Na vypracovanie tejto kapitoly bola použitá citačná bibliografická databáza Web of Science v režime pokročilého vyhľadávania so zvolením kľúčových slov autora food supplements, analysis, amino acids a časovo vymedzené obdobie na roky 2015 – 2020, aby metódy zodpovedali najnovším trendom v analýze. V ďalšom vyhľadávaní sme použili možnosť vyhľadávania pomocou slov z abstraktu, kde boli vybrané slová analysis, supplement, amino acid. Cieľom bolo vyhľadať analytické metódy, preto bolo vyhľadávanie zúžené na vedný odbor analytická chémia. V závere podkapitoly je uvedená Tabuľka 4, ktorá obsahuje prehľad metód v publikovaných článkoch.

5.3.1 Analýza voľných aminokyselín spojením chromatografie a hmotnostnej spektrometrie – aplikácia pre doplnky stravy

V článku je prezentovaná chromatografická metóda spájajúca a využívajúca široký elučný gradient SFC a HPLC. Aplikovanie metódy bolo experimentálne skúšané na 3 doplnkoch stravy – tablety Amino Acid Complex (17 L-proteinogenných aminokyselín), kapsule s obsahom BCAA a VITALL +[®].

Experiment bol uskutočnený na prístroji AQUITY Ultra Performance Convergence Chromatography[™], vybavený binárnou pumpou i PDA detektorom a jednoduchým kvadrupólovým analyzátorom využívajúcim ionizáciu elektrosprejom (ESI). Separácia prebiehala na kolóne Chiralpak ZWIX (+) s rozmermi 150 x 3,0 mm a veľkosťou častíc 3 µm. Mobilná fáza obsahovala oxid uhličitý, ako pomocné rozpúšťadlo metanol obsahujúci 2% vody a 20 mM metánsulfónovú kyselinu pri prietokovej rýchlosti 0,5 ml/min a teplote 25 °C. Detekcia bola dosiahnutá pomocou ESI-MS so zvoleným pozitívnym režimom ionizácie a záznamom celkového iónového prúdu.

Pre vyhodnotenie boli použité dve metódy – metóda štandardného prídavku a metóda vnútorného štandardu (IS). Pri metóde vnútorného štandardu bol ako IS použitý L-tryptofán, pričom poskytnutá závislosť bola lineárna. Stanovená bola medza detekcie (LOD) a medza stanoviteľnosti (LOQ), pričom najnižšia hodnota LOD sa získala pre izoleucín a prolín, naopak najvyššia pre glycín. Validácia metódy štandardného prídavku prebehla na vzorke BCAA a na tauríne. Získaná závislosť signálu na koncentrácií bola polynomickeá. Metódou štandardného prídavku bola určená medziľahlá presnosť a opakovateľnosť, ktorej najhoršie hodnoty opakovateľnosti predstavovali 13 a 15 %.

V článku je popísaný experiment využívajúci elučný gradient v rozmedzí od superkritickej kvapaliny po kvapalnú mobilnú fázu, čo umožnilo elúciu 20 voľných aminokyselín. Vďaka reverznému tlakovému gradientu (15 – 11 MPa) a reverznej prietokovej rýchlosti (3 – 1 ml/min) bola umožnená analýza v trvaní 10 minút. Aplikovanie tejto metódy je výhodné pri analýze veľkého množstva vzoriek, pričom nie je potrebná zložitá prvotná úprava alebo derivatizácia [47].

5.3.2 Chirálna analýza aromatických aminokyselín použitím superkritickej fluidnej chromatografie

V článku je popísaná chirálna separácia metódou superkritickej fluidnej chromatografie pre analýzu piatich rozličných doplnkov stravy obsahujúcich aromatické aminokyseliny.

Na analýzu bol použitý superkritický fluidný chromatograf firmy Jasco s detektorom diódového poľa. Pre separáciu bola využitá teikoplanínová chirálna kolóna Chirobiotic T2 a zároveň boli testované aj súčasné zapojenie viacerých achirálnych kolón s polárnymi stacionárnymi fázami. Podmienky separácie na T2 kolóne boli optimalizované na prietokovú rýchlosť 2 ml/min, tlak 100 bar a teplotu 35 °C, ako modifikátor bol zvolený metanol v koncentracii 40% s vysokým prídavkom vody (10% v metanole).

Publikovaná práca predstavuje metódu superkritickej fluidnej chromatografie, pri ktorej prebehla enantiometrická separácia s využitím štandardných roztokov racemickej zmesi a kvantifikácia aminokyselín v doplnkoch stravy bez potreby derivatizácie, pričom získaná citlivosť predstavovala LOD v rozmedzí 0,5 – 2,0 µg/ml. V doplnkoch stravy neboli detekované žiadne enantiometrické nečistoty a všetky zodpovedali deklarovanému obsahu L-aminokyselín [48].

5.3.3 Nová metóda hydrofilnej interakčnej chromatografie pre stanovenie aminokyselín v doplnkoch stravy bez derivatizácie

Autori článku navrhli použitie HILIC pre analýzu doplnku stravy obsahujúceho okrem aminokyselín (Asp, Arg, karnitín) aj ďalšie zložky s možnosťou analýzy touto metódou vrátane glutathionu a kreatín tartrátu.

Príprava vzorky bola obmedzená len na zriedenie a na analýzu bol využitý kvapalinový chromatograf MD-910 vybavený pumpou PU-1580 s ternárnou gradientovou jednotkou LG-1580-002 a UV-DAD. Bola použitá silkagélová kolóna Phenomenex Kinetex s pevným jadrom (100 x 4,6 mm; 2,6 µm). Mobilná fáza

pozostávala z acetonitrilu a 12,5 mM fosforečnanu draselného o pH 2,3 v pomere 85:15 (v/v), prietoková rýchlosť bola optimalizovaná na 1,4 ml/min. Spektrofotometrická UV detekcia prebiehala pri vlnovej dĺžke 200 nm. Táto krátka vlnová dĺžka mohla byť použitá vďaka tomu, že hlavnou zložkou mobilnej fázy bol ACN a mobilná fáza neobsahovala žiadne rušivé zložky.

Autori preukázali stanovenie pomocou HILIC ako možnosť pre kvantitatívnu analýzu doplnkov stravy bez nutnosti zložitej úpravy vzorky. Metóda je v porovnaní so štandardne používanou analýzou v RP-HPLC jednoduchšia, pretože nie je potrebná predkolónová derivatizácia. Zaujímavosťou je, že autori zistili prítomnosť asi 20% oxidovanej, teda neaktívnej formy glutathionu, čo poukazuje na nutnosť kontroly doplnkov stravy [49].

5.3.4 Optimalizácia „one pot“ derivatizácie a enantioseparácie cysteínu: aplikácia na doplnky stravy

Autori sa zamerali na enantioseparáciu cysteínu. V ich záujme bolo nájsť optimálny proces derivatizácie vzhľadom k vysoko reaktívnej tiolovej skupine, ktorú obsahuje cysteín vo svojej štruktúre.

Derivatizácia vzorky prebiehala úpravou prostredia borátovým pufrom a reakcie s činidlom 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolom (NBD-F) za podmienok zahriatia na 40 °C v prostredí acetonitrilu. Po následnom ochladení v ľadovej vode a pridaní 2% roztoku trifluóroctovej kyseliny nasledoval nástrek do HPLC systému.

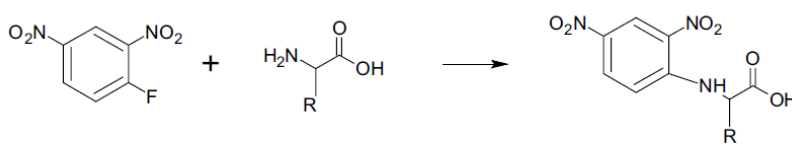
Na separáciu sa využili HPLC systém Shimadzu LC-20A Prominence. Mobilná fáza v zložení metanol – voda 90:10 (v/v) s obsahom 15 mM mravčanu amónneho, prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min pri teplote 35 °C. Enantioseparácia na kolóne Whelk-O1, ktorá obsahuje 1-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrofenantrén ako chirálny selektor a následná UV detekcia derivátu NBD-Cys prebiehala pri vlnovej dĺžke 472 nm.

Validovaná metóda, pri ktorej sa podarilo optimalizovať derivatizačnú reakciu bola úspešne aplikovaná na doplnok stravy obsahujúci L-Cys. Produkt reakcie vykazuje stabilitu 10 dní a potvrdenie jeho chemickej identity bolo uskutočnené za pomoci hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením. Hodnoty LOD a LOQ sú pre oba enantioméry zhodné [50].

5.3.5 Súčasné stanovenie taurínu, N-acetylcysteínu, glycínu, metionínu v komerčne dostupnom prípravku pomocou HPLC

Metóda predstavuje citlivé, selektívne, spoľahlivé a súčasné stanovenie aminokyselín a derivátu aminokyseliny v doplnku stravy s využitím predkolónovej derivatizácie a následnou HPLC analýzou.

Derivatizácia roztoku vzorky k umožneniu detekcie prebiehala v prostredí cetyltrimetylamónia bromidu s 1-fluór-2,4-dinitrobenzén (DNFB) v čase 10 minút pri teplote 60 °C. Reakčná schéma medzi aminokyselinou a derivatizačným činidlom je uvedená na Obrázok 2.



Obrázok 2 Schéma reakcie aminokyseliny a derivatizačného činidla (DNFB) [51]

HPLC separácia derivatizovaných aminokyselín sa uskutočňovala pri teplote 25 °C na kolóne C18 Phenomenex Synergi MAX-RP 4 (250 mm x 4,6 m). Mobilná fáza pozostávala zo zmesi trietylamónia, 0,05 M fosfátového pufru (pH=3) a acetonitrilu pri podmienkach gradientovej elúcie a rýchlosti prietoku 0,4 ml/min. K detekcii bol využitý UV-DAD detektor pri vlnovej dĺžke 360 nm.

HPLC analýza s využitím derivatizačného činidla DNFB a vnútorného štandardu Arg, resp. Arg-DNFB poskytovali hodnoty LOD v rozmedzí 45 – 69 ng/ml a LOQ 150 až 597 ng/ml. Bola potvrdená vhodnosť metódy pre jej využitie v kvalitatívnej a kvantitatívnej kontrole viaczložkového doplnku stravy [51].

5.3.6 Validačná štúdia protónovej NMR ako metódy stanovenia L-arginínu, L-citrulínu a taurínu v doplnkoch stravy

Predmetom štúdie je možnosť súčasného stanovenia obsahu L-arginínu, L-citrulínu a taurínu z doplnkov stravy vo forme prášku a tabliet použitím kvantitatívnej NMR spektroskopie.

Na analýzu 400 MHz NMR spektrometer Bruker Ascend 400 s 5 mm širokopásmovou sondou s gradientom v ose Z. V zázname NMR spektra sa píky nachádzajú v poradí – slepá vzorka, vnútorný štandard (kyselina maleínová), štandardy cieľových analytov a vzorka.

Experimentálne skúšanie potvrdilo vhodnosť metódy na zamýšľané použitie s výhodou menšej environmentálnej záťaže, keďže sa nepoužívajú prchavé organické rozpúšťadla. Pri porovnaní s referenčnou HPLC metódou vyniká NMR metóda jednoduchosťou prípravy vzorky a rýchlosťou analýzy [52].

5.3.7 Využitie MS a NMR pre kontrolu doplnkov stravy obsahujúcich aminokyseliny

Autori článku podrobili kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze doplnky stravy Amino 75[®] a BCAA + Glutamine Advanced R[®] technikami MS a NMR. Prvý uvedený prípravok obsahuje 8 aminokyselín (Leu, Val, Ile, Phe, Thr, Met, Lys, His), druhý obsahuje 4 aminokyseliny (Val, Leu, Ile, Gln). Za účelom validácie metódy použili injekčný roztok Primene[®] 10%, ktorý obsahuje dvadsať aminokyselín. Každá vzorka bola podrobená analýze MS aj NMR.

Nástrek vzorky bol uskutočnený pomocou prietokovej injekčnej analýzy (FIA) na prístroji ACQUITY UPLC H-Class systém prepojený s tandemovým hmotnostným spektrometrom Synapt G2-Si využívajúci ESI a hybridné techniky s vysokým rozlíšením kvadrupólu spojeného s analyzátorom doby letu. Mobilnú fázu tvorila zmes metanolu a acetonitrilu (50:50). Ako vnútorný štandard bol použitý teofylín. NMR analýza prebiehala na prístroji Bruker Avance III 600 MHz s použitím 5 mm inverznej sondy TXI v gradiente osy Z.

Prínos tejto štúdie je najmä v aplikácií dvoch analytických postupov, v ktorých aj napriek zložitosti matric boli poskytnuté komplexné informácie o viaczložkových doplnkoch stravy. Prekrývajúce signály viditeľné pri 1D NMR spektre boli vyriešené optimalizáciou za využitia 2D NMR spektra. V článku boli na viaczložkové doplnky stravy aplikované techniky FIA-ESI-MS a NMR pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie s toleranciou $\pm 10\%$ pre NMR a $\pm 20\%$ pre MS. NMR analýza umožnila analýzu komplexnej vzorky za 2 min [53].

Tabuľka 4 Analytické metódy používané na stanovenie aminokyselín v doplnkoch stravy v publikovaných článkoch

| Analyt | Matrica | Úprava vzorky | Derivatizačné činidlo | Metóda | Detekcia | LOD [μg] | LOQ [μg] | Zdroj |
|--------|--------------------|--|-----------------------|----------|----------|-----------------------|-----------------------|-------|
| Val | tableta kapsula | rozpúšťanie vo vode a 0,1 M HCl, riedené metanolom 1:5, filtrácia cez 0,45 μm injekčný filter, prídavok L-Trp (IS) | – | HPLC/SFC | MS | 0,013 | 0,042 | [47] |
| Ile | | | | | | 0,001 | 0,003 | |
| Pro | | | | | | 0,001 | 0,003 | |
| Leu | | | | | | 0,001 | 0,004 | |
| Ala | | | | | | 0,004 | 0,013 | |
| Ser | | | | | | 0,003 | 0,008 | |
| Met | | | | | | 0,003 | 0,008 | |
| Gln | | | | | | 0,007 | 0,023 | |
| Thr | | | | | | 0,002 | 0,007 | |
| Phe | | | | | | 0,002 | 0,007 | |
| Asn | | | | | | 0,005 | 0,015 | |
| Asp | | | | | | 0,006 | 0,021 | |
| Arg | | | | | | 0,006 | 0,021 | |
| His | | | | | | 0,006 | 0,021 | |
| Gly | | | | | | 0,033 | 0,111 | |
| Tyr | | | | | | 0,005 | 0,017 | |
| Taurín | 0,005 | 0,017 | | | | | | |
| Lys | 0,010 | 0,033 | | | | | | |

Pokračovanie Tabuľka 4

| Analyt | Matrica | Úprava vzorky | Derivatizačné činidlo | Metóda | Detekcia | LOD [$\mu\text{g/ml}$] | LOQ [$\mu\text{g/ml}$] | Zdroj |
|----------|---------|--|-----------------------|---------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| L-Phe | kapsula | rozdrobenie na prášok, 4-krát opakovaná extrakcia vodou, miešanie, sonikácia, centrifugácia | – | SFC | PDA | 2,0 | 6,7 | [48] |
| L-Tyr | | | | | | 1,0 | 3,3 | |
| L-Trp | | | | | | 0,5 | 1,7 | |
| L-Trp | tableta | | | | | 0,5 | 1,7 | |
| Asp | prášok | rozdrobenie na prášok, fosfátový pufr (pH=2,8; 15,5 mM), sonikácia, filtrácia cez 0,22 μm membránu z acetylovanej celulózy, alikvót zriedený 1:10 fosfátový pufr/ACN (25:75; v:v), sonikácia a filtrácia cez 0,22 μm membránu | – | HILIC | UV $\lambda=200\text{ nm}$ | 5,5 | 12,0 | [49] |
| Karnitín | | | | | | 8,0 | 20,0 | |
| Arg | | | | | | 6,0 | 15,0 | |
| L-Cys | kapsula | aliquót prášku s destilovanou vodou, sonikácia, filtrácia cez 0,45 μm nylonový filter, aliquót derivatizovaný | NBD-F | RP-HPLC | UV $\lambda=472\text{ nm}$ | 0,5 | 2,0 | [50] |

Pokračovanie Tabuľka 4

| Analyt | Matrica | Úprava vzorky | Derivatizačné činidlo | Metóda | Detekcia | LOD [$\mu\text{g/ml}$] | LOQ [$\mu\text{g/ml}$] | Zdroj |
|-------------------|-----------------|--|-----------------------|---------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Taurín | tableta | vodný roztok prášku z tablety sonikovaný, filtrovaný cez 0,22 μm nylonovú membránu, pridaný IS a alikvót derivatizovaný | DNFB | RP-HPLC | UV DAD $\lambda=360\text{ nm}$ | 0,056 | 0,185 | [51] |
| Gly | | | | | | 0,045 | 0,150 | |
| Met | | | | | | 0,069 | 0,230 | |
| L-Arg | prášok, tableta | vzorky práškované, prídavok TSP, IS a D_2O , vortexovanie, sonikácia a úprava pH na 11 | – | NMR | – | – | – | [52] |
| L-citrulín | | | | | | | | |
| Taurín | | | | | | | | |
| Phe | kapsula | úprava vodného roztoku z prášku na $\text{pH } 7 \pm 0,5$, centrifugácia, k supernatantu prídavok roztoku teofylínu (10 mM pre ESI + a 1mM pre ESI -) a prídavok $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (85:15; v:v) | – | MS | – | *0,330 | *0,991 | [53] |
| His | | | | | | *0,465 | *1,552 | |
| Lys | | | | | | *0,439 | *1,316 | |
| Met | | | | | | *0,298 | *1,044 | |
| Val | | | | | | *0,234 | *0,703 | |
| Leu, Ile** | | | | | | *0,525 | *0,918 | |
| Thr | | | | | | *0,357 | *1,191 | |

Pokračovanie Tabuľka 4

| Analyt | Matrica | Úprava vzorky | Derivatizačné činidlo | Metóda | Detekcia | LOD [$\mu\text{g/ml}$] | LOQ [$\mu\text{g/ml}$] | Zdroj |
|------------|---------|---|-----------------------|--------|----------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Phe | kapsula | evaporácia vodného roztoku pripraveného z prášku (úprava na pH $7 \pm 0,5$,) pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ za prietoku dusíka, suchá zložka sonikácia s D_2O a fosfátovým pufrom (pH=7,4; 10 mM), prídavok TMSP-4 (0,1 mg/ml), NaN_3 (10mM) a teofylín (pH=7,5; 5 mM) | – | NMR | – | *14,867 | *45,097 | [53] |
| Ile | | | | | | *11,280 | *34,104 | |
| His | | | | | | *14,740 | *44,686 | |
| Lys | | | | | | *14,619 | *44,149 | |
| Met | | | | | | *13,130 | *39,988 | |
| Thr | | | | | | *11,316 | *34,307 | |
| Val | | | | | | *10,423 | *31,631 | |
| Leu | | | | | | *126,186 | *38,249 | |

- Vysvetlivky: ESI + pozitívny režim ionizácie elektrosprejom
 ESI – negatívny režim ionizácie elektrosprejom
 TSP sodná soľ 3-(trimethyl)silylpropiónovej kyseliny
 TMSP-4 2,2,3,4-D4 sodná soľ 3-(trimethyl)silylpropiónovej kyseliny
 * hodnoty pri danej metóde uvedené v $\mu\text{g/ml}$ sú prepočítané z mM

6 Záver

Cieľom bakalárskej práce bolo vytvorenie prehľadu o vlastnostiach aminokyselín, ich kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze i popis najnovších metód kontroly obsahu doplnkov stravy.

Prvá časť obsahuje charakteristiku chemickej štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností aminokyselín, ktoré podmieňujú aj samotný výber používanej analytickej metódy pri ich stanovení. Nasleduje charakterizácia základných funkcií v organizme a farmaceutické použitie.

V ďalšej kapitole je uvedená legislatívna úprava a aktuálne právne nariadenia týkajúce sa doplnkov stravy. Doplnky stravy sú kategóriou potravín, nemajú vlastnosti terapeutické, a tým sa jednoznačne dokazuje ich nemožnosť zámeny s liečivými prípravkami. Regulácia je menej prísna ako u liečivých prípravkov, kontrolné orgány sú však dôležité pre garanciu ich bezpečnosti a záruku deklarovaného množstva látok.

Posledná kapitola sa venuje princípom používaných analytických metód pri kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze vyskytujúcich sa v liekopisných a publikovaných článkoch. Prvá časť kapitoly sa zaoberá chromatografickými separáciami, konkrétne využitiu kvapalinovej chromatografie, uvedenými v liekopisnej časti fyzikálnych a fyzikálno-chemických metód. Podkapitola liekopisných dôkazov obsahuje možnosti identifikácie aminokyselín metódami uvedenými v liekopisných článkoch jednotlivých aminokyselín a ďalšia podkapitola uvádza odmernú analýzu, konkrétne acidobázické titrácie používané k stanoveniu obsahu.

Posledná časť obsahuje publikované články popisujúce metódy analýzy aminokyselín a prehľadovú tabuľku. Na základe zistených údajov môžeme povedať, že prevažujúcou metódou stanovenia aminokyselín v doplnkoch stravy je chromatografia. Okrem klasických techník, ako je napr. iónovymenná chromatografia s predkolónovou derivatizáciou, sa postupne využívajú aj moderné techniky, ako je SFC a HILIC, ktoré umožňujú derivatizačný krok vynechať. Ďalšími výhodami týchto metód je, že smerujú nielen k detekcii a kvantifikácii, ale sústreďujú sa aj na enantiometrické separácie. Z pohľadu citlivosti rešeršovaných metód je zrejme, že najnižšie hodnoty LOD dosahuje metóda RP-HPLC za použitia predkolónovej derivatizácie činidlom DNFB.

7 Zdroje

1. MATOUŠ, Bohuslav et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
2. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich, RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 4.vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
3. MCMURRY, John. *Organická chemie*. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
4. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1416-8.
5. KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
6. KARKI, Gaurab. Amino acids: Characteristics and Classification of amino acids. In: *Online biology notes* [online]. WordPress Theme, 2018 [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/amino-acids-characteristics-classification-amino-acids/>
7. TOMANDL, Josef a kol. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-6973-2.
8. OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Nutraceutika. Primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech*. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1884-5.
9. CARUSO, John et al. Ergogenic Effects of β -Alanine and Carnosine: Proposed Future Research to Quantify Their Efficacy. *Nutrients*. 2012, **4**(7), 585-601. DOI:10.3390/nu4070585
10. HOLEČEK, Milan. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism* [online]. 2018, **15**(33) [cit. 2020-10-27]. DOI:10.1186/s12986-018-0271-1
11. ZHANG, Shihai et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2017, **8**(10) [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-016-0139-z>. DOI: 10.1186/s40104-016-0139-z

12. BIFARI, Francesco a Enzo NISOLI. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *British journal of pharmacology*. 2017, **174**(11), 1366-1377. DOI:10.1111/bph.13624
13. LIANG, Mingcai et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, **115**, 315-328. DOI: 10.1016/j.fct.2018.03.029
14. DECALUWÉ, Kelly et al. Treatment of erectile dysfunction: New targets and strategies from recent research. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2014, **121**(2014), 146-157. DOI:10.1016/j.pbb.2013.11.024
15. GAD, Mohamed Z. Anti-aging effects of l-arginine. *Journal of Advanced Research*. 2010, , 169-177. DOI: 10.1016/j.jare.2010.05.001
16. SOLER-ALFONSO, Claudia et al. L-Cysteine supplementation prevents liver transplantation in a patient with TRMU deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2019, **19** [cit. 2020-11-21]. DOI:10.1016/j.ymgmr.2019.100453
17. TESSERAUD, Sophie et al. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *British Journal of Nutrition* [online]. 2008, **101**(8), 1132-1139 [cit. 2020-11-21]. DOI:10.1017/S0007114508159025
18. TSAKIRIS, Stylianos et al. The beneficial effect of l-cysteine supplementation on DNA oxidation induced by forced training. *Pharmacological Research*. 2006, **53**(4), 386-390. DOI:10.1016/j.phrs.2006.01.008
19. HUMPHRIES, Petro, Ethersia PRETORIUS a Hannes NAUDÉ. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2008, **62**, 451-462. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/1602866> DOI:10.1038/sj.ejcn.1602866
20. KAPALKA, George M. Chapter 6 - Depression. [Abstrakt]. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*. 2010, 141-187. DOI:10.1016/B978-0-12-374927-7.00006-6
21. WU, Guoyao. *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition* [online]. Boca Raton: CRC Press, 2013 [cit. 2020-10-26]. ISBN 9780429107597. Dostupné z: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429107597>

22. RAZAK, Meerza Abdul et al. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017** [cit. 2020-11-11]. DOI:10.1155/2017/1716701
23. HOLEČEK, Milan. Histidine in Health and Disease: Metabolism, Physiological Importance, and Use as a Supplement. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(3) [cit. 2020-11-23]. DOI:10.3390/nu12030848
24. WILLOUGHBY, Darryn S. a Brian LEUTHOLTZ. D-Aspartic acid supplementation combined with 28 days of heavy resistance training has no effect on body composition, muscle strength, and serum hormones associated with the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in resistance-trained men. *Nutrition Research*. 2013, **33**(10), 803-810. DOI:10.1016/j.nutres.2013.07.010
25. TAKAOKA, Motoko et al. Effect of amino-acid intake on physical conditions and skin state: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2019, **65**(1), 54-58. DOI:10.3164/jcbtn.18-108
26. WERNERMAN, Jan. Clinical Use of Glutamine Supplementation. *The Journal of Nutrition*. 2008, **138**(10), 2040-2044. DOI: 10.1093/jn/138.10.2040S
27. CENGİZ, Mahir et al. Effect of oral l-Glutamine supplementation on Covid-19 treatment. *Clinical Nutrition Experimental*. 2020, **33**, 24-31. DOI: 10.1016/j.yclnex.2020.07.003
28. SINGH, Meenu et al. Medicinal Uses of L-Lysine: Past and Future. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **2**(4), 637-642 [cit. 2020-11-27].
29. RUBEY, Robert N. Could lysine supplementation prevent Alzheimer's dementia? A novel hypothesis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2010, **6**, 707-710. DOI:10.2147/NDT.S14338
30. Methionine. *DrugBank* [online]. 2020 [cit. 2020-11-27]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00134>
31. KRUPKOVAĽ -MEIXNEROVAĽ, L. et al. Methionine-loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study. *Clinical Nutrition*. 2002, **21**(2), 151-156. DOI:10.1054/clnu.2001.0523
32. PALEGO, Lionella et al. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *Journal of Amino Acids*. 2016, **2016**, 16. DOI:10.1155/2016/8952520

33. FERNSTROM, John D. Effects and Side Effects Associated with the Non-Nutritional Use of Tryptophan by Humans. *The Journal of Nutrition*. 2012, **142**(12), 2236-2244. DOI:10.3945/jn.111.157065
34. FIBIGR, Jakub. *Využití HPLC techniky v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů*. Hradec Králové, 2019. Disertační práce. Univerzita Karlova.
35. BROUSILOVÁ, Tereza. *Veřejnoprávní regulace reklamy na doplňky stravy*. Praha, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova.
36. Uvádění doplňků stravy do oběhu. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/doplanky-stravy-1>
37. Vyhláška č. 58/2018 Sb. Vyhláška o doplňcích stravy a složení potravin.
38. Zákon č. 378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech)
39. METYŠ, Karel a Peter BALOG. *Marketing ve farmacii*. Praha: Grada, 2006, ISBN 80-247-0830-2.
40. *Český lékopis 2017 - Doplněk 2019*. Praha: Grada, 2019. ISBN 978-80-271-2531-9.
41. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
42. KLIMEŠ, Jiří a kol. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
43. HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. 2000. ISBN 0072375477.
44. GRECO, Giorgia a Thomas LETZEL. The Basics of HILIC - HILIC Tip #2. In: *Researchgate* [online]. Berlin: ResearchGate, 2014 [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/297229518_The_Basics_of_HILIC_-_HILIC_Tip_2
45. *Český lékopis*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
46. *Český lékopis 2017 - Doplněk 2018*. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0858-9.
47. RAIMBAULT, Adrien, Angéline NOIREAU a Caroline WEST. Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry—application to food supplements. *Journal of Chromatography A*. 2019, **1616**(2020). DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460772

48. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Laura et al. Chiral analysis of aromatic amino acids in food supplements using subcritical fluid chromatography and Chirobiotic T2 column. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015, **107**, 519-525. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.06.027
49. THEMELIS, Thomas, Roberto GOTTI a Rita GATTI. A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **145**(2017), 751-757. DOI:10.1016/j.jpba.2017.08.001
50. PUCIARINI, Lucia et al. Optimized one-pot derivatization and enantioseparation of cysteine: Application to the study of a dietary supplement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, **180**(2020). DOI:10.1016/j.jpba.2019.113066
51. GATTI, Rita. Simultaneous Determination of Taurine, N-Acetylcysteine, Glycine and Methionine in Commercial Formulations by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 2019, **82**, 1833-1837. DOI:10.1007/s10337-019-03808-8
52. LEE, Isaac et al. Single-Laboratory Validation Study of a Proton NMR Method for the Determination of L-Arginine, L-Citrulline, and Taurine Contents in Dietary Supplements. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2020, **103**(4), 1140–1147. DOI:10.1093/jaoacint/qsaa002
53. PALARIC, Cécile et al. Combined MS-NMR approach for the quality control of food supplements containing amino acids. *Food Control*. 2018, **88**, 217-228. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.01.022

Zoznam obrázkov

| | |
|---|----|
| Obrázok 1 Chemická štruktúra kódovaných aminokyselín a rozdelenie na základe polaritý ich postranného reťazca | 12 |
| Obrázok 2 Schéma reakcie aminokyseliny a derivatizačného činidla (DNFB)..... | 38 |

Zoznam tabuliek

| | |
|--|----|
| Tabuľka 1 Názov a skratka aminokyselín..... | 10 |
| Tabuľka 2 Rozdiel požiadavok kladených na voľne predajné liečivá a doplnky stravy | 23 |
| Tabuľka 3 Predkolónová derivatizácia | 31 |
| Tabuľka 4 Analytické metódy používané na stanovenie aminokyselín v doplnkoch stravy v publikovaných článkoch | 40 |