UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

IZOTACHOFORETICKÉ STANOVENÍ TAURINU

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Michálková

Vedoucí práce: Ing. Martin Bartoš, CSc.

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE

Faculty of chemistry and technology

Department of analytical chemistry

ISOTACHOPHORETIC DETERMINATION OF TAURINE

Thesis

Author: Bc. Hana Michálková

Supervisor: Ing. Martin Bartoš, CSc.

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2018/2019**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Hana Michálková**
Osobní číslo:	**C17519**
Studijní program:	**N1407 Chemie**
Studijní obor:	**Analytická chemie**
Název tématu:	**Izotachoforetické stanovení taurinu**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se se základními fyzikálními a chemickými vlastnostmi taurinu, popište jeho výrobu, použití, roli v organismu a výskyt v potravinách a nápojích.

2. Proveďte literární rešerši na téma stanovení taurinu v různých matricích, zvláštní pozornost věnujte jeho stanovení elektromigračními separačními technikami.

3. V praktické části se zaměřte na stanovení taurinu v energetických nápojích pomocí izotachoforézy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Janečková**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 5. 2019

Hana Michálková

Chtěla bych poděkovat Ing. Martinu Bartošovi, CSc. a Ing. Michaele Janečkové za rady a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala mé rodině, přátelům a známým za podporu při studiu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá stanovením 2-aminoethansulfonové kyseliny pomocí různých chemických metod. V teoretické části je zaměřena na popis taurinu jako látky napomáhající různým biochemickým procesům v těle, na produkci a metabolismus taurinu a na odběr vzorků obsahujících taurin. V experimentální části je zpracováno stanovení taurinu pomocí izotachoforézy z doplňků stravy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izotachoforéza
Aminokyseliny
Sulfonové kyseliny
Taurin

TITLE

Isotachophoretic determination of taurine.

ANNOTATION

This thesis deals with the determination of 2-aminoethansulfonic acid using various chemical methods. The theoretical part addresses the description of taurine as a substance, which is employed during numerous biochemical processes in the human body, production, metabolism of taurine, and discusses sampling substances which contain taurine. The experimental part focuses on the determination of taurine in food supplements by isotachophoresis.

KEYWORDS

Isotachophoresis
Amino acids
Sulfonic acids
Taurine

1. ÚVOD 13
2. TEORETICKÁ ČÁST 14
2.1 Vlastnosti taurinu 14
2.2 Výskyt a působení taurinu a jeho derivátů v organismu 14
2.3 Výroba taurinu 20
2.4 Metabolismus taurinu 22
2.5 Biologické vzorky 23
2.6 Stanovení taurinu chromatografickými metodami 25
2.6.1 Kapalinová chromatografie 25
2.6.2 Iontová chromatografie 27
2.6.3 Plynová chromatografie 28
2.6.4 Chromatografie na tenké vrstvě 28
2.7 Spektrální metody stanovení taurinu 28
2.8 Elektrochemické metody stanovení taurinu 30
2.9 Elektroseparační metody stanovení taurinu 34
2.9.1 Stanovení taurinu kapilární zónovou elektroforézou 34
2.9.2 Izoelektrické fokusování 38
2.9.3 Izotachoforetické stanovení taurinu 39
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 40
3.1 Seznam použitých chemikálií 40
3.2 Příprava roztoků 40
3.3 Elektrolyty pro ITP analýzu 41
3.4 Přístroje a zařízení 42
3.5 Stanovení taurinu v modelových směsích 43
3.6 Reálné vzorky 43
4. VÝSLEDKY A DISKUSE 45
4.1 Převedení taurinu na hydroxykyselinu 45

4.2 Výběr elektrolytového systému 48
4.3 Stabilita, reprodukovatelnost, kalibrace, detekční limit a mez stanovení.....49
4.4 Reálné vzorky 52
5. ZÁVĚR 57
6. ZDROJE.....58

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Graf 1 – Závislost účinnosti konverze taurinu na isethionovou kyselinu na čase. Složení směsi: 0,02 mM taurin, 0,1 mM kyselina octová a 0,1 mM dusitan sodný, V=50 ml, ♦ - ultrazvuk, ■ – míchání, ▲ – míchání + teplota. 46
Graf 2 – Závislost účinnosti konverze taurinu na koncentraci kyseliny octové. Koncentrace v baňce (V = 50 ml) taurinu 0,02 mol/l, koncentrace dusitanu sodného 0,1 mol/l. Směs byla povařena deset minut a poté ještě 20x naředěna a analyzována. 47
Graf 3 – Závislost účinnosti konverze na koncentraci dusitanu sodného. Koncentrace v baňce (V = 50 ml) taurinu 0,02 mol/l, koncentrace kyseliny octové 0,1 mol/l. Směs byla povařena deset minut a poté ještě 20x naředěna a analyzována. 48
Graf 4 – Kalibrační závislost délky zóny taurinu na koncentraci taurinu, elektrolyt I. vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl, β-alanin (pH 3,6), koncový elektrolyt 10 mM CH_3COONa, předseparační kolona. 50
Graf 5 – Kalibrační závislost délky zóny taurinu na koncentraci taurinu, elektrolyt I. vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl, β-alanin (pH 3,6), koncový elektrolyt 10 mM CH_3COONa, analytická kolona.....51

Obr. 1 – Obecná struktura žlučových kyselin [26] 16
Obr. 2 – Iontový chromatogram vzorku moči [3] 27
Obr. 3 – Cyklický voltamogram Ni^{II}(2,4DHS)/SWCNTSPE v 0,1 M NaOH za nepřítomnosti (křivka a) a za přítomnosti (křivka b) 5 mM taurinu [4].....31
Obr. 4 – Předpokládaná struktura MICP filmu s vazbou na taurin.[10].....33
Obr. 5 – N,N,N-trimethylethanolamoniový kation (cholin) [1].....34
Obr. 6. – Elektroforegram energetického nápoje [6] 36
Obr. 7 – Elektroforegram směsi bílkovinné protilátky, NDSB a taurinu [13].....38
Obr. 8 – Izotachoforegram vzorku Maximal G, analytická kolona. 53
Obr. 9 – Izotachoforegram vzorku QXE, analytická kolona. 54
Obr. 10 – Izotachoforegram vzorku Tiger, analytická kolona.....55
Obr. 11 – Izotachoforegram vzorku Crazy Wolf, analytická kolona.....55
Obr. 12 – Izotachoforegram vzorku Carbo Snack, analytická kolona. 56

Rov. 1 – Schéma možné oxidace taurinu na povrchu elektrody.....32
Rov. 2 – Rovnice derivatizace aminokyseliny pomocí NDA za přítomnosti NaCN [8] 36

Tab. 1 – Shrnutí předkolonových derivatizačních metod užívaných pro taurin u HPLC [3] 26
Tab. 2 – Reprodukovatelnost měření na předseparační koloně, elektrolyt I. 50
Tab. 3 – Reprodukovatelnost měření na analytické koloně, elektrolyt I. 50
Tab. 4 – Výtěžnost stanovení taurinu. 52
Tab. 5 – Detekční limit a mez stanovení u zředěné a nezředěné směsi v analytické koloně, elektrolyt I. 52
Tab. 6 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Maximal G. 53
Tab. 7 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje QXE. 54
Tab. 8 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Tiger. 54
Tab. 9 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Crazy Wolf. 55
Tab. 10 – Zjištěný obsah taurinu u energetického gelu Carbo Snack. 56

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE - kapilární elektroforéza

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

ESI – ionizace elektrosprejem

GCE – elektroda ze sklovitého uhlíku

HEC – hydroxyethylcelulóza

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC – iontová chromatografie

ISA – kyselina isethionová

LIF – laserem indukovaná fluorescence

LOQ – mez stanovení

MALDI – ionizace laserem za účasti matrice

NDSB – nedertgentní sulfobetain

NMR – nukleární magnetická rezonance

RSD – relativní směrodatná odchylka

SD – standardní odchylka

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. ÚVOD

Aminokyseliny jsou sloučeniny obsahující kromě základního uhlíkového řetězce dvě funkční skupiny. Tato skupina látek se dělí na α-aminokyseliny a β-aminokyseliny (***a další***). α-aminokyseliny jsou stavebními kameny bílkovin a peptidů a jejich funkčními skupinami jsou karboxylová (-COOH) a amino skupina ($-NH_2$). β-aminokyseliny jsou neproteinogenní, mohou se lišit funkčními skupinami a mají v organismu jiné funkce.

Taurin se řadí mezi β-aminokyseliny, vyskytuje se v těle jakožto volná aminokyselina a nezačleňuje se tedy do bílkovin. Tato aminokyselina, neobsahující karboxylovou skupinu ale sulfoskupinu, je zároveň sulfonovou kyselinou a je známá také jako významné léčivo u mnoha chorob, např. poruch spojených s ledvinami a játry. Zároveň působí jako antioxidant, neurotransmiter, modulátor hladiny vápníku v buňkách a má ochranný účinek na nervovou soustavu.

Taurin se kromě jiných látek jako je kofein nebo vitamíny přidává do energetických nápojů a různých dalších doplňků stravy z důvodu povzbuzení organismu při sportovních aktivitách. Používá se také jako přísada do kojeneckých výživ z důvodu stimulace nervového systému.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vlastnosti taurinu

Taurin (2-aminoethanesulfonová kyselina) je v čistém stavu bílá krystalická látka, bez zápachu, mírně kyselé chuti. Jeho strukturní vzorec je $NH_2CH_2CH_2SO_3H$, molární hmotnost má 125,14 g/mol, rozpustnost v chladné vodě 65g/l, bod tání 300 °C, přičemž se již počíná rozkládat. Při tepelném rozkladu uvolňuje mj. oxidy síry a dusíku. Disociační konstanta sulfoskupiny se blíží 0, pK_A aminoskupiny je 9,34.[52]

Taurin je podmíněně esenciální β-aminokyselinou (esenciální pouze za určitých okolností nebo období) a je jedním z koncových produktů metabolismu cysteinu a methioninu (z něj může být i syntetizován) a je vylučován močí.[3,4,7]

Biosyntézu taurinu lze vystihnout schematem[20]:
methionin → cystein → cysteinsulfonová kyselina → hypotaurin → taurin

Taurin obsahuje sulfonovou skupinu a neobsahuje karboxylovou skupinu, tudíž název aminokyselina není úplně přesný. To je nejspíš také jeden z důvodů, proč se vyskytuje jako volná kyselina a nezačleňuje se do bílkovin.[7]

2.2 Výskyt a působení taurinu a jeho derivátů v organismu

Taurin je antioxidant, neurotransmiter, modulátor hladiny vápníku v buňkách, má ochranný účinek na nervovou soustavu a z preklinických studií vychází, že při jeho nedostatku dochází k degeneraci sítnice.[2,3,14] Nemá přirozeného antagonistu (synteticky vytvořeným antagonistou je např. 6-aminomethyl-5-methyl-(4H)-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid).[20] Taurin hraje klíčovou roli při oxidativní fosforylaci,[41] má farmakologické účinky na játra (ve správné koncentraci chrání játra před volnými radikály, přebytek játrům škodí) a žlučník (tvoří konjugáty se žlučovými kyselinami – žlučové soli), a také snižuje vysoký tlak.[3,7,11,20] Kromě toho působí proti změnám, které v těle vyvolávají některé toxické látky, např. monocrotalin nebo arsen.[7,11,42] Bylo zjištěno, že taurin se vyskytuje častěji v játrech u samic a plicích u samců. V ostatních orgánech je obsah taurinu prakticky nezávislý na pohlaví.[32]

Taurin a některé jeho sirné deriváty ovlivňují termoregulaci interakcí se serotoninergním systémem. Antagonistou tohoto procesu jsou fosfátové deriváty.

Výměnou aminoskupiny u taurinu za guanidinovou skupinu se tento jeho potenciál ještě zvýší. Snížení teploty těla se připisuje snížení vasomotorického tonusu.[20]

Před mnoha lety byla též studována antimikrobiální aktivita derivátů taurinu. Tato schopnost byla nalezena u N-pentoyltaurinu. U ω-isopropylpentoyltaurinu bylo zjištěno, že inhibuje bakterie kyseliny mléčné. 2-(2-hydroxyalkylamino)ethansulfonová kyselina má také antibakteriální účinky, a to vůči gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a grampozitivním bakteriím *Staphyloccocus aureus*. Další deriváty jako p-nitrobenzoyltaurinamid nebo např. p-aminobenzoyltaurinamid mají rovněž antimalarické účinky.[20]

Sulfonové kyseliny, mezi které řadíme i taurin, reagují s ribonukleovou a deoxyribonukleovou kyselinou a tím dochází k ochrannému efektu vůči alkylačním činidlům, radiaci nebo karcinogenům. Tato činidla se mohou podílet na změně konformace nukleových kyselin, a tím zmírňují toxické účinky chemických mutagenů.[20]

Taurin ovlivňuje také stavbu kostí. Nachází se v celkem vysokých koncentracích v kostní tkáni, stimuluje tvorbu kostí a působí antiosteoporoticky.[20]

Další nemocí, kterou je možno ovlivnit taurinem, je diabetes. Insulin a taurin pracují v symbióze a navzájem stimulují akce spojené s hypoglykemickými stavy. Taurin zmírňuje komplikace spojené s nefropatií a retinopatií.[20]

U taurinu byla také objevena schopnost působit proti účinkům KCN. Při podání KCN, klesá spotřeba kyslíku v těle. Pokud se ale aplikuje taurin, tato spotřeba se opět zvýší. Ještě lépe fungují deriváty taurinu, jako methyltaurin, dimethyltaurin nebo homotaurin.[20]

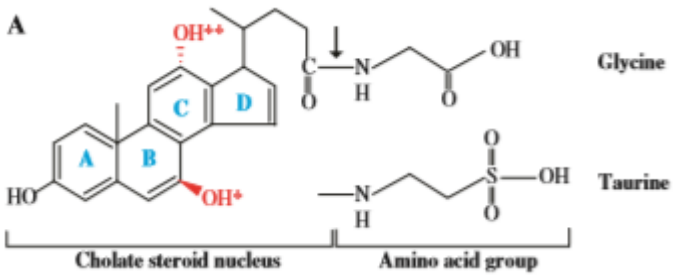
Taurin patří mezi látky přidávané do kojeneckých výživ, energetických nápojů a doplňků stravy. Stimuluje myšlenkové procesy a zvyšuje výkon.[1] Nedostatek taurinu zvláště v období růstu způsobuje imunodeficienci, kardiomyopatii, retinální degeneraci a růstovou retardaci. Byla prokázána jeho spojitost s Alzheimerovou chorobou, epilepsií, kardiovaskulárními chorobami, rakovinou a hypercholesterolemií.[3,58]

Taurin se používá i jako léčivo (avšak s různým stupněm úspěšnosti) například u výše zmíněných chorob, dále u makulární degenerace, jaterních poruch, alkoholismu a cystické fibrózy. Využívá se také v tabletách, které by měly zmírňovat efekty stárnutí.[3,20]

Taurin jako součást žluči

Konjugaci s taurinem či glycinem na C-24 karboxylovou skupinu, která probíhá před sekrecí přes membránu hepatocytů, podléhají žlučové kyseliny, což jsou fyziologické surfaktanty, které jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu. Dvě hlavní kyseliny jsou cholová (CA) a chenodeoxycholová (CDCA). Střevní bakterie metabolizují žlučové soli během jejich enteropatické cirkulace a jejich hlavní biotransformační reakcí je hydrolýza konjugovaných kyselin na volné kyseliny.[52]

Žluč obsahuje šest hlavních konjugovaných žlučových kyselin – taurocholová kyselina (TCA), taurodeoxycholová kyselina (TDCA), taurochenodeoxycholová kyselina (TCDCA), glykocholová kyselina (GCA), glykodeoxycholová kyselina (GDCA) a glykochenodeoxycholová (GCDCA). Jejich obsah se liší u různých živočišných druhů. Obsah kyselin u lidí je 9 % TCA, 9 % TDCA, 8 % TCDCA, 26 % GCA, 22 % GDCA a 26 % GCDCA. Poměr konjugátů glycinu ke konjugátům taurinu je tedy přibližně 3 : 1.[26]



Obr. 1 – Obecná struktura žlučových kyselin [26]

Spojení žlučových kyselin s taurinem proběhlo mnohem dříve než konjugace s glycinem.[34] Poměr mezi glycinovými a taurinovými konjugáty žlučových kyselin (G/T poměr) je odlišný u různých druhů. Tato odlišnost je částečně způsobená druhově specifickými účinky v aktivitách enzymů, které katalyzují konjugaci žlučových kyselin s taurinem a glycinem.[25,35]

Z preparátů lidských jater bylo zjištěno, že játra jsou schopna vytvořit oba konjugáty. Bez přídavku taurinu vzniká 40 až 60 % konjugátů s taurinem, ale po jeho přídavku vzroste toto množství až na 90 %. Přidání glycinu má na druhou stranu velice malý vliv na G/T poměr.[32,36] Poměr G/T určuje nejen aktivita enzymu typická pro daný druh, ale tedy i množství taurinu, které je možné použít ke konjugaci.[25]

Žlučové kyseliny a jejich konjugáty napomáhají k absorpci tuků, lipolýze, tvorbě micel a reesterifikaci mastných kyselin v tenkém střevě. Vzdáleně také ovlivňuje odstraňování cholesterolu z těla.[32]

Pokud je žlučová kyselina volná, její pK_A je okolo 5. Je-li ale v konjugátu, pohybuje se její pK_A okolo 4 (při spojení s glycinem) a pod 2 (při spojeni s taurinem). Pokud jsou tedy kyseliny konjugované, jsou o něco silnějšími kyselinami než ve volném stavu.[55] Taurin-konjugované kyseliny jsou dokonce rozpustné při tak nízkém pH, jaké je v žaludku, a lze je tedy použít jako součást do orálně podávaných léků.[54] Hydrofilně-lipofilní rovnováha žlučových kyselin závisí na počtu, pozici a orientaci hydroxylových skupin a také na konjugaci s aminokyselinami. Hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC) nepřímo korelují s hydrofobicitou žlučových kyselin. K této informaci se došlo měřením retenčních faktorů HPLC s obrácenými fázemi.[53] Dokazuje to tedy, že hnací silou tvorby micel je minimalizace povrchu hydrofobního charakteru. Jelikož konjugace kyselin s aminokyselinami vede k nižším hodnotám CMC, může souhra mezi hydrofobním účinkem a specifickými reakcemi vodíkových vazeb přispívat k tvorbě micel a vést k překvapivým hodnotám CMC.[27]

Hydrolásy žlučových solí jsou enzymy označované zkráceně BSH (bile salts hydrolase), nebo CBSH (conjugated bile salts hydrolase), CBAH (conjugated bile acid hydrolase) nebo CGH (cholylglycine hydrolase). Slouží ke katalýze hydrolýzy konjugovaných žlučových kyselin na nekonjugované kyseliny a rezidua aminokyselin.[26]

Ochrana buněk před účinky arsenu

Byl učiněn pokus, ve kterém se vědci pokusili o ochranu buňky před arsenem pomocí taurinu. Jako pokusný objekt byly zvoleny krysy (oplodněné), které byly vystaveny As_2O_3. Arsen je znám jakožto látka, která mimo jiné prostupuje přes placentu. Zkoumaným objektem byla slinivka břišní potomků krys vystavených působení arsenu. Oplodněné krysy byly rozděleny do několika skupin. Jedna skupina byla „léčena“ destilovanou vodou, další roztoky s různými koncentracemi As_2O_3 a poslední byl podáván roztok As_2O_3 v nejvyšší předkládané koncentraci a také taurin. Stejně jako s krysami bylo zacházeno i s jejich potomky.[11]

Po odebrání vzorků pankreatu byly tyto vzorky sloučeny s 2,5% glutaraldehydem a 1% oxidem osmičelým. Byly vysušeny pomocí ethanolu a vloženy do epoxidové pryskyřice. Z takto zpracovaných vzorků byly vytvořeny peletky, které byly dále zkoumány pomocí

transmisní elektronové mikroskopie. Peletky byly ustáleny citronanem olovnatým a octanem uranylu.[11]

Kromě sledování vzorků pankreatu pomocí elektronové mikroskopie bylo na buňkách pankreatu provedeno také měření mitochondriálního membránového potenciálu. Před vystavením buněk sloučenině arsenu byly bunky předem ošetřeny malým množstvím taurinu. Poté byly buňky vystaveny 1 μM a později 4 μM arsenitanu sodného po dobu 24 hodin. Po této době bylo k buňkám přidáno 5 μg/ml JC-1 (tetrachlortetraethylbenzimidazolkarbokyanin jodid), buňky se nechaly s touto látkou inkubovat po 20 min při teplotě 37 °C. JC-1 zde slouží jako fluorescenční barvivo, díky kterému se dá zjistit, na kterých místech v mitochondrii došlo k akumulaci sloučenin, a to pomocí mitochondriálního membránového potenciálu. Pokud je látka monomerní, je depolarizována a má tedy nízký mitochondriální membránový potenciál. Je-li látka ve formě agregátu, je polarizována a její mitochondriální membránový potenciál je normální. Sleduje se tedy přechod ze zelené na červenou barvu. Pak následovalo omytí ledově studeným fosfátovým pufrem a analýza pomocí fluorescenčního mikroskopu.[11]

Po proměření vzorků pankreatu, membránového potenciálu a ještě několika testů s enzymy a dalšími látkami bylo prokázáno, že taurin dokáže léčit poničenou krysí tkáň.[11]

N-acetyltaurin je markrem ethanolu obsaženého v moči.[43] Při metabolismu ethanolu jsou velice důležitými látkami acetát a acetyl-CoA. Právě tyto acetátové zbytky jsou důležité pro vznik N-acetyltaurinu, jehož koncentrace stoupá při konzumaci alkoholu.[16]

Taurin-pyruvát transamináza patří mezi ω-transaminázy řadící se do III. třídy. ω-transaminázy jsou jedny z nejznámějších enzymů na biosyntézu chirálních aminů. Taurin-pyruvát transamináza katalyzuje transaminaci mezi taurinem a pyruvátem a je obsažena v mikroorganismech, které z této sloučeniny čerpají uhlík, dusík a síru.[18]

Ochrana ledvin a jater

Na játra a ledviny má negativní vliv mimo jiné KBr, CCl_4, kadmium a alloxan, vyvolávající diabetes mellitus. Proti toxicitě způsobené těmito látkami působí velmi dobře taurin.[21,44,45,46]

Testování těchto účinků taurinu probíhalo na 56 krysách, které byly rozděleny do několika skupin, kterým byla podávána odlišná medikace. Jedné ze skupin byl podáván samotný taurin a další taurin společně s N-acetylcysteinem. Po 11 dnech byly krysám

odebrány vzorky krve, játra a ledviny. Vzorky krve byly centrifugovány a získané krevní sérum bylo uchováno při -20 °C. Játra a ledviny byly omyty solným roztokem. Malá část byla vložena do formalínu a zbývající části byly ponořeny do ledové vody obsahující fosfátový pufr (pH 7,4). Vzorky byly poté homogenizovány a vloženy do centrifugy. Supernatant byl uchováván při -80 °C. Sérová aktivita ALT (alanin transferázy) a AST (aspartát transferázy) byla analyzována spektrofotometricky a hladina kreatininu byla měřena kolorimetricky. Ve vzorcích jater a ledvin byly hledány biomarkery oxidativního stresu. Vzorky uchované ve formalínu byly opláchnuty ethanolem a xylenem, a poté vloženy do parafínového vosku. Vzorky byly nakrájeny na tenké plátky a byly histopatologicky zkoumány.[21]

Posouzení jaterních lézí bylo založeno na přítomnosti jaterní degenerace a nekrotické tkáně. Na posouzení lézí ledvin bylo využito renální tubulární degenerace a obsahu hyalinu. Vzorky tkání v parafínovém vosku byly deparafinizovány pomocí xylenu, ve kterém byly ponořeny po dobu 24 h, a poté hydratovány alkoholem. Vzorky byly smíseny s kyselinou octovou (10 mmol/l, pH 6) a s TRIS-EDTA (0,05 mmol/l, pH 7,6), zahřáty a po ochlazení byl přidán fosfátový pufr. Aktivita endogenní peroxidásy byla zablokována pomocí H_2O_2. Jako poslední před analýzou pomocí elektronové mikroskopie byl ke vzorku přidán chromogen diaminobenzidin, který byl po 10 minutách vypláchnut fosfátovým pufrem, hematoxylin, který byl vypláchnut po 2 minutách vodou, dehydratován alkoholem a namočen v xylenu.[21]

U skupiny, které byl podáván jak taurin, tak N-acetylcystein, nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly v analyzovaných parametrech v porovnání s kontrolovanou skupinou. Na druhou stranu, u skupin, kterým byl podáván zvlášť taurin a N-acetylcystein (50 mg/kg denně u obou), se zlepšily výsledky biomarkerů hepatorenálních zranění ve srovnání se skupinou léčenou fipronilem. Při analýze zaměřené na změny způsobené oxidativním stresem byla zjištěna obnova antioxidační enzymatické aktivity u skupiny fipronil-taurin-N-acetylcystein (FPN-TAU-NAC). U této skupiny došlo též k návratu koncentrace oxidačních-antioxidačních markerů na normální hladinu. U analýzy jaterních lézí a lézí ledvin bylo zjištěno, že u skupin FPN-TAU a FPN-NAC došlo ke zlepšení v porovnání se skupinou FPN. Z výsledků měření lze tedy vyvodit, že taurin má detoxikační účinek na játra a ledviny.[21]

Klinická léčba myokarditidy pomocí taurinu

Byl proveden experiment na myších, které byly rozděleny do pěti skupin – kontrolované, neléčené EAM (experimental autoimmune myocarditis), EAM léčené taurinem (5 mg/kg), EAM léčené taurinem (10 mg/kg), EAM léčené taurinem (20 mg/kg). Myším, které byly ve skupině, kterým se dávala dávka taurinu, byl denně aplikován taurin po dobu 21 dní. Myším ve dvou zbylých skupinách byl aplikován solný roztok. V poslední den experimentu byly myši zváženy, byl jim změřen tlak a tep. Poté byly myši usmrceny a byla zvážena jejich srdce, která byla nakrájena na tenké plátky, které byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Takto upravené vzorky byly analyzovány pod mikroskopem. Dále byl zkoumán obsah biomarkerů oxidativního stresu – malondialdehyd, superoxid dismutáza a glutathion dioxidáza. Vzorky tkáně myokardu byly homogenizovány v ledově studeném solném roztoku pufrovaném fosfáty (PBS), homogenát byl centrifugován a dále byl zpracováván supernatant pomocí ELISA.[17]

Ačkoliv všechny výsledky všech skupin byly hodně obdobné, byl zjištěn nárůst poměru váhy srdce/váhy těla u skupiny neléčené EAM narozdíl od kontrolované skupiny. Z echokardiogramu vyšlo najevo, že na srdcích myší léčených taurinem (10 nebo 20 mg/kg), nebyly nalezeny změny způsobené dysfunkcí levé komory. Z mikroskopických měření bylo zjištěno, že podávaný taurin snížil koncentraci zánětlivých buněk a nekrotické tkáně. Při porovnávání obsahu biomarkerů oxidativního stresu mezi neléčenou a léčenou skupinou bylo odhaleno, že u myší léčených taurinem došlo k poklesu těchto biomarkerů.[17]

Z těchto faktů lze vyvodit, že taurin by mohl zmírnit vývoj EAM tím, že snižuje biomarkery oxidativního stresu a koncentraci zánětlivých buněk.[17]

2.3 Výroba taurinu

Taurin je produkován především těmito třemi způsoby:

- Extrakce z potravin
- Enzymatická syntéza
- Chemická syntéza

Extrakce z potravin

Taurin se v potravinách vyskytuje především v drůbežím mase, rybách, měkkýších a mořských plodech. Neobsahují jej rostliny – ani ovoce ani zelenina. Přírodní taurin se tedy získává extrakcí právě z těchto potravin s vysokým obsahem taurinu a následnou purifikací získané látky. Takto získaný přírodní taurin ale není vhodný pro medicinální použití, jelikož může obsahovat vedlejší živočišné produkty, jako rezidua antibiotik, veterinární léčiva, hormony, jiné aminokyseliny nebo dipeptidy.[24,47,48,49,50,51]

Enzymatická syntéza

Dalším způsobem výroby taurinu je enzymatická syntéza, která sestává ze dvou kroků. Tato syntéza začíná výrobou keratinového hydrolysátu pomocí rozsáhlé hydrolýsy proteás izolovaných ze zvířecí slinivky břišní. Poté následuje konverze hydrolysátu na taurin užitím směsi enzymů extrahovaných ze zvířecích jater.[24]

Chemická syntéza

Komerčně je taurin vyráběn chemickou cestou. Základní chemický postup výroby je dvoukrokový. Nejprve reaguje monoethanolamin s kyselinou sírovou za tepla za vzniku 2-aminoethylsírové kyseliny. Tato kyselina pak reaguje s kyselým roztokem siřičitanu sodného za tepla a produktem této reakce je taurin. Chemická syntéza může přinášet různé zdravotní či environmentální problémy z důvodu vzniku chemického odpadu a použití organických rozpouštědel.[24]

Jiné metody

Dalším ze způsobů výroby taurinu je například syntéza pomocí L-cysteinsulfonové kyseliny ze substrátu obsahující L-cystein. L-cystein je oxidován na L-cysteinsulfonovou kyselinu užitím L-cystein dioxygenázy (CDO). Poté je L-cysteinsulfonová kyselina dekarboxylována dekarboxylázou L-cysteinsulfonové kyseliny (CSAD) na hypotaurin. Pak následuje spontánní oxidace na taurin.[24]

U kuřat a ryb vzniká taurin přeměnou L-cysteinsulfonové kyseliny pomocí dekarboxylázy kyseliny L-cysteinsulfonové (CAD) či CSAD.[24]

U kvasinek *Yarrowia lipolytica* může být taurin syntetizován z L-cysteinu přes L-cysteinsulfonovou kyselinu. Přeměna zahrnuje dekarboxylaci L-glutamátdekaroboxylásou.[24]

2.4 Metabolismus taurinu

Taurin je znám především jako sloučenina, která se žlučovými kyselinami tvoří žlučové soli. Vyskytuje se ovšem i jako součást některých metabolických procesů (ne v lidském těle), díky kterým vznikají jiné sloučeniny obsahující síru. Informace týkající se těchto procesů nejsou kompletní, bylo ale zjištěno, že se taurin může přeměňovat na:

- Anorganické sírany
- Karbamyltaurin
- Taurocyamin a fosfotaurocyamin
- Isethionová kyselina (ISA)
- Ostatní deriváty [32]

Anorganické sírany

Sírany vznikaly z několika kmenů bakterií rostoucích na médiu, ve kterém byl taurin jediným zdrojem síry.[32]

Karbamyltaurin

Tato sloučenina byla Salkowskim nalezena v moči u psů a u pacientů, kterým byl pravidelně podáván taurin.[85] Ostatní vědci ale tyto výsledky nebyli schopni potvrdit. Nedávné studie však tvrdí, že karbamyltaurin byl v moči pacientů s dávkami taurinu a v moči krys pomocí speciálních chromatografických metod opravdu stanoven.[32]

Taurocyamin a fosfotaurocyamin

Biosyntéza taurocyaminu je založená na přenosu guanidinové skupiny na taurin nebo hypotaurin. In vitro byla syntéza provedena pomocí transaminace mezi argininem a hypotaurinem za vzniku hypotaurocyaminu, který byl posléze oxidován na taurocyamin. Tato reakce probíhá u kroužkovců – transaminace ve střevním traktu a oxidace ve svalech. Taurocyamin byl izolován z moči psů. Fosfotaurocyamin vzniká reakcí hypotaurocyaminu s ATP-hypotaurocyaminfosfotransferázou nebo taurocyaminu s ATP-taurocyaminfosfo-transferázou. Vhodnějším substrátem je ale hypotaurocyamin.[32,86]

Isethionová kyselina (ISA)

ISA byla izolována a stanovena i ve vzorcích odebraných ze psího srdce.[78] Tato sloučenina zde vznikla z taurinu a cysteinu. Existují dvě studie, které zkoumaly obsah ISA v lidské moči. Stanovení proběhlo pomocí citlivé a specifické dvojité izotopové derivatizační metody. Průměrné vylučování ISA močí bylo 13,7 mg/24 h u pacientů s chorobami jinými než týkajícími se svalových onemocnění a 7 mg/24 h u pacientů se svalovými onemocněními. Toto zjištění je zajímavé zejména kvůli těmto třem důvodům:

- Dokazuje výskyt ISA v lidském těle.
- Naznačuje, že vyloučené množství této látky je poměrně vysoké. Představuje zhruba 10% obsahu taurinu v těle, který je předpokládaným prekurzorem.
- Poukazuje na možnost, že pruhovaný sval je hlavním zdrojem ISA vyloučeného močí.[32]

Ostatní deriváty

Deriváty vzniklými z taurinu jsou například mono- a dimethyltaurin, které byly nalezeny v červených řasách.[77] Výskyt trimethyltaurinu nebo taurobetainu byl zjištěn v některých houbách a korálech.[74] Dále například asterubin, což je dimethylderivát taurocyaminu, byl nalezen ve hvězdici růžové (Asterias rubens). Mechanismy vzniku těchto derivátů v živočiších ale bohužel nejsou známy.[32]

2.5 Biologické vzorky

Odebírání a skladování vzorků

Odběr vzorků a jejich následné uchovávání je jednou ze základních věcí ovlivňující kvalitu analýzy. Jelikož je koncentrace taurinu v biologických materiálech velice nízká, bylo třeba vyvinout metody, které zabrání například kontaminaci vzorku nebo nedovolí interferenci biologické matrice.[3]

Jako kapalné vzorky je většinou používána moč, mozkomíšní mok nebo krev. Vzorky je potřeba vložit do centrifugy, aby byly odstraněny pevné částice.[59] Bylo zjištěno, že kupříkladu vzorky krve je třeba podrobit analýze ihned po odběru. Na druhou stranu, granulované vzorky či prášky lze rozpustit ve vodě a buď analyzovat ihned, nebo uchovat při teplotě 4 °C. Poté se zpracovávají podle toho, jako analytickou metodu si zvolíme.[3]

Moč

Při stanovení iontovou chromatografií se vzorek pouze naředí. Při stanovení pomocí **HPLC** je vzorek nejdříve deproteinizován bílkovinným srážedlem.[3] Pro stanovení hmotnostní spektrometrií musí být **v**zorek hydrolyzován HCl a poté přečištěn pomocí iontově výměnné chromatografie.[60] Pokud nemohou být vzorky analyzovány hned, je třeba je zmrazit při teplotě -24 °C.[61]

Mozkomíšní mok

Vzorky by měly být ihned deproteinizovány a centrifugovány. Supernatant může být poté buď zpracován, nebo uchováván při teplotě -20 nebo -80 °C. Pokud není vzorek po centrifugaci adjustován na pH 7,3 pomocí $NaHCO_3$, dojde zhruba po dvou týdnech k poklesu koncentrace taurinu v uchovávaném vzorku.[3,62]

Krev

Většina laboratoří odebírá krev do injekčních stříkaček už obsahujících nějaký antikoagulant – heparin, citronan sodný nebo EDTA s draslíkem.[63,64,65] Poté je vzorek centrifugován a rozdělen na různé části (jako je krevní sérum a plasma) pomocí odlišných podmínek centrifugace. Ihned po centrifugaci je vzorek deproteinizován a zmražen na -80 °C.[59]

Vzorky tkání

Vzorky se odebírají z jater, mozku, ledvin nebo srdce a musí být co nejdříve homogenizovány a extrahovány.[3,66,67,68,69] Extrahovaný roztok je poté deproteinizován. Roztoky na homogenizaci a extrakci obsahují borátový pufr, fosfátový pufr, cukernatý roztok nebo například acetátový pufr.[3,68,69,70,71]

Toldrá a Aristoy (odkaz) učinili pokus, ve kterém zkoumali, která extrakční kapalina bude výhodnější při extrakci taurinu z čerstvého vepřového masa a ze sušené šunky. Použili 0,03 mol/l fosfátového pufru (pH 7,4), 0,05 mol/l acetátového pufru (pH 4,5) a 0,1 mol/l HCl. Zjistili, že nejlepších výsledků dosáhli při použití 0,1 mol/l HCl.[3,30]

Vroucí voda může být použita na extrahování taurinu z masa tuňáka nebo olihně. Pro ty nejlepší výsledky je třeba velice dobře hlídat podmínky homogenizace. Optimální doba by měla být 8 minut.[3,72,73]

Deproteinizace

Odstranění bílkoviny ze vzorku je nezbytností pro přesnou detekci taurinu v subpikomolových hladinách.[62] Nejrozšířenějšími bílkovinnými srážedly jsou směsné roztoky, organická rozpouštědla (acetonitril, methanol), kyseliny (sulfosalicylová kyselina, kyselina chloristá, trichloroctová kyselina), atd. Lze užít i ultrafiltraci (fyzikální deproteinizace), ale ta není příliš rozšířenou metodou.[3]

2.6 Stanovení taurinu chromatografickými metodami

2.6.1 Kapalinová chromatografie

Před rokem 1990 probíhalo stanovení taurinu hlavně pomocí různých automatizovaných iontově-výměnných post-kolonových derivatizačních metod, většinou s využitím ninhydrinu. Jednou z takových metod byl kupříkladu analyzátor aminokyselin. Pro jeho nespecifičnost, nedostatečnou citlivost, časovou a finanční náročnost bylo třeba najít lepší metody. Nevýhodou také bylo, že derivatizační činidla bylo třeba držet pod ochranou dusíkovou atmosférou.[3,75]

Postupem času se začala využívat kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi využívající derivatizaci předem pomocí o-ftalaldehydu (OPA). Derivatizace předem jsou výhodnější, protože se nemusí přidávat k HPLC žádná jiná zařízení. Jako derivatizační činidla se u HPLC využívá OPA, 2,4-dinitrofluorbenzen (DNFB), 1-dimethylaminonaftalen-5-sulfonylchlorid (dansyl-Cl), fluoreskamin a thiamin. Fluoreskamin je snad jediné z derivatizačních činidel, které se používá pro výrobu derivátu taurinu, který lze analyzovat jak s pomocí HPLC, tak s CE. K detekci je většinou používán fluorescenční či UV nebo elektrochemický detektor.[3,75]

Stanovení taurinu pomocí HPLC lze sice provést i bez předchozí derivatizace, ale tato metoda je velice nespecifická.[3] Výjimkou je HPLC s hmotnostní detekcí.

Jelikož je taurin β-aminokyselina, dá se separovat ze vzorků pomocí extrakčního procesu, který se využívá pro běžné aminokyseliny. Kvantifikace se provádí analyzátorem aminokyselin. Vzorky je třeba hydrolyzovat v HCl po dobu 22 hodin při 110 °C, poté derivatizovat fenylisothiokyanátem a stanovit pomocí HPLC s norleucinem jakožto vnitřním standardem.[23]

Další možností je separace na koloně Capcell Pak NH_2 při 40 °C s pufrem $NH_4H_2PO_4$ – NH_3 o koncentraci 2 mM (pH 8) : methanol (4 : 1) jako mobilní fází a průtokovým rozprašovačem ICP-AES. Taurin byl detekován pomocí zón odpovídajících síře při 180,73 nm.[3]

Detekce pomocí FTIR byla použita při HPLC analýze na zjištění obsahu cukru v nealkoholických nápojích a bylo by možné pomocí ní detekovat i přítomnost taurinu.[3,76]

Tab. 1 – Shrnutí předkolonových derivatizačních metod užívaných pro taurin u HPLC [3]

	OPA	DNFB	Dansyl-Cl	DABS-Cl	Fluorescamine
Derivatization time (min)	<1	30	30	10 (70 °C)	Instantaneous
Sample preparation	Very simple	Complex	Simple	Simple	Simple
Automation of derivatization	Yes	No	No	No	Yes
Removal of reagent by drying	No	Yes	No	No	No
Quantitative yield	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Stable derivative	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Interfering side-products	No	Yes	Yes	No	No
Detection	Fluor	360 nm	Fluor	430 nm	Fluor
Sensitivity	Femtomol	Picomol	Picomol	Picomol	Picomol
Reproducibilty	Very good	Good	Good	Good	Good

Abbreviations: OPA=*o*-phthaldialdehyde; DNFB=2,4-dinitrofluorobenzene; dansyl-Cl=1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl-chloride; DABS-Cl=4-dimethylaminoazobenzene-4′-sulfonyl chloride; fluor=fluorescence.

o-ftalaldehyd (OPA)

OPA reaguje s taurinem za přítomnosti redukčního činidla, jako je např. 2-merkaptoethanol (2-ME), za vzniku isoindolového kruhu.[62] Derivát nejenže absorbuje při 260 a 340 nm, ale i fluoreskuje při 475 nm. Derivát je navíc elektroaktivní a šel by detekovat i pomocí elektrochemických detektorů. Vzorek mozku krysy byl derivatizován pomocí OPA a derivát byl vstříknut do HPLC. Byla použita velice krátká kolona (45 x 4,6 mm) a byl zvolen rychlý průtok mobilní fáze (2,7 ml/min). Teplota kolony byla nastavena na 30 °C a mobilní fáze byla složena z methanolu (10%) a tetrahydrofuranu (12%). Kolona byla naplněna velice malými částicemi (3 nebo 5 μm) a bylo dokázáno, že zvolením této zrnitosti bylo dosaženo velmi krátkého času analýzy, a to bez ztráty efektivnosti kolony. Detekce taurinu bylo provedeno elektrochemicky a celková doba analýzy a detekce byla 2 minuty.[3,67]

Fluoreskamin

Výhodou fluoreskaminu je, že derivatizace probíhá ihned za pokojové teploty v alkalickém prostředí. Deriváty jsou stabilní ve vodném roztoku, ve kterém nezreagované činidlo hydrolyzuje za vzniku látky, která nenarušuje měření.[3]

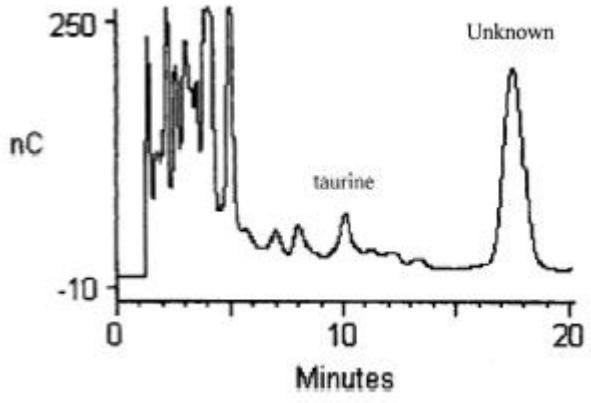
V tomto experimentu byly analyzovány vzorky plasmy býka, dojnice a kuřete. Mobilní fáze byla složena z 23% acetonitrilu v 15 mM fosfátového pufru (pH 1,9). Derivatizační reakce byla provedena za pokojové teploty s přídavkem 20 µl fosfátového pufru. Fluoreskující deriváty byly detekovány při 400 nm pro excitační spektrum a při 480 nm pro emisní spektrum.[79]

2.6.2 Iontová chromatografie

Iontová chromatografie (IC) se používá na analýzu anorganických kationtů a aniontů ve vodných roztocích. Výhodou oproti HPLC je, že taurin před ani po analýze pomocí IC nepotřebuje derivatizaci.[3]

Jako mobilní fáze byla použita směs KCl-NaOH o koncentraci 0,75 mM a pH 11,5. Pro detekci byla použita nepřímá vodivostní detekce a limit detekce pro taurin byl okolo 0,53 mg/l.[3]

Jako další pokus bylo provedeno spojení s elektrochemickou integrovanou pulzní amperometrickou detekcí. Byla použita separační kolona CarboPac PA1, která obsahuje obě iontově-výměnné funkční skupiny a má hydrofobní charakter. Kombinace aniontové výměny a hydrofobních interakcí má obrovskou sílu udržet karbohydrátové skupiny, které mají vysoké hodnoty pK_a. Taurin zde byl separován z 10 druhů běžných aminokyselin použitím 160 mM NaOH jako eluentu. Dále byl separován z lidské moči, kde byl detekční limit 0,034 µg/ml.[3]



Obr. 2 – Iontový chromatogram vzorku moči [3]

2.6.3 Plynová chromatografie

Před analýzou plynovou chromatografií je nutno taurin derivatizovat, protože se rozkládá ještě před dosažením bodu varu. Problémem jsou nestálé deriváty sulfonové skupiny taurinu. Taurin byl derivatizován pomocí N-pentafluorobenzyldi-N-butylamid.[56]

Taurin v kočičí moči byl derivatizován N-pentafluorobenzyldi-N-butylamidem a byl měřen pomocí plynové chromatografie. Jako detektor byl zvolen hmotnostní spektrometr. Bylo zjištěno, že 85 % taurinu v moči se vyskytovalo ve volné formě. Později byla metoda rozšířena i na zkoumání obsahu taurinu v lidské plasmě. Byla zjištěna koncentrace 56 ± 14 μmol/l, což odpovídá koncentracím uváděným v literatuře.[3]

2.6.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Pro nízkou sensitivitu a reprodukovatelnost je tato metoda používaná jen vzácně.[3]

2.7 Spektrální metody stanovení taurinu

Spektrofotometrie

Spektrometricky byly zkoumány vzorky připravené v laboratoři (rozpuštěním 0,2 g taurinu ve 100 ml destilované vody), energetický nápoj, balené mléko a mléko v prášku. Baňka se vzorkem vytvořeným v laboratoři byla obalená hliníkovou folií, aby nedošlo k jeho fotodegradaci. Do baňky byly dány 2 ml energetického nápoje a 4 g kationtoměničové pryskyřice. Směs byla protřepávána 15 minut, poté přefiltrována a nakonec byl filtrát naředěn destilovanou vodou. Mléko v prášku (14 g) bylo smícháno se 70 ml destilované vody a tato směs byla zahřívána 5 minut při teplotě 60 °C. Tato směs byla naředěna destilovanou vodou a promíchána. Poté byl vzorek smíchán s kyselinou chloristou, promíchán, přefiltrován a nadávkován do baňky. Do baňky byla přidána kationměničová pryskyřice, vše bylo opět promícháno, přefiltrováno a jako poslední krok bylo odstranění pryskyřice. Nejdříve byla proměřena kalibrační řada taurinu. Ke každému vzorku byl přidán Na_3PO_4 – Na_2HPO_4 pufr, roztok fenolu a chlornan sodný. Jakmile měly roztoky pokojovou teplotu, byla proměřena jejich absorbance při 630 nm. Po vytvoření kalibrace byly stejným způsobem proměřeny i vzorky.[12]

Ke stanovení taurinu v nealkoholických nápojích, mořských plodech a moči byla využita taurin dioxygenáza. Gen kódující taurin dioxygenázu byl vytvořen klonování

Escherichia coli K-12. Stanovení touto metodou je založeno na určení koncentrace sulfátu. Enzymatické stanovení bylo jednodušší, jelikož nebylo třeba látku derivatizovat. Byla by to také ekologičtější a finančně nenákladná metoda, využívající taurin dehydrogenázu nebo taurin dioxygenázu. Taurin dioxygenáza je α-ketoglutarová kyselina, která rozkládá taurin na aminoacetaldehyd a sulfát. Standardní roztoky a vzorky byly nadávkovány do 96 jamkové mikrotitrační destičky, která obsahovala 100 μl reakčního roztoku (100 mM imidazolového pufru o pH 6, 9, 2 mM α-ketoglutarátu, 2 mM $FeSO_4$ a 4 U/ml taurin dioxygenázy). Jako vzorky byly použity energetický nápoj, vroucí voda obsahující krevety a oliheň a lidská moč. Energetický nápoj byl pouze zředěn vodou. Mořské plody (5 g) byly rozmixovány a extrahovány vroucí vodou (100 ml). Extrakty mořských plodů a moč byly přefiltrovány a zředěny deionizovanou vodou. Takto připravená mikrotitrační destička byla inkubována při teplotě 30 °C a zároveň promíchávána po dobu 15 min. Na ukončení reakce bylo přidáno 20 μl 0,5 M EDTA-Na (váže přítomné Fe^{2+} ionty). Poté bylo přidáno Ellmanovo činidlo (5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) a destička byla opět inkubována a promíchávána (stejná teplota i čas). Absorbance byla měřena při 415 nm. Ze standardních roztoků byla pořízena kalibrační závislost a koncentrace taurinu ve vzorcích z ní byla dopočítána.[5]

Infračervená spektrometrie

Pomocí této metody byly zkoumány vzorky energetických nápojů. Prvně byly analyzovány pomocí HPLC a poté FTIR. Vzorky byly rozděleny do tří skupin – vzorky obsahující arginin, vzorky obsahující taurin a vzorky čisté (bez těchto dvou látek). Příprava vzorků na analýzu spočívala v tom, že bylo třeba odstranit bublinky a vzorek napipetovat do lahvičky. Detektor pracoval při 800 – 2500 nm.[15]

Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance byla použita ke stanovení taurinu ve vzorcích tkáně mozku od krys bez bakterií ve střevech (chovaných v zajetí) a od krys chycených v přírodě. Vědci chtěli dokázat souvislost mezi koncentrací taurinu v mozku a přítomností bakterií ve střevech. Vzorky byly homogenizovány ve 300 μl roztoku chloroform : voda (2 : 1), a poté došlo ke smísení vzorku s vodou a centrifugaci po dobu 10 minut. Vodná fáze byla oddělena od organické fáze a vody. Tento vodný roztok byl smíchán s 550 μl fosfátového pufru (pH 7,4), obohaceného o vnitřní standard. Vyšší koncentrace taurinu byla nalezena ve vzorcích od krys bez bakterií. Tento fakt se připisuje tomu, že bakterie ve střevech taurin nerozkládají, a proto je ho v krysách víc.[9]

Hmotnostní spektrometrie

Pro tento experiment byla využita myší játra, která byla ihned po vyjmutí zamražena tekutým dusíkem a byla uložena při teplotě -80 °C. Cílem tohoto experimentu bylo detekovat a identifikovat konjugáty taurinu a žlučových kyselin v játrech myši. Příprava vzorků byla provedena nařezáním jater na mikrotomy, vložením těchto mikrotomů na mikroskopické sklíčko a vysušením ve vakuovém exsikátoru. Poté byly vzorky opět uchovány při -80 °C až do analýzy. Jako MALDI matrix byl vybrán 9-aminoakridin, který byl vybrán kvůli jeho schopnosti ionizovat sloučeniny kyselé povahy na negativně nabité sloučeniny, včetně žlučových kyselin. MALDI zobrazování, MALDI a ESI byly prováděny v negativním iontovém módu. Data byla sbírána v rozmezí m/z od 50 do 2000. Mezi výsledky získanými z měření byl ve vzorku zjištěn obsah taurocholové kyseliny, tauromuricholové kyseliny, taurochenodeoxycholové kyseliny, tautotetrahydrocholové kyseliny, konjugát taurinu se žlučovými kyselinami.[19]

2.8 Elektrochemické metody stanovení taurinu

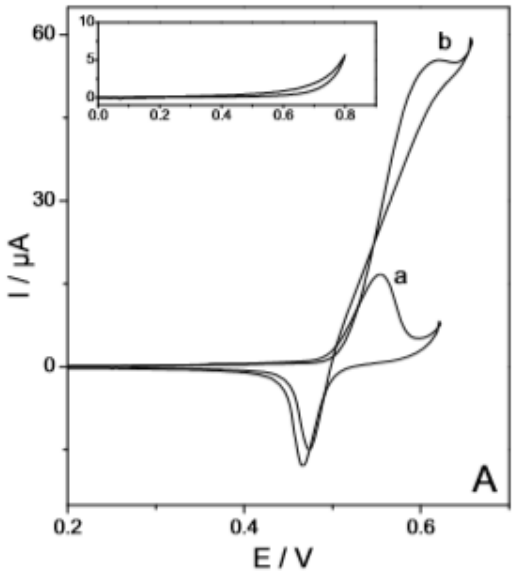
Elektrochemické stanovení taurinu je založeno na jeho přímé oxidaci na povrchu elektrody. K této reakci je potřeba vložit na tuto elektrodu vysoké napětí, což zapříčiňuje i vznik dalších produktů, které ničí její povrch. Nevýhodou u běžně užívaných elektrochemických detektorů byla nízká životnost elektrod. To by ale mohly vyřešit povrchy obsahující uhlíkové nanostruktury, jako jsou grafenová nanovlákna nebo (a ty především) uhlíkové nanotrubičky.[4]

Tištěná uhlíková elektroda obsahující komplex Ni^{2+}

Nikl působí elektrokatalyticky na oxidaci organických sloučenin obsahujících hydroxylovou skupinu a na sirnaté deriváty – tedy i na taurin. Toho bylo využito při stanovení taurinu v slzách a slinách pomocí HPLC. Detekce byla provedena elektrochemicky s tištěnou uhlíkovou elektrodou. Tato tištěná uhlíková elektroda obsahovala jednu řadu uhlíkových nanotrubiček, na kterou byl nanesen elektropolymerní film vyrobený z Schiffovy báze vzniklé reakcí Ni^{2+} s ligandem N,N´-bis(2,4-dihydroxybenziliden)-1,2-diaminobenzenem.[4]

Při voltametrickém měření, kdy do roztoku nebyl přidán žádný biomarker, proběhla voltametrická křivka dle obrázku 3 (křivka a), což odpovídá redoxní reakci Ni^{2+}/Ni^{3+}. Po přidání taurinu byl zaznamenán nárůst anodického proudu současně s poklesem

katodického proudu (křivka b). Toto chování je typické pro elektrokatalytické efekty a dokazuje se tím, že redoxní centra zabudovaná ve filmu elektrody se podílejí na oxidaci taurinu, což způsobuje pokles počtu Ni^{3+} center a snížení katodického proudu na pozadí.[4]



Obr. 3 – Cyklický voltamogram Ni^{II}(2,4DHS)/SWCNTSPE v 0,1 M NaOH za nepřítomnosti (křivka a) a za přítomnosti (křivka b) 5 mM taurinu [4]

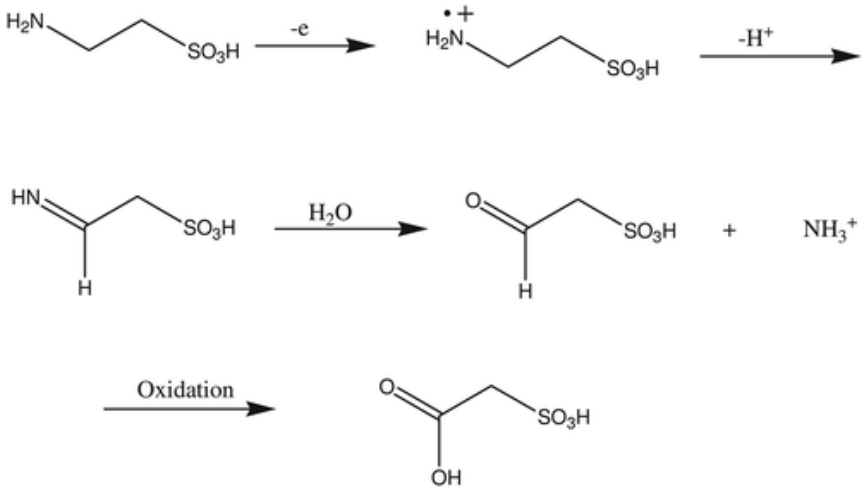
Vzorky byly zředěny vodným roztokem NaOH, poté byly vstříknuty do HPLC a analyzovány. Mobilní fáze obsahovala 0,1 M NaOH a 3% acentonitril, rychlost toku byla 0,75 ml/min. Nejnižší koncentrace taurinu, kterou bylo možno zachytit, byla 0,97 μmol/l.[4]

Elektroda ze skelného uhlíku s grafenovými kvantovými tečkami

Taurin byl také stanoven pomocí elektrody ze skelného uhlíku pokryté biokompatibilním nanokompozitem z asparagové kyseliny a grafenových kvantových teček. Tuto elektrodu je možné používat ve spojení s cyklickou voltametrií, chronoamperometrií a diferenční pulzní voltametrií. Po optimalizaci je mez kvantifikace pro taurin 0,001 mmol/l. Pro tuto metodu není třeba vzorek předem nijak složitě připravovat ani derivatizovat. Kvantové tečky jsou dobrým materiálem pro jeho nízkou toxicitu, jednoduchou přípravu, vysokou chemickou stabilitu, přátelskost k životnímu prostředí, schopnost přenášet elektrony, a výbornou fotostabilitu.[7]

K vytvoření tenké vrstvy filmu na povrchu elektrody bylo užito cyklické voltametrie. Na elektrodu byla nanesena vrstva ponořením do roztoku obsahujícího 0,1 M NaOH

a 0,9 mM kyseliny asparagové o pH 5,8. Elektropolymerizace byla prováděna v rozmezí napětí -1,5 až +2 V. Na nanesení vrstvy bylo třeba 5 cyklů. Po ukončení byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou, aby byly odstraněny případné naadsorbované materiály. Poté byla elektroda vložena do elektrochemické cely.[7]

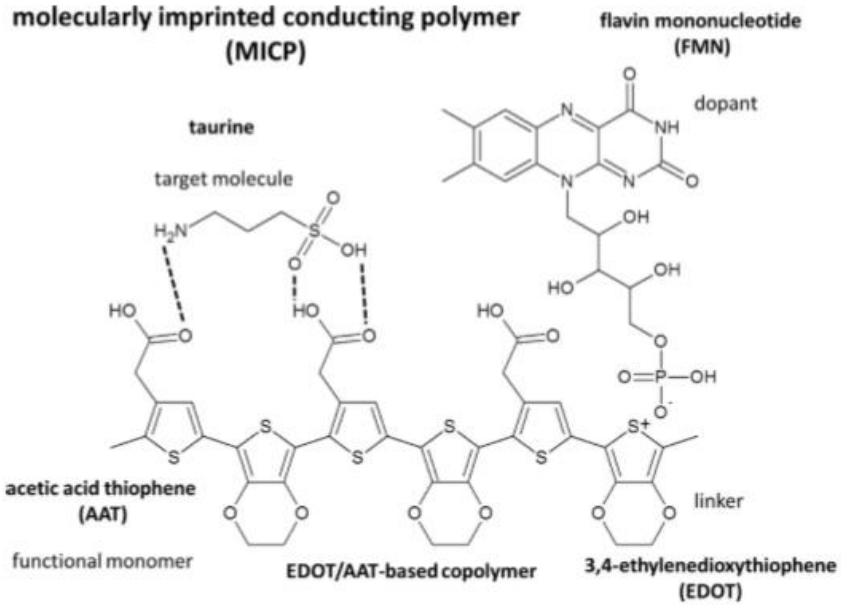


Rov. 1 – Schéma možné oxidace taurinu na povrchu elektrody

Na stanovení taurinu byla použita diferenční pulzní voltametrie, protože je schopná stanovit taurin při nižších koncentracích než cyklická voltametrie. Jako elektrolyt byl zvolený 0,1 M roztok NaOH. LOQ pro taurin zde byl 0,0011 mM. Při měření bylo vloženo napětí 0,005 V (Ag/AgCl), amplitudová modulace byla 0,025 V (Ag/AgCl), modulační čas 0,05 s a skenovací rychlost 0,01 V/s.[7]

Potenciometrické čidlo taurinu

Molekulární imprinting je proces, kde jsou monomery vkládány do polymerní „šablony“, čímž se tento komplex stává selektivní.[10] Polymerní komplex (MIP – molecular imprinting polymer) je tedy složen ze základní sloučeniny a z jedné nebo více funkčních monomerů s kovalentními popř. nekovalentními interakcemi.[57] Šablona je poté chemicky odstraněna a v komplexu po ní zůstanou místa, která přesně odpovídají tvaru, velikosti a orientaci funkční skupiny, v našem případě taurinu.[10]



Obr. 4 – Předpokládaná struktura MICP filmu s vazbou na taurin.[10]

Elektrochemická depozice EDOT/AAT filmu byla provedena ve 3-elektrodové elektrochemické cele. Jako pracovní elektrody mohou být použity buď skleněná uhlíková disková elektroda, nebo platinová listová elektroda, které se pokryjí kopolymerovým filmem. Pomocnou elektrodou může být platinový drátek a jako referenční elektroda může vystupovat dvojitá AgCl elektroda. Můstek může být naplněn SSA (2-hydroxy-5-sulfobenzoová kyselina).[10]

Obě pracovní elektrody je třeba připravit (vyčištění, odmaštění) na nanesení polymerního filmu. GC elektrodu je třeba práškovým oxidem hlinitým, a poté postupně ponořit do HNO_3, vody, roztoku KOH/ethanol, vody a na konec do methanolu. Platinová elektroda se jen povaří s koncentrovanou HNO_3 a opláchne vodou.[10]

Takto připravené elektrody se už mohou potáhnout vrstvou kopolymerního filmu tak, že se ponoří do roztoku obsahujícího 0,01 mol/dm^3 EDOT (3,4-etylendioxythiofen), 0,1 mol/dm^3 AAT (3-thiofenoctová kyselina), 0,1 mol/dm^3 FMN (flavin mononukleotid) a 0,5 mol/dm^3 taurin. V tomto roztoku se mění napětí od 0 mV do 1100 mV s rychlostí skenování 50 mV/s. Po ukončení se elektroda opláchne vodou a její kvalita se zkoumá pomocí elektronové mikroskopie.[10]

Nakonec je třeba zbavit vrstvu taurinu. Extrakční proces je sice možné provést několika způsoby, ale nejlepší výsledky byly dosaženy s roztokem methanol : voda (2 : 5).[10]

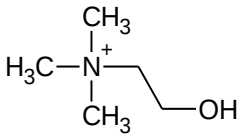
Takto upravené elektrody byly použity na potenciometrické měření modelových vzorků taurinu o koncentracích mezi 10^{-5} – 10^{-1} mol/dm^3.[10]

2.9 Elektroseparační metody stanovení taurinu

2.9.1 Stanovení taurinu kapilární zónovou elektroforézou

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je velmi rozšířená metoda na analýzu taurinu. Oproti HPLC má několik výhod – velmi malou spotřebu organického rozpouštědla v pufru, krátký čas separace a vysokou separační účinnost.[3,80]

Pomocí CZE byl v 8 energetických nápojích, 2 čerstvých mlécích různých značek, 4 práškových doplňcích stravy pro kojence a v 5 probiotických vzorcích zelené rýže stanovován taurin a cholin. Pevné vzorky byly jemně rozemlety a od každého bylo naváženo 0,25 – 1,00 g. Ke každé navážce bylo přidáno 10 ml deionizované vody, a poté byla směs vložena do ultrazvuku. Po 30 minutách byl vzorek přefiltrován přes teflonový membránový filtr a případně byl pak ještě zředěn deionizovanou vodou. U tekutých vzorků byla provedena pouze filtrace přes již zmíněný membránový filtr a bylo provedeno zředění. Takto připravené vzorky byly co nejdříve použity k analýze, aby nedošlo k modifikaci látek v nich obsažených. Analýza byla provedena za použití dvoukanálového zapojení kapilární elektroforézy (analýza pomocí dvou kapilár současně). Na stanovení taurinu bylo použito napětí 10 kV. Délka použité kapiláry byla 60 cm, její průměr byl 50 μm a efektivní délka činila 49 cm. Jako elektrolyt byla použita směs 150 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS) s kyselinou mléčnou o pH 8,96. Ke stanovení cholinu bylo použito téměř stejných podmínek jako u taurinu, jen místo kyselina mléčné byla užita kyselina octová. Cholin byl nabit kladně. Detekce byla prováděna bezkontaktním konduktometrickým detektorem.[1]



Obr. 5 – N,N,N-trimethylethanolamoniový kation (cholin) [1]

Taurin byl pomocí CZE stanoven v lidské srdeční tkáni, která byla homogenizována pomocí fosfátového pufru o pH 7,5 a pak deproteinizována kyselinou chloristou. Supernatant byl neutralizován roztokem fosforečnanu sodného a poté byl derivatizován po dobu 20 minut

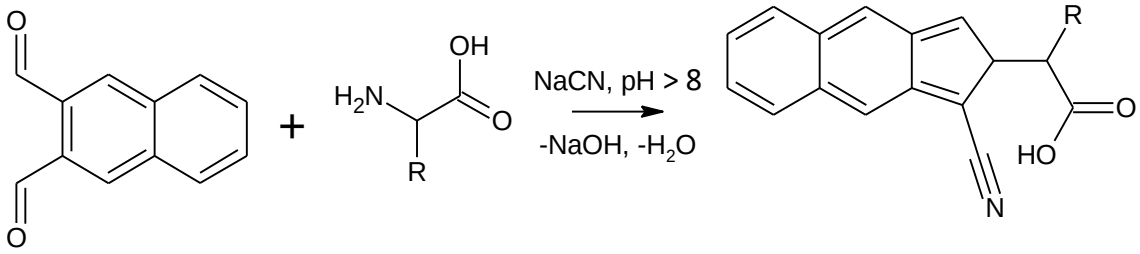
při pokojové teplotě 9-fluorenylmethylchlorformátem (FMOC). Derivát byl separován z 3-amino -1-propansulfonové kyseliny (jakožto vnitřního standardu) a glutathionu použitím 0,05 mol/l fosforečnanu sodného (pH 2,5) jakožto pufru. Jako detektor zde byl použit fluorescenční spektrometr.[69]

Bylo také analyzováno 6 aminokyselinových transmiterů (včetně taurinu) odebraných z ganglionu krysy. Homogenizované vzorky byly okyseleny koncentrovanou kyselinou chloristou, a poté centrifugovány. Supernatant byl derivatizován fluoresceinisothiokyanátem (FITC) při 40 °C po dobu 6 hodin. Derivát byl separován na křemenné náplňové kapiláře při napětí 12,5 kV s 15 mM borátovým pufrem (pH 9,2). K detekci byl použit LIF detektor. Detekční limit se pohyboval mezi 1,2 – 17,2 nmol/l pro zmíněných 6 aminokyselin.[81]

Jako derivatizační činidlo byl ve spojení s kapilární elektroforézou využit i 5-furoylchinolin-3-karboxaldehyd (FQ). Derivatizováno bylo 5 neurotransmiterů získaných z uměle připraveného mozkomíšního moku (včetně taurinu). Derivatizace probíhala po dobu téměř 1 hodiny při teplotě 65 °C a vznikly fluoreskující deriváty. Detekční limity pro tyto neurotransmitery byly 10^{-9} – 10^{-8} M, což odpovídá 0,3 – 7 amol vstříknutých do kapiláry.[82]

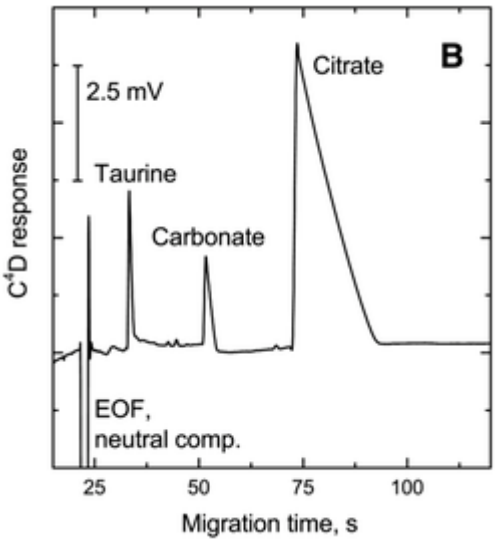
Derivatizace taurinu byla prováděna i s naftalen-2,3-dikarboxaldehydem. Tento produkt byl poté separován na prázdné křemenné kapiláře. Ačkoliv jsou tyto deriváty stabilní, nevýhodou je, že reakce vyžaduje přídavek kyanidu, který je toxický. Přítomnost taurinu byla poté prokázána buď pomocí HPLC, NMR, CE, nebo MS.[3,83]

Vědci z Masarykovy univerzity se pokoušeli stanovit taurin pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí indukovanou ligt-emitting-diode. Kapilára použitá na měření měla celkovou délku 66 cm a efektivní délka byla 45 cm, Vzorek byl nejdříve deproteinizován pomocí acetonitrilu, promíchán a supernatant byl poté derivatizován. Derivatizační reakce byla provedena v jantarové trubičce, aby bylo zamezeno přístupu světla. 5 µl desetkrát koncentrovanějšího deproteinizovaného vzorku bylo smícháno s 15 µl 8,33 mM NaCN a 25 µl reakčního pufru (200 mM H_3BO_3/NaOH pH 9,0) a vnitřním standardem (L-norvalin). Reakce byla započatá přidáním naftalen-2,3-dikarboxaldehydu rozpuštěného v acetonitrilu. Reakce trvala 45 minut při teplotě 25 °C a poté byla ukončena zmrazením látky na -70 °C. Na stanovení byl použit fluorescenční detektor.[8]



Rov. 2 – Rovnice derivatizace aminokyseliny pomocí NDA za přítomnosti NaCN [8]

Byl také učiněn pokus, kdy byl taurin separován pomocí základního elektrolytu složeného z 20 mM CHES (n-cyklohexyl-2-aminoethansulfonová kyselina) a 10 mM NaOH, pH této směsi bylo 9,5. Při tomto pH je protonace aminoskupiny potlačovaná a taurin migruje jako anion proti směru elektroosmotického toku, což zpomaluje migraci anionu do detektoru. Vzorky byly vloženy do ultrazvuku na 10 minut, aby byl odstraněn plyn, který obsahovaly, a vzorek s taurinem byl 40 x naředěn deionizovanou vodou. Měření bylo provedeno za konstantního toku vstupního roztoku složeného z 50 mM kyseliny octové + 20 mM Tris o pH 4,5 (150 µl/min) a za konstantního toku roztoku vzorku (10 µl/min). Vzorek byl vpraven do separační kapiláry pod vakuovým pulsem - 50 kPa. Separační kapilára měla délku 16, 5 cm a délka k detektoru byla 11,5 cm. Tok vstupního roztoku byl pozastaven na 5 s a vzorek byl vstřikován po dobu 0,5 s. Separace probíhala při napětí +10 kV a proudu 6 µA. Taurin byl detekován bezkontaktním vodivostním detektorem mimo zónu elektroneutrálních částic, a to ve 32 s.[6]



Obr. 6. – Elektroforegram energetického nápoje [6]

Při analýze taurinu v lidské plasmě bylo třeba vzorek derivatizovat a to pomocí fluoreskaminu. Separace je založená na rozdílné ionizaci taurinu a ostatních aminokyselin. Taurin se totiž chová spíše jako sulfonová kyselina než jako karboxylová kyselina. Jako vnitřní standard byl použit homotaurin, který vykazoval lepší výsledky než dříve používaná aminomethanová sulfonová kyselina. K plasmě byl tedy přidán homotaurin, bílkovinné srážedlo (acetonitril) a supernatant byl derivatizován fluoreskaminem za přítomnosti borátového pufru. Separace byla prováděna s módem obrácené polarity při 27,5 kV a rozměry náplňové křemenné kapiláry byly 52 cm x 75 μm. Jako detektor byl použit spektrometr s diodovým polem a taurin zde byl detekován při 266 nm.[80]

Jako další bylo pomocí této metody analyzováno 9 hlavních složek čistícího mléka – pyridoxinhydrochlorid, neostigminmethylsulfát, chlorfeniraminmalát, alantoin, nafazolinhydrochlorid, glycyrrhizinová kyselina, chondroitinsulfát, taurin a kyanokobalamin). Jako vnitřní standard byla použita 2-propenová kyselina. Vzorky byly separovány na náplňové křemenné kapiláře s napětím 25 kV s 20 mM borátovým pufrem (pH 10) jako running buffer. Detekce probíhala při 200 nm.[3,84]

Metoda „Flow-gated“ CE je hybridem mezi klasickou a mikročipovou kapilární elektroforézou. V tomto postupu se používá pro dávkování systém flow-gate (z polykarbonátu), který je využíván hlavně pro mikročipovou CE. Tato hybridní metoda je velice flexibilní a dá se propojit např. s procesy před analýzou, jako mikrodialýza, derivatizace, pročištění nebo obohacování vzorku pomocí extrakce tuhou fází. Při spojení s mikročipovou CE má tento postup mnoho výhod – vysoká efektivnost separace, nízké náklady na kapiláry, spojení s různými detektory a užití čerstvě připraveného separačního pufru. In vivo využití je známo málo, při užití in vitro se stanovují většinou odebrané vzorky buněk nebo tkání.[22,37]

Touto metodou byl ve vzorku krysího mozku stanovován kromě taurinu i např. glycin, aspartát, serin, glutamin atd. Na analýzu byla použita kapilára o malém průměru (10 μm), vyšší sila elektrického pole (2 kV/cm) a kyveta použitelná na detekci pomocí LIF. Díky těmto podmínkám a derivatizaci pomocí OPA bylo dosaženo vysoké separační efektivnosti, velmi rychlé separace (20 s) a vysoké citlivosti detekce.[22]

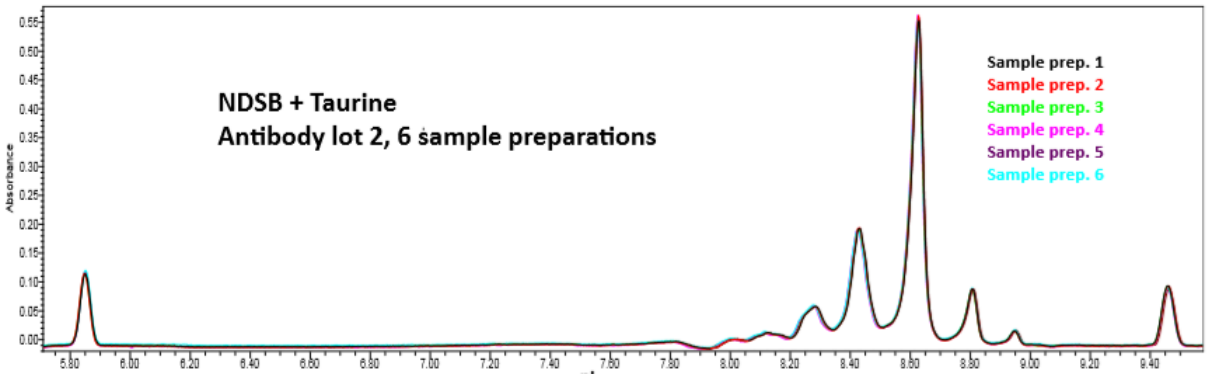
V dalším experimentu byly podrobeny analýze vzorky biomarkerů aminokyselin z tříselní tukové tkáně myší. Zde byla sonda na mikrodialýzu implantována do tukové tkáně a získaný dialyzát byl poté derivatizován 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadizolem (NDB-F).

Derivát byl pak vstříknut do polykarbonátového flow-gate systému a sloučenina byla separována. Na stanovení taurinu a dalších látek stačil jediný elektroforegram. Měření na in vitro vzorků se provádí většinou s tkáněmi a buňkami kultivovanými v laboratoři. U těchto vzorků se metoda obvykle pojí s mikrodialýzou na monitorování např. neurochemického uvolnění Astrocytů. Mikrodialýza se zde provádí tak, že buňky rostou v jedné řadě na sondě, u které jsou po stranách kapiláry (side-by-side) ve vzdálenosti 200 µm od dialyzačního vlákna. Takto upravené vzorky jsou poté derivatizovány NDB-F a separovány po dobu 20 s.[22,39,40]

2.9.2 Izoelektrické fokusování

Pomocí této techniky se zkoumá isoelektrický bod proteinů a dá se tak také zjistit relativní kvantifikace a stanovení druhů bílkovinného náboje.[13]

Byly smíchány reagenty – 0,35% methylcelulosa, 4% Pharmalyte, 0,5 M NDSB, 10 mM taurinu, 0,5% pI marker 5,85, 0,5% pI marker 9,46. Jako poslední byla přidána bílkovinná protilátka, která byla rozpuštěná v deionizované vodě. Celá směs byla pečlivě promíchána, 160 µl vzorku bylo napipetováno do 300 µl lahvičky. NDSB obsahuje velkou hydrofilní část, sulfobetain a také malou hydrofobní část. Hraje klíčovou roli při stabilizaci náboje protilátky a zlepšuje separaci (lepší rozlišení peaků). Tato lahvička byla vložena do přístroje a byla provedena analýza. Pokus byl proveden při teplotě 10 °C a napětí 3000 V. Pokus zabral 8 minut a látka byla detekována na 280 nm. Na obrázku 7 jde vidět, že isoelektrický bod pro sloučeninu s taurinem vyšel okolo 8,8.[13]



Obr. 7 – Elektroforegram směsi bílkovinné protilátky, NDSB a taurinu [13]

2.9.3 Izotachoforetické stanovení taurinu

Izotachoforeticky byl taurin stanovován v krevním séru a tkáních z usmrcených krys. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C a byly homogenizovány v centrifuze ve vodě s přídavkem 2% sulfosalicylové kyseliny. Supernatant byl odebrán a vstříknut do kolony obsahující 10 ml Diaion SK-1. Tato kolona byla propláchnuta deionizovanou vodou. Získaný naředěný supernatant získaný z průplachu kolony byl nadávkován do kolony Diaion SA-100, kolona byla opět propláchnuta a látka byla eluována 2 M kyselinou octovou. Eluát byl analyzován pomocí izotachoforézy.[28]

Jako izotachoforetický analyzátor byl zvolen přístroj Shimadzu IP-1B. Rozměr kapilár byl 20 cm x 0,5 mm, migrační proud byl nastaven na hodnotu 75 μA a experiment byl proveden za teploty 20 °C. Detekční cela měla rozměry 0,5 mm x 0,05 mm. Složení vedoucího elektrolytu bylo 10 mM HCl s amediolem o pH 6,5. Koncový elektrolyt vznikl smísením 10 mM kyseliny γ-aminomáselné a $Ba(OH)_2$ a pH tohoto elektrolytu bylo 10,9.[28]

Detekovat taurin bylo po částečné separaci nakonec možné v obou typech tkání. Křivka závislosti délky zóny taurinu na koncentraci taurinu byla lineární a dobře reprodukovatelná v rozmezí 5 – 30 nanomolů.[28]

Koncentrace taurinu v srdci byla 32,7 μmol/120g váhy zvířete, v játrech 9,6 μmol/120g váhy zvířete, v krevním séru 0,89 μmol/120g váhy zvířete ve svalech 16,3 μmol/120g váhy zvířete. Při porovnání výsledků získaných izotachoforézou s výsledky získanými analyzátoru aminokyselin se dá tvrdit, že hodnoty jsou velmi blízké. Izotachoforéza je tedy vhodnou metodou na stanovování taurinu v různých typech tkání a dává správné a dobře reprodukovatelné výsledky.[28]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých chemikálií

Název	Výrobce
β-alanin	Serva
Kyselina chlorovodíková (32%)	Fluka
Kyselina octová (99%)	Penta
Dusitan sodný	Lachema
Taurin	Sigma-Aldrich
Hydroxyethylcelulóza 4000	Serva
Octan sodný	Lachema
Isethionová kyselina	Sigma-Aldrich
Sodná sůl vinylsulfonové kyseliny (25%)	Sigma-Aldrich
Histidin hydrochlorid	Merck
Histidin	Serva

3.2 Příprava roztoků

K přípravě roztoků byla použita demineralizovaná voda z laboratorního rozvodu a běžné laboratorní odměrné nádobí. K odměřování menších objemů roztoků byly použity miropipety Biohit různých jmenovitých objemů.

Příprava 0,03 M zásobního roztoku taurinu

Do odměrné baňky (V = 100 ml) bylo naváženo 0,3755 g taurinu. Baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Roztok taurinu byl využit při stanovování taurinu v reálných vzorcích pomocí standardního přídavku.

Příprava 1 M roztoku $NaNO_2$

Do odměrné baňky (V = 250 ml) bylo naváženo 17,25 g $NaNO_2$ a baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Tento roztok byl použit při derivatizaci taurinu.

Příprava 1 M kyseliny octové

Do odměrné baňky (V = 500 ml) bylo odměřeno 30 ml koncentrované kyseliny octové. Baňka byla poté doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok kyseliny octové byl použit při konverzi na hydroxylovou kyselinu.

Příprava roztoku 0,001 M isethionové kyseliny

Do odměrné baňky (V = 100 ml) bylo naváženo 0,1342 g isethionové kyseliny a baňka byla naplněna po rysku demineralizovanou vodou. Z této směsi bylo odebráno 5 ml do odměrné baňky (V = 50 ml) a baňka byla opět doplněna demineralizovanou vodou. Roztok byl použitý při identifikaci hydroxykyseliny vzniklé po konverzi.

Příprava 0,0238 M isethionové kyseliny

Do odměrné baňky (V = 50 ml) bylo naváženo 0,1763 g isethionové kyseliny, baňka byla poté doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Tento roztok byl použit při zjištění procentuální účinnosti konverze.

Příprava 0,001 M roztoku sodné soli vinylsulfonové kyseliny

Do odměrné baňky (V = 100 ml) bylo napipetováno 40 μl roztoku sodné soli vinylsulfonové kyseliny a baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Roztok byl použitý při identifikaci hydroxykyseliny vzniklé po derivatizaci.

3.3 Elektrolyty pro ITP analýzu

Vedoucí elektrolyt I: 10 mM HCl + β-alanin (pH 3,6)

Do baňky (V = 100 ml) byl odměřen 1 ml 1 M HCl, přilito několik desítek mililitrů demineralizované vody a přidáno 0,18 g β-alaninu. Směs byla promíchána a po rozpuštění krystalů byla baňka doplněna po rysku demineralizovanou vodou. K roztoku byl pak postupně přidáván pevný β-alanin k dosažení pH 3,6.

Vedoucí elektrolyt II: 10 mM HCl + β-alanin (pH 3,6) + 0,1% HEC

Do baňky (V = 100 ml) bylo napipetováno 1 ml 1 M HCl a k ní bylo přidáno 0,18 g β-alaninu. Směs byla promíchána a po rozpuštění krystalů byla baňka doplněna po rysku

demineralizovanou vodou. K roztoku byl přidán β-alanin k dosažení pH 3,6. Pak byla přidána hydroxyethylcelulóza (0,1 %) a roztok byl několik hodin míchán až do jejího rozpuštění.

Vedoucí elektrolyt III: 10 mM histidin hydrochlorid + histidin (pH 5,5 a 6)

Do odměrné baňky bylo naváženo 0,1913 g histidin hydrochloridu a baňka byla doplněna po rysku vodou. Postupně bylo pH tohoto roztoku upraveno na 5,5 a 6,0.

Koncový elektrolyt

Jako koncový elektrolyt byl používán 10 mM octan sodný. Navážka 0,136 g krystalického octanu sodného byla rozpuštěna v odměrné baňce (V = 100 ml) a doplněna po rysku demineralizovanou vodou.

3.4 Přístroje a zařízení

Electrophoretic analyser EA 102, Villa Labeco Spišská Nové Ves (Slovensko)
Elektrický vařič integrovaný s magnetickou míchačkou, SA (Kanada)
Analytické váhy ABT120-4M, Kern (Německo)
Laboratorní pH-metr HI-4221, Hanna (Německo)
Ultrazvuková lázeň K-2, Kraintek Podhájska (Slovensko)

Electrophoretic analyser EA 102

Izotachoforetický analyzátor EA 102 je dvoukolonový přístroj, který se využívá se na izotachoforetické analýzy kapalných roztoků. Dávkování je realizováno přes 30 µl dávkovací kohout. Separace probíhá ve dvou teflonových kolonách – předseparační o objemu přibližně 100 µl a analytické o objemu přibližně 10 µl. Detekce je vodivostní kontaktní. Přístroj je ovládán pomocí softwaru ITPPro32, který umožňuje naprogramovat průběh analýzy, zaznamenává signál z detektorů a umožňuje jeho vyhodnocení.

Podmínky analýzy: proud v předseparační koloně byl 300 µA, v analytické koloně 50 µA, analýza byla provedena v anionickém módu a trvala 22 až 25 minut.

3.5 Stanovení taurinu v modelových směsích

Modelové směsi byly nejprve použity k tomu, aby mohla být identifikována zóna hydroxykyseliny vznikající z taurinu. Pomocí modelových směsí byly také optimalizovány některé přístrojové parametry, především časování jednotlivých kroků.

Slepý pokus

Do odměrné baňky bylo napipetováno 5 ml 1 M CH_3COOH a 5 ml 1 M $NaNO_2$. Směs byla promíchána a poté byl roztok zředěn. Do baňky (V = 50 ml) bylo nadávkováno 2,5 ml směsi a baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Takto 20x zředěná směs byla nadávkována do přístroje a analyzována.

Příprava taurinu k analýze

Do odměrné baňky bylo napipetováno 5 ml 1 M CH_3COOH a 5 ml 1 M $NaNO_2$. K směsi bylo poté přidáno 0,114 g taurinu. Po doplnění po rysku bylo do baňky přidáno magnetické míchadlo. Pak byla baňka vložena do vroucí vodní lázně. Roztok byl zahříván a promícháván po dobu 10 minut. Poté byl ochlazen a bylo z něj odpipetováno do baňky (V = 50 ml) 2,5 ml roztoku a baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Takto 20x zředěná směs byla dávkována do přístroje a analyzována.

3.6 Reálné vzorky

Vzorky 1 až 4 jsou energetické nápoje určené k doplnění energie při větší zátěži. Vzorek 5 je gel obdobného účelu.

Vzorek 1 – Maximal G

Výrobce: Buszezs Zrt

Země původu: Maďarsko

Obsah taurinu: 1,017 g/250 ml

Vzorek 2 – QXE

Výrobce: Van Pur

Země původu: Polsko

Obsah taurinu: 1,040 g/250 ml

Vzorek 3 – Tiger

Výrobce: neuveden

Země původu: neuvedena

Obsah taurinu: 1,017 g/250 ml

Vzorek 4 – Crazywolf – Watermelon

Výrobce: neuveden

Země původu: Polsko

Obsah taurinu: 1,051 g/250 ml

Vzorek č. 5 – Carbosnack – Meruňka

Výrobce: NUTREND d.s.

Země původu: Česká republika

Obsah taurinu: 500 mg/55 g

Příprava reálných vzorků k analýze

Ze vzorků 1 až 4 bylo do odměrné baňky (V = 50 ml) odpipetováno 25 ml vzorku, k nim bylo přidáno 5 ml 1 M CH_3COOH, 5 ml 1 M $NaNO_2$ a nakonec byla baňka doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Směs byla na několik minut vložena do ultrazvukové lázně kvůli snížení obsahu plynů. Následně byla směs zahřívána na vroucí vodní lázni a současně míchána po dobu 10 minut, pak ochlazena a poté bylo odpipetováno 2,5 ml směsi do odměrné baňky (V = 50 ml). Takto naředěná směs byla analyzována. Ze vzorku 5 bylo odebráno 10 g gelu, které byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky (V = 50 ml). Dále bylo postupováno jako u vzorků 1 až 4.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí izotachoforézy lze analyzovat jenom látky elektricky nabité – anionty a kationty. Aminokyseliny se ale nejčastěji vyskytují v podobě amfiontu, což je forma, která obsahuje jak kladný, tak záporný náboj, celkový náboj je tedy prakticky nulový.

Aby bylo možné taurin analyzovat, bylo třeba jej derivatizovat. Zvolena byla derivatizace kyselinou dusitou, kdy dochází nejdříve ke vzniku diazoniových solí, které se následně rozkládají za vzniku hydroxykyselin, které lze izotachoforeticky stanovit.[29] Derivatizací taurinu vzniká 2-hydroxyethansulfonová (isethionová) kyselina, jejíž sulfoskupina nese i v silně kyselé oblasti záporný náboj.

4.1 Převedení taurinu na hydroxykyselinu

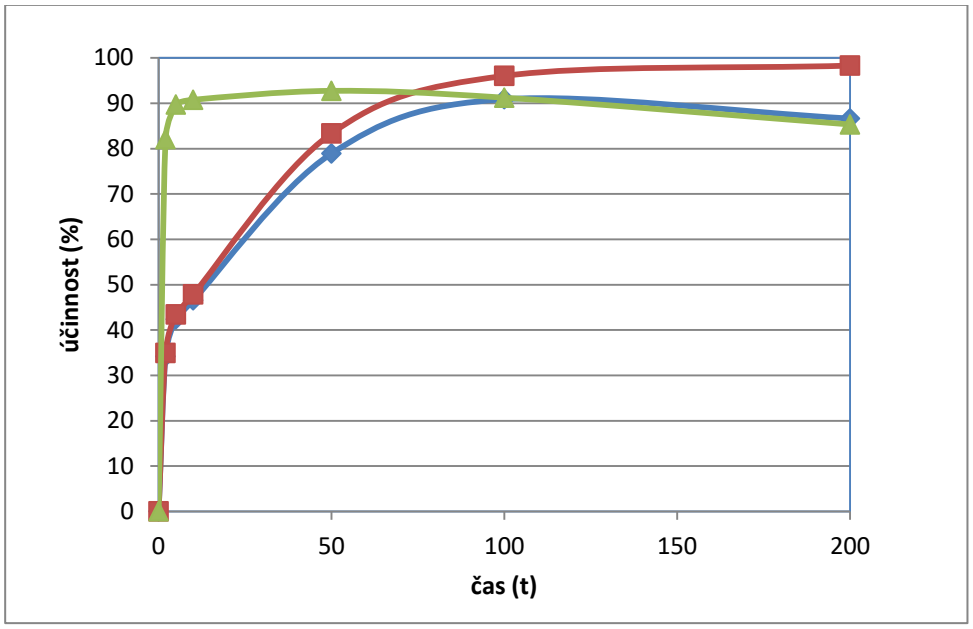
Abychom potvrdili, že nalezená látka je skutečně isethionová kyselina, byl za stejných podmínek proměřen roztok této látky. Jelikož poloha zón byla totožná, byla látka určena správně. Kromě zón této sloučeniny byly ale na izotachoforegramu nalezeny ještě dvě velmi krátké zóny produktů vzniklých z taurinu, které byly rychlejší než isethionová kyselina. Jedna z těchto látek je vinylsulfonová kyselina, druhou se nepodařilo identifikovat. Při tvoření kalibrační přímky bylo srovnáváno, zda je na výpočet koncentrace taurinu nejlepší použít jenom hlavní zónu, nebo jestli vychází vyšší procenta výtěžnosti při sečtení všech tří zón (včetně dvou rychlejších zón). Jako nejpřesnější se ukázalo použít do výpočtu sumu všech tří zón. Při porovnání délek zón použitých k výpočtu zaujímala hlavní zóna asi 87% délky a dvě vedlejší zóny 13 %.

Vliv teploty, způsobu míchání a doby průběhu reakce

Existuje spousta proměnných, které ovlivňují konverzi. Jsou to např. teplota, míchání, trvání reakce reakce, pH roztoku a koncentrace reagujících komponent. Bylo třeba zjistit, jaké jsou optimální podmínky pro stanovení taurinu. Byl upravován čas reakce, způsob míchání a teplota.

Do baňky (V = 50 ml) bylo nadávkováno 5 ml 1 M kyseliny octové, 5 ml 1 M dusitanu sodného a 0,144 g taurinu. Baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou a reakce byla prováděna třemi různými způsoby: v ultrazvuku, za mechanického míchání za laboratorní teploty a za mechanického míchání na vroucí vodní lázni. Po 2, 5, 10, 20, 50,

100 a 200 minutách od počátku reakce bylo z baněk odpipetováno 2,5 ml roztoku do odměrné baňky (V = 50 ml). Tato baňka byla pak doplněna po rysku demineralizovanou vodou a z takto 20x zředěného vzorku byla část odebrána na analýzu. Na analýzu byl použit elektrolyt I. Délky zón byly porovnány s délkou zóny isethionové kyseliny o koncentraci stejné, jakou měl roztok taurinu.



Graf 1 – Závislost účinnosti konverze taurinu na isethionovou kyselinu na čase. Složení směsi: 0,02 mM taurin, 0,1 mM kyselina octová a 0,1 mM dusitan sodný, V=50 ml, ♦ - ultrazvuk, ■ – míchání, ▲ – míchání + teplota.

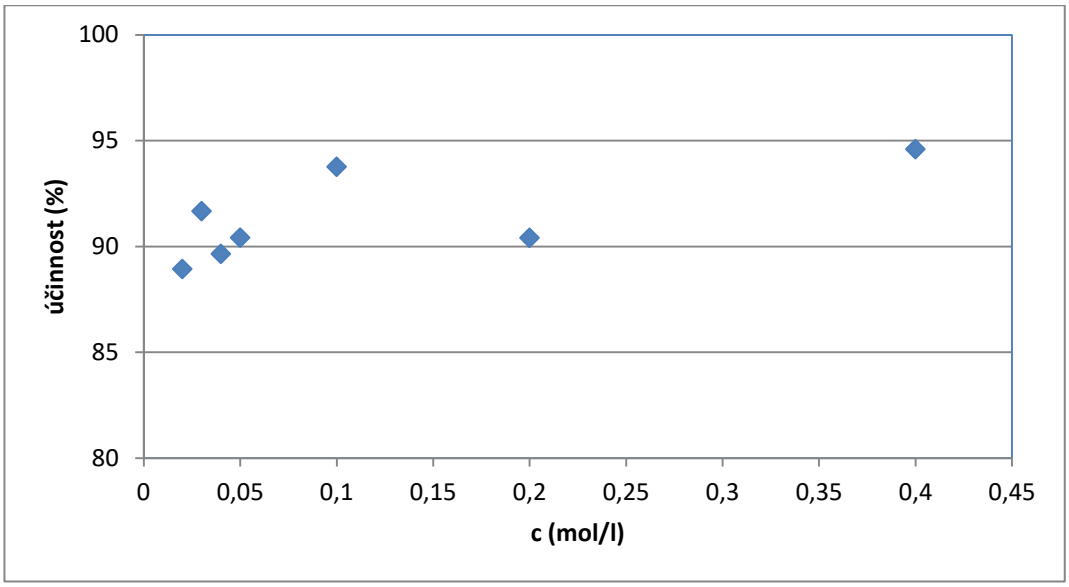
Z grafu lze vyčíst, že nejlepší výsledek je sice získán pomocí míchání za laboratorní teploty, ale doba konverze je příliš dlouhá, a proto tento způsob není praktický. U postupu zahrnujícího ultrazvuk nedošlo k dostatečné konverzi ani po dvou stech minutách. Při míchání za zvýšené teploty lze dojít k dostačujícímu výsledku konverze již po deseti minutách, a proto bylo k analýze využito tohoto postupu.

Zajímavé je, že po zhruba hodině od začátku varu začaly vznikat v baňce oranžové plyny, pravděpodobně oxidy dusíku. Na grafu je zřetelné, že u této křivky (míchání + teplota) po 50. minutě došlo k poklesu účinnosti konverze a je tedy možné, že byla tímto jevem konverze negativně ovlivněna.

Vliv koncentrace kyseliny octové

Bylo zkoumáno, zda má koncentrace kyseliny octové vliv na konverzi taurinu. Směs byla připravena podle jako předešle (0,114 g taurinu + 5 ml 1 M dusitanu) jen byla měněna

koncentrace kyseliny octové. Byla připravena sada roztoků o koncentracích kyseliny octové 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2 a 0,4 mol/l.

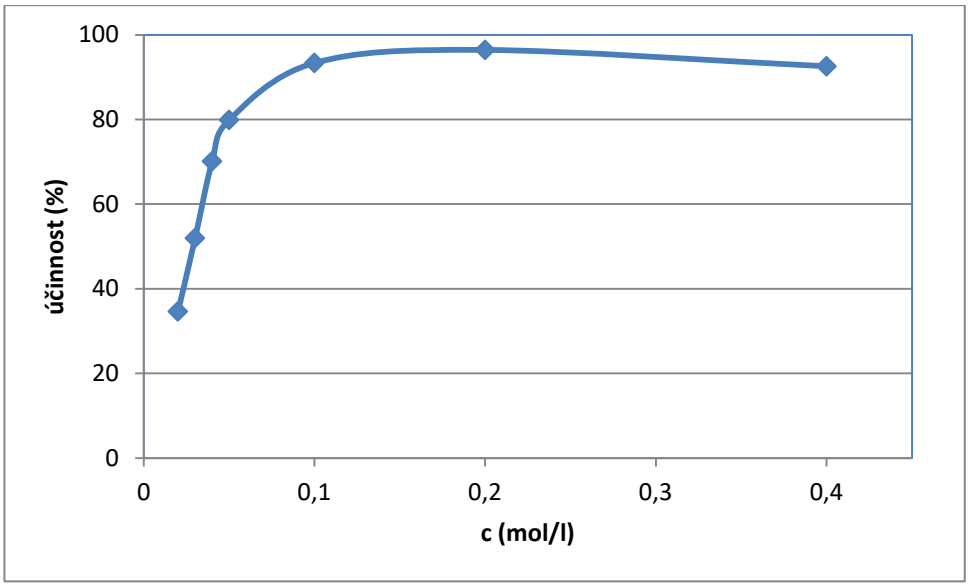


Graf 2 – Závislost účinnosti konverze taurinu na koncentraci kyseliny octové. Koncentrace v baňce (V = 50 ml) taurinu 0,02 mol/l, koncentrace dusitanu sodného 0,1 mol/l. Směs byla povařena deset minut a poté ještě 20x naředěna a analyzována.

V grafu lze vidět, že účinnost konverze je po celou dobu takřka konstantní, a lze tedy říci, že i po minimálním přídavku kyseliny octové dojde k uspokojivému výsledku konverze. Je to zřejmě z toho důvodu, že sulfoskupina nepřijímá kyselé vodíky, a proto stačí k okyselení směsi kvůli diazotaci (tj. k převodu dusitanu na kyselinu dusitou), pouze malé množství kyseliny. Tímto se tedy taurin liší od ostatních aminokyselin, u kterých se změněné přídavky kyseliny octové projevují velice výrazně.[29] Aminokyseliny totiž přijímají kyselé vodíky na karboxylové skupině velice ochotně a k okyselení směsi je tedy potřeba přidat větší množství kyseliny octové.

Vliv koncentrace dusitanu sodného

V rámci optimalizace bylo třeba také zjistit, zda má na vliv konverze vliv i koncentrace dusitanu sodného. K vytvoření směsi bylo tedy opět využito 0,114 g taurinu a 5 ml 1 M kyseliny octové, ale byl měněn objem přidávaného dusitanu sodného. Byla připravena řada roztoků o koncentraci dusitanu sodného 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2 a 0,4 mol/l.



Graf 3 – Závislost účinnosti konverze na koncentraci dusitanu sodného. Koncentrace v baňce (V = 50 ml) taurinu 0,02 mol/l, koncentrace kyseliny octové 0,1 mol/l. Směs byla povařena deset minut a poté ještě 20x naředěna a analyzována.

Graf vypovídá o tom, že čím vyšší koncentrace dusitanu sodného je ve vzorku, tím konverze probíhá lépe. Toto tvrzení platí do dosažení koncentrace dusitanu sodného 0,1 mol/l, dále je už konverze stabilní. Dá se tedy říci, že optimální přídavek dusitanu sodného je 5 ml. Vyšší koncentrace už jsou zbytečné. Taurin tedy v tomto případě reaguje obdobně jako ostatní aminokyseliny.[29]

4.2 Výběr elektrolytového systému

Nejdříve bylo zapotřebí zjistit, jaký elektrolytový systém bude nejlepší na stanovení taurinu. Při stanovování taurinu byl použit systém I, ve kterém byla jakožto vedoucí elektrolyt použita směs 10 mmol HCl + β-alaninu, kterým bylo nastaveno pH na 3,6. Koncovým elektrolytem byl 10 mM octan sodný. Jako koncový elektrolyt byl zkoušen i 20 mM roztok kyseliny octové, ten ale je méně vodivý než roztok octanu, což se projevilo vyšším napětím na separačním systému zvláště ke konci analýzy. Proto byl dále používán roztok octanu. Byl učiněn pokus, ve kterém byla do vedoucího elektrolytu přidána hydroxyethylcelulóza, která je doporučována ke zmírnění elektroosmotického toku a zvýšení viskozity vedoucího elektrolytu. Přídavek ale nijak neovlivnil výsledný čas ani kvalitu separace, a tudíž dále nebyla hydroxyethylceluloza používána.

Jako další optimalizační krok byla vyzkoušena změna pH vedoucího elektrolytu. Taurin byl analyzován při pH vedoucího elektrolytu 3,0, 3,6 a 4,2 (pH bylo nastavováno přídavky pevného β-alaninu k roztoku vedoucího elektrolytu). Dále byl taurin analyzován při pH 5,5 a 6,0 v systému III. V tomto případě bylo pH nastavováno přídavky pevného histidinu.

Při použití pH 3,0 má koncový elektrolyt příliš malou vodivost a docházelo k překročení maximálního separačního napětí a k předčasnému ukončení analýzy. U vedoucího elektrolytu s pH 4,2 byly zóny v obou kolonách rozděleny a čas analýzy byl obdobný jako u vedoucího elektrolytu s pH 3,6. Využití tohoto vedoucího elektrolytu pro kvantitativní analýzu by nebylo příliš vhodné, jelikož vedoucí elektrolyt má při tomto pH malou pufrační kapacitu. U vedoucích elektrolytů s pH 5,5 a 6 již nedošlo k rozdělení látek ve směsi kvůli vysoké pohyblivosti koncového iontu (octanu). Při všech těchto měřeních byl jako koncový elektrolyt použit 10 mM octan sodný.

4.3 Stabilita, reprodukovatelnost, kalibrace, detekční limit a mez stanovení

Při analýze modelových vzorků bylo zjišťováno, zda se taurin dobře separuje od ostatních látek, kde se vyskytuje zóna taurinu a je-li délka jeho signálu stabilní i po přeměření modelového vzorku následující den.

K vymezení výskytu taurinu na grafu byl jako první proměřen modelový vzorek neobsahující taurin. Poté byl proměřen modelový vzorek obsahující taurin, grafy byly porovnány a byla identifikována zóna taurinu.

Byla také zjišťována reprodukovatelnost měření modelového vzorku s taurinem v den přípravy a den po ní. Výsledkem bylo zjištění, že část dusitanů přešla na dusičnany, ale zóny vzniklé z taurinu zůstaly v nezměněném stavu.

Reprodukovatelnost

Z měření bylo možné získat směrodatnou i relativní směrodatnou odchylku. Směrodatná odchylka byla vypočítána z naměřených délek zón. Vzhledem k tomu, že navažované množství taurinu nebylo vždy stejné, byly délky zón nejprve přepočteny na navážku o velikosti 1 gramu taurinu. Hodnota RSD byla vyjádřena v procentech. Měření byla provedena jak v předseparační, tak v analytické koloně.

Tab. 2 – Reprodukovatelnost měření na předseparační koloně, elektrolyt I.

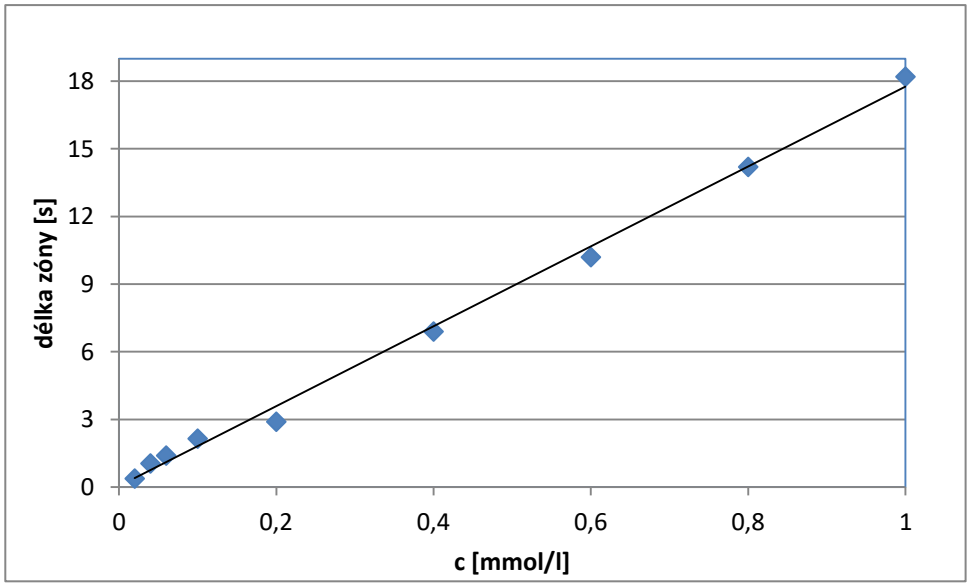
Měření	1	2	3	4	5	Průměr	SD	RSD (%)
Délka zóny (s)	138,4	138,0	136,9	142,2	140,5	139,187	2,146	1,542

Tab. 3 – Reprodukovatelnost měření na analytické koloně, elektrolyt I.

Měření	1	2	3	4	5	Průměr	SD	RSD (%)
Délka zóny (s)	877,6	879,8	866,6	904,3	905,6	886,777	17,324	1,954

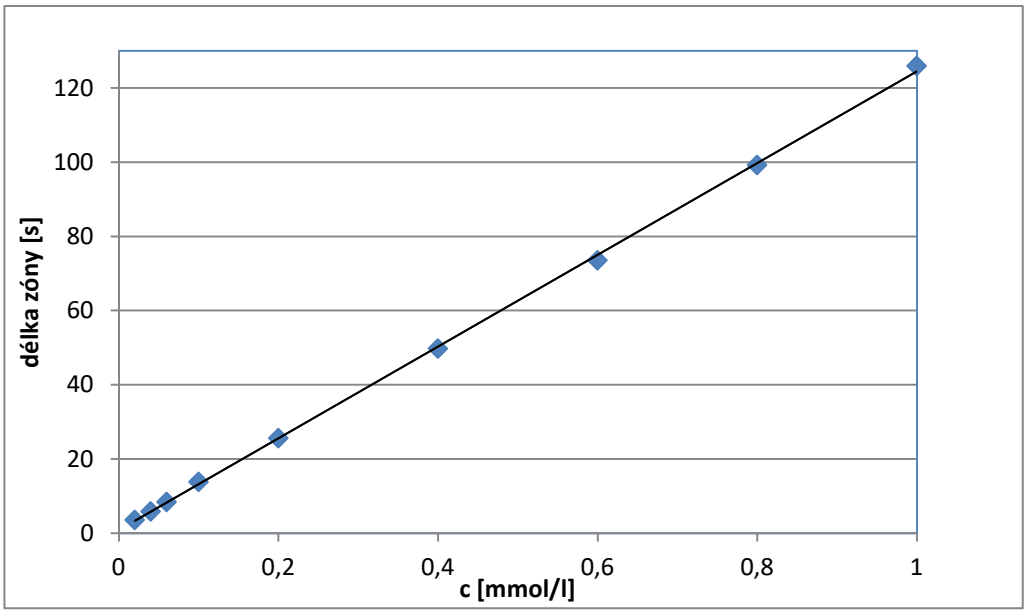
Kalibrační závislost

Z připraveného zásobního roztoku o koncentraci 0,1 mol/l byly namíchány roztoky o koncentracích 0,4 mmol/l, 0,8 mmol/l, 1,2 mmol/l, 2 mmol/l, 4 mmol/l, 8 mmol/l, 12 mmol/l, 16 mmol/l a 20 mmol/l. Po konverzi byly roztoky opět 20x naředěny (0,02 mmol/l. 0,04 mmol/l, 0,06 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,6 mmol/l, 0,8 mmol/l a 1 mmol/l) a tyto roztoky byly zanalyzovány. Ze získaných hodnot byl vytvořen graf závislosti koncentrace taurinu na délce zóny taurinu. Díky kalibrační křivce lze říci, že analýza vzorků byla stabilní, a lze díky ní dostatečně přesně vypočítat koncentraci taurinu v reálných vzorcích.



Graf 4 – Kalibrační závislost délky zóny taurinu na koncentraci taurinu, elektrolyt I. vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl, β-alanin (pH 3,6), koncový elektrolyt 10 mM CH_3COONa, předseparační kolona.

Rovnice kalibrační křivky (separační kolona)	Hodnota spolehlivosti R^2
y = 17,71 x + 0,04 [sec;mmol/l]	0,9963



Graf 5 – Kalibrační závislost délky zóny taurinu na koncentraci taurinu, elektrolyt I. vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl, β-alanin (pH 3,6), koncový elektrolyt 10 mM CH_3COONa, analytická kolona.

Rovnice kalibrační křivky (analytická kolona)	Hodnota spolehlivosti R^2
y = 123,68 x + 0,83 [sec;mmol/l]	0,9997

Byla použita rovnice kalibrační křivky získaná z dat z měření kalibrační řady na analytické koloně, kvůli větší přesnosti a lepšímu rozdělení látek.

Dále byl taurin 3x stanovován v modelovém vzorku v elektrolytovém systému I z důvodu ověření správnosti a přesnosti měření. Ke zjištění koncentrace bylo užito kalibrační závislosti. Koncentrace zvolená k analýze byla vybrána tak, aby spadala do koncentrací analyzovaných v kalibrační řadě. Výtěžnost popisuje správnost měření, která byla získána jako rozdíl zvolené koncentrace a průměru hodnot koncentrací získaných z analýzy.

Tab. 4 – Výtěžnost stanovení taurinu.

Zvolená koncentrace (mmol/l)	Průměr získaných koncentrací (mmol/l)	Výtěžnost (%)
0,7	0,648 ± 0,01	92,6 ± 1,54

Detekční limit a mez stanovení

Ke zjištění meze stanovení byla využita rovnice kalibrační závislosti. Za hodnotu *y* byla doplněna 1 sekunda, což je nejmenší zaznamenatelná hodnota v grafu. Mez detekce byla získaná podělením výsledné hodnoty 3. V tabulce 5 jsou udány získané hodnoty jak pro dávkovanou (a tedy ředěnou směs), tak i pro původní roztok. Při analýze byl použit elektrolytický systém I s pH 3,6 (vedoucí elektrolyt 10 mmol/l HCl + β-alanin, koncový elektrolyt 10 mmol/l octan sodný).

Tab. 5 – Detekční limit a mez stanovení u zředěné a nezředěné směsi v analytické koloně, elektrolyt I.

	Mez stanovení	**Mez detekce**
Původní roztok	$1{,}6.10^{-4}$ mol/l	$5{,}3.10^{-5}$ mol/l
Dávkovaný roztok	$8{,}0.10^{-6}$ mol/l	$2{,}710^{-6}$ mol/l

4.4 Reálné vzorky

Podle optimalizovaných postupů bylo zkoušeno stanovit taurin u reálných vzorků. Jako reálné vzorky vystupovaly energetické nápoje a energetický gel. Všechny vzorky byly zakoupeny v běžných obchodních řetězcích.

Nejdříve bylo zapotřebí vzorky vhodně naředit, aby koncentrace spadala do kalibrační křivky, a poté derivatizovat podle zjištěných optimálních podmínek. Po derivatizaci došlo k nadávkování do přístroje a analýze s elektrolytovým systémem I.

Derivátem aminoethansulfonové kyseliny byla kyselina isethionová. Během analýzy vzorků se v elektroforegramu objevovala kromě zóny isethionové kyseliny také kyselina citronová, která se vyskytovala ve všech energetických nápojích.

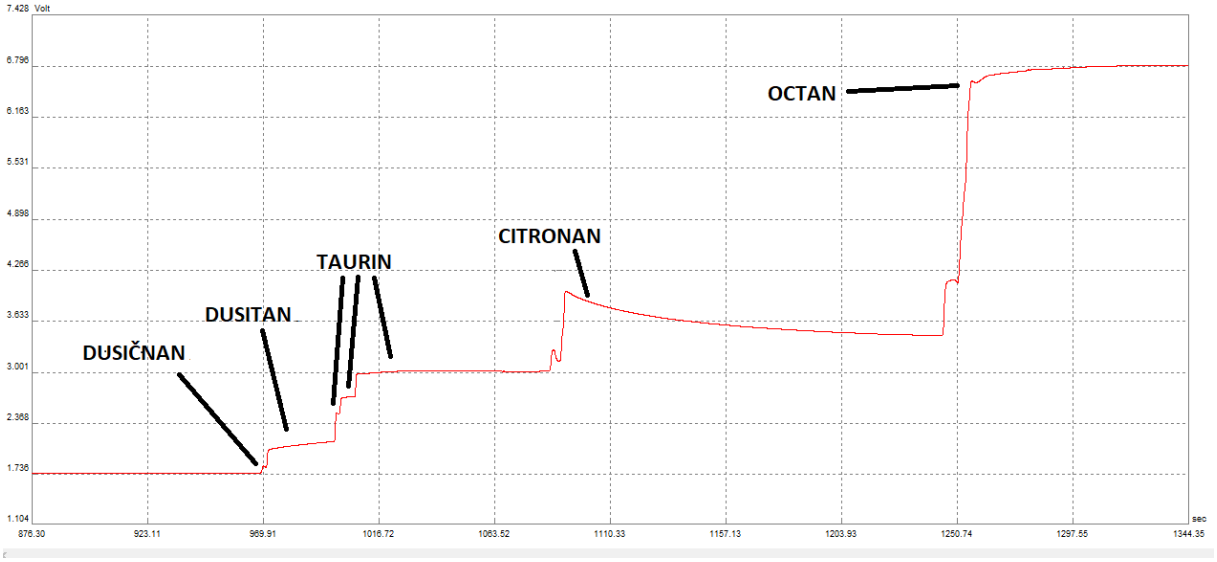
Koncentrace taurinu byla stanovována pomocí kalibrační křivky a standardního přídavku. Na stanovení koncentrace taurinu pomocí kalibrační křivky byl každý vzorek proměřen 3x. Ke zjištění koncentrace standardním přídavkem byly použity dva přídavky –

5 a 10 ml standardního roztoku taurinu o koncentraci 0,03 mol/l. Vzorky s přídavkem standardního roztoku taurinu byly pokaždé proměřeny 2x. Přídavky byly přidány ke vzorku před konverzí.

Výsledky získané pomocí standardního přídavku se více shodovaly s obsahy uváděnými výrobci než hodnoty získané pomocí kalibrační křivky. Je to nejspíš z toho důvodu, že u standardního přídavku byla ve směsi již přítomna matrice vzorku, která měla na měření vliv. Při proměřování vzorků nedocházelo k rušení stanovení žádnými jinými látkami obsaženými ve směsi.

Tab. 6 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Maximal G.

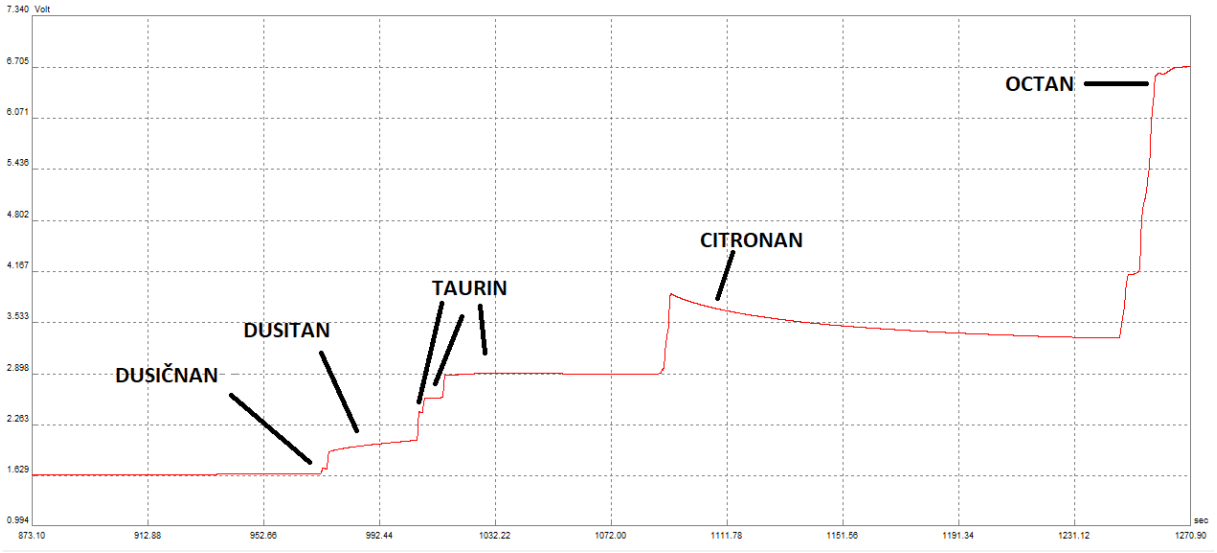
Stanovení	Zjištěná koncentrace taurinu	RSH (%)	Koncentrace taurinu uvedená na obalu
Standardní přídavek	0,99 ± 0,012 g/250 ml	1,20	1,02 g/250 ml
Kalibrační křivka	0,88 ± 0,008 g/250 ml	1,15	



Obr. 8 – Izotachoforegram vzorku Maximal G, analytická kolona.

Tab. 7 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje QXE.

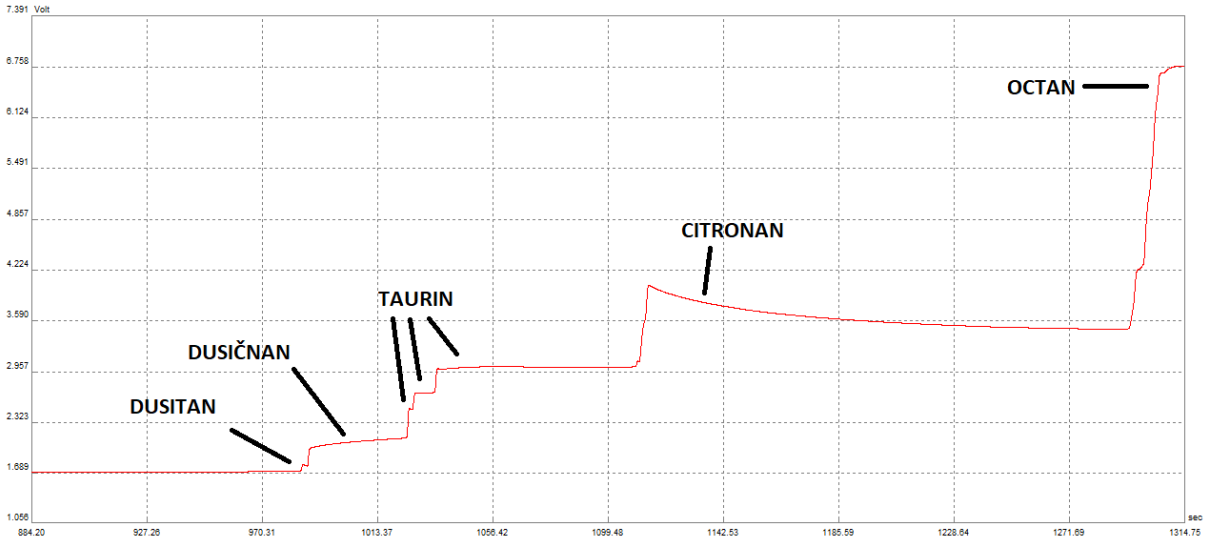
Stanovení	Zjištěná koncentrace taurinu	RSH (%)	Koncentrace taurinu uvedená na obalu
Standardní přídavek	1,06 ± 0,009 g/250 ml	0,87	1,04 g/250 ml
Kalibrační křivka	0,87 ± 0,019 g/250 ml	2,66	



Obr. 9 – Izotachoforegram vzorku QXE, analytická kolona.

Tab. 8 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Tiger.

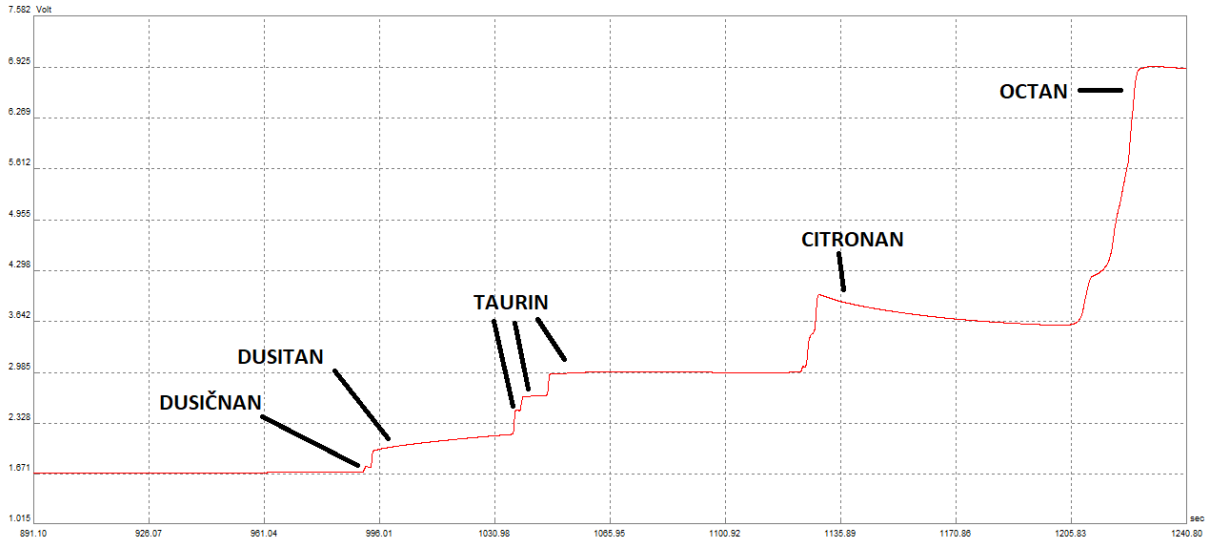
Stanovení	Zjištěná koncentrace taurinu	RSH (%)	Koncentrace taurinu uvedená na obalu
Standardní přídavek	0,83 ± 0,015 g/250 ml	1,77	1,05 g/250 ml
Kalibrační křivka	0,88 ± 0,009 g/250 ml	1,28	



Obr. 10 – Izotachoforegram vzorku Tiger, analytická kolona.

Tab. 9 – Zjištěný obsah taurinu u energetického nápoje Crazy Wolf.

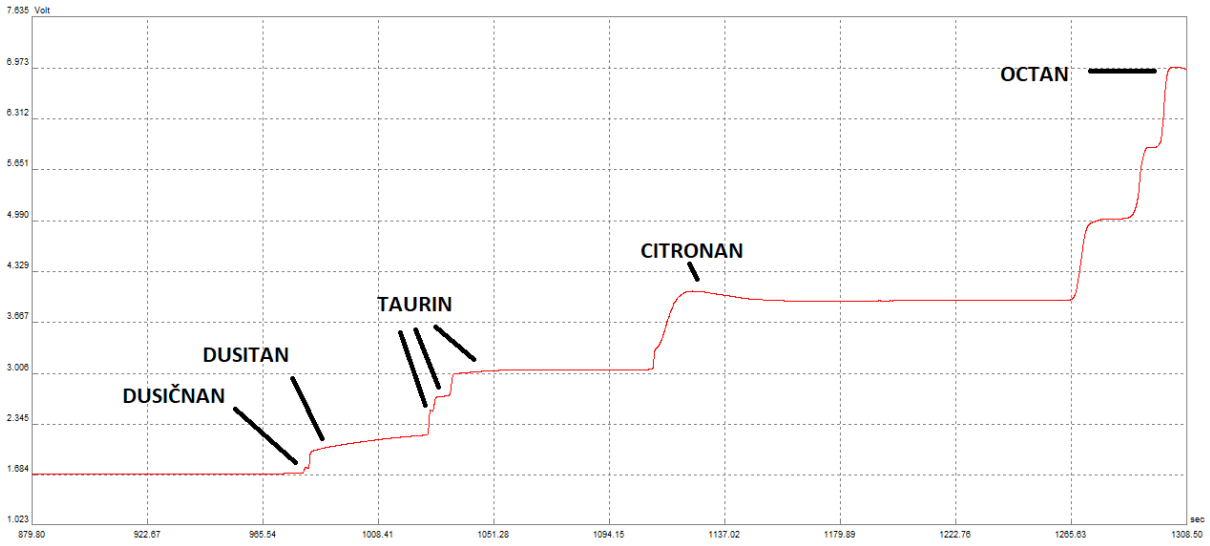
Stanovení	Zjištěná koncentrace taurinu	RSH (%)	Koncentrace taurinu uvedená na obalu
Standardní přídavek	0,86 ± 0,021 g/250 ml	2,48	1,05 g/250 ml
Kalibrační křivka	0,88 ± 0,004 g/250 ml	0,60	



Obr. 11 – Izotachoforegram vzorku Crazy Wolf, analytická kolona.

Tab. 10 – Zjištěný obsah taurinu u energetického gelu Carbo Snack.

Stanovení	Zjištěná koncentrace taurinu	RSH (%)	Koncentrace taurinu uvedená na obalu
Standardní přídavek	0,52 ± 0,024 g/55 g	2,56	0,5 g/55 g
Kalibrační křivka	0,45 ± 0,009 g/55 g	1,40	



Obr. 12 – Izotachoforegram vzorku Carbo Snack, analytická kolona.

5. ZÁVĚR

Tato práce se zabývala možným stanovením β-aminokyseliny taurinu pomocí izotachoforézy v aniontovém módu. Na analýzu byla použita látka vzniklá reakcí taurinu s dusitanem sodným a kyselinou octovou po povaření – isethionová kyselina. V průběhu reakce unikal z baňky elementární dusík.

Nejdříve bylo třeba zjistit, jaké jsou ideální podmínky pro co nejpřesnější stanovení taurinu v doplňcích stravy. Z experimentů vyšlo najevo, že ideální je použití reakční směsi obsahující vzorek, kyselinu dusitou a kyselinu octovou. Vyhovujícím elektrolytem byl ten, kde jako vedoucí eletrolyt byla využita 10 mM kyselina chlorovodíková s β-alaninem. Vedoucí elektrolyt měl po přídavku β-alaninu pH 3,6. Jako koncový elektrolyt byl použit 10 mM octan sodný. Jako optimální řešení konverze aminokyseliny na hydroxykyselinu se ukázalo zahřívání na vroucí vodní lázni se současným promícháváním po dobu deseti minut.

Z měření bylo patrné, že spolehlivější je použití dat z analytické kolony. K vyhodnocení bylo použito kalibrační křivky a metody standardního přídavku. Metoda standardního přídavku byla ve většině případů poněkud spolehlivější nejspíše proto, že přídavky byly pipetovány do směsi, která již obsahovala matrici vzorku. U hodnot získaných z kalibrační křivky došlo ke zkreslení patrně právě z toho důvodu, že kalibrační řada matrici vzorku neobsahovala.

Z výsledků experimentů byla zjištěna výtěžnost modelového vzorku, která popisuje přesnost a správnost měření. Pomocí rovnice kalibrační závislosti byla získána mez stanovení taurinu a jeho detekční limit.

Izotachoforéza je jednoduchý a poměrně rychlý způsob, jak zjistit koncentraci buď aniontů, nebo kationtů ve vzorcích. Je to také ekonomicky výhodná, dostatečně citlivá dobře reprodukovatelná metoda.

6. ZDROJE

1. NGUYEN, Thanh, Dam, NGUYEN, Manh, Huy, VU, Minh, Tuan, DUONG, Hong, Anh, PHAM, Hung, Viet, MAI, Thanh, Duc. Dual channeled capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection for rapid determination of choline and taurine in energy drinks and diatery supplements. *Talanta*, 2019, **193**, 168-175.

2. JAMMOUL, Firas, et al. Taurine deficiency damages photoreceptors and retinal ganglion cells in vigabatrin-treated neonatal rats. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2010, 43.4: 414-421.

3. MOU, Shifen, DING, Xiaojing, LIU, Yongjian. Separation methods for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 2002, **781**, 251-267.

4. REVENGA-PARA, Mónica, MARTÍNEZ-PERIÑÁN, Emiliano, MORENO, Berta, PARIENTE, Félix, LORENZO, Encarnación. Rapid taurine and lactate biomarkers determination with disposible electrochemical detectors. *Electrochimica acta*, 2017, **240**, 506-513.

5. MATSUDA, Motoki, ASANO, Yasuhisa. A simple assay of taurine concentrations in food and biological samples using taurine dioxygenase. *Analytical Biochemistry*, 2012, **427**(2), 121-123.

6. OPEKAR, František, TŮMA, Petr. Coaxial flow-gating interface for capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 2017, **40**(15), 3138-3143.

7. SHADJOU, Nasrin, ALIZADEH, Salar, HASANZADEH, Mohammad. Sensitive monitoring of taurine biomarker in unprocessed human plasma samples using a novel nanocompositebased on poly(aspartic acid) functionalized by graphene quantum dots. *Journal of Molecular Recognition*, 2018, **31**(12), e2737.

8. CELÁ, Andrea, MÁDR, Aleš, JEŠETA, Michal, ŽÁKOVÁ, Jana, CRHA, Igor, GLATZ, Zdeněk. Study of metabolic activity of human embryos focused on amino acids by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2018, **39**(23), 3040-3048.

9. SWANN, Jonathan, R., GARCIA PEREZ, Isabel, BRANISTE, Viorica, WILSON, Ian, D., SIDAWAY, James, E., NICHOLSON, Jeremy, K., PETTERSSON, Sven,

HOLMES, Elaine. Application of ^{1}H NMR spectroscopy to the metabolic phenotyping of rodent brain extracts: A metabonomic study of gut microbial influence on host brain metabolism. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, **143**, 141-146.

10. KUPIS-ROZMYSŁOWICZ, Justyna, WAGNER, Michał, BOBACKA, Johan, LEWENSTAM, Andrzej, MIGDALSKI, Jan. Biomimetic membranes based on molecularly imprinted conducting polymers as a sensing element for determination of taurine. *Electrochimica Acta*, 2016, **188**, 537-544.

11. ZHANG, Qiaoting, BAI, Jie, YAO, Xiaofeng, JIANG, Liping, WU, Wei, YANG, Lei, GAO, Ni, QIU, Tianming, YANG, Guang, Hidru, Tesfaldet, Habteremiam, SUN, Xiance. Taurine rescues the arsennic-induced injury in the pancreas of rat offsprings and in the INS-1 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, **109**, 815-822.

12. LAU, Oi-Wah, LUK, Shiu-Fai, CHIU, Theresa, P., Y. Spectrophotometric determination of taurine in food samples with phenol and sodium hypochlorite as reagents and an ion-exchange clean-up. *The Analyst*, 1990, **115**(5), 653-655.

13. ZHANG, Xin, CHEMMALIL, Letha, DING, Julia, MUSSA, Nesredin, LI, Zhengjian. Imaged capillary isoelectric focusing in native condition: A novel and succesful example. *Analytical Biochemistry*, 2017, **537**, 13-19.

14. STURMAN, J. A.; RASSIN, D. K.; GAULL, G. E. Taurine in developing rat brain: maternal-fetal transfer of [35S] taurine and its fate in the neonate. *Journal of neurochemistry*, 1977, 28.1: 31-39.

15. RÁCZ, Anita, HÉBERGER, Károly, FODOR, Marietta. Quantitative determination and classification of energy drinks using near-infrared spectroscopy. *Analyticaland Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**(23), 6403-6411.

16. LUGINBÜHL, Marc, RUTJENS, Sofie, KÖNIG, Stefan, FURRER, Julien, WEINMANN, Wolfgang. N-Acetyltaurine as a novel urinary ethanol marker in a drinking study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**(26), 7529-7536.

17. LU, Y.-F., ZHANG, Q.-Y., WANG, L.-H., LIU, X.-Y., ZHANG, S.-X. The protective effects of taurine on experimental autoimmune myocarditis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, **21**(8), 1868-1875. ISSN 2284-0729.

18. CHEN, Yujie, YI, Dong, JIANG, Shuiqin, WEI, Dongzhi. Identification of novel thermostable taurine-pyruvate transaminase from Geobacillus thermodenitrificans for chiral amine synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, **100**(7), 3101-3111.

19. RZAGALINSKI, Ignacy, HAINZ, Nadine, MEIER, Carola, TSCHERNIG, Thomas, VOLMER, Dietrich, V. MALDI mass spectral imaging of bile acids observed as deprotonated molecules and proton-bound dimers from mouse liver sections. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2018, **29**(4), 711-722.

20. GUPTA, Ramesh, C., WIN, Thilda, BITTNER, Shmuel. Taurine analogues; A new class of therapeutics: Retrospects and Prospects. *Current Medical Chemistry*, 2005, **12**(17), 2021-2039.

21. ABDEL-DAIM, Mohamed, M., DESSOUKI, Amina, A., ABDEL-RAHMAN, Haidy, G., ELTAYSH, Rasha, ALKAHTANI, Saad. Hepatorenal protective effects of taurine and N-acetylcysteine against fipronil-induced injuries: The antioxidant status and apoptic markers expression in rats. *Science of the Total Environment*, 2019, **650**(2), 2063-2073.

22. GONG, Maojun, ZHANG, Ning, MADDUKURI, Naveen. Flow-gated capillary electrophoresis: a powerful technique for rapid and efficient chemical separation. *Analytical Methods*, 2018, **10**(26), 3131-3143.

23. TAKEUCHI, Tsunehiro; MATUNARI, H. Taurine. *Science of functional food. Technology Research Service Center. Tokyo*, 2008, 1134-1136..

24. JOO, Young-Chul, KO, Young, Jin, YOU, Seung, Kyou, SHIN, Sang, Kyu, HYEON, Jeoung, Eun, MUSAAD, Almisned, Shuaa, HAN, Sung, Ok. Creating a new pathway in Corynebacterium glutamicum for the production of taurine as a food additive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, **66**(51), 13454-13463.

25. ANDREWS, Samuel; SCHMIDT, Carl LA. Titration curves of taurine and of cysteic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 1927, **73** (2), 651-654.

26. DONG, Zixing, LEE, Byong, H. Bile salts hydrolases: Structure and function, substrate preference, and inhibitor development. *Protein Science*, 2018, **27**(10), 1742-1754.

27. PAVLOVIĆ, Nebojša, GOLOČORBIN-KON, Svetlana, ĐANIĆ, Maja, STANIMIROV, Bojan, AL-SALAMI, Hani, STANKOV, Karmen, MIKOV, Momir. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmatokinetic profiles. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, **9**, 1283.

28. MIKASA, Hiroaki, AGETA, Tomiko, MIZOGUCHI, Noriko, KODAMA, Hiroyuki. Simple assay method using isotachophoresis for taurine in tissues of the rat. *Journal of Chromatography*, 1980, **202**, 504-506.

29. KOVÁŘOVÁ, Michaela, BARTOŠ, Martin, MIKYSEK, Tomáš, HLOUŠKOVÁ, Dana, HYHLÍKOVÁ, Blanka, VLADYKOVÁ, Jana. Isotachophoretic determination of amino acids after their conversion to hydroxy acids. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 2018, **149**, 1709-1718.

30. ARISTOY, MC., TOLDRÁ, F, AGRIC, J. Food Chemistry. 1991. 39, 1792. ISBN 0308-8146.

31. COHEN, Steven A.; MEYS, Michael; TARVIN, Thomas L. *The pico-tag method: a manual of advanced techniques for amino acid analysis*. Millipore Corporation, 1989.

32. JACOBSEN, Jørgen, G., SMITH, Lloyd, H. Biochemistry and Physiology of taurine and taurine derivates. *Physiological Reviews*, 1968, **48**(2), 424-511. ISSN 1522-1210.

33. KAY, Robert E., et al. Quantification of the ninhydrin color reaction as applied to paper chromatography. *Archives of Biochemistry*, 1956, **63**, 14-25.

34. HASLEWOOD, Geoffrey Arthur Dering. Comparative Biochemistry. *by M. Florkin, and HS Mason, Academic Press Inc., New York and London*, 1962, **3**, 205.

35. BREMER, Jon. Species differences in the conjugation of free bile acids with taurine and glycine. *Biochemical Journal*, 1956, **63**(3), 507.

36. BERGSTROM, S.; GLOOR, U. Metabolism of bile acids in liver slices and homogenates. *Acta Chemica Scandinavica*, 1954, **35**, 1109-1110.

37. HOOKER, Thomas F.; JORGENSON, James W. A transparent flow gating interface for the coupling of microcolumn LC with CZE in a comprehensive two-dimensional system. *Analytical Chemistry*, 1997, **69**(20), 4134-4142.

38. WEISENBERGER, Megan M.; BOWSER, Michael T. In Vivo Monitoring of Amino Acid Biomarkers from Inguinal Adipose Tissue Using Online Microdialysis-Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2016, **89**(1), 1009-1014.

39. BOWSER, Michael T.; KENNEDY, Robert T. In vivomonitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2001, **22**(17), 3668-3676.

40. HOGERTON, Amy L.; BOWSER, Michael T. Monitoring neurochemical release from astrocytes using in vitro microdialysis coupled with high-speed capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(19), 9070-9077.

41. BAI, Jie, et al. Taurine protects against As2O3-induced autophagy in pancreas of rat offsprings through Nrf2/Trx pathway. *Biochimie*, 2016, **123**, 1-6.

42. POURNARA, Angeliki, et al. Arsenic alters global histone modifications in lymphocytes in vitro and in vivo. *Cell Biology and Toxicology*, 2016, **32**(4), 275-284.

43. SHI, Xiaolei; YAO, Dan; CHEN, Chi. Identification of N-acetyltaurine as a novel metabolite of ethanol through metabolomics-guided biochemical analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(9), 6336-6349.

44. DINCER, Sevil, et al. The protective effect of taurine pretreatment on carbon tetrachloride-induced hepatic damage–a light and electron microscopic study. *Amino Acids*, 2002, **22**(4), 417-426.

45. MANNA, Prasenjit; SINHA, Mahua; SIL, Parames C. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino Acids*, 2009, **36**(3), 417.

46. RASHID, Kahkashan; DAS, Joydeep; SIL, Parames C. Taurine ameliorate alloxan induced oxidative stress and intrinsic apoptotic pathway in the hepatic tissue of diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, **51**, 317-329.

47. TEVATIA, Rahul, et al. The taurine biosynthetic pathway of microalgae. *Algal Research*, 2015, **9**, 21-26.

48. HONJOH, Ken-ichi, et al. Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from Cyprinus

carpio, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinate decarboxylase in Saccharomyces cerevisiae. *Amino Acids*, 2010, **38**(4), 1173-1183.

49. BULYCHEV, E. Yu; RUBANYAK, N. Yu. Commercial synthesis of 2-aminoethanesulfonic acid (taurine). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2013, **46**(12), 740-741.

50. SCHÖNHERR, Jens. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(7), 1945-1950.

51. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications*, 2016, **13**(5), 923E.

52. RIDLON, Jason M., et al. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut microbes*, 2016, **7(**1), 22-39.

53. RODA, Aldo, et al. Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of lipid research*, 1990, **31**(8), 1433-1443.

54. NURUNNABI, Md, et al. Design and strategies for bile acid mediated therapy and imaging. *RSC Advances*, 2016, **6(**78), 73986-74002.

55. HOFMANN, Alexander F.; HAGEY, L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and molecular life sciences*, 2008, **65(**16), 2461-2483.

56. KATAOKA, Hiroyuki; OHNISHI, Naomi; MAKITA, Masami. Electron-capture gas chromatography of taurine as its N-pentafluorobenzoyl di-n-butylamide derivative. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1985, **339,** 370-374.

57. MAYES, Andrew G.; WHITCOMBE, Michael James. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced drug delivery reviews*, 2005, **57(**12), 1742-1778.

58. GOODMAN, Harold O., et al. Taurine transport in epilepsy. *Clinical chemistry*, 1980, **26(**3), 414-419.

59. WATERFIELD, Catherine J. Determination of taurine in biological samples and isolated hepatocytes by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1994, **657(**1), 37-45.

60. STÄMPFLI, Andress A.; BALLÈVRE, Olivier; FAY, Laurent B. Determination of 15N enrichment of taurine in cat urine by high resolution fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1992, **6(**9), 547-549.

61. FEKKES, Durk, et al. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, **744**(1), 183-188.

62. RIZZO, V., et al. Reference values of neuroactive amino acids in the cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1996, **729**(1-2), 181-188.

63. TERRLINK, T.; VAN LEEUWEN, P. A.; HOUDIJK, Alexander. Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes. *Clinical chemistry*, 1994, **40(**2), 245-249.

64. MARKS, Laurence, et al. A gas chromatographic/electron impact mass spectrometric method for the isolation and derivatization of plasma taurine for use in stable isotope tracer kinetic studies. *Journal of Mass Spectrometry*, 1995, **30(**12), 1687-1693.

65. MCMAHON, Gillian P.; O'KENNEDY, Richard; KELLY, Mary T. High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1996, **14(**8-10), 1287-1294.

66. FIERABRACCI, Vanna, et al. Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1991, **570(**2), 285-291.

67. MURAI, Shunsuke, et al. A rapid assay for neurotransmitter amino acids, aspartate, glutamate, glycine, taurine and γ-aminobutyric acid in the brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 1992, **87(**2), 145-153.

68. IDE, Takashi. Simple high-performance liquid chromatographic method for assaying cysteinesulfinic acid decarboxylase activity in rat tissue. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, **694(**2), 325-332.

69. JELLUM, Egil; THORSRUD, Anne Karine; TIME, Ellen. Capillary electrophoresis for diagnosis and studies of human disease, particularly metabolic disorders. *Journal of Chromatography A*, 1991, **559**(1-2), 455-465.

70. ZHANG, Le, et al. Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence-charge coupled device. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, **707**(1-2), 59-67.

71. QU, Ying, et al. Simultaneous determination of total and extracellular concentrations of the amino acid neurotransmitters in cat visual cortex by microbore liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1998, **798**(1-2), 19-26.

72. POLANUER, Boris M.; IVANOV, Sergei V.; SHOLIN, A. F. Rapid assay of dinitrophenyl derivative of taurine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1994, **656**(1), 81-85.

73. ARISTOY, Maria Concepcion; TOLDRA, Fidel. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, **39(**10), 1792-1795.

74. ACKERMANN, D.; LIST, P. H. Erstmaliges Vorkommen von Taurobetain in der belebten Natur. *Naturwissenschaften*, 1959, **46(**10), 354-354.

75. YOKOYAMA, Toshio; KINOSHITA, Toshio. High-performance liquid chromatographic determination of taurine in biological fluids by post-column fluorescence reaction with thiamine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1991, **568(**1), 212-218.

76. VONACH, Richard; LENDL, Bernhard; KELLNER, Robert. Hyphenation of ion exchange high-performance liquid chromatography with Fourier transform infrared detection for the determination of sugars in nonalcoholic beverages. *Analytical chemistry*, 1997, **69(**20) 4286-4290.

77. LINDBERG, BENGT. Methylated taurines and choline sulphate in red algae. *Acta Chem. Scand*, 1955, **9,** 1323-1326.

78. DAKOTA, Vermillion. Isolation of 2-hydroxyethanesulfonic acid (isethionic acid) from dog heart. *The Journal of biological chemistry*, 1962, **237**(4).

79. SAKAI, Tadashi; NAGASAWA, Takashi. Simple, rapid and sensitive determination of plasma taurine by high-performance liquid chromatography using pre-column derivative formation with fluorescamine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1992, **576**(1), 155-157.

80. KELLY, Mary T.; FABRE, Huguette; PERRETT, David. Determination of taurine in plasma by capillary zone electrophoresis following derivatisation with fluorescamine. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 2000, **21(**4), 699-705.

81. LI, Hua, et al. Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 2003, **788(**1), 93-101.

82. WU, Jin; CHEN, Zhaohui; DOVICHI, Norman J. Reaction rate, activation energy, and detection limit for the reaction of 5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde with neurotransmitters in artificial cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, **741(**1), 85-88.

83. LILLARD, Sheri J., et al. Separation and characterization of amines from individual atrial gland vesicles of Aplysia californica. *Analytical chemistry*, 1998, **70**(17), 3517-3524.

84. IWAGAMI, S.; SAWABE, Y.; NAKAGAWA, T. Determination of Components in Eye Lotion by Capillary Electrophoresis. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1995, **41(**1), 85-91.

85. SALKOWSKI, E. Ueber die Entstehung der Schwefelsäure und das Verhalten des Taurins im thierischen Organismus. *Virchows Archiv*, 1873, **58**(3), 460-508.

86. THOAI, Nguyen Van; ZAPPACOSTA, S.; ROBIN, Yvonne. Biogénèse de deux guanidines soufrées: la taurocyamine et l'hypotaurocyamine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1963, **10**(3), 209-225.