

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Darja Javorská

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce potu

Bc. Darja Javorská

Diplomová práce

2020

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

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Darja Javorská**  
Osobní číslo: **C17443**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce potu**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

#### Teoretická část:

Tvorba a složení potu.  
Suchá kapka potu.  
Možnosti stanovení aminokyselin v biologických vzorcích.

#### Experimentální část:

Zpracování vzorků suché kapky potu pro stanovení vybraných aminokyselin kapalinovou chromatografií s fluorescenční, případně hmotnostní detekcí.  
Určení analytických parametrů metody.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

**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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2020

.....

Darja Javorská

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce, za jeho ochotu, rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Michalovi Kopčilovi za milé a přátelské jednání, za odborné konzultace, za trpělivost a strávený čas při zpracování této práce. Nakonec bych ráda poděkovala lidem, co mi darovali pot.

## **Anotace**

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro sledování hladin vybraných aminokyselin v suché kapce potu.

## **Klíčová slova**

aminokyseliny, pot, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, suchá kapka potu

## **Title**

Determination of selected amino acids in dried sweat spot

## **Annotation**

This thesis deals with the development and optimization of the method of high performance liquid chromatography for the determination of selected amino acids in dried sweat spot.

## **Keywords**

amino acids, sweat, high performance liquid chromatography, dried sweat spot

## Seznam obrázků:

<b>Obrázek 1:</b> Biogenní aminokyseliny .....	15
<b>Obrázek 2:</b> Vzácněji se vyskytující biogenní aminokyseliny .....	16
<b>Obrázek 3:</b> Schéma dekarboxylace .....	20
<b>Obrázek 4:</b> Schéma transaminace.....	21
<b>Obrázek 5:</b> Schéma oxidativní deaminace .....	21
<b>Obrázek 6:</b> Schéma tvorby peptidové vazby .....	22
<b>Obrázek 7:</b> Macroduct <sup>®</sup> , přístroj pro odběr potu [20] .....	25
<b>Obrázek 8:</b> Reakce o-ftaldialdehydu v přítomnosti thiolu s primárním aminem za vzniku isoindolového derivátu. ....	28
<b>Obrázek 9:</b> Reakce dansylchloridu s aminem za vzniku dansylderavátu.....	28
<b>Obrázek 10:</b> Reakce aminokyselin s ninhydrinem .....	29



## Seznam symbolů a zkratek:

ACN	acetonitril
AMK	aminokyselina
APCI	ionizace za atmosférického tlaku, z angl. Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku, z angl.
CE	kapilární elektroforéza, z angl.
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí, z angl.
DABSI	N, N'-dimethylaminoazobenzensulfonylchlorid
DBS	suchá kapka krve, z angl.
Dbs-Cl	dabsylchlorid
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNFB	2,4-dinitro-1-fluorobenzen
DSS	suchá kapka potu, z angl.
ECD	detektor elektronového záchyty, z angl.
EI	elektronová ionizace, z angl.
EOF	elektroosmotický tok, z angl.
ESI	ionizace elektrosprejem, z angl.
FID	plamenově ionizační detektor, z angl.
GC	plynová chromatografie, z angl.
GFP	zeleně fluoreskující protein, z angl.
HFBA	anhydrid kyseliny heptafluormáselné
HFBI	heptafluorobutyrylimidazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl.
ICR	iontová cyklotronová rezonance, z angl.
IT	iontová past, z angl.
IT-ICR	iontová past s iontovou cyklotronovou rezonancí, z angl.
LC	kapalinová chromatografie, z angl.
MBFTA	N-methyl-bis(trifluoracetamid)
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie, z angl.

MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie, z angl.
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl.
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH+H <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotid, redukována forma
NITC	naftylisothiokyanát
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
PBS	fosfátový pufr
PFPA	anhydrid kyseliny pentafluorpropionové
PFPI	pentafluorpropionylimidazol
pI	izoelektrický bod
PITC	fenylisothiokyanát
Pyl	pyrolysin
QqQ	dva kvadrupóly
QqTOF	kvadrupól s analyzátoem doby letu
SDS	dodecylsulfát sodný
TCD	tepelně vodivostní detektor, z angl.
TFAA	anhydrid kyseliny trifluoroctové
TFAI	trifluoracetylimidazol
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TNBSA	trinitrobenzensulfonová kyselina
TOF	analyzátoem doby letu, z angl.
TSCI	toluensulfonylchlorid

## Seznam tabulek:

<i>Tabulka 1: Rozdělení jednotlivých aminokyselin na esenciální, semiesenciální a neesenciální.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabulka 2: Přehled odbourávání uhlikatých koster jednotlivých aminokyselin.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabulka 3: Charakteristika (pohlaví, věk) sledované skupiny dobrovolných dárců a typ cvičení pro získání vzorku potu. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 4: Příprava zásobních roztoků aminokyselin .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 5: Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standardu S5. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 6: Příprava standardů pro sestavení kalibrační křivky.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 7: Retenční časy derivátů aminokyselin za podmínek uvedených v experimentální části. ..</i>	<i>47</i>
<i>Tabulka 8: Mez stanovitelnosti, mez detekce a průměrné parametry 5 kalibračních křivek metody vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tabulka 9: Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v potu technikou suché kapky a metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabulka 10: Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v potu u dobrovolných dárců (n = 40, 20 žen a 20 mužů). ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 11: Porovnání hladin vybraných aminokyselin v potu mezi ženami a muži.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 12: Základní statistická analýza procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v potu u dobrovolných dárců (n = 40, 20 žen a 20 mužů). ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 13: Porovnání procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v potu mezi ženami a muži. ....</i>	<i>53</i>

# Obsah

Úvod.....	14
1 Teoretická část .....	15
1.1 Aminokyseliny.....	15
1.1.1 Esenciální a postradatelné aminokyseliny.....	16
1.1.2 Rozdělení aminokyselin podle polaroty vedlejších řetězců .....	17
1.1.3 Fyzikální vlastnosti aminokyselin.....	17
1.2 Biosyntéza aminokyselin.....	18
1.3 Odbourávání aminokyselin.....	18
1.4 Onemocnění související s metabolismem aminokyselin.....	19
1.5 Důležité reakce aminokyselin.....	20
1.5.1 Dekarboxylace.....	20
1.5.1 Transaminace .....	21
1.5.2 Oxidativní deaminace.....	21
1.5.3 Tvorba peptidové vazby .....	22
1.6 Lidský pot.....	22
1.6.1 Tvorba potu .....	23
1.6.2 Techniky odběru potu.....	23
1.6.2.1 Termálně vyvolané pocení.....	23
1.6.2.2 Pilokarpinová iontoforéza.....	24
1.6.2.3 Perspiro 201 .....	24
1.6.2.4 Macroduct® .....	24
1.6.2.5 Metoda náplasti .....	25
1.7 Metody stanovení aminokyselin.....	26
1.7.1 Plynová chromatografie .....	26
1.7.1.1 Derivatizace aminokyselin při separaci plynovou chromatografií .....	26
1.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	27
1.7.2.1 Derivatizace aminokyselin při separaci kapalinovou chromatografií .....	27
1.7.2.2 Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.....	30
1.7.2.3 Detektory v kapalinové chromatografii.....	30
1.7.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie .....	31
1.7.2.5 Elektroforetické techniky .....	32
1.8 Stanovení aminokyselin v krvi .....	33

1.8.1	Technika suché kapky krve .....	33
1.9	Stanovení aminokyselin v moči.....	33
1.10	Stanovení aminokyselin v potu.....	34
1.10.1	Technika suché kapky .....	34
2	Cíl práce .....	35
3	Experimentální část.....	36
3.1	Vzorky potu, charakteristika sledované skupiny dobrovolných dárců .....	36
3.2	Chemikálie.....	37
3.3	Přístroje a pomůcky .....	38
3.4	Pracovní roztoky .....	39
3.5	Postup stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce potu .....	42
3.5.1	Příprava vzorků .....	42
3.5.2	Podmínky pro stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí .....	43
3.5.3	Analytické parametry metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí .....	44
3.6	Zpracování výsledků.....	45
4	Výsledky a diskuse .....	46
4.1	Optimalizace derivatizačního kroku .....	46
4.2	Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů.....	46
4.3	Analytické parametry metody stanovení aminokyselin v potu.....	47
4.3.1	Linearita.....	47
4.3.2	Nepřesnost v sérii .....	48
4.4	Základní statistická analýza naměřených dat .....	49
5	Závěr .....	54
6	Seznam literatury .....	55
7	Přílohy:.....	61

## Úvod

Tato práce se zabývá stanovením vybraných aminokyselin v suché kapce potu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí.

Aminokyseliny v potu udržují mírně kyselé pH. Pot je jedna z možných alternativ, jak získat neinvazivním způsobem vzorek pro stanovení hladin aminokyselin. Stanovení aminokyselin je důležité pro diagnostiku různých onemocnění a také výživového stavu jedince. V současné době je málo studií, které se zabývaly stanovením aminokyselin v potu.

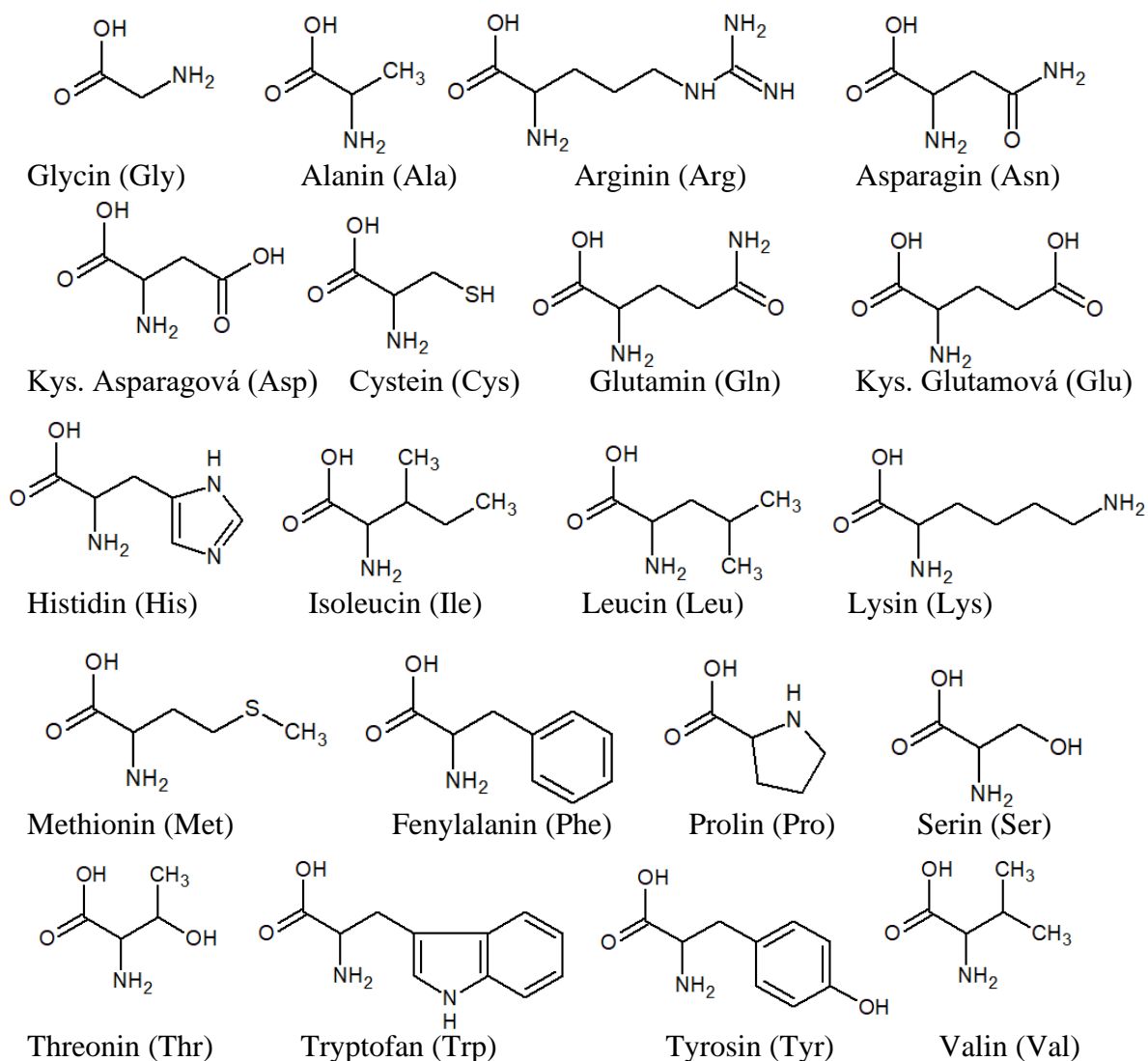
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí patří mezi nejčastěji používané metody pro stanovení aminokyselin v krvi, mimo jiné i potu. Jedná se o metodu dostatečně specifickou, citlivou a svým způsobem i rychlou.

Teoretická část se zabývá metabolismem, výskytem a fyzikálními vlastnostmi aminokyselin. Další část je věnována potu, jeho složení a významu. V závěru teoretické části jsou popsány metody stanovení jednotlivých aminokyselin v krvi a potu, a jednotlivé techniky odběru potu.

# 1 Teoretická část

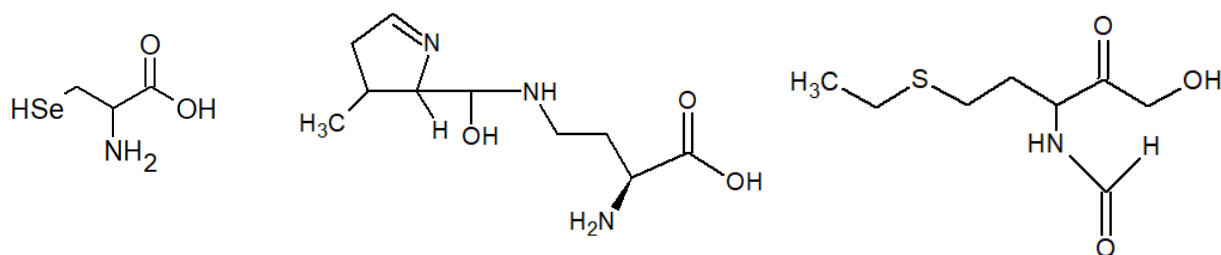
## 1.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou organické sloučeniny, které obsahují karboxylovou (-COOH) a aminovou (-NH<sub>2</sub>) skupinu. Dále mohou mít další funkční skupiny, jako je například hydroxylová (-OH), thiolová (-SH), atd. Jsou to základní stavební složky proteinů a peptidů, kdy vlastnosti jednotlivých proteinů jsou dány druhem, pořadím a vzájemnými prostorovým uspořádáním jednotlivých AMK. AMK jsou významnými substráty pro syntézu důležitých látek, jako jsou například puriny, pyrimidiny, kreatin atd.



**Obrázek 1:** Biogenní aminokyseliny

V přírodě se vyskytuje více než 300 AMK, pouze dvacet tři z nich jsou proteinogenní (20 AMK uvedených na obrázku 1), dále pak selenocystein, pyrolysin a N–formylmethionin (obrázek 2). Pyrolysin se vyskytuje převážně u bakterií a sinic, selenocystein je odvozen od cysteinu, místo atomu síry obsahuje atom selenu, N-formylmethionin se vyskytuje pouze u některých bakterií. Ty ho využívají pro iniciaci translace [1].



Selenocystein (Sec)

Pyrolysin (Pyl)

N-formylmethionin (fMet)

**Obrázek 2:** *Vzácněji se vyskytující biogenní aminokyseliny*

### 1.1.1 Esenciální a postradatelné aminokyseliny

Aminokyseliny můžeme dělit podle toho, zda si je buňky umí syntetizovat samy, nebo je musíme přijímat v potravě. Na základě toho rozdělujeme AMK na esenciální, podmíněně esenciální a na postradatelné. Postradatelné neboli neesenciální AMK si naše buňky dovedou syntetizovat samy, esenciální musíme přijímat v potravě [2].

Esenciální AMK můžeme dále rozdělit na rozvětvené (valin, leucin, isoleucin), aromatické (fenylalanin, tryptofan), bazické (lysin), obsahující ve své molekule atom síry (methionin) nebo hydroxylovou skupinu (threonin). Mezi podmíněně esenciální AMK, označované také jako semiesenciální, se řadí arginin a histidin. Jedná se o AMK, které jsou esenciálními jen v dětském věku, protože během růstu si jich buňky nedokáží vytvořit dostatek. Postradatelnými (neesenciálními) aminokyselinami jsou glycin, alanin, serin, prolin, cystein, tyrosin, asparagin, glutamin, asparagová a glutamová kyselina (tabulka 1) [1,4].



**Tabulka 1:** Rozdělení jednotlivých aminokyselin na esenciální, semiesenciální a neesenciální

Esenciální	Neesenciální	Semiesenciální
Fenylalanin	Alanin	Arginin
Isoleucin	Asparagin	Histidin
Leucin	Kyselina asparagová	
Lysin	Cystein	
Methionin	Kyselina glutamová	
Tryptofan	Glutamin	
Threonin	Glycin	
Valin	Prolin	
	Serin	
	Tyrosin	

### 1.1.2 Rozdělení aminokyselin podle polarity vedlejších řetězců

Aminokyseliny se často klasifikují do čtyř skupin na základě polarity jejich postranních řetězců. Do první skupiny patří AMK s nepolárním postranním řetězcem (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp). Glycin má nejjednodušší postranní řetězec, který je tvořen pouze atomem vodíku. Do druhé skupiny patří AMK s polárním řetězcem bez náboje (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys). Jedná se o AMK s polární hydroxy (-OH), thio (-SH) nebo amido (-CONH<sub>2</sub>) skupinou [3, 4]. Do třetí a čtvrté skupiny patří AMK s polárním řetězcem a nábojem. Podle toho, zda AMK obsahují kladně nebo záporně nabitý postranní řetězec je dělíme na kyselé AMK, kam patří kyselina asparagová a glutamová a zásadité AMK, které obsahují více než jednu bazickou skupinu a řadíme zde lysin, arginin a histidin [1, 2].

### 1.1.3 Fyzikální vlastnosti aminokyselin

Mezi fyzikální vlastnosti patří optická aktivita. AMK jsou opticky aktivní, díky přítomnosti chirálního uhlíku. To znamená, že mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, s výjimkou glycinu, který nemá chirální centrum. Podle směru stáčení rozlišujeme optické izomery na pravotočivé (+) a levotočivé (-), označované také jako D a L izomery [2, 4].

Další fyzikální vlastností je rozpustnost AMK ve vodě a organických rozpouštědlech. Většinou jsou AMK dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je třeba voda nebo ethanol, ale jsou nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech [4].

Každá AMK nese náboj, protože obsahuje vždy alespoň dvě funkční skupiny: kyselou karboxylovou (-COOH) a zásaditou aminoskupinu (-NH<sub>2</sub>). AMK nese kladný náboj, pokud se nachází v prostředí s pH menším, než je hodnota jejího izoelektrického bodu (pI). Dochází tedy k potlačení disociace karboxylové skupiny, a naopak aminoskupina je protonizována jako -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. V prostředí s hodnotou pH vyšší než je izoelektrický bod AMK, je karboxylová skupina disociována jako -COO<sup>-</sup>. Naopak -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupina předává svůj proton iontům OH<sup>-</sup> a mění se na -NH<sub>2</sub>, AMK tak nese záporný náboj [5, 6].

## 1.2 Biosyntéza aminokyselin

Biosyntéza esenciálních AMK probíhá pouze v buňkách rostlin a mikroorganismů. Neesenciální AMK si vytváří buňky lidského těla. Biosyntéza AMK má velký význam nejen proto, že jsou z nich složeny bílkoviny, ale také proto, že jsou prekurzory dalších biologicky aktivních látek, jako je například hem, který je syntetizován z glycinu. Dále jsou od AMK odvozeny hormony a neurotransmitery, například dopamin a adrenalin, jež jsou syntetizovány z tyrosinu, histamin z histidinu nebo serotonin z tryptofanu [5].

Biosyntéza neesenciálních AMK, s výjimkou tyrosinu, probíhá poměrně jednoduše, transaminačními reakcemi, kdy akceptory aminoskupiny jsou čtyři metabolity, pyruvát, 3- fosfoglycerát, oxalacetát a 2-oxoglutarát. Pyruvát a 3-fosfoglycerát jsou metabolity glykolýzy. Oxalacetát a 2-oxoglutarát jsou metabolity citrátového cyklu [4].

Syntéza esenciálních AMK je poměrně složitá a probíhá pouze v buňkách rostlin nebo mikroorganismů. Syntéza esenciálních AMK je složitější a energeticky náročnější. Zdrojem dusíku pro syntézu esenciálních AMK může být také vzdušný dusík. Fixovat ho ve sloučeninách není jednoduché, protože molekula N<sub>2</sub> je značně stabilní a její přeměna vyžaduje dodání velkého množství energie. Dokáží to jen některé druhy bakterií a sinic, které obsahují enzymový komplex nitrogenasu [4, 5].

## 1.3 Odbourávání aminokyselin

Aminokyseliny jsou využívány pro syntézu biologicky významných látek, jako jsou puriny, pyrimidiny, biogenní aminy, atd. Odbourávání uhlíkatých koster AMK zahrnuje různý počet kroků a probíhá v hepatocytech, s výjimkou větvených AMK, to probíhá ve svalových buňkách. Odbourávání uhlíkatých koster proteinogenních aminokyselin vede k tvorbě sedmi produktů, jimiž

jsou pyruvát, acetyl-S-CoA, acetoacetyl-S-CoA, 2-oxoglutarát, sukcinyl-S-CoA, fumarát a oxalacetát. Přehled odbourávání uhlíkatých koster jednotlivých AMK je uveden v tabulce 2. Dle toho, zda lze tyto produkty využít v glukoneogenezi nebo pro syntézu mastných kyselin a ketolátek, je dělíme na glukogenní a ketogenní AMK [1].

Mezi ketogenní AMK patří leucin a lysin, odbouráním jejich uhlíkaté kostry vzniká acetyl-S-CoA a acetoacetyl-S-CoA. Mezi glukogenní AMK řadíme serin, threonin, cystein, methionin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, asparagin, glutamin, glycin, alanin, valin, prolin, histidin a arginin, odbouráním jejich uhlíkaté kostry vznikají pyruvát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-S-CoA, fumarát nebo oxalacetát. Isoleucin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan jsou AMK glukogenní i ketogenní, protože při odbourávání jejich uhlíkaté kostry vzniká jak produkt pro glukoneogenezi, tak také pro syntézu mastných kyselin a ketolátek [4].

*Tabulka 2: Přehled odbourávání uhlíkatých koster jednotlivých aminokyselin*

<b>Aminokyseliny</b>	<b>Produkt</b>
Lys, Leu, Phe, Tyr, Trp, Ile	Acetyl-S-CoA a acetoacetyl-S-CoA
Glu, Gln, Pro, Arg, His	2-Oxoglutarát
Met, Ile, Val	Suckcinylnyl-S-CoA
Phe, Tyr	Fumarát
Asp, Asn	Oxalacetát
Cys, Ala, Ser, Gly, Thr, Trp	Pyruvát

#### **1.4 Onemocnění související s metabolismem aminokyselin**

Nejznámější onemocnění, které je spjato s poruchou metabolismu AMK, je fenylketonurie. Jedná se o onemocnění způsobené poruchou přeměny fenylalaninu na tyrosin. Příčinou je deficiencie fenylalaninhydroxylasy. Fenylketonurie patří mezi nemoci, které nelze vyléčit. Je zde možná prevence, a to strava bez fenylalaninu [2].

Další známé onemocnění je leucinóza, jež je také známo pod názvem nemoc javorového sirupu. Jedná se o defekt oxidativní dekarboxylace oxokyselin odvozených od AMK s rozvětveným řetězcem, valinu, leucinu a isoleucinu. Doporučenou léčbou je vyvážená strava s nízkým obsahem bílkovin. Homocystinurie je onemocnění, které vzniká na základě poruchy aktivity nebo úplné absence enzymu cystathion- $\beta$ -syntethasy. Jedná se o poruchu přeměny methioninu na cystein. Hromadící se homocystein působí toxicky na centrální nervovou soustavu a je rizikem

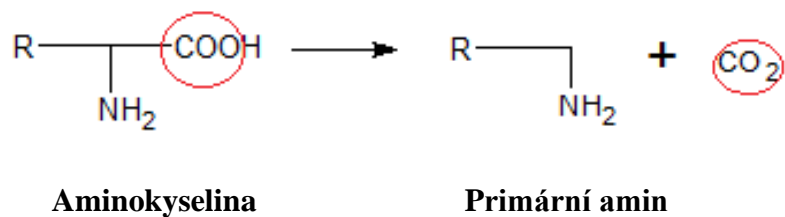
kardiovaskulárních chorob. Tyrosinémie je onemocnění, u kterého dochází k hromadění tyrosinu a metabolitů vzniklých při jeho odbourávání. Hromadění tyrosinu vede k poškození jater a ledvin. Jsou popsány tři typy tyrosinémie, typ I, II a III. Typ I se vyskytuje nejčastěji, typ II a III jsou vzácnější [3].

## 1.5 Důležité reakce aminokyselin

Dusík aminoskupiny se nedá využít pro produkci energie a musí být z těla odstraněn. To se děje buď přeměnou amoniaku na močovinu, která je následně z organismu vyloučena močí, nebo se vylučuje v tubulárních buňkách ledvin, zdrojem je glutamin. Odbourávání AMK probíhá intracelulárně. Prvním krokem je odstranění  $\alpha$ -aminoskupiny transaminací nebo oxidativní deaminací. Mezi další důležité reakce AMK patří dekarboxylace a tvorba peptidové vazby [4].

### 1.5.1 Dekarboxylace

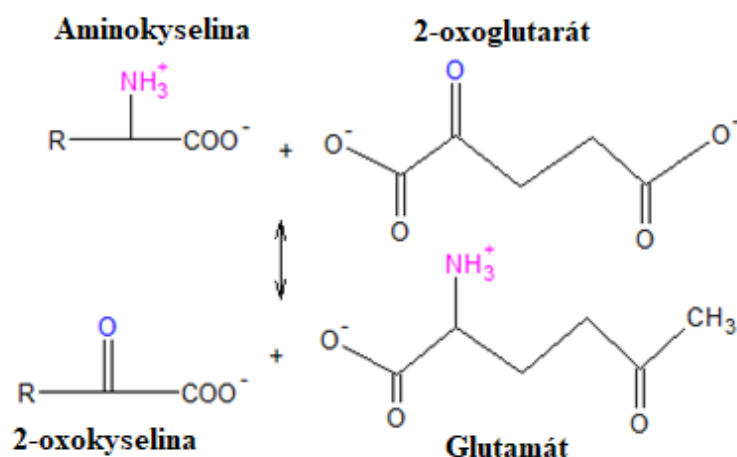
Při dekarboxylaci (obrázek 3) se z AMK odstraní karboxylová skupina za vzniku biogenních aminů. Dekarboxylace patří mezi důležitý krok v katabolismu AMK.



*Obrázek 3: Schéma dekarboxylace*

### 1.5.2 Transaminace

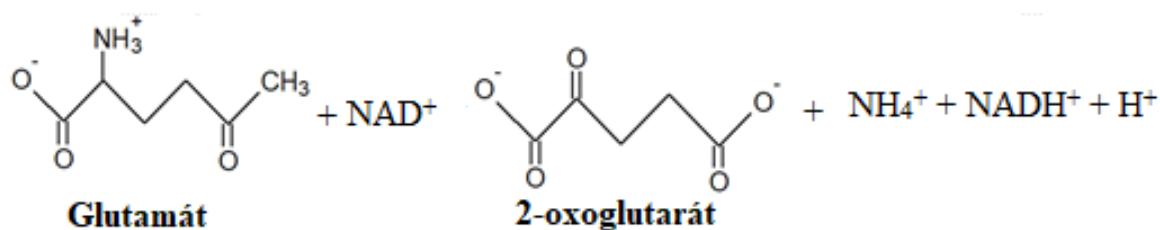
Pod pojmem transaminace (obrázek 4) se rozumí přenesení aminoskupiny z  $\alpha$ -aminokyseliny na  $\alpha$ -oxokyselinu, následně z  $\alpha$ -aminokyseliny vzniká  $\alpha$ -oxokyselina a z  $\alpha$ -oxokyseliny vzniká  $\alpha$ -aminokyselina. Nejvýznamnějšími akceptory aminoskupiny AMK jsou 2-oxoglutarát, oxalacetát a pyruvát. Jedná se o reakci reverzibilní, kofaktorem je pyridoxalfosfát [1, 2].



*Obrázek 4: Schéma transaminace*

### 1.5.3 Oxidativní deaminace

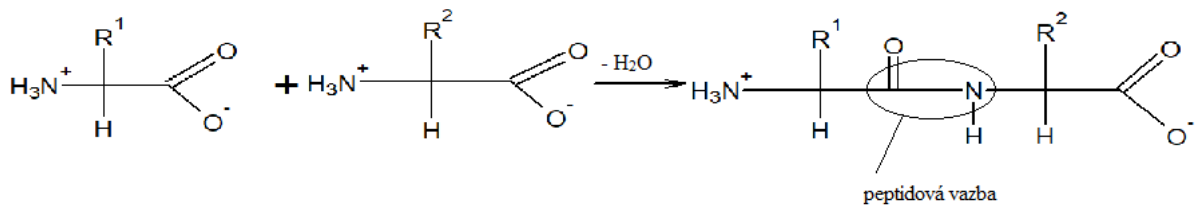
Při oxidativní deaminaci (obrázek 5) se aminoskupina přeměňuje na oxoskupinu za uvolnění amoniaku. Glutamát je jediná AMK, která se v lidském těle deaminuje dostatečnou rychlostí. Přeměnu katalyzuje mitochondriální glutamátdehydrogenasa. Vzniklý amonný kationt vstupuje do ornithinového cyklu a  $\alpha$ -oxoglutarát se může využít v transaminačních reakcích nebo vstupuje do citrátového cyklu. Jedná se o reverzibilní reakci [1, 5].



*Obrázek 5: Schéma oxidativní deaminace*

### 1.5.4 Tvorba peptidové vazby

Tvorba peptidové vazby (obrázek 6) je nejdůležitější reakcí, které podléhá skoro 90 % aminokyselin v organismu. Peptidová vazba se tvoří mezi aminoskupinou jedné AMK a karboxylovou skupinou druhé AMK. Tímto spojením dvou AMK vznikají dipeptidy, spojením tří AMK tripeptidy, a spojením více jak sto AMK vzniká bílkovina neboli protein [1].



**Obrázek 6:** Schéma tvorby peptidové vazby

### 1.6 Lidský pot

Pot neboli sudor (hidor) je vodnatý produkt apokrinních a ekrinních potních žláz. Jedná se o hypotonický roztok, který obsahuje mnoho látek. Hlavní složkou potu je voda, dále ionty sodné, vápenaté, chloridové a draselné. Dále obsahuje fosfáty, sírany, laktát, kyselinu močovou, močovinu, glukosu, vitamín C, biogenní aminy a AMK. Z AMK jsou nejvíce zastoupeny serin a glycin, dále pak arginin a histidin. AMK v potu udržují mírně kyselé pH [7].

Potem se mohou vylučovat mimo jiné i látky, které jsou pro organismus škodlivé. Jedná se například o těžké kovy jako jsou arsen, olovo, kadmium a rtuť, které mají toxické účinky a mohou poškozovat nervový, endokrinní, imunitní či kardiovaskulární systém [8].

Hodnota pH potu je za normálních okolností mezi 4,0-6,8. Během cvičení se sekrece potu zvyšuje, také stoupá pH, a to až na hodnotu 6,8. Organismus je schopný vyprodukovat přibližně 800- 1000 ml potu za den a během mimořádných situací to může být až 10 litrů. Sekrece potu je řízena hypothalamem na základě teploty krve. Sekrece potu, jeho složení a množství, může být ovlivněna mnoha faktory, ať už vnitřními, nebo vnějšími. Mezi vnější faktory patří věk, genetická dispozice, fyzická zátěž, zdravotní a psychický stav, strava [8, 9].

### **1.6.1 Tvorba potu**

Tvorba potu, pocení, hraje primární úlohu v termoregulaci. Pocení zabraňuje přehřátí organismu, jedná se o důležitý proces, díky kterému se udržuje stabilní tělesná teplota. Kůže se zvlhčuje, a tak dochází k ochlazení povrchu těla. Tvorba potu je daná aktivací potních (kožních) žláz a výrazně narůstá při zvýšení tělesné teploty. Existují dva druhy potních žláz, apokrinní a ekrinní žlázy, které jsou řízeny hormonálním nebo nervovým systémem [10].

Ekrinní potní žlázy pokrývají celé tělo, kromě rtů a genitálií. Nejvíce jsou zastoupeny na čele a dlaních. Ekrinní žlázy produkují kyselý roztok, který je čirý a obvykle bez zápachu. Apokrinní, nebo také označované jako aromatické žlázy, máme od narození, ale aktivními se stávají po dosažení pohlavní zralosti, v pubertě. Jsou podstatně větší než ekrinní žlázy a nacházejí se v pubické a podpažní oblasti. Apokrinní žlázy produkují malé množství potu, který vzhledově připomíná viskózní kapalinu s typickým zápachem a mírně kyselým pH. Tento pot je bohatý na tuky a bílkoviny, množí se zde bakterie, proto nepříjemně zapáchá.

Při pocení, které je vyvoláno zvýšenými teplotami nebo fyzickou námahou jsou aktivní pouze ekrinní žlázy, při pocení vyvolané psychicky stresujícími situacemi jsou aktivní ekrinní i apokrinní žlázy [11].

Pot se tvoří v drobných potních žlázách, tyto žlázy mají podobu jemného klubíčka, a jsou uloženy v kůži. Jakmile dojde k sekreci těchto žláz, což může být dáno při fyzické námaze, zvýšené teplotě, při stresových situacích nebo emocionálních zážitcích, začnou žlázy tvořit pot. Apikální části buněk se mění ve složky sekretu, přecházejí do lumina žlázy a odtud ústí do spirálovitě zatočeného vývodu z pokožky ven [12, 13].

### **1.6.2 Techniky odběru potu**

Vzorek potu odebíráme tak, aby nedošlo k narušení jakékoliv části organismu. Je zde hned několik metod odběru potu. Nejjednodušší odběr potu je jednorázovou pipetou nebo do skleněné lahvičky pro odběr potu přímo z pokožky během cvičení [14].

#### **1.6.2.1 Termálně vyvolané pocení**

Mezi úplně první metody patřilo termálně vyvolané pocení. Osoba se umístí do místnosti s vyšší teplotou (29-31 °C) a vlhkostí (20-40 %) po dobu 1-2 hodin, kde navíc může vyšetřovaný vyvíjet fyzickou aktivitu, např. šlapáním na rotopedu. Tuto metodu lze použít jak pro odběr potu z celého

povrchu těla, tak i pro lokální odběr. Vzorke se odebírají z čela, levého předloktí, či obou stehen. Pot se odebírá na neadherující podložku o rozměru 5x7 cm. Kůže se před odběrem očistí 70% isopropanolem a poté opláchne destilovanou vodou. Podložka se vloží na kůži a pevně stlačí. Poté se odebraný pot přenesse do zkumavky [15].

### **1.6.2.2 Pilokarpinová iontoforéza**

Pilokarpinová iontoforéza je metoda pro stimulaci produkce potu. Pilokarpin stimuluje potní žlázy k sekreci potu prostřednictvím muskarinových receptorů. Pilokarpin se aplikuje do kůže iontoforézou. Iontoforéza trvá asi 5 minut a je při ní použit stejnosměrný proud o intenzitě 2,5 až 3,0 mA. Pot je získán po ukončení iontoforézy v místě anody. Místem sběru potu u dospělých je nejčastěji předloktí a u dětí se pot odebírá z horní části zad. Výhodou metody je její rychlost, bezbolestnost, bezpečnost a spolehlivost. Tuto metodu představili v roce 1959 Gibson a Cooke [16, 17].

### **1.6.2.3 Perspiro 201**

Odběr vzorku potu může být prováděn přístrojem Perspiro 201 od firmy Suzuken. Před odběrem vzorku potu si umyjeme obě ruce mýdlem, poté je opláchneme studenou tekoucí vodou, nakonec 1% roztokem ethanolu a řádně je vysušíme papírovou utěrkou. Na pravý ukazováček aplikujeme sondu přístroje a vzniklý pot na špičce prstu odebíráme do 0,6ml polypropylenové lahvičky [18].

### **1.6.2.4 Macroduct®**

Jedná se o systém vyráběný firmou ELITech Group, který je určený pro stimulaci pocení a následný odběr vzorku potu (obrázek 7). Pot je sbírán z povrchu kůže do odběrového systému, obsahující kapiláry a kolektor. Před odběrem je nutné místo na kůži, kde bude odběr probíhat, očistit 70% alkoholem. Nejčastěji se pot odebírá na předloktí. Po očištění se na místo připojí elektrody suchým zipem. Zapne se přístroj a asi po dvaceti sekundách dochází ke stimulaci pocení. Pot, který je vylučován potními žlázami, je tlakem vytlačován do plastové spirálovité hadičky, která je zabudována v kolektoru. Při průchodu potu kolektorem dochází ke změně barvy, pot modrá. To je způsobeno tím, že pot v kolektoru přichází do kontaktu s malým množstvím barviva, a díky tomu můžeme sledovat průběh vylučování potu. Po ukončení odběru se elektrody odpojí od kůže



a přístroj se vypne. Pot se z kolektoru přenese injekční stříkačkou do mikrozkušavky. Celkové množství získaného potu tímto systémem je asi 50  $\mu\text{l}$  [14, 19].



*Obrázek 7: Macroduct<sup>®</sup>, přístroj pro odběr potu [20]*

#### **1.6.2.5 Metoda náplastí**

Pot můžeme odebírat jednoduchými savými materiály, jako je například gáza nebo materiál z bavlny. Jelikož tento způsob je časově náročný a získáváme jím jen malé množství potu, začaly se vyvíjet speciální náplastí. Náplast je složena z tenké průhledné adhezivní fólie, na které je vrstva lepidla a na ní je připojena adsorpční vložka. Lepidlo je vyvinuto tak, aby mohlo být použito pouze jednou a nemohlo být odstraněno a znovu nalepeno na povrch kůže. Náplast se lepí nejčastěji na horní část paže. Před aplikací je kůže očištěna alkoholem.

Nejznámější náplastí, která se používá pro sběr potu, je od firmy PharmCheck. Tato náplast se skládá z adhezivní polyuretanové fólie a adsorpční vložky. Jelikož fólie umožňuje průchod kyslíku, oxidu uhličitého a vody, může kůže volně dýchat. Už při teplotě 22 °C je náplast schopná zachytit minimálně 300  $\mu\text{l}$  potu za den. Fyzická zátěž a vyšší teplota umožňuje získat větší množství vzorku. Systém se ponechává připevněn na kůži i několik dnů, dokonce i týden. Tato metoda odběru má své výhody i nevýhody. Výhodou je snadná aplikace a získání relativně dostatečného množství potu za den. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena a nechtěné odstranění náplastí z odběrového místa [21, 22].

## 1.7 Metody stanovení aminokyselin

Stanovení hladin jednotlivých AMK v tělních tekutinách je důležité pro zhodnocení zdravotního stavu pacienta. Referenční hladiny jednotlivých AMK jsou závislé na věku a pohlaví. Pro stanovení hladin jednotlivých AMK se nejčastěji používají separační metody, jako jsou elektroforéza a chromatografie [23].

### 1.7.1 Plynová chromatografie

Hladiny AMK můžeme stanovit metodou plynové chromatografie (GC). Jedná se o separační metodu, která je založena na separaci látek mezi dvě fáze, fází pohyblivou (mobilní) a fází nepohyblivou (stacionární). V GC je mobilní fází nosný plyn. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující dusík, helium, vodík nebo argon. Stacionární fáze může být pevná látka (silikagel, oxid hlinitý, polymerní sorbenty) nebo kapalina, která je u náplňových kolon nanesená jako tenká vrstva na inertním nosiči umístěném v chromatografické koloně. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanesená v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Vzorek je nadávkován do proudu nosného plynu, následně je odpařen a unášen kolonou. V závislosti na rozpustnosti látek ve stacionární fází dochází k jejich separaci a postupné eluci z kolony. [24]. Separované látky vstupují do detektoru, kde jsou detegovány na základě svých fyzikálních vlastností. K detekci se nejčastěji používá plamenově ionizační detektor (FID), hmotnostní spektrometr (MS) či detektor elektronového záchytu (ECD) [24-27].

#### 1.7.1.1 Derivatizace aminokyselin při separaci plynovou chromatografií

Aminokyseliny jsou polární, tedy netěkavé látky, proto je musíme před GC analýzou převést na těkavější deriváty, tedy derivatizovat. Derivatizací také zvýšíme citlivost a selektivitu. AMK jsou nejčastěji silylovány, acylovány, esterifikovány či alkylovány.

Nejčastěji používanými derivatizačními činidly pro derivatizaci AMK jsou acylační činidla. Při acylaci dochází k náhradě aktivního vodíku v polární skupině (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) acylovou skupinou. Acylace je alternativou k silylacím a uplatňuje se při přípravě derivátů aminů, amidů, thiolů, alkoholů atd. Deriváty jsou charakterizované vysokou stabilitou, nižší polaritou a vysokou těkavostí. Ve srovnání se silylací, jsou acylace zaměřeny na vysoce polární a vícefunkční sloučeniny jako jsou např. sacharidy nebo aminokyseliny. Při přípravě derivátů se obvykle pracuje s několika molárním nadbytkem acylačního činidla ve vhodném rozpouštědle, které je schopné vázat vznikající kyselinu, a tím posouvat reakční rovnováhu ve směru tvorby produktu. Oproti silylačním činidlům

jsou acylační činidla hydrolyticky stabilnější. Běžně používanými acylačními činidly jsou anhydridy kyseliny trifluoroctové (TFAA), kyseliny pentafluorpropionové (PFPA) a kyseliny heptafluormásečné (HFBA), dále pak trifluoracetylimidazol (TFAI), pentafluorpropionylimidazol (PFPI) a heptafluorbutyrylimidazol (HFBI) [28-32].

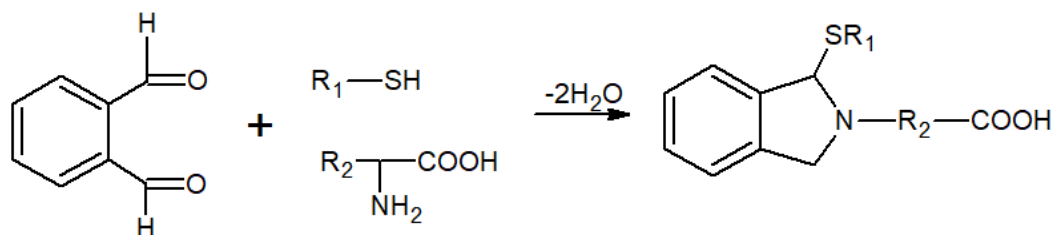
## 1.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je pro stanovení AMK v biologických vzorcích dominantní. Oproti klasické kapalinové chromatografii poskytuje účinnější separaci a je časově méně náročná. V HPLC se často můžeme setkat s pojmy "normální fáze" a "obrácená fáze". U normálních fází jsou na stacionární fázi navázány sloučeniny s polárními funkčními skupinami a mobilní fáze bývá nepolární rozpouštědlo, např. hexan. U obrácených fází, nebo také reverzních (RP), se používá chemicky vázaná nepolární stacionární fáze. Tento typ se využívá asi v 80 % všech aplikací [24, 33, 34].

### 1.7.2.1 Derivatizace aminokyselin při separaci kapalinovou chromatografií

Jelikož AMK neabsorbují v blízké UV oblasti záření a ani nefluoreskují, s výjimkou tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu, je nutné převést AMK na vhodné deriváty, které budou snadno detekovány UV/Vis nebo fluorescenčním detektorem. Běžně používanými derivatizačními činidly pro derivatizaci AMK stanovovaných metodou HPLC jsou ninhydrin, fenylisothiokyanát (PITC), naftylisothiokyanát, *p*-methoxybenzchlorid, *m*-toluylchlorid, benzoylchlorid, toluensulfonylchlorid (TSCI), *N,N'*-dimethylaminoazobenzensulfonylchlorid (DABSI), 2, 4-dinitro-1-fluorobenzen (DNFB), trinitrobenzensulfonová kyselina (TNBSA), *o*-ftaldialdehyd (OPA), naftalen-2,3 dikarboxaldehyd (NDA), dabsylchlorid (DBS-Cl) a 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (FMOC-Cl). Derivatizace může být provedena buď před separací, před kolonou (předkolonová derivatizace), nebo po separaci, za kolonou (postkolonová derivatizace), nebo přímo na koloně [2, 24, 35, 36, 37, 61].

*o*-Ftaldialdehyd (OPA) je známe derivatizační činidlo, které lze použít jak u předkolonové, tak také postkolonové derivatizaci. Toto činidlo reaguje pouze s primárními aminy za přítomnosti thiolové skupiny v bazickém prostředí. OPA vytváří s aminem isoindolové deriváty (obrázek 8) . Reakce probíhá velmi rychle, během několik minut, při pokojové teplotě a pH 9-11 [38].

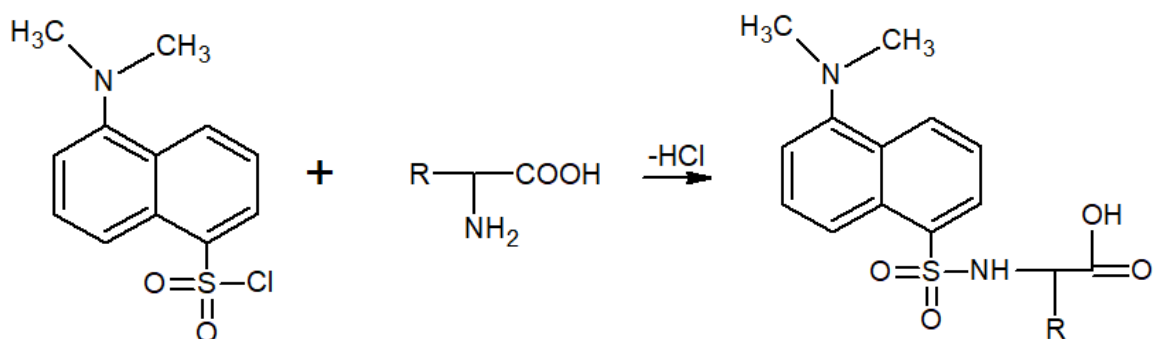


**Obrázek 8:** *Reakce o-ftaldialdehydu v přítomnosti thiolu s primárním aminem za vzniku isoindolového derivátu*

### Předkolonová derivatizace

Při předkolonové derivatizaci jsou vzniklé deriváty dávkovány na chromatografickou kolonu. Předkolonovou derivatizaci můžeme rozdělit na on-line a off-line. Při on-line derivatizaci je derivatizační reaktor součástí chromatografu. Předkolonová derivatizace má své výhody a nevýhody. Derivát musí být chemické individuum a dostatečně stabilní. Derivatizační reakce musí probíhat kvantitativně a pokud možno by měla být selektivní, bez vzniku vedlejších produktů a měla by probíhat za mírných reakčních podmínek. Při použití nadbytku derivatizačního činidla, musí být toto činidlo dobře separovatelné od vzniklých derivátů a nemělo by absorbovat či fluoreskovat při stejných vlnových délkách jako vzniklé deriváty [36, 39, 40].

Dansylchlorid je činidlo, které se převážně používá u předkolonové derivatizace. Reaguje jak s primárními, tak také sekundárními aminy, které jsou detegovány fluorescečním detektorem (obrázek 9). Reakce probíhá za zvýšené teploty (50-100° C) a v alkalickém prostředí po dobu 30- 120 minut [41].



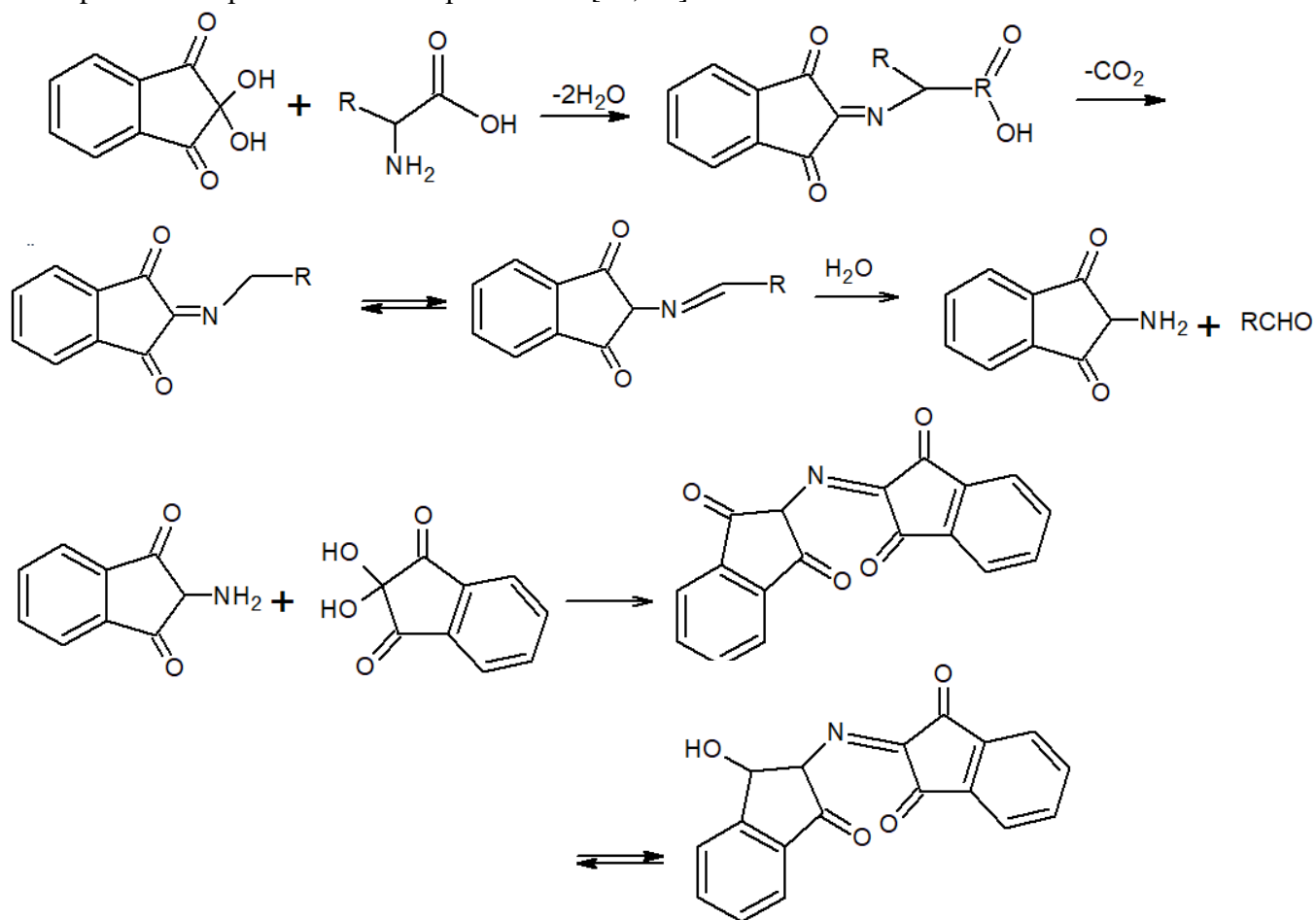
**Obrázek 9:** *Reakce dansylchloridu s aminem za vzniku dansylderavátu*

## Postkolonová derivatizace

Při postkolonové derivatizaci jsou AMK separovány na koloně a po výstupu z kolony jsou před vstupem do detektoru derivatizovány. Derivatizační reakce nemusí poskytovat jednoznačné chemické individuum, nemusí probíhat kvantitativně, musí však probíhat rychle. Může probíhat za extrémních podmínek, kdy se používá nadbytek reakčního činidla, což vede k rozmytí chromatografické zóny. Reakce může být neselektivní, vedlejší produkty reakce nevadí. Nevýhodou je použití finančně náročných post-kolonových reaktorů.

U postkolonové derivatizace se separované AMK nejčastěji derivatizují ninhydrinem, dabsylchloridem nebo fenylisothiokyanátem [36, 39].

Při post-kolonové derivatizaci ninhydrinem jsou AMK separovány iontově výměnnou chromatografií, vstupují do post-kolonového reaktoru, kde po dobu 1-2 minut, při teplotě 100-135 °C, reagují s 2 molekulami ninhydrinu za vzniku tzv. Ruhemannova purpuru s absorpčním maximem 570 nm (obrázek 10). AMK se se sekundární aminoskupinou (prolin, hydroxyprolin) poskytují komplex s absorpčním maximem při 440 nm [36, 42].



**Obrázek 10:** Reakce aminokyselin s ninhydrinem

### **1.7.2.2 Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií**

Nejdůležitější součástí chromatografického systému je separační kolona. V metodách HPLC se používají kolony z materiálů, které musí splňovat určité podmínky, a to odolávat relativně vysokým pracovním tlakům, chemickému působení separovaných složek a mobilních fází. Nejběžnější materiál je antikorozivní ocel nebo tvrzené borosilikátové sklo. Lze však použít kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají náplňové kolony, plněné pórovitými náplněmi o průměru 3-10  $\mu\text{m}$ , délce 5-30 cm a vnitřním průměru 3-4 mm. Délka kolony má vliv na dobu analýzy, účinnost separace a pracovní tlak, který se s rostoucí délkou kolony zvyšuje. S rostoucím průměrem částic naopak klesá. Dále se používají kolony o průměru menším než 2 mm, tzv. mikrokolony, výhodou je snížení spotřeby mobilní fáze a vzorku, také zvýšení citlivosti detekce. Pro plnění kolon se jako matrice nejčastěji používá silikagel, oxid hlinitý nebo pórovité sklo. Na matici je chemicky vázána nebo zakotvena stacionární fáze [43, 44].

### **1.7.2.3 Detektory v kapalinové chromatografií**

Detektory používané při HPLC lze rozdělit na selektivní, univerzální a speciální. Mezi selektivní detektory řadíme např. fluorimetrické, elektrochemické a hmotnostní [45].

Detektory UV-Vis jsou vhodné pro detekci látek, které dostatečně absorbují v UV nebo viditelné oblasti spektra. Detektor má celu, která je konstruovaná tak, aby nedocházelo k rozmývání elučních zón a zároveň, aby bylo dosaženo vysokého poměru signálu a šumu. Jako zdroj se používá polychromatické záření a dle typu konstrukce umožňuje měřit absorpční záření procházejícího vzorkem při jedné nebo dvou vlnových délkách. Snímání absorpce záření v celém spektru probíhá detektorem s diodovým polem. Spektrální rozlišení je dáno počtem fotodiod. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem. Při dopadu záření na fotodiodu vzniká elektrický proud, který vybije kondenzátor úměrně velikosti intenzity zářivého toku. Následně dochází k dobíjení kondenzátoru a měří se proud potřebný na jeho dobití [44, 45].

Fluorimetrické detektory jsou vysoce citlivé a selektivní. Fluoreskuje jen relativně malá skupina látek, která obsahuje ve své molekule tzv. fluorofor. Molekula je schopná po absorpci budícího záření emitovat záření o nižší energii, než mělo záření excitační. Intenzita emitovaného záření je zesílena a detekována fotonásobičem, který je umístěn kolmo na směr excitačního záření. U látek, které nevykazují přirozenou fluorescenci, je možno provést derivatizaci za vzniku fluoreskujícího derivátu [44].

Spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem je vysoce citlivé a selektivní. Hmotnostní spektrometr je zařízení, které měří podíl iontů jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a zaznamenává jejich intenzitu. Základní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Iontový zdroj slouží k převedení molekul vzorku na nabitě částice (na ionizovanou plynnou fázi). Proces ionizace může probíhat za sníženého nebo atmosférického tlaku. V současné době se jako iontový zdroj ve spojení HPLC-MS používá nejčastěji ionizace elektrosprejem, dále chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), popř. fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Hmotnostní analyzátor má za úkol vzniklé ionty rozdělit podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Hmotnostní analyzátor může být například kvadrupól (Q), iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF) nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Typické jsou jejich kombinace, dvou kvadropólů (QqQ), kvadrupólu s průletovým analyzátozem (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem, iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí (IT-ICR) a mnoho dalších. Jako detektor se využívá elektronový násobič nebo fotobásobič, který slouží k detekci iontů po jejich rozdělení a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Výstupem hodnocení je tedy hmotnostní spektrum [24, 45, 46].

#### 1.7.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie v poslední době našla velké uplatnění v rutinních laboratořích, ať už při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických chorob, tak při stanovení celé řady metabolitů, jako jsou AMK, organické kyseliny, puriny a pyrimidiny, v biologických vzorcích. V neposlední řadě se využívá při monitorování hladin léků [47].

Během posledních let se kombinace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) vyvinula v životně důležitou technologii. Jedná se o výkonnou kvalitativní a kvantitativní analytickou techniku se širokou škálou klinických aplikací v toxikologii, endokrinologii, pediatrii, či mikrobiologii [32].

Princip tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je založen na spojení hmotnostních analyzátorů v sérii. Existuje mnoho kombinací hmotnostních analyzátorů jako například TOF/TOF, FT-ICR, Q-TOF, QqQ, apod. [14].

Typickým zástupcem pro kvantitativní analýzu je trojitý kvadrupól (QqQ). Jedná se o tři kvadrupóly řazené za sebou. První a třetí kvadrupól slouží jako hmotnostní analyzátor, zatímco druhý kvadrupól je kolizní celou. V kolizní cele se prekurzorové ionty srazí s molekulami plynu (například argonu) a jsou fragmentovány na menší ionty označované jako produktové ionty.

MS/MS má řadu výhod, jako je selektivní výběr zkoumaných iontů, možnost fragmentace těchto iontů, analýza jejich fragmentů a je významná pro strukturní analýzu látek [47, 48].

LC-MS/MS nabízí spolehlivou metodu pro stanovení hladin různých metabolitů v různých biologických vzorcích.

### 1.7.2.5 Elektroforetické techniky

Pro stanovení hladin AMK v biologickém materiálu lze také použít elektroforetické techniky. Výhodou těchto technik oproti HPLC je malá spotřeba vzorku, vyšší účinnost separace a krátká doba analýzy. Pro derivatizaci AMK používáme stejná činidla jako u HPLC a můžeme použít i stejný typ detektorů [2].

Mezi elektroforetické techniky, které lze použít pro stanovení hladin AMK v biologických vzorcích, patří kapilární elektroforéza (CE). Principem této techniky je, že elektricky nabitě látky (molekuly) migrují v elektrolytu při stejnosměrném elektrickém poli a dělí se na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí v kapiláře z taveného křemene. Tato technika nevyžaduje derivatizaci AMK. Kvůli velmi malému průměru kapiláry musíme zvolit velmi citlivé detektory. Jedná se o detektory, které sledují absorpci UV/Vis záření nebo fluorescenci, případně může být použit jako detektor hmotnostní spektrometr [39, 49, 50].

Mezi méně běžné metody stanovení AMK elektroforetickými technikami patří modifikace kapilární elektroforézy, jako je například micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) nebo mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC).

MEEKC byla původně vytvořena pro separaci nenabitých látek. Jedná se o techniku, kde se látky dělí mezi micely (pseudostacionární fázi) a vodný pufr (mobilní fáze). Nastavení systému a detekce je stejná jako u CE, rozdíl je jen v tom, že základní elektrolyt obsahuje relativně vysokou koncentraci povrchově aktivních látek, která je vyšší než kritická. Jako povrchově aktivní látka se nejčastěji používá dodecylsulfát sodný (SDS) nebo se může také použít cetyltrimethylammoniumbromid, žlučové soli a další. Při koncentraci povrchově aktivních látek nad určitou mez, než je tzv. kritická micelární koncentrace, začnou spolu povrchově aktivní molekuly agregovat a vytvářejí micely. Ve vnější vrstvě micel jsou umístěny hydrofilní skupiny, hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro, kde se mohou rozpouštět látky analyzovaného vzorku. Ve většině případech se MEKC provádí v otevřených kapilárách s pufrem o vysokém pH, vytvoří se tak silný elektroosmotický tok (EOF). Micely SDS mají záporný náboj a migrují proti EOF, který je dostatečně silný na to, aby unášel látky k detektoru [24, 49].



Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí (CE-LIF) je vysoce účinná, rychlá a selektivní metoda pro stanovení AMK, po jejich derivatizaci, v biologických vzorcích. [51, 52].

## **1.8 Stanovení aminokyselin v krvi**

Krev patří mezi nejvhodnější biologický materiál pro stanovení AMK. Stanovení hladin AMK je důležité při diagnostice některých metabolických onemocnění a k určení výživového stavu jedince. Hladiny AMK můžeme také stanovit v krevní plazmě, na základě výsledků lze například s předstihem poukázat na vznik onemocnění *diabetes mellitus* [53, 54].

### **1.8.1 Technika suché kapky krve**

Technika suché kapky krve (DBS, z angl. dried blood spot) je nejčastěji používaná při novorozeneckém screeningu pro diagnostiku vrozených metabolických chorob. Tato technika má mnoho výhod, jako je malé množství odebraného vzorku, méně invazivní a bezbolestný odběr, snadné uchovávání, jednoduchý transport a stabilita stanovovaných látek. Odběr kapilární krve se provede buď z prstu, ušního lalůčku anebo patičky (při novorozeneckém screeningu). Kapka kapilární krve se nanese na odběrovou kartičku ze speciálního filtračního papíru a nechá se zaschnout (sušení probíhá při pokojové teplotě alespoň po dobu tří hodin). Po zaschnutí, nejlépe ze středu skvrny, se vyrází terčík o průměru 3-6 mm. Následuje extrakce látek vhodným rozpouštědlem nebo pufrem [55].

## **1.9 Stanovení aminokyselin v moči**

Aminokyseliny jsou vylučovány močí jen v malém množství, protože jsou v tubulech aktivně resorbovány. Zvýšená koncentrace některých AMK v moči je obvykle patologická, hovoříme o tzv. aminoacidurii. Aminoacidurie může být důsledkem dědičné metabolické poruchy. Zvýšené hladiny AMK v moči mohou být ukazatelem různých degenerativních onemocnění a neurologických poruch. Mezi diagnostikované metabolické poruchy AMK patří cystinurie, fenyketourie či tyrosinemie. Hladiny AMK v moči jsou stanoveny stejnými metodami jako u vzorků krve [56].

## **1.10 Stanovení aminokyselin v potu**

Hladiny AMK jsou nejčastěji stanovovány v krvi, séru, plazmě a moči. Existují však i méně běžné biologické vzorky, ve kterých jsou hladiny AMK stanovovány, jedním z nich je pot, který může být získán neinvazivním způsobem odběru [57].

### **1.10.1 Technika suché kapky**

U techniky suché kapky potu (DSS, z angl. dried sweat spot) se, na rozdíl od odběru krve, jedná o neinvazivní způsob odběru vzorku, nehrozí téměř žádné riziko infekce a můžeme odběr provádět, kolikrát potřebujeme. Další výhodou je jednoduchý transport vzorku do laboratoře a stabilita stanovovaných látek. Postup je podobný jako u DBS. Odběr potu probíhá nejčastěji z čela během cvičení. Pot je odebírán na speciální filtrační papír, stačí přibližně 20-30  $\mu\text{l}$ . Vzorek potu necháme zaschnout při pokojové teplotě, poté vysekne terčík o průměru 6 mm, který převedeme do uzavíratelné skleněné zkumavky. Provedeme extrakci látek rozpouštědlem, jako je například methanol a analyzujeme [55, 57].

## **2 Cíl práce**

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce potu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Vzorky potu, charakteristika sledované skupiny dobrovolných dárců

Vzorky potu byly získány od čtyřiceti dobrovolných dárců (20 žen a 20 mužů), ve věku 11-43 let (tabulka 3). Pot byl odebírán při fyzické námaze (kondiční cvičení, házená, volejbal, jízda na kole). Pot byl odebírán z čela. Čelo bylo nejprve otřeno 70% roztokem ethanolu, poté deionizovanou vodou. První kapky potu byly otřeny čistou gázou, další byly sbírány na speciální odběrový filtrační papír (odběrovou kartu) Whatman 903 (Whatman, Dassel, Německo). Vzorky DSS byly před analýzou uchovávány při -20 °C.

*Tabulka 3: Charakteristika (pohlaví, věk) sledované skupiny dobrovolných dárců a typ cvičení pro získání vzorku potu*

Vzorek	Pohlaví	Věk	Typ cvičení	Vzorek	Pohlaví	Věk	Typ cvičení
1	žena	35	jízda na kole	21	muž	20	házena
2	žena	34	jízda na kole	22	muž	20	házena
3	žena	20	jízda na kole	23	muž	21	házena
4	muž	30	jízda na kole	24	muž	21	házena
5	muž	36	jízda na kole	25	muž	20	házena
6	žena	27	kondiční cvičení	26	žena	13	volejbal
7	žena	33	kondiční cvičení	27	žena	43	kondiční cvičení
8	muž	33	kondiční cvičení	28	žena	14	volejbal
9	žena	11	volejbal	29	žena	14	volejbal
10	žena	12	volejbal	30	žena	13	volejbal
11	žena	13	volejbal	31	žena	13	volejbal
12	žena	13	volejbal	32	žena	15	volejbal
13	muž	20	házena	33	žena	19	volejbal
14	muž	21	házena	34	muž	16	kondiční cvičení
15	muž	20	házena	35	žena	40	kondiční cvičení
16	muž	19	házena	36	muž	28	kondiční cvičení
17	muž	20	házena	37	žena	28	kondiční cvičení
18	muž	19	házena	38	žena	38	kondiční cvičení
19	muž	22	házena	39	muž	40	kondiční cvičení
20	muž	21	házena	40	muž	36	kondiční cvičení

## 3.2 Chemikálie

- Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); Mr 41,05; (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Deionizovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ ); Mr 18,00;  $G = 0,055 \mu\text{S}$
- Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ); Mr 46,07; (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2$ ); Mr 184,19; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- Kyanid draselný (KCN); Mr 65,12; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); Mr 119,98; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina boritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ); Mr 61,83; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH); Mr 40,00; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková (HCl); Mr 36,46; (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)
- L-Alanin ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ ); Mr 89,09; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Arginin monohydrochlorid ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ ); Mr 210,66; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagin ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ); Mr 132,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagová kyselina ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ ); Mr 133,1; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Citrulin ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ); Mr 175,2; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Fenylalanin ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ); Mr 165,19; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamin ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ ); Mr 146,15; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamová kyselina ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ); Mr 147,13; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ); Mr 75,07; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Histidin ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ ); Mr 155,15; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Isoleucin ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ ); Mr 131,18; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Leucin ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ ); Mr 131,18; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Lysin monohydrochlorid ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ ); Mr 182,65; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- L-Methionin (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S); Mr 149,21; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L -Norleucin (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>); Mr 131,17; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Serin (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>); Mr 105,09; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Threonin (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>); Mr 119,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tryptofan (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Mr 204,23; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tyrosin (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>); Mr 181,19; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Valin (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>); Mr 117,15; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Taurin (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S); Mr 125,14; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

### 3.3 Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
  - čerpadla LC-20<sub>AD</sub>
  - autosampler SIL-20<sub>AC</sub>
  - termostat kolon CTO-20<sub>AC</sub>
  - odvzdušňovač mobilní fáze DGU-20<sub>A5</sub>
  - fluorescenční detektor RF-20<sub>A</sub>
  - řídicí systém CBM-20<sub>A</sub>
  - software LabSolution, verze 5.97 SP1
- analytická kolona Ascentis Express 150 x 4,6 mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- předkolona Ascentis Express 5 x 4,6 mm, 5 μm, (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- analytické váhy Adventurer<sup>TM</sup> Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- mrazicí box (Liebherr, Biberach, Německo)
- vortex Reax top (Heidolph, Frankfurt, Německo)
- odstředivka OHAUS<sup>®</sup> Frontier<sup>TM</sup> 5706 (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- automatické mikropipety
- polypropylenové (PP) zkumavky; 1,5 ml (Fisher Scientific, spol. s r. o., Pardubice, ČR)
- skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, spol. s r. o., Pardubice, ČR)
- odběrové karty Protein Saver<sup>TM</sup> 903<sup>TM</sup> (Whatman<sup>TM</sup>, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Dassel, Německo)
- Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, , porozita 0,22 μm (Supelco, Bellefonte, USA)
- nylonové filtry pro filtrování vzorků, Spin-X<sup>®</sup>, porozita 0,22 μm (Costar<sup>®</sup>, Corning , NY, USA)

- ultrazvuková lázeň
- kádinky, odměrné baňky

### 3.4 Pracovní roztoky

#### Deionizovaná voda

Deionizovaná voda, určena pro propláchnutí HPLC systému, byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,22  $\mu\text{m}$  a odvzdušněná ultrazvukem.

#### Směs acetonitrilu a 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného (5:95, v/v)

Navážka 1,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  byla rozpuštěna v 950 ml deionizované vody, po rozpuštění bylo přidáno 50 ml acetonitrilu, pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 7,2 asi 6mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2  $\mu\text{m}$  a ovzdušněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

#### Směs acetonitrilu a 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného (65:35, v/v)

Navážka 0,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  byla rozpuštěna v 350 ml deionizované vody, po rozpuštění bylo přidáno 650 ml acetonitrilu, pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 7,2 asi 6mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2  $\mu\text{m}$  a ovzdušněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

#### Zásobní roztoky aminokyselin

Zásobní roztoky jednotlivých AMK byly připraveny rozpuštěním navážek v 10 ml deionizované vody, vyjma tyrosinu a kyseliny glutamové, ty byly rozpuštěny v 50 ml deionizované vody (tabulka 4). Zásobní roztoky byly po 1 ml pipetovány do 1,5 ml PP zkumavek a uchovávány při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabulka 4: Příprava zásobních roztoků aminokyselin**

AMK	Navážka (g)	Koncentrace (mmol/l)	AMK	Navážka (g)	Koncentrace (mmol/l)
Ala	0,0907	101,8	Leu	0,1065	81,2
Arg	0,2101	99,7	Met	0,1440	96,5
Asn	0,1329	100,6	Phe	0,1328	80,4
Asp	0,0283	21,3	Ser	0,1077	102,5
Cit	0,1744	99,5	Tau	0,1271	101,6
Gln	0,1488	101,8	Thr	0,1189	99,8
Glu	0,2215	30,1	Trp	0,0620	30,4
Gly	0,0784	104,4	Tyr	0,0098	1,1
His	0,1568	101,1	Val	0,1141	97,4
Ile	0,1325	101,0			

Zásobní roztok vnitřního standardu norleucinu (asi 22,5 mmol/l)

Navážka 0,0295 g norleucinu byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Zásobní roztok byl po 1 ml pipetován do 1,5 ml PP zkumavek a uchováván při -80 °C.

Pracovní roztok vnitřního standardu norleucinu (asi 10 µmol/l)

Objem 90 µl zásobního roztoku norleucinu byl naředěn ethanolem do objemu 10 ml. Tento roztok byl dále 20x naředěn ethanolem v množství potřebném pro přípravu vzorků v jednom dni.

Směsný pracovní roztok aminokyselin, standard aminokyselin S5

Směsný pracovní roztok AMK byl připraven pipetováním odpovídajícího množství zásobního roztoku jednotlivé AMK (tabulka 5) do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněním po rysku deionizovanou vodou.



**Tabulka 5:** Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standardu S5

AMK	Objem (μl)	Koncentrace (μmol/l)	AMK	Objem (μl)	Koncentrace (μmol/l)
Ala	370	1507	Leu	230	747
Arg	125	499	Met	25	97
Asn	60	241	Phe	155	498
Asp	590	502	Ser	490	2009
Cit	250	995	Tau	25	102
Gln	125	509	Thr	125	499
Glu	415	500	Trp	415	504
Gly	480	2005	Tyr	2300	100
His	375	1516	Val	195	760
Ile	125	505			

Standardy pro sestavení kalibrační křivky

Jednotlivé standardy pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny ředěním standardu S5 deionovanou vodou (tabulka 6)

**Tabulka 6:** Příprava standardů pro sestavení kalibrační křivky

Standard	Standard S5 (μl)	Voda (μl)
S0	0	20
S1	20	380
S2	20	180
S3	20	80
S4	50	50

Borátový pufr (asi 0,1 mol/l)

Navážka 0,31 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> byla rozpuštěna v 50 ml deionované vody, pH bylo upraveno na hodnotu 9,3 asi 6mol/l hydroxidem sodným. Borátový pufr byl uchováván při 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

#### Roztok kyanidu draselného (asi 40 mmol/l)

Navážka 0, 0130 g KCN byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody. Roztok KCN byl uchováván při 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

#### Roztok naftalen-2,3-dikarboxaldehydu v ethanolu (asi 1 mg/ml)

Navážka 0, 0100 g naftalen-2,3-dikarboxaldehydu (NDA) byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu. Roztok byl uchováván při -80 °C maximálně po dobu 1 měsíce.

### **3.5 Postup stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce potu**

Aminokyseliny byly derivatizovány NDA, vzniklé deriváty separovány na reverzní fázi a detegovány fluorescenčním detektorem.

#### **3.5.1 Příprava vzorků**

Pro analýzu AMK v DSS byl ze středu odběrové karty vyseknut terčík o průměru 6 mm (odpovídá 10 µl potu) a umístěn do 1,5 ml PP zkumavky. Na povrch terčíku bylo pipetováno 50 µl deionizované vody a AMK byly eluovány 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo k terčíku přidáno 150 µl roztoku norleucinu (asi 10 µmol/l) a PP zkumavka byla umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázni. Po vyjmutí zkumavky z ultrazvukové lázni byl obsah zkumavky inkubován 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavky odstředěn (1 minuta, 1000 x g, laboratorní teplota), 100 µl supernatantu přeneseno do 1,5ml vialky z hnědého skla, přidáno 300 µl borátového pufru, 20 µl roztoku KCN a 20 µl roztoku NDA v ethanolu. Obsah vialky byl řádně promíchán a směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Standardy byly zpracovány stejným způsobem, jen namísto terčíku bylo do 1,5ml PP zkumavky pipetováno 10 µl (odpovídá objemu potu v 6mm terčíku) jednotlivého směšného standardu AMK a přidáno namísto 50 µl deionizované vody, jen 40 µl.

### 3.5.2 Podmínky pro stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

- Průtok mobilní fáze: 0,75 ml/min
- Tlak na čerpadlech: maximální 20,0 MPa, minimální 2,0 MPa
- Teplota kolony: 37 °C
- Vzorky před nástřikem chlazeny při 8 °C
- Objem dávkovaného vzorku: 5 µl
- Detektor:      $\lambda$  (excitační) 420 nm  
                   $\lambda$  (emisní) 480 nm  
                  teplota cely 37 °C  
                  citlivost: nízká  
                  zesílení:  $\times 4$
- Eluce: gradientová

Mobilní fáze A: směs acetonitrilu a 10mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5:95, v/v), pH 7,2

Mobilní fáze B: směs acetonitrilu a 10mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (65:35, v/v), pH 7,2

- 0,01 min, 20 % B
- 20,00 min, 32 % B
- 35,00 min, 54,5 % B
- 35,01 min, 100 % B
- 40,00 min, 100 % B
- 40,01 min, 20 % B
- 45,00 min, STOP

### 3.5.3 Analytické parametry metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

#### Linearita

Linearita je přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Interval mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou stanovované látky, v němž je látka stanovována s určitou přesností, správností a linearitou se nazývá lineární rozsah. Lineární závislost dvou vzájemně zkoumaných veličin lze pak vyjádřit jako:

$$y = ax + b$$

a – úsek na ose y

b – směrnice kalibrační křivky

Důležitým parametrem je tzv. korelační koeficient (R), který charakterizuje těsnost shody dvou analyzovaných proměnných. V případě lineární závislosti nabývá korelační koeficient hodnot  $\pm 1$ , přičemž čím více se R blíží jedné, tím těsnější je shoda veličin [60].

#### Přesnost

Přesnost je vyjádřena jako shoda mezi opakovanými analýzami téhož vzorku za stejných podmínek. Jako míra přesnosti se používá variační koeficient CV (%).

$$s = \frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}$$

$$CV (\%) = \frac{s}{AVG} \times 100,$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka,  $AVG$  je průměrná hodnota,  $x_i$  je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii a  $n$  je počet vzorků.

Přesnost metody může být ověřena na třech úrovních, opakovatelností (přesnost metody za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu), mezilehlou přesností (shoda výsledků v rámci jedné laboratoře, ale v jiném dni, jiným přístrojem nebo jiným laboratorním pracovníkem) a reprodukovatelností (shoda výsledků mezi různými laboratořemi).

### Mez detekce a Mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) spolu úzce souvisí. Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. V separačních metodách se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie.

$$LOQ = \frac{10 \times h}{m}$$

$$LOD = \frac{3 \times h}{m},$$

kde  $h$  je šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky.

### **3.6 Zpracování výsledků**

Pro zpracování získaných výsledků byl použit program MS Excel a STATISTICA 12 (StatSoft CR s.r.o., Praha, ČR).

## 4 Výsledky a diskuse

Již několik studií se zabývalo stanovením vybraných AMK v lidském potu [15, 58, 59]. Pro kvantitativní stanovení vybraných AMK v potu lze použít hned několik metod, které jsou popsány v teoretické části. Metodou HPLC s fluorescenční detekcí se nám podařilo stanovit hladiny 19 AMK v potu všech dobrovolných dárců.

### 4.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Pro citlivé a správné stanovení AMK v biologických vzorcích je důležité metodu derivatizace optimalizovat. Optimalizována byla teplota a čas reakce, složení reakční směsi a také množství derivatizačního činidla. V této práci jsme jako derivatizační činidlo použili NDA. Derivatizační krok byl optimalizován k získání maximální výtěžnosti 1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových (CBI) derivátů AMK. Maximální fluorescence byla dosažena po patnáctiminutové inkubaci při laboratorní teplotě, kdy složení reakční směsi bylo následující: 18  $\mu\text{g}$  NDA a 52  $\mu\text{g}$  KCN v 68mmol/l borátovém pufru, pH 9,3. Reakce je celkem rychlá a probíhá již za laboratorní teploty. Zjistili jsme, že stabilita CBI derivátů je minimálně 48 h, pro deriváty většiny AMK dokonce při laboratorní teplotě. Výjimkou jsou deriváty serinu, threoninu a methioninu, jejichž deriváty jsou stabilní pouze po dobu 24 h při 8 °C. Vzniklé deriváty byly detegovány při emisní vlnové délce 480 nm s excitací při 420 nm. Bylo optimalizováno i složení mobilní fáze pro získání relativně nejlepší separace CBI derivátů jednotlivých AMK, v co nejkratším čase. Pro optimalizaci metody byl použit směsný standard AMK a směsný vzorek potu, který byl smíchaný z několika vzorků potu dárců. Byla testována celá řada mobilních fází, především směsi různých pufrů a organických rozpouštědel, jako jsou ACN, methanol a ethanol a řada sekvencí gradientové eluce. Kritéria byla rozlišení, stabilita fluorescence a rychlost analýzy.

### 4.2 Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů

Analýzou jednotlivých standardů AMK byly určeny retenční časy (RT) odpovídajících derivátů AMK (tabulka 7). Variační koeficienty retenčních časů se pohybovaly pod 5 %. V příloze 1 je chromatografický záznam stanovení vybraných AMK v lidském potu metodou HPLC s fluorescenční detekcí, přílohy 1A-1D jsou přiblížením přílohy 1.

**Tabulka 7:** Retenční časy derivátů aminokyselin za podmínek uvedených v experimentální části

AMK	RT (min)	AMK	RT (min)	AMK	RT (min)	AMK	RT (min)
Asp	3,1	Ser	11,9	Ala	20,1	Trp	30,6
Glu	4,0	Cit	13,0	Tyr	21,4	Ile	32,1
Asn	9,4	Arg	15,0	Tau	21,9	Phe	32,5
His	10,8	Gly	16,1	Val	28,9	Leu	33,0
Gln	11,3	Thr	16,4	Met	29,4	Nleu (IS)	33,5

Nleu, norleucin, IS, vnitřní standard

### 4.3 Analytické parametry metody stanovení aminokyselin v potu

#### 4.3.1 Linearita

Pro kvantifikaci hladin vybraných AMK v lidském potu získaném technikou DSS byla použita metoda kalibrační křivky. Parametry 5 kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 8.

Zkoušeli jsme také kvantifikovat hladiny vybraných AMK v lidském potu z kalibračních křivek, kde jednotlivé standardy byly připraveny technikou suché kapky. K potu jsme přidali směsný standard s pětinašobně vyšší koncentrací AMK, než byly u standardu S5. K 4 dílům potu jsme přidali 1 díl směsného standardu AMK a tak jsme získali směsný standard S5 připravený v potu se stejnými koncentracemi jako v případě směsného standardu AMK S5, připraveném v deionizované vodě. Další standardy S1-S4 byly připraveny stejným způsobem, jak je uvedeno v tabulce 6, jen namísto deionizované vody jsme ředili standard S5 potem, standard S0 byl samotný pot. Takto připravené standardy jsme nakapali (asi 30  $\mu$ l) na speciální odběrový filtrační papír (odběrovou kartu) Whatman 903. Vzorky potu jsme nechali zaschnout při laboratorní teplotě po dobu asi 3 hodin, po zaschnutí jsme ze středu vysekli 6mm terčík, ten vložili do 1,5ml PP zkumavky a takto uchovávali do doby analýzy při -20 °C. Standardy S0-S5, připravené v potu, jsme zpracovávali stejným způsobem jako vzorky DSS dobrovolných dárců (viz kapitola 3.5.1). Získali jsme podobné výsledky, což nám potvrdilo, že 6mm terčík obsahuje 10  $\mu$ l potu a že se AMK z terčíku téměř ze 100 % extrahují.

### 4.3.2 Nepřesnost v sérii

Pro určení nepřesnosti v sérii byl vzorek potu desetkrát analyzován (10 vzorků stejného potu) v ten samý den, za stejných podmínek a při použití jedné kalibrační křivky. Variační koeficienty (CV), vyjadřující nepřesnost metody v sérii jsou uvedeny v tabulce 9. Kromě taurinu se variační koeficienty nepřesnosti pohybovaly pod 10 %. Pro biologické vzorky a především pro biologické vzorky získané technikou suché kapky jsou výsledky uspokojivé.

**Tabulka 8:** Mez stanovitelnosti, mez detekce a průměrné parametry 5 kalibračních křivek metody vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

AMK	Směrnice AVG (SD.10 <sup>-6</sup> )	Intercept AVG (SD) μmol/l	Korelační koeficient	LOQ μmol/l	LOD μmol/l	Pracovní rozmezí μmol/l
Asp	0,0053 (71)	0,0051 (0,0020)	0,9995	3,8	1,3	3,8-501,8
Glu	0,0055 (40)	-0,0044 (0,0023)	0,9997	4,1	1,4	4,1-499,8
Asn	0,0054 (8)	0,0018 (0,0010)	0,9996	1,8	0,6	1,8-241,4
His	0,0052 (4)	-0,0064 (0,0096)	0,9998	18,3	6,0	18,3-1516,0
Gln	0,0055 (10)	-0,0056 (0,0032)	0,9998	5,8	1,9	5,8-509,1
Ser	0,0047 (225)	0,0343 (0,0111)	0,9997	23,7	7,8	23,7-2008,7
Cit	0,0055 (3)	0,0282 (0,0063)	0,9997	11,5	3,8	11,5-995,5
Arg	0,0054 (107)	-0,0038 (0,0023)	0,9998	4,2	1,4	4,2-498,7
Gly	0,0060 (51)	-0,0168 (0,0057)	0,9998	9,5	3,1	9,5-2005,2
Thr	0,0047 (236)	0,0133 (0,0023)	0,9995	4,9	1,6	4,9-499,1
Ala	0,0055 (24)	-0,0050 (0,0026)	0,9997	4,7	1,5	4,7-1506,7
Tyr	0,0055 (5)	0,0007 (0,0005)	0,9997	1,0	0,3	1,0-99,5
Tau	0,0061 (55)	-0,0010 (0,0007)	0,9997	1,2	0,4	1,2-101,6
Val	0,0057 (51)	0,0065 (0,0036)	0,9997	6,3	2,1	6,3-759,7
Met	0,0055 (26)	-0,0001 (0,0004)	0,9998	0,7	0,2	0,7-96,5
Trp	0,0032 (6)	0,0004 (0,0008)	0,9997	2,5	0,8	2,5-503,9
Ile	0,0055 (32)	0,0018 (0,0022)	0,9997	3,9	1,3	3,9-505,0
Phe	0,0055 (32)	0,0025 (0,0020)	0,9997	3,7	1,2	3,7-498,4
Leu	0,0058 (31)	-0,0012 (0,0038)	0,9997	6,6	2,2	6,6-746,9

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka. Mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) a mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) byly vypočteny z následujících rovnic:  $LOQ = 10 S_a/b$ ;  $LOD = 3,3 S_a/b$ , kde  $S_a$  je standardní odchylka interceptu a  $b$  je průměrná směrnice kalibračních křivek;  $x$ -intercept (μmol/l) je bod, ve kterém křivka protíná osu  $x$  (kde hodnota  $y = 0$ )



**Tabulka 9:** *Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v potu technikou suché kapky a metodou vysokoučinné kapalínové chromatografie s fluorescenční detekcí*

AMK	AVG ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	CV (%)	AMK	AVG ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	CV (%)
Asp	125,8	8,4	6,7	Ala	163,9	10,0	6,1
Glu	120,0	8,5	7,1	Tyr	58,2	4,1	7,0
Asn	45,5	3,1	6,8	Tau	9,6	1,5	15,3
His	162,8	8,5	5,2	Val	72,1	6,3	8,7
Gln	42,1	4,0	9,4	Met	6,3	0,3	4,8
Ser	493,6	25,5	5,2	Trp	38,4	2,9	7,5
Cit	115,3	7,7	6,6	Ile	42,2	3,3	7,8
Arg	131,8	9,6	7,3	Phe	43,1	3,4	7,9
Gly	281,5	18,5	6,6	Leu	64,8	4,5	6,9
Thr	127,3	8,4	6,6				

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

#### 4.4 Základní statistická analýza naměřených dat

Základní statistická analýza naměřených dat je shrnuta v následujících tabulkách (10- 13) a příloze 2. Hladiny vybraných AMK v lidském potu dobrovolných dárců (20 žen a 20 mužů), stanovené metodou HPLC s fluorescenční detekcí, jsou uvedeny v tabulce 10. Pot byl odebrán technikou suché kapky při tělesné námaze (kondiční cvičení, házená, volejbal, jízda na kole). Vzorky potu byly odebírány z čela, které bylo prvně otřeno gázou s alkoholem, aby se odstranily látky, které by mohly interferovat se stanovením a zkreslily by výsledky. Poté bylo čelo otřeno gázou namočenou v deionizovanou vodě, aby se odstranil z čela alkohol. Prvních několik kapek potu bylo otřeno do gázy a až ty další byly odebírány na filtrační papír. Tímto způsobem jsme zajistili reprezentativní odběr vzorku potu. Z výsledků je patrné, že hladiny AMK v potu se u jednotlivých dárců významně liší, což je dáno velkým rozptylem naměřených dat (hodnoty mezikvartilového rozpětí jsou vzhledem k mediánu velmi vysoké). Další zajímavostí je, že hladiny všech AMK v potu jsou u žen výrazně vyšší oproti mužům (tabulka 11), u některých AMK až dvojnásobně, avšak pouze hladiny 4 AMK (citrulin, glycin, alanin a taurin) jsou vyšší statisticky významně, což je dáno velkým rozptylem. Pot jako biologický vzorek je pro stanovení hladin různých látek stejně komplikovaný jako například moč. V porovnání s krví, kde je hladina

AMK regulována, se AMK potem vylučují zřejmě neřízeně a jejich hladiny závisí na množství vody v potu a rychlosti pocení. Podobný problém je s močí. Moč ale můžeme sbírat po dobu 24 hodin a pak určíme množství dané látky za 24 hodin, případně můžeme množství látky vztáhnout na množství látky, která se ledvinami prakticky 100% vylučuje, tzv. bezprahovou látku. Touto látkou může být například kreatinin, pak se koncentrace stanovené látky v moči vyjadřuje látkovým množstvím vztaženém na látkové množství kreatininu. Existuje-li nějaká taková látka v potu, to nevíme.

**Tabulka 10:** Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v potu u dobrovolných dárců ( $n = 40$ , 20 žen a 20 mužů)

Parametr (jednotka)	Medián (všichni)	IQR* (všichni)	Medián (ženy)	IQR* (ženy)	Medián (muži)	IQR* (muži)
Věk (roky)	20	16	17	21	21	9
Asp ( $\mu\text{mol/l}$ )	99,0	131,0	129,2	165,1	71,4	86,4
Glu ( $\mu\text{mol/l}$ )	95,6	108,8	105,5	91,0	70,5	83,3
Asn ( $\mu\text{mol/l}$ )	30,2	38,8	40,4	44,0	20,1	24,8
His ( $\mu\text{mol/l}$ )	128,4	153,0	163,4	166,4	81,2	115,2
Gln ( $\mu\text{mol/l}$ )	29,5	28,9	34,7	35,2	22,3	30,6
Ser ( $\mu\text{mol/l}$ )	407,3	584,7	694,1	729,0	320,8	474,5
Cit ( $\mu\text{mol/l}$ )	116,6	177,7	141,9	200,4	62,5	98,1
Arg ( $\mu\text{mol/l}$ )	93,0	129,5	116,4	166,6	70,4	97,5
Gly ( $\mu\text{mol/l}$ )	274,3	320,4	380,0	402,1	187,2	217,1
Thr ( $\mu\text{mol/l}$ )	84,2	136,4	146,1	152,7	65,4	96,5
Ala ( $\mu\text{mol/l}$ )	175,9	205,2	225,0	257,2	110,0	135,3
Tyr ( $\mu\text{mol/l}$ )	39,2	46,2	50,7	55,1	25,8	33,3
Tau ( $\mu\text{mol/l}$ )	5,8	6,2	8,3	8,0	4,0	3,8
Val ( $\mu\text{mol/l}$ )	62,6	73,3	84,3	82,5	43,3	53,4
Met ( $\mu\text{mol/l}$ )	5,5	6,8	7,4	9,2	4,6	6,1
Trp ( $\mu\text{mol/l}$ )	21,9	26,4	26,9	24,0	14,1	22,5
Ile ( $\mu\text{mol/l}$ )	40,4	43,4	50,1	52,1	26,4	30,6
Phe ( $\mu\text{mol/l}$ )	28,9	34,0	41,5	38,7	20,3	24,6
Leu ( $\mu\text{mol/l}$ )	52,2	63,8	69,2	73,2	36,4	44,5

\*IQR je mezikvartilové rozpětí, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem (z angl. interquartile range)

**Tabulka 11: Porovnání hladin vybraných aminokyselin v potu mezi ženami a muži**

	Ženy, n = 20 Medián (IQR)*	Muži, n = 20 Medián (IQR)*	p**
Asp (μmol/l)	129,2 (165,1)	71,4 (86,4)	0,068
Glu (μmol/l)	105,5 (91,0)	70,5 (83,3)	0,081
Asn (μmol/l)	40,4 (44,0)	20,1 (24,8)	0,091
His (μmol/l)	163,4 (166,4)	81,2 (115,2)	0,102
Gln (μmol/l)	34,7 (35,2)	22,3 (30,6)	0,072
Ser (μmol/l)	694,1 (729,0)	320,8 (474,5)	0,068
Cit (μmol/l)	141,9 (200,4)	62,5 (98,1)	<b>0,005</b>
Arg (μmol/l)	116,4 (166,6)	70,4 (97,5)	0,156
Gly (μmol/l)	380,0 (402,1)	187,2 (217,1)	<b>0,029</b>
Thr (μmol/l)	146,1 (152,7)	65,4 (96,5)	0,076
Ala (μmol/l)	225,0 (257,2)	110,0 (135,3)	<b>0,029</b>
Tyr (μmol/l)	50,7 (55,1)	25,8 (33,3)	0,156
Tau (μmol/l)	8,3 (8,0)	4,0 (3,8)	<b>0,050</b>
Val (μmol/l)	84,3 (82,5)	43,3 (53,4)	0,053
Met (μmol/l)	7,4 (9,2)	4,6 (6,1)	0,425
Trp (μmol/l)	26,9 (24,0)	14,1 (22,5)	0,218
Ile (μmol/l)	50,1 (52,1)	26,4 (30,6)	0,156
Phe (μmol/l)	41,5 (38,7)	20,3 (24,6)	0,218
Leu (μmol/l)	69,2 (73,2)	36,4 (44,5)	0,181

\*IQR je mezikvartilové rozpětí, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem (z angl. interquartile range); \*\*Mann-Whitney U test

To byl také jeden z důvodů, proč jsme se rozhodli pro určení procentuálního zastoupení námi stanovovaných AMK v potu. Sečetli jsme koncentrace všech stanovovaných AMK a uvedli procentuální zastoupení jednotlivé AMK (tabulky 12 a 13). Z tabulek je patrné, že hodnoty mezikvartilového rozpětí již nejsou vzhledem k mediánu tak vysoké. Při porovnání procentuálního zastoupení AMK v potu mezi ženami a muži již u většiny AMK tak markantní rozdíl není, ale zase je statisticky významný díky menšímu rozptylu dat. Ženy mají v potu více procentuálně zastoupenou kyselinu asparagovou a citrulin, kyselinu asparagovou výrazně, muži zase kyselinu glutamovou, tyrosin, valin, methionin, isoleucin, fenylalanin a leucin (tabulka 13).

**Tabulka 12:** Základní statistická analýza procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v potu u dobrovolných dárců ( $n = 40$ , 20 žen a 20 mužů)

Parametr (jednotka)	Medián (všichni)	IQR* (všichni)	Medián (ženy)	IQR* (ženy)	Medián (muži)	IQR* (muži)
Asp (%)	5,18	1,11	5,04	1,43	5,34	0,89
Glu (%)	5,09	2,10	4,26	1,43	5,64	1,42
Asn (%)	1,59	0,27	1,56	0,15	1,64	0,42
His (%)	6,76	1,41	6,36	1,54	6,85	1,14
Gln (%)	1,38	0,97	1,27	1,05	1,64	0,91
Ser (%)	24,69	4,88	26,29	4,58	23,77	3,76
Cit (%)	5,82	2,66	7,04	3,29	5,53	1,58
Arg (%)	5,30	1,84	4,82	1,76	5,67	1,07
Gly (%)	14,92	3,20	15,15	3,69	14,64	2,47
Thr (%)	5,10	1,22	5,25	0,81	4,83	1,26
Ala (%)	9,50	1,51	9,50	1,85	9,42	1,47
Tyr (%)	2,05	0,43	1,84	0,39	2,19	0,32
Tau (%)	0,37	0,15	0,34	0,16	0,38	0,24
Val (%)	3,40	0,43	3,31	0,34	3,57	0,46
Met (%)	0,32	0,14	0,26	0,07	0,39	0,10
Trp (%)	1,11	0,46	0,96	0,41	1,23	0,36
Ile (%)	2,03	0,48	1,87	0,30	2,28	0,44
Phe (%)	1,64	0,48	1,42	0,41	1,82	0,45
Leu (%)	2,72	0,74	2,62	0,53	3,21	0,69

\*IQR je mezikvartilové rozpětí, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem (z angl. interquartile range)

Metodou korelační analýzy jsme zjistili, že hladiny jednotlivých AMK v potu spolu silně korelují (příloha 2). Výjimkou je AMK glutamin, jehož hladiny v potu korelují s hladinami ostatních AMK slaběji, s hladinou taurinu je korelace statisticky nevýznamná. Proč tomu tak je, bude předmětem dalšího zkoumání.

**Tabulka 13:** Porovnání procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v potu mezi ženami a muži

	Ženy, n = 20 Medián (IQR)*	Muži, n = 20 Medián (IQR)*	p**
Asp (%)	5,04 (1,43)	1,64 (0,42)	<b>&lt;0,001</b>
Glu (%)	4,26 (1,43)	5,64 (1,42)	<b>0,005</b>
Asn (%)	1,56 (0,15)	1,64 (0,42)	0,229
His (%)	6,36 (1,54)	6,85 (1,14)	0,199
Gln (%)	1,27 (1,05)	1,64 (0,91)	0,457
Ser (%)	26,29 (4,58)	23,77 (3,76)	0,068
Cit (%)	7,04 (3,29)	5,53 (1,58)	<b>0,027</b>
Arg (%)	4,82 (1,76)	5,67 (1,07)	0,064
Gly (%)	15,15 (3,69)	14,64 (2,47)	0,617
Thr (%)	5,25 (0,81)	4,83 (1,26)	0,172
Ala (%)	9,50 (1,85)	9,42 (1,47)	0,882
Tyr (%)	1,84 (0,39)	2,19 (0,32)	<b>0,006</b>
Tau (%)	0,34 (0,16)	0,38 (0,24)	0,441
Val (%)	3,31 (0,34)	3,57 (0,46)	<b>0,008</b>
Met (%)	0,26 (0,07)	0,39 (0,10)	<b>&lt;0,001</b>
Trp (%)	0,96 (0,41)	1,23 (0,36)	0,064
Ile (%)	1,87 (0,30)	2,28 (0,44)	<b>&lt;0,001</b>
Phe (%)	1,42 (0,41)	1,82 (0,45)	<b>&lt;0,001</b>
Leu (%)	2,62 (0,53)	3,21 (0,69)	<b>&lt;0,001</b>

\*IQR je mezikvartilové rozpětí, rozdíl mezi 75. a 25. percentilem (z angl. interquartile range); \*\*Mann-Whitney U test

## **5 Závěr**

Cílem této práce bylo zavést a validovat vhodnou metodu pro stanovení vybraných aminokyselin v lidském potu získaného technikou suché kapky. Technika suché kapky potu je neinvazivní a pro pacienta nezatěžující. Pot by byl tak vhodnou alternativou k vzorkům krve, kde se hladiny aminokyselin běžně stanovují. Technika suché kapky potu má mnoho výhod, limitující je množství analyzovaného vzorku. Podařilo se nám zavést a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému obrácených fází a fluorescenční detekcí. Stanovili jsme hladiny 19 aminokyselin u 40 dobrovolných dárců a získali zajímavé výsledky, které vedou k zamyšlení a budou předmětem dalšího zkoumání.

## 6 Seznam literatury

- [1] RACEK J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. Vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 8072623249.
- [2] ČERMÁKOVÁ M. *Klinická biochemie*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013-4240.
- [3] HOFFMANN G. F. *Dědičné metabolické poruchy*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0831-0.
- [4] VOET D., VOETOVÁ J.G. *Biochemie*, Victoria publishing Praha 1994. ISBN 80-85605-44-9
- [5] ŠTERN P. *Obecná a klinická biochemie: Pro bakalářské obory studia*. 2., upravené vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.
- [6] ROSKOSKI R. *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders, 1996. ISBN 0721651747.
- [7] MENA-BRAVO A., LUQUE DE CASTRO M. D. *Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 90: 139-147.
- [8] SEARS M. E., KERR K. J., BRAY R. I. *Arsenic, cadmium, lead, and mercury in sweat: A systematic review*. Journal of Environmental and Public Health, 2012, (10): 10.
- [9] ZÁPECOVÁ D. *Sekreční funkce lidské kůže*. Zlín, 2014. 58 s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Vedoucí práce doc. MUDr. Milan Buček, CSc.
- [10] PENG Y., CUI X., LIU Y., LI Y., et al. *Systematic review focusing on the excretion and protection roles of sweat in the skin*. Dermatology, 2014, 228(2): 115-120.
- [11] SEARS M. E., KERR K. J., BRAY R. I. *Arsenic, cadmium, lead, and mercury in sweat: A systematic review*. Journal of Environmental and Public Health, 2012, (10): 10
- [12] BAKER L. B. *Sweating Rate and Sweat Sodium Concentration in Athletes: A Review of Methodology and Intra/Interindividual Variability*. Sports Med, 2017; 47(Suppl 1): 111–128. DOI: 10.1007/s40279-017-0691-5.
- [13] RÖCKEN M., SCHALLER M., SATTLER E. a WALTER H., BURGDORF. C. *Kapesní atlas dermatologie*. Přeložil CETKOVSKÁ M., CHALOUPKA P. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.

- [14] DELGADO-POVEDANO M.M., CALDERÓN-SANTIAGO M., PRIEGO- CAPOTE F. , AND LUQUE DE CASTRO M.D., *Study of sample preparation for quantitative analysis of amino acids in Human sweat by liquid chromatography-tandem mass spektrometry*. *Talanta*, 2016(146), p. 310-317.
- [15] DUNSTAN R., HUGH D. L., SPARKES B., DASCOMBE J., et al. *Sweat Facilitated Amino Acid Losses in Male Athletes during Exercise at 32-34°C*. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(12), e0167844- [cit. 2018-05-21]. DOI: 10.1371/journal.pone.0167844. ISSN 1932-6203.
- [16] COLLIE J. T. B., R. J. MASSIE, O. A. H. JONES, V. A. LEGRYS and R. F. GREAVES. *Sixty-five years since the New York heat wave: Advances in sweat testing for cystic fibrosis*. *Pediatric Pulmonology*. 2013, 49, 106-117.
- [17] SHIRREFFS S. M. and MAUGHAN R. J.. *Whole body sweat collection in humans: an improved method with preliminary data on electrolyte kontent*. *Journal of Applied Physiology*. 1997, 82, 336–341.
- [18] KANNO K , YOSHIKE T , OGAWA H . *Evaluation of a measurement method for perspiration volume using newly 56pektrome equipment for continuous recording of local perspiration volume (Kenz-Perspiro) (I)*. *Nihon Hifuka Gakkai Zasshi*. 1989 Feb; 99 (2): 135-9.
- [19] NYEIN HYY1, TAI LC1, NGO QP1, CHAO M, ZHANG GB1, GAO W1, BARIYA M1, BULLOCK J1, KIM H1, FAHAD HM, JAVEY A1. *A Wearable Microfluidic Sensing Patch for Dynamic Sweat Secretion Analysis*. *ACS Sens*. 2018 May 25;3(5):944-952. DOI: 10.1021/acssensors.7b00961. Epub 2018 May 16.
- [20] Macroduct® Sweat Collection System, *Biovendor* [online]. BioVendor 2013 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/macroduct-r-sweat-collection-system/p91.MODEL%203700-SYS/>
- [21] CHAWARSKI, M. C., FIELLIN D. A., O’CONNOR P. G., BERNARD M., et al. *Utility of sweat patch testing for drug use monitoring in outpatient treatment for opiate dependence*. *Journal of substance abuse treatment*, 2007, 33(4): 411-420.
- [22] VILLIGER M., STOOP R., VETSCH T., HOHENAUER E., PINI M., CLARYS P., PEREIRA F. and CLIJSEN R. *Evaluation and review of body fluids saliva, sweat and tear compared to*



*biochemical hydration assessment markers within blood and urine*. European Journal of Clinical Nutrition [online]. 2017, 72(1), 69-76 [cit. 2018-03-02]. ISSN 0954-3007.

[23] SONG Y., XU C., KUROKI H., LIAO Y., TSUNODA M. (2018). *Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 147, 35–49. DOI:10.1016/j.jpba.2017.08.050.

[24] KLOUDA P. *Moderní analytické metody. 2., upr. A dopl. Vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.

[25] ZACHAŘ P., SÝKORA D. *Plynová chromatografie* [online]. [citováno 2019-03-20] Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>.

[26] HORÁK T., ČULÍK J., JURKOVÁ M., ČEJKA P., KELLNER V., DVOŘÁK J., HAŠKOVÁ D. *Základní detektory v plynové chromatografii používané v pivovarské analytice*. Kvasny Prum. 57 / 2011 (6).

[27] CHURÁČEK J., a kol., *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academica, Praha 1993.

[28] Derivatization. 2007. *Derivatization*. [cit. 2019-01-03] Dostupné z: [http://www.registech.com/Library/Catalog/GC\\_Derivatization\\_2008.pdf](http://www.registech.com/Library/Catalog/GC_Derivatization_2008.pdf).

[29] STENERSON K. K. *The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC-MS*. Reporter US Volume 25.3 [online]. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/the-derivatization.html>.

[30] MOLDOVEANU S. C, DAVID V. *Sample preparation in Chromatography*, J.Chromatogr. Library. 65. p. 942.

[31] VANDENABEELE-TRAMBOUZE O., RODIER C., DOBRIJEVIC M., DESOIS D., STERNBERG R., VIDAL-MADJAR C., GRENIER-LOUSTALOT M. F., RAULIN F. *Identification of amino acids by capillary gas chromatography. Application to martian samples*. Chromatographia January 2001. Volume 53, Supplement 1, p. 332–339.

[32] ZAIKIN V., HALKET J.: *A Handbook of derivatives for mass spectrometry*, IM Publications. 2009. p. 513.

- [33] HUŠEK P., MATUCHA P., VRÁNKOVÁ A., ŠIMEK P. *Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids*. Journal of Chromatography B. 789 (2003) 311–322.
- [34] NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC Separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [35] RUTHERFURD, S. M., & GILANI, G. S. (2009). *Amino Acid Analysis*. Current Protocols in Protein Science, 11.9.1–11.9.37. doi:10.1002/0471140864.ps1109s58.
- [36] DOUŠA M. *Derivatizace v HPLC*. HPLC. [cit.2019-30-01] Dostupné z: [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz)
- [37] ŽÁKOVÁ P., SKLENÁŘOVÁ H., HAVLÍKOVÁ L., MATYSOVÁ L., ŠATÍNSKÝ D. *Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu*, Chem. Listy 103 (2009) 251–255.
- [38] ZOTOU, A. and NOTOU M. *Study of the naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde pre-column derivatization of biogenic mono- and diamines in mixture and fluorescence–HPLC determination*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012, 403, 1039-1048.
- [39] ŠTULÍK K., et al. *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum, s. 2005. 264. ISBN 80-246-0852-9.
- [40] MICHALČÍKOVÁ R. *Bakalářská práce: Stanovení enantiomerů aminokyselin metodou HPLC*. Praha 2010. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra fyzikální a makromolekulární chemie.
- [41] ROZMAN T. *HPLC stanovení organických sloučenin obsahujících aminovou skupinu jako indikátorů stárnutí potravin*. Brno, 2015. 82s. Diplomová práce. Masaryková Univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [42] GARRETT, R., GRISHAM, M. CH., *Biochemistry*. 3th ed. Belmont: Thomson Book/Cole, 2005. ISBN 0-534-49033-6
- [43] NAWROCKI J., DUNLAP C., MCCORMICK A., CARR P. W. J. *Chromatogr. A* 1028 (2004) p. 1–30.
- [44] SNYDER L. R., KIRKLAND J. J., GLAJCH J. L., *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition, Wiley-Interscience, 1997.

- [45] PITT J. J. *Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*. The Clinical Biochemist Reviews, 2009 Feb; 30(1). p. 19–34. PMID: 19224008.
- [46] BELL D. S. *Advantages of Polar Reversed-Phase Chemistries for LC/MS Analyses*. Supelco, Bellefonte, PA (2003), Supelco Publication Number T403121.
- [47] JANNETTO P., DABCC, FACB . *Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry*. Clinical Laboratory News (online) JUL.1.2015. Dostupné z: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/july/liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry>.
- [48] YOST R.A., ENKE C.G. *Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer*. Journal of the American Chemical Society 100, 2274–2275.
- [49] OGURI S. *Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines*. Journal of Chromatography B. 2000. vol. 747. p. 1–19.
- [50] CIESLAROVA Z., LOPES F. S., LAGO C. L. D., FRANÇA JR M. C., SIMIONATO A. V. *Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and homocysteine's metabolites: Potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis*. TALANTA. 2017(170), 63-68.
- [51] Vědci pro průmysl a praxi. *Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí*. ChemPoint [online].[cit. 2019-03-22] Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kapilarni-elektroforeza-s-laserem-indukovanou-fluorescencni-detekci>.
- [52] KANETA, Takashi. *Laser-Induced Fluorometry for Capillary Electrophoresis*. The Chemical Record [online]. 2019. 19(2-3). p. 452-461 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1002/tcr.201800051. ISSN 15278999. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201800051>.
- [53] DEYL Z., HYÁNEK J., HORÁKOVÁ M.. *Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography*. Journal of chromatography. 379 (1986) 177–250.
- [54] WANG CH., ZHU H., PI Z., SONG F., LIU Z., LIU S.. *Classification of type 2 diabetes rats based on urine amino acids metabolic profiling by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B. 935 (2013) 26–31

[55] Dried Blood Spots – Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. *National Center for Biotechnology Information*. [online]. [cit. 2019-03-30] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397000/>.

[56] GAO Y., XU X., SONG G., HU Y., CHENG H. *A Novel Derivatization Method for Separation of Sarcosine from Isobaric l-Alanine in Human Urine by GC–MS*. *Chromatographia*. 76 (2013) 1181–1186.

[57] KANĎÁR, R., DRÁBKOVÁ, P., ANDRLOVÁ, L., KOSTELNÍK, A., & ČEGAN, A. (2016). *Determination of selected fatty acids in dried sweat spot using gas chromatography with flame ionization detection*. *Journal of Separation Science*, 39(22), 4377–4383. doi:10.1002/jssc.201600513

[58] HIROKAWA T., OKAMOTO H., GOSYO Y., TSUDA T. and TIMERBAEV A. R. *Simultaneous monitoring of inorganic cations, amines and amino acids in human sweat by capillary electrophoresis*. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, 581(1), 83- 88. ISSN00032670.

[59] DUNSTAN, R. H., D. L. SPARKES, B. J. DASCOSBE, et al. *Sex differences in amino acids lost via sweating could lead to differential susceptibilities to disturbances in nitrogen balance and collagen turnover*. *Amino Acids* [online]. 2017, 49(8), 1337-1345 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1007/s00726-017-2431-4. ISSN 0939-4451.

[60] VAN LOCO J., ELSKENS M., CROUX CH., BEERNAERT H. *Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient*. *Accredit. Qual. Assur.*, 2002, 7; 281

[61] ANDERSON J., BERTHOD L., ESTÉVEZ A., STALCUP V. P., Apryll M. *Sample Derivatization in Separation Science*. In: *Analytical Separation Science* [online]. 5 Volume. John Wiley & Sons, 2015. 1725-1752. a. [cit. 2018-04-18]. ISBN: 978-1-5231-1058-2.

## 7 Přílohy:

**Příloha 1:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky.....62

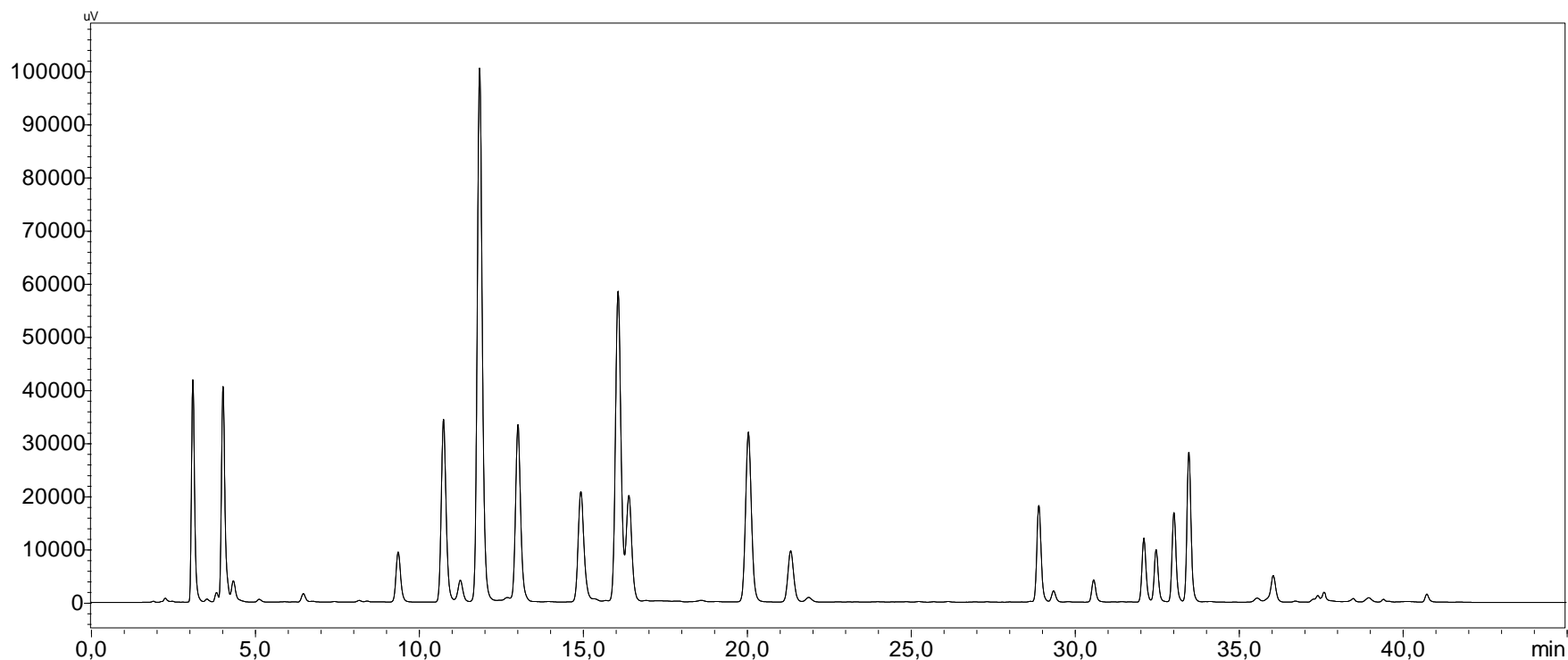
**Příloha 1A:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení).....63

**Příloha 1B:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení).....64

**Příloha 1C:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení).....65

**Příloha 1B:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky(přiblížení).....66

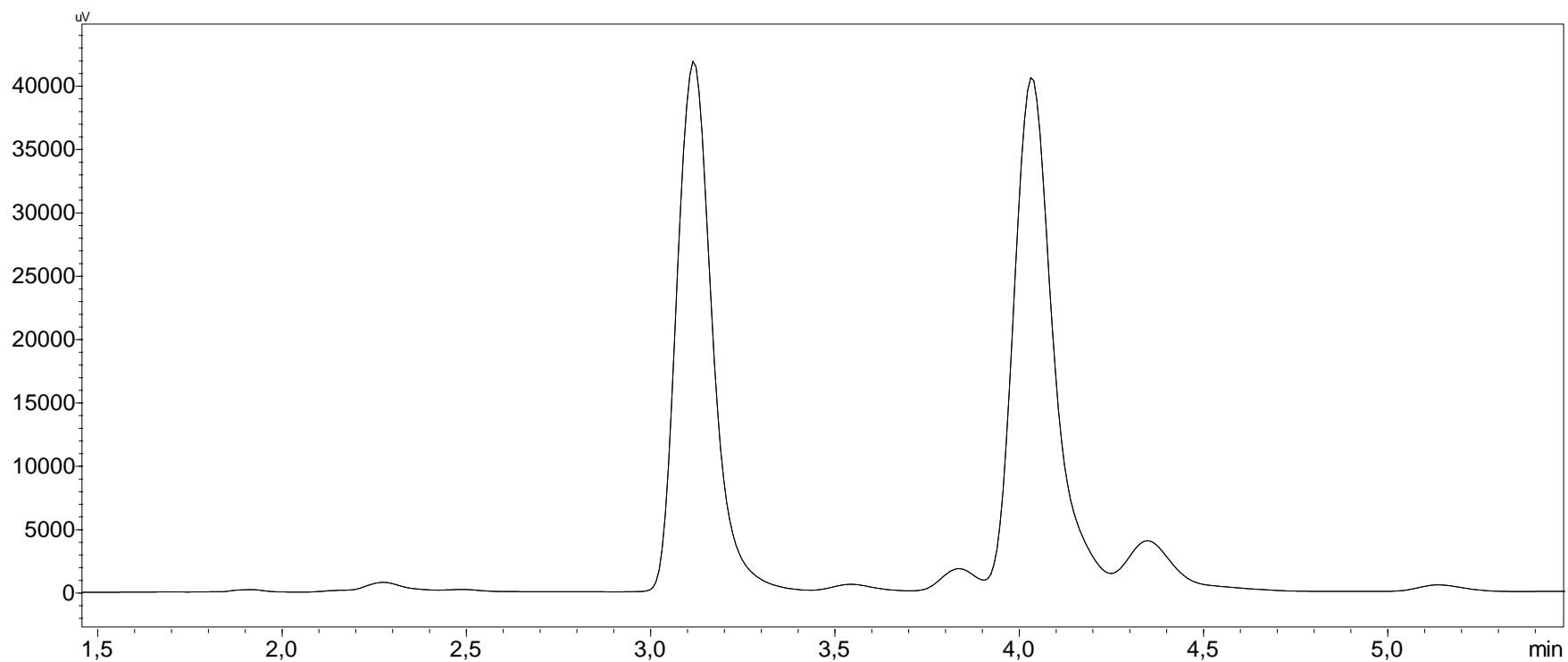
**Příloha 2:** Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v potu dobrovolných dárců.....67



**Příloha 1:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky.

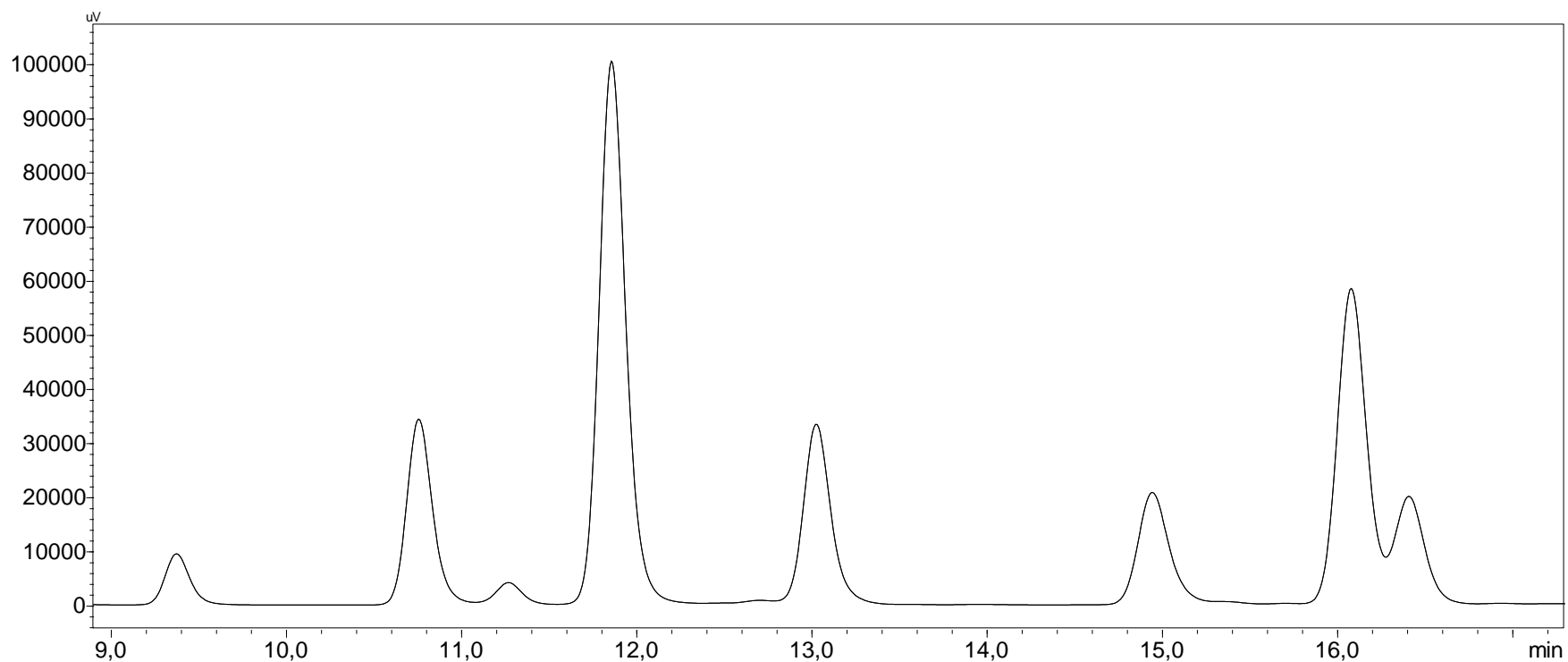
Asp (207,9  $\mu\text{mol/l}$ , 3,12 min); Glu (220,5  $\mu\text{mol/l}$ , 4,04 min); Asn (70,3  $\mu\text{mol/l}$ , 9,38 min); His (275,2  $\mu\text{mol/l}$ , 10,76 min); Gln (35,0  $\mu\text{mol/l}$ , 11,27 min); Ser (969,1  $\mu\text{mol/l}$ , 11,86 min); Cit (269,1  $\mu\text{mol/l}$ , 13,03 min); Arg (191,9  $\mu\text{mol/l}$ , 14,95 min); Gly (451,8  $\mu\text{mol/l}$ , 16,08 min); Thr (211,8  $\mu\text{mol/l}$ , 16,41 min); Ala (293,2  $\mu\text{mol/l}$ , 20,06 min); Tyr (88,6  $\mu\text{mol/l}$ , 21,35 min); Tau (8,1  $\mu\text{mol/l}$ , 21,90 min); Val (118,1  $\mu\text{mol/l}$ , 28,91 min); Met (15,0  $\mu\text{mol/l}$ , 29,36 min); Trp (48,1  $\mu\text{mol/l}$ , 30,59 min); Ile (76,7  $\mu\text{mol/l}$ , 32,12 min); Phe (64,3  $\mu\text{mol/l}$ , 32,49 min); Leu (101,5  $\mu\text{mol/l}$ , 33,03 min); Nleu (33,49 min)

HPLC podmínky: mobilní fázi A byla směs acetonitrilu a 10mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5:95, v/v), pH 7,2, mobilní fázi B směs acetonitrilu a 10mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (65:35, v/v), pH 7,2, eluce byla gradientová, 0,01 min – 20 % B, 20,00 min – 32 % B, 35,00 min – 54,5 % B, 35,01 min – 100 % B, 40,00 min – 100 % B, 40,01 min – 20 % B; průtok mobilní fáze byl 0,75 ml/min při 37 °C, detekce byla fluorescenční ( $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 480 \text{ nm}$ , nastavení citlivosti bylo nízké se zesílením 4x), nástřik byl 5  $\mu\text{l}$ .



**Příloha 1A:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení)

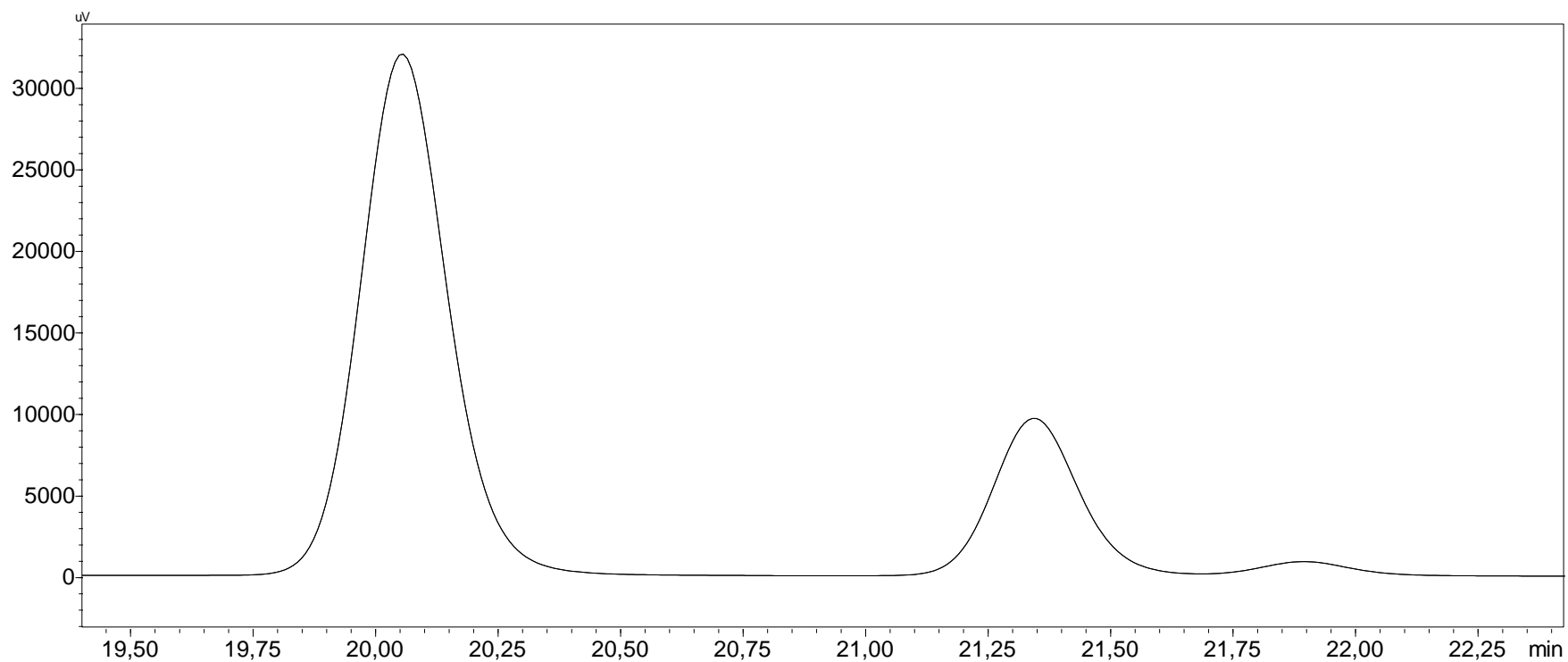
Asp (207,9  $\mu\text{mol/l}$ , 3,12 min); Glu (220,5  $\mu\text{mol/l}$ , 4,04 min); HPLC podmínky: viz příloha 1



**Příloha 1B:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení)

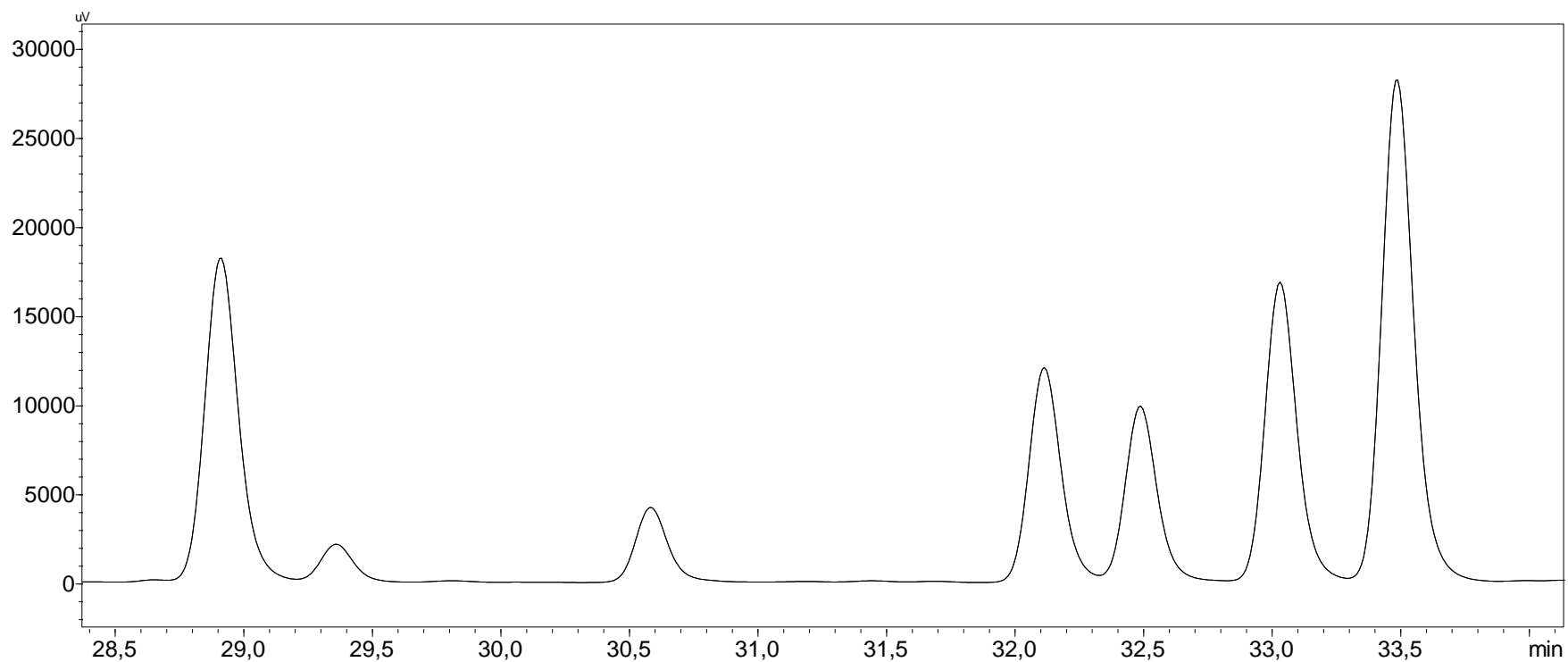
Asn (70,3  $\mu\text{mol/l}$ , 9,38 min); His (275,2  $\mu\text{mol/l}$ , 10,76 min); Gln (35,0  $\mu\text{mol/l}$ , 11,27 min); Ser (969,1  $\mu\text{mol/l}$ , 11,86 min); Cit (269,1  $\mu\text{mol/l}$ ; 13,03 min); Arg (191,9  $\mu\text{mol/l}$ , 14,95 min); Gly (451,8  $\mu\text{mol/l}$ , 16,08 min); Thr (211,8  $\mu\text{mol/l}$ , 16,41 min); HPLC podmínky: viz příloha 1





**Příloha 1C:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Ala (293,2  $\mu\text{mol/l}$ , 20,06 min); Tyr (88,6  $\mu\text{mol/l}$ , 21,35 min); Tau (8,1  $\mu\text{mol/l}$ , 21,90 min); HPLC podmínky: viz příloha 1



**Příloha 1D:** Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku lidského potu získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Val (118,1  $\mu\text{mol/l}$ , 28,91 min); Met (15,0  $\mu\text{mol/l}$ , 29,36 min); Trp (48,1  $\mu\text{mol/l}$ , 30,59 min); Ile (76,7  $\mu\text{mol/l}$ , 32,12 min); Phe (64,3  $\mu\text{mol/l}$ , 32,49 min); Leu (101,5  $\mu\text{mol/l}$ , 33,03 min); Nleu (33,49 min); HPLC podmínky: viz příloha 1

	Glu	Asn	His	Gln	Ser	Cit	Arg	Gly	Thr	Ala	Tyr	Tau	Val	Met	Trp	Ile	Phe	Leu
Asp	0,866 ***	0,981 ***	0,956 ***	0,443 **	0,977 ***	0,865 ***	0,949 ***	0,955 ***	0,973 ***	0,954 ***	0,973 ***	0,593 ***	0,974 ***	0,957 ***	0,950 ***	0,969 ***	0,957 ***	0,954 ***
	Glu	0,870 ***	0,897 ***	0,668 ***	0,815 ***	0,827 ***	0,895 ***	0,835 ***	0,822 ***	0,862 ***	0,862 ***	0,646 ***	0,901 ***	0,877 ***	0,888 ***	0,889 ***	0,872 ***	0,894 ***
		Asn	0,976 ***	0,359 *	0,974 ***	0,837 ***	0,962 ***	0,966 ***	0,967 ***	0,969 ***	0,982 ***	0,645 ***	0,985 ***	0,973 ***	0,945 ***	0,990 ***	0,981 ***	0,980 ***
			His	0,411 **	0,935 ***	0,825 ***	0,970 ***	0,928 ***	0,937 ***	0,937 ***	0,974 ***	0,643 ***	0,970 ***	0,964 ***	0,946 ***	0,979 ***	0,980 ***	0,979 ***
				Gln	0,329 *	0,520 ***	0,451 **	0,376 *	0,342 *	0,389 *	0,390 *	0,276 x	0,450 **	0,399 *	0,529 ***	0,404 **	0,379 *	0,419 **
					Ser	0,881 ***	0,919 ***	0,966 ***	0,994 ***	0,971 ***	0,963 ***	0,582 ***	0,970 ***	0,939 ***	0,929 ***	0,962 ***	0,943 ***	0,934 ***
						Cit	0,800 ***	0,817 ***	0,908 ***	0,848 ***	0,865 ***	0,406 **	0,877 ***	0,812 ***	0,885 ***	0,845 ***	0,830 ***	0,804 ***
							Arg	0,905 ***	0,925 ***	0,917 ***	0,962 ***	0,670 ***	0,954 ***	0,971 ***	0,952 ***	0,963 ***	0,965 ***	0,969 ***
								Gly	0,938 ***	0,993 ***	0,935 ***	0,652 ***	0,976 ***	0,905 ***	0,896 ***	0,964 ***	0,929 ***	0,942 ***
									Thr	0,952 ***	0,968 ***	0,569 ***	0,964 ***	0,946 ***	0,939 ***	0,958 ***	0,946 ***	0,931 ***
										Ala	0,945 ***	0,676 ***	0,986 ***	0,918 ***	0,909 ***	0,973 ***	0,938 ***	0,949 ***
											Tyr	0,614 ***	0,977 ***	0,979 ***	0,977 ***	0,987 ***	0,992 ***	0,975 ***
												Tau	0,669 ***	0,648 ***	0,555 ***	0,681 ***	0,656 ***	0,709 ***
													Val	0,959 ***	0,954 ***	0,994 ***	0,976 ***	0,981 ***
														Met	0,960 ***	0,977 ***	0,984 ***	0,980 ***
															Trp	0,957 ***	0,965 ***	0,946 ***
																Ile	0,992 ***	0,993 ***
																	Phe	0,991 ***

**Příloha 2: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v potu dobrovolných dárců**

Pearsonův korelační koeficient; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, x p > 0,05

