

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Možnosti stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce
metodami plynové a kapalinové chromatografie**

Diplomová práce

2020

Bc. Iveta Břízová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Břízová**
Osobní číslo: **C18495**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Možnosti stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce
metodami plynové a kapalinové chromatografie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Tvorba a složení mateřského mléka
Suchá kapka mateřského mléka
Možnosti stanovení aminokyselin v biologických vzorcích
Derivatizace v plynové a kapalinové chromatografii

Experimentální část:

Zpracování vzorků mateřského mléka a suché kapky mateřského mléka pro stanovení vybraných aminokyselin metodami plynové a kapalinové chromatografie
Zavedení metody plynové chromatografie pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce
Zavedení metody kapalinové chromatografie pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce
Porovnání metod plynové a kapalinové chromatografie

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

Seznam doporučené 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: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S. .

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

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 směrnici 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

Bc. Iveta Břízová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Michalovi Kopčilovi za jejich ochotu, odborné rady, vstřícnost, korekturu a čas, který mi věnovali při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat všem maminkám, které mi poskytly mateřské mléko pro realizaci této práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody plynové a kapalinové chromatografie pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce. Deriváty aminokyselin derivatizovaných ethylchlorformiátem byly stanoveny metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Deriváty aminokyselin derivatizovaných naftalen-2,3-dikarboxaldehydem byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVÁ

aminokyseliny, mateřské mléko, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, derivatizace

TITLE

Possibilities of determination of selected amino acids in breast milk by gas and liquid chromatography methods

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the development and optimization of gas and liquid chromatography for the determination of selected amino acids in breast milk. Amino acids derivatives derivatized with ethyl chloroformate were determined by gas chromatography with mass detection. Amino acid derivatives derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde were determined by liquid chromatography with fluorescence detection.

KEYWORDS

amino acids, breast milk, gas chromatography, liquid chromatography, derivatization

OBSAH

ÚVOD	12
1 Teoretická část	13
1.1 Mateřské mléko.....	13
1.1.1 Tvorba mateřského mléka.....	13
1.1.2 Anatomie mléčné žlázy	14
1.1.3 Složení mateřského mléka	15
1.2 Suchá kapka mateřského mléka	17
1.3 Aminokyseliny	18
1.4 Metody pro stanovení aminokyselin v biologických vzorcích	24
1.4.1 Kapalinová chromatografie.....	24
1.4.2 Plynová chromatografie.....	32
1.4.3 Kapilární elektroforéza	36
2 Cíl práce	37
3 Experimentální část.....	38
3.1 Seznam přístrojů a pomůcek.....	38
3.2 Seznam chemikálií	39
3.3 Pracovní roztoky	41
3.4 Vzorky mateřského mléka	44
3.5 Postup stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce metodou plynové chromatografie	44
3.5.1 Příprava vzorků	44
3.5.2 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky	45
3.5.3 Podmínky pro stanovení aminokyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí	45
3.5.4 Kalibrace	46
3.6 Stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci naftalen-2,4-dikarboxaldehydem	47

3.6.1	Příprava vzorků pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce.....	47
3.6.2	Příprava vzorků pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce, získaných technikou suché kapky	47
3.6.3	Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky	47
3.6.4	Podmínky pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	48
3.6.5	Analytické parametry	49
3.7	Zpracování výsledků	50
4	Výsledky a diskuze	51
4.1	Optimalizace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	51
4.1.1	Optimalizace derivatizačního kroku.....	51
4.1.2	Optimalizace extrakce derivátů aminokyselin z reakční směsi	52
4.1.3	Analytické parametry	54
4.2	Optimalizace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	55
4.2.1	Optimalizace derivatizačního kroku.....	55
4.2.2	Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů	56
4.2.3	Analytické parametry	56
4.3	Porovnání hladin aminokyselin v mateřském mléce získaných metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	58
4.4	Základní statistická analýza naměřených dat metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	60
5	Závěr.....	65
6	Použitá literatura	66
7	Přílohy	74

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A ROVNIC

OBRÁZKY

Obrázek 1 Anatomie mléčné žlázy.....	14
Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu.....	25
Obrázek 3 Schéma reakce o-ftalaldehydu s primárním aminem	27
Obrázek 4 Schéma reakce fenylisothiokyanátu s aminokyselinou	28
Obrázek 6 Schéma hmotnostního spektrometru	29
Obrázek 7 Schéma kvadrupólového analyzátoru	31
Obrázek 5 Schéma plynového chromatografu	33
Obrázek 8 Schéma silylace glycinu.....	34
Obrázek 9 Schéma reakce chlorformiátu s aminokyselinou.....	35

ROVNICE

Rovnice 1 Výpočet směrodatné odchylky	49
Rovnice 2 Výpočet variačního koeficientu.....	49

TABULKY

Tabulka 1 Přehled nepolárních proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20]......	18
Tabulka 2 Přehled kyselých proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].	19
Tabulka 3 Přehled bazických proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].	20
Tabulka 4 Přehled polárních proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20]......	20
Tabulka 5 Příprava zásobních roztoků aminokyselin.....	43
Tabulka 6 Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standard S ₅	43
Tabulka 7 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	45
Tabulka 8 Retenční časy a poměry hmotnosti k náboji (m/z) derivátů aminokyselin určených metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	46
Tabulka 9 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	48
Tabulka 10 Parametry kalibračních křivek pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	54

Tabulka 11 Nepřesnost v sérii metody stanovení aminokyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.....	55
Tabulka 12 Retenční časy derivátů stanovených aminokyselin za podmínek uvedených v experimentální části.....	56
Tabulka 13 Průměrné parametry kalibračních křivek, mez stanovitelnosti a mez detekce metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí ...	57
Tabulka 14 Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce a kolostru, získaných technikou suché kapky a stanovených metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	58
Tabulka 15 Základní statistická analýza a korelace hladin vybraných aminokyselin ve vzorcích mateřského mléka (n = 20) dobrovolných dárkyň stanovených metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	59
Tabulka 16 Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v kolostru (n = 8) a mateřském mléce (n = 10) dobrovolných dárkyň.....	61
Tabulka 17 Základní statistická analýza procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v kolostru (n = 8) a mateřském mléce (n = 10) dobrovolných dárkyň.....	62
Tabulka 18 Porovnání hladin vybraných aminokyselin mezi kolostrem a zralým mlékem	63
Tabulka 19 Porovnání procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin mezi kolostrem a zralým mlékem.....	64

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyseliny
CE	kapilární elektroforéza, z angl. capillary electrophoresis
DMS	suchá kapka mateřského mléka, z angl. dried milk spot
ECD	detektor elektronového záchytu, z angl. electron capture detector
ECF	ethylchlorformiát
EtOH	ethanol
FID	plamenově ionizační detektor, z angl. flame ionization detector
FLD	fluorescenční detektor, z angl. fluorescence detector
GC	plynová chromatografie, z angl. gas chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high-performance liquid chromatography
IS	vnitřní standard, z angl. internal standard
LC	kapalinová chromatografie, z angl. liquid chromatography
MCF	methylchlorformiát
MF	mobilní fáze
MM	mateřské mléko
MŽ	mléčná žláza
NDA	naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
Nleu	norleucin
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
PITC	fenylisothiokyanát
SF	stacionární fáze

ÚVOD

Mateřské mléko je nejvhodnější potravou pro kojence. Obsahuje bílkoviny, tuky a sacharidy v stravitelné formě, dále minerály, stopové prvky a vitamíny, které jsou důležité pro správný růst a vývoj dítěte. Složení mateřského mléka se liší nejen v průběhu laktace, ale také během dne. Jednou z důležitých složek mateřského mléka jsou aminokyseliny (AMK), na které jsme se v této diplomové práci zaměřili.

AMK jsou sloučeniny, které tvoří peptidy a proteiny. Jsou potřebné pro syntézu bílkovin a dalších důležitých sloučenin, které obsahují dusík. Mají řadu funkcí v buněčném metabolismu. Pro stanovení AMK se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí nebo i plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Tyto dvě metody stanovení AMK v mateřském mléce jsou v práci porovnány a detailněji popsány.

1 Teoretická část

1.1 Mateřské mléko

Lidské mateřské mléko (MM) je jedinou potravinou, která dokáže během prvních šesti měsíců života dítěte splnit všechny nutriční a fyziologické požadavky. Kojení je nejlepším a doporučeným způsobem výživy novorozenců. Veškeré složky MM jsou nezbytné pro správný růst a vývoj dítěte [1]. MM je optimální výživa pro kojence. Jedná se o komplexní směs živin s proměnlivým složením. Mléko se mění s dobou laktace. Snižuje se obsah bílkovin a zvyšuje obsah tuku. Mezi další faktory ovlivňující laktaci patří délka těhotenství, nemoci matky jako je *diabetes mellitus*, podvýživa, genotyp a mateřská strava [2].

1.1.1 Tvorba mateřského mléka

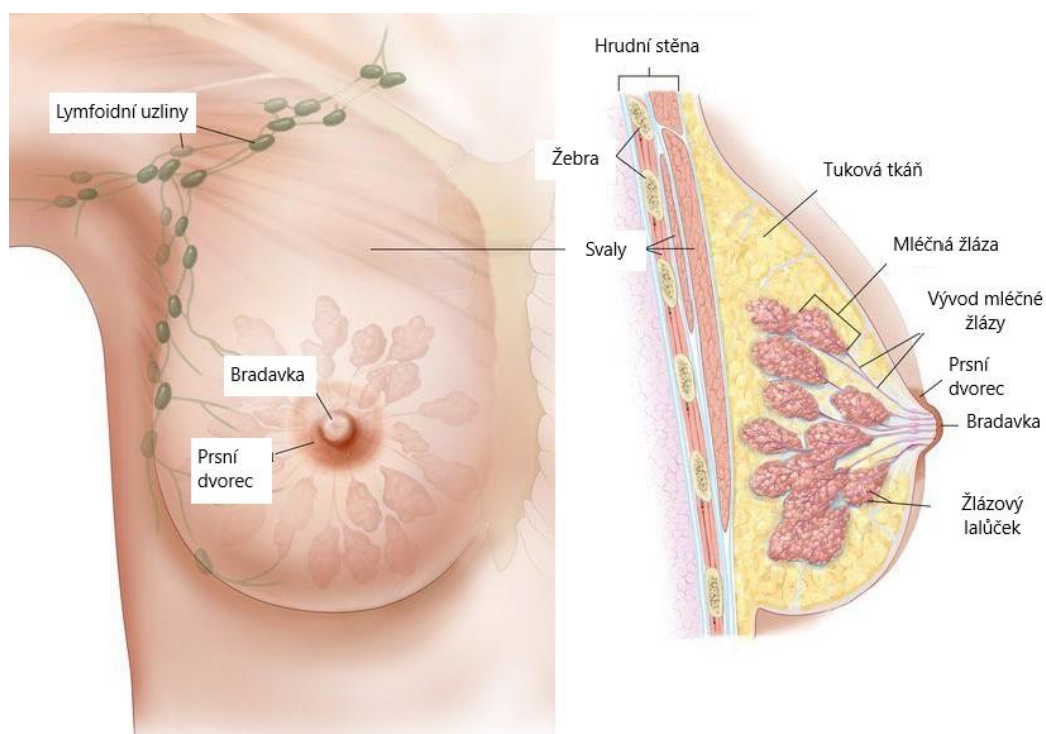
V období puberty dochází ke stimulaci růstu epiteliální sítě a tukové tkáně. K těmto změnám dochází v průběhu ovulačních cyklů a jsou regulovány hormony, jako jsou estrogeny, progesteron, prolaktin, luteinizační hormon, hormon stimulující folikuly a růstový hormon. Během folikulární fáze menstruačního cyklu jsou laloky malé a mají málo alveol. Během luteální fáze stimuluje progesteron lobulo-alveolární vývoj. V dospělosti převažuje pojivová a tuková tkáň, zatímco tkáň epiteliální je řídká. Během těhotenství dochází ke změnám v buněčné i funkční organizaci mléčné žlázy. Dochází k proliferaci alveolárních buněk a redukci tukového polštáře [3].

Ejekční reflex je neurohormonální reflex, který je spouštěn stimulací bradavky. Aktivací nervové dráhy dochází k uvolňování oxytocinu ze zadního laloku hypofýzy. Oxytocin způsobuje kontrakci myoepiteliálních buněk obklopujících alveolus a vytlačování mléka směrem k bradavce. Nonapeptid oxytocin [1-((4*R*,7*S*,10*S*,13*S*,16*S*,19*R*)-19-amino-7-(2-amino-2-oxoethyl)-10-(3-amino-3-oxopropyl)-16-(4-hydroxybenzyl)-13-[(1*S*)-1-methylpropyl]-6,9,12,15,18-pentaoxo-1,2-dithia-5,8,11,14,17-pentaazacykloeikosan-4-yl}karbonyl)-L-prolyl-L-leucylglycinamide], který kromě toho, že způsobuje ejakci mléka, ovlivňuje funkci reprodukčního systému a srdce, také moduluje sociální, reprodukční a agresivní chování. Na tvorbu a regulaci množství mléka má vliv i hormon prolaktin. Tvoří se koncem těhotenství v předním laloku hypofýzy a působí na tvorbu nezralého MM, tzv. kolostra. Podnětem pro vylučování tohoto hormonu je sání dítětem, zvláště v první půlhodině po porodu [4].

1.1.2 Anatomie mléčné žlázy

Mléčná žláza (MŽ) je zdrojem potravy. Vyvíjí se z ektodermálních zahuštění zvaných mléčná linie, která se rozprostírá po obou stranách těla, od krku po tříselnou oblast vyvíjejícího se plodu. Prsní žláza je lokalizovaná na přední stěně hrudníku. Epitel MŽ pochází z mléčného pupenu, který tvoří primitivní bradavku, a zasahuje do tukové podložky MŽ jako řada větvících kanálků. Rychlost růstu před pubertou je relativně pomalá a pak se zrychluje. MŽ roste z větví koncových pupenů, které obsahují nediferencované progenitorové nebo kmenové buňky. Terminální větve tak vytvářejí funkční laloky MŽ [5].

Žláza je rozdělena na 15-25 oddílů navzájem oddělených přepážkami. Každý oddíl je tvořen stovkami lalůček, ve kterých se tvoří mléko. Z nich vycházejí vývodné kanálky, které se směrem k bradavce spojují ve větší (obrázek 1). Úsek vývodů pod dvorcem prsu je rozšířen a zde se mléko shromažďuje [6].



Obrázek 1 Anatomie mléčné žlázy. Upraveno dle [7].

Růst a morfolgie parenchymu prsů je regulována řadou systémových a lokálních faktorů, tukové a pojivové tkáně působením hormonů. Tkáněmi prsa je syntetizována řada růstových regulačních molekul [6].

1.1.3 Složení mateřského mléka

Lidské mléko je komplexní tekutina, která obsahuje velké množství látek produkovaných mateřským organismem (endogenní metabolity) a látek vpravených do těla matky požitím jídla, pití a léků nebo inhalací chemikálií či dermální expozicí (exogenní metabolity) [1].

MM obsahuje bílkoviny, tuky a sacharidy v stravitelné formě, minerály, stopové prvky a vitamíny, které jsou důležité pro růst a vývoj dítěte. Dále obsahuje různé faktory spojené s vrozeným imunitním systémem, který usnadňuje přechod novorozence z relativně sterilního prostředí mateřské dělohy do prostředí obsahujícího množství mikrobů a patogenů. MM také poskytuje novorozenci růstové faktory a hormony [4].

Většina proteinů je syntetizována v laktocytech na hrubém endoplazmatickém retikulu a je přenášena do Golgiho aparátu, kde je zabalena do sekrečních vezikul a exocytózou vylučována do alveolárního lumen. Proteiny a peptidy, jako jsou albumin, sekreční imunoglobuliny IgA, IgG a inzulin, jsou vychytávány z krve endocytózou v bazolaterální membráně a transportovány přes cytosol do membrány laktocytu. Buď se uvolňují přímo do alveolárního lumen, nebo se secernují s mléčnými proteiny. V mléce jsou dvě hlavní skupiny proteinů, kaseiny a syrovátkové bílkoviny. Kaseiny jsou definovány jako proteiny, které mohou být vysráženy z mléka při pH 4,6, zatímco syrovátkové proteiny zůstávají v roztoku. κ -Kasein je strukturně příbuzný γ -fibrinogenu a jeho nepřítomnost má za následek selhání laktace v důsledku blokování alveolárního lumen a mléčných kanálků proteinovými agregáty. Kaseinové micely vytvářejí porézní struktury, které se agregují při dehydrataci [4].

Mezi syrovátkové proteiny patří α -laktalbumin, který je hlavní mléčnou bílkovinou v MM, dále kyselé bílkoviny syrovátky, sérový albumin, peptid inzulin a mnoho enzymů a hormonů. Dominantním sacharidem v MM je laktóza. Zahájení laktace je spojeno s nárůstem syntézy laktózy, který má za následek zvýšení její koncentrace a současně zvýšení objemu mléka. Laktóza je také dominantním dietním sacharidem v mléce. Oligosacharidy obsahují dvě až deset monosacharidových jednotek, které se kombinují za vzniku mnoha různých molekul. Oligosacharidy nejsou snadno štěpeny, proto je lze kvalifikovat jako rozpustnou vlákninu. Téměř veškerý tuk v MM je přítomen ve formě triacylglycerolů. Kyselina palmitová ve formě monoacylglycerolu se absorbuje z tenkého střeva účinněji, než kdyby byla volná [4].

MM můžeme rozdělit do tří vývojových etap. První je kolostrum, následuje přechodné mléko, které se přeměňuje ve zralé mléko. Zralé mléko je produkováno až do odstavení kojence [8].

1.1.3.1 Kolostrum

Prvotní mléko neboli kolostrum je tvořeno v mléčné žláze bezprostředně po narození. Produkce kolostra trvá 2-4 dny od začátku laktace. Toto mléko je bohaté na bílkoviny a je také zdrojem tuků, cukrů, vitamínů a minerálů. Je zdrojem pasivní imunity, která se přenáší z matky na dítě. Obsahuje sekreční IgA, který chrání gastrointestinální trakt novorozence před různými infekcemi [9]. Tvoří se pouze v malém množství, odpovídající velikosti žaludku dítěte. Kolostrum má žlutou barvu a je husté. Má vysoký obsah bílkovin a nízký obsah tuků a cukrů. V porovnání se zralým mlékem obsahuje kolostrum až třikrát více bílkovin [10]. Složení kolostra je ovlivněno stravou, délkou těhotenství, stádiem laktace i některými chorobami. Je prokázáno, že složení kolostra odráží dlouhodobé stravovací návyky ženy. Z nasycených mastných kyselin je v kolostru nejvíce zastoupena kyselin palmitová, stearová a myristová. V kolostru se nachází i nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Patří mezi ně kyselina dokosaheptaenová, dokosapentaenová, eikosapentaenová a arachidonová. Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mají vliv na růst a funkci buněk, regulaci kardiovaskulárního a imunitního systému a mnoha dalších fyziologických funkcí. Jejich množství ve zralém mléku je téměř poloviční [11].

1.1.3.2 Přejídné mléko

Od 5. do 14. dne se tvoří přejídné mléko. Má nažloutlou barvu. Obsahuje více tuků, kalorií i laktózy a stává se tak ideální potravou pro rychle rostoucího novorozence. Množství přejídného mléka postupně stoupá, stoupá i obsah mastných kyselin se středním řetězcem (C6-C12) [12].

1.1.3.3 Zralé mléko

Zralé mléko se začíná produkovat čtyři týdny po porodu. Toto mléko je bohaté na dobře stravitelné bílkoviny, cukry, vitamíny, minerály a mnoho bioaktivních složek (hormony, enzymy, růstové faktory a živé buňky). Složení zralého mléka se neustále mění. Zralé mléko obsahuje 3–5 % tuku, 0,8–0,9 % bílkovin a 6,9–7,2 % laktózy. Hlavními bílkovinami, které zralé mléko obsahuje, jsou kasein, alfa-laktalbumin, laktoferin, imunoglobulin A, lysozym a sérový albumin. Oproti kolostru obsahuje zralé mléko až dvojnásobek tuku. Mléčný tuk obsahuje převážně kyselinu palmitovou a olejovou. Složení mastných kyselin v mléčném tuku se liší se složením stravy a mastných kyselin v ní přijímaných. Hlavní minerální složky mateřského mléka jsou Na, K, Ca, Mg, P a Cl. V mateřském mléce se také nacházejí AMK, nejvíce kyselina glutamová a taurin, a všechny vitamíny, kromě vitamínu K [13]. Kvalita a

množství bílkovin jsou klíčovými aspekty nutriční hodnoty kojenců. Obsah AMK v mateřském mléku je tvořen celkovými AMK a volnými AMK. Volné AMK se z trávicího traktu vstřebávají do krevního oběhu dříve než AMK vzniklé hydrolyzou proteinů. Jsou tak snadněji absorbovány. Hrají důležitou úlohu v časném postnatálním vývoji. Jejich úplný biologický význam však není dosud plně definován. Studie Zhanga a kol. poukázala na to, že celkový dusík a volné AMK v lidském mléku prudce klesají v prvních dvou měsících, v dalších měsících je jejich pokles mírný. Hladiny většiny volných AMK se s progresí laktace postupně zvyšují. Nejvíce se zvyšuje hladina glutamátu, až 20x, a taurinu [14].

1.2 Suchá kapka mateřského mléka

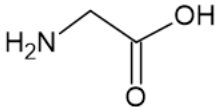
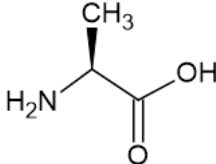
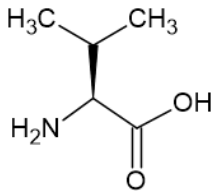
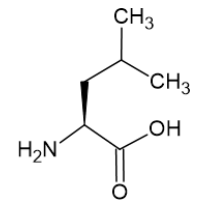
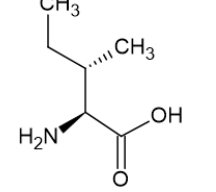
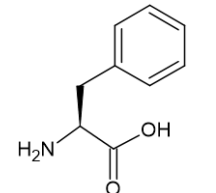
První technologie využívající suchý vzorek k analýze je suchá kapka krve. Tato technologie je jednoduchá z hlediska odběru vzorku, jeho skladování i přepravy. Suchá kapka krve se původně používala pro stanovení hladiny glukózy v krvi. Od roku 1963 se začala používat i pro novorozenecký screening vrozených onemocnění a při genetických testech. Dále se tato metoda využívá při monitorování hladin léků a dopingu u sportovců. Vzhledem k možnosti stanovení široké škály hormonů a souvisejících biomarkerů, je tato metoda zajímavá i pro psychoneuroendokrinologii. V současné době se touto technologií zpracovávají různé vzorky, jako jsou sliny, moč, krevní sérum, plazma i mateřské mléko [15-17].

Metoda suché kapky mléka (DMS) byla poprvé popsána roku 1982. V dalších letech byla metoda DMS rozšířena a využívala se pro diagnostiku různých infekcí. Nyní se také používá pro sběr vzorků v terénu a stanovení konkrétních biomarkerů v MM. U techniky DMS je potřeba pouze malé množství vzorku. Skladování vzorku ve formě suché kapky může také zvýšit stabilitu stanovovaných látek. Stačí pouze jedna kapka MM, která se nakape na filtrační papír, který může být ošetřen určitým stabilizátorem. DMS slouží i pro různé studie stanovující hladiny léků, které mohou být užívány během laktace [18, 19].

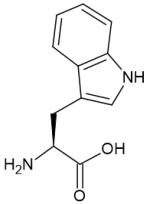
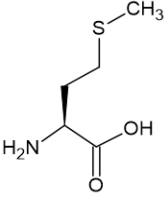
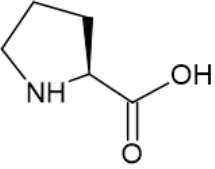
1.3 Aminokyseliny

AMK jsou sloučeniny, které tvoří peptidy a proteiny. Každá AMK je tvořena aminoskupinou, karboxylovou skupinou, atomem vodíku a postranním řetězcem R, který je připojen k α -uhlíku. Výjimkou je prolin, který má cyklickou strukturu a obsahuje sekundární aminoskupinu. AMK jsou klasifikovány podle chemických vlastností postranního řetězce R. Podle rozpustnosti můžeme AMK rozdělit do čtyř skupin – nepolární, kyselé, bazické a neutrální AMK (tabulky 1–4). R řetězce se liší velikostí, tvarem a dalšími vlastnostmi [20].

Tabulka 1 Přehled nepolárních proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].

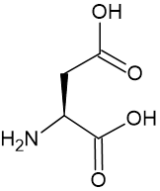
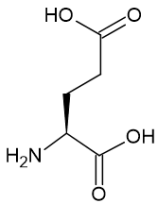
Hydrofobní, nepolární aminokyseliny			
Glycin	Gly		neesenciální
Alanin	Ala		neesenciální
Valin	Val		esenciální
Leucin	Leu		esenciální
Isoleucin	Ile		esenciální
Fenylalanin	Phe		esenciální

Hydrofobní, nepolární aminokyseliny

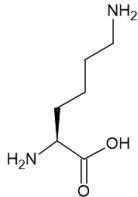
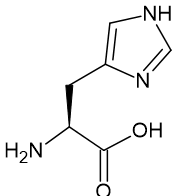
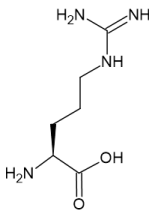
Tryptofan	Trp		esenciální
Methionin	Met		esenciální
Prolin	Pro		neesenciální

Tabulka 2 Přehled kyselých proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].

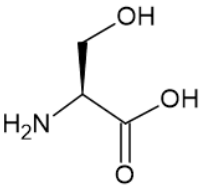
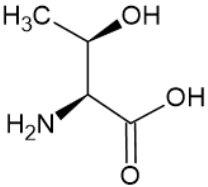
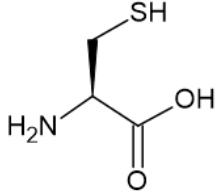
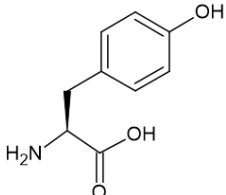
Kyselé aminokyseliny

Kyselina asparagová	Asp		neesenciální
Kyselina glutamová	Glu		neesenciální

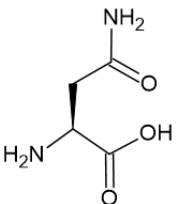
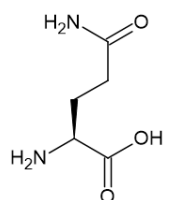
Tabulka 3 Přehled bazických proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].

Bazické aminokyseliny			
Lysin	Lys		esenciální
Histidin	His		semiesenciální
Arginin	Arg		semiesenciální

Tabulka 4 Přehled polárních proteinogenních aminokyselin. Upraveno dle [20].

Polární aminokyseliny			
Serin	Ser		neesenciální
Threonin	Thr		esenciální
Cystein	Cys		neesenciální
Tyrosin	Tyr		neesenciální

Polární aminokyseliny

Asparagin	Asn		neesenciální
Glutamin	Gln		neesenciální

AMK jsou potřebné pro syntézu bílkovin a dalších důležitých sloučenin obsahujících dusík. Osm AMK (isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin) si lidé nedokážou syntetizovat a do těla musí být dodávány ve stravě. Tyto AMK se nazývají esenciální AMK. Zbylé AMK jsou v těle syntetizovány různými biochemickými cestami [20, 21].

AMK mají řadu funkcí v buněčném metabolismu. Jsou strukturálními jednotkami proteinů a substráty biologicky významných látek. Některé AMK, jako je kyselina asparagová, glutamová, γ -aminomáselná a taurin, působí jako neurotransmitery. Regulují synaptický přenos a paměť. AMK s rozvětveným řetězcem, mezi které patří leucin, isoleucin a valin, se účastní modulace syntézy proteinů a inhibují katabolismus proteinů. Fenylalanin a tyrosin se podílejí na biosyntéze aminů a katecholaminů [22].

Byly popsány stovky AMK, 20 z nich jsou proteinogenní. S výjimkou glycinu obsahují AMK alespoň jeden asymetrický uhlík. V důsledku toho jsou AMK chirální a mohou existovat v jedné ze dvou enantiomerních forem L- nebo D-aminokyselin. Přírodní proteiny jsou tvořeny převážně L-aminokyselinami [23].

Aminokyseliny s nepolárním řetězcem

Glycin

Glycin je jednoduchá neesenciální AMK s atomem vodíku jako R skupinou. Je to jediná α -aminokyselina, která není opticky aktivní. Jedná se o malou molekulu, která se využívá pro biosyntézu mnoha neproteinových sloučenin, jako jsou porfyriny a puriny. Spolu s taurinem je konjugován se žlučovými kyselinami, které jsou důležité při absorpci lipidů. Glycin je také neurotransmitter, který má inhibiční účinky v míše a excitační v mozkové kůře [20].

Alanin

Alanin je malá neesenciální AMK. Je tvořen v těle přeměnou pyruvátu nebo rozpadem DNA, karnosinu a anserinu. Je důležitým zdrojem energie pro svaly a centrální nervový systém. Alanin je také regulátorem metabolismu glukózy, tryptofanu a pyridoxinu. Spolu s taurinem či glycinem je inhibičním neurotransmiterem v mozku [24].

Valin, leucin, isoleucin

Valin, leucin a isoleucin jsou alifatické AMK s rozvětveným řetězcem. Obsahují objemné nepolární postranní řetězce a účastní se hydrofobních interakcí. Všechny tři jsou esenciální AMK. Porucha v jejich katabolismu vede ke vzniku leucinózy neboli nemoci javorového sirupu [20].

Fenylalanin a tryptofan

Fenylalanin je esenciální aromatickou AMK. Bicyklický dusíkatý aromatický kruhový systém (indolový kruh) je připojen k β -uhlíku alaninu za vzniku tryptofanu. Tato AMK je prekurzorem serotoninu, nikotinamidu a mnoha dalších přirozeně se vyskytujících léčivých látek odvozených z rostlin. Tryptofan je esenciální AMK. Indolová skupina absorbuje UV záření při 280 nm. Tato vlastnost je užitečná pro spektrofotometrické měření koncentrace proteinu [20].

Methionin a prolin

Postranní řetězec methioninu obsahuje methylovou skupinu navázanou na síru. Tato esenciální AMK slouží jako donor methylové skupiny v mnoha transmethylačních reakcích. Prolin obsahuje místo primární aminové skupiny sekundární aminovou skupinu, která se nazývá imin. K hydroxylaci vyžaduje kofaktor kyselinu askorbovou (vitamín C). Nedostatek vitamínu C způsobuje torbu defektního kolagenu a kurděje [20].

Kyselé aminokyseliny

Kyselina asparagová a kyselina glutamová

Kyselina asparagová a kyselina glutamová jsou dikarboxylové kyseliny. Kyselina asparagová je důležitá pro *de novo* syntézu purinových a pyrimidinových nukleotidů. Aniontové skupiny aspartátu a glutamátu se vyskytují na povrchu proteinů ve vodném prostředí. Glutamát je primární excitační neurotransmitter v mozku [20].

Bazické aminokyseliny

Lysin a arginin

Lysin je esenciální AMK. Je důležitý pro tvorbu příčných můstků v kolagenu. Postranní řetězec lysinu se účastní zesílení při tvorbě fibrinu, což je proces nezbytný pro srážení krve. Arginin se využívá při syntéze kreatinu a je součástí ureosyntetického cyklu, při kterém se tvoří močovina. Dále je zdrojem oxidu dusnatého, který ovlivňuje řadu biologických aktivit, jako je vasodilatace a neurotransmise [20].

Histidin

Díky histidinu mají bílkoviny schopnost udržovat stálé pH, fungují jako pufr. Postranní řetězec histidinu je schopen vázat a odštěpovat proton v oblasti fyziologického pH. Dekarboxylací histidinu vzniká histamin, který má důležitou funkci při alergických reakcích, při kterých se uvolňuje ve vysokých koncentracích [20].

Aminokyseliny s polárním řetězcem

Serin a threonin

Serin a threonin obsahují hydroxyskupinu (-OH), na kterou se váže nejčastěji fosfát při fosforylaci proteinů. Serin je součástí fosfolipidů a může být syntetizován z meziproductů glykolýzy. Threonin je esenciální AMK [20].

Cystein a tyrosin

Cystein obsahuje v postranním řetězci thioskupinu (-SH), která je nezbytná pro funkci mnoha enzymů a strukturálních proteinů. Cystein je součástí glutathionu, který je v redukované formě důležitým intracelulárním antioxidantem. Tyrosin je aromatická AMK. Hromadí se v tkáních a krvi při tyrosinémii I. a II. typu, které jsou způsobeny dědičnými poruchami katabolismu této AMK. Tyrosin je biosyntetickým prekursorem tyroxinu, katecholaminů a melaninu [20].

Asparagin a glutamin

Asparagin a glutamin jsou neutrální AMK, které obsahují amidovou skupinu (-CO-NH₂). Patří k donorům aminoskupiny při mnoha biochemických syntézách. Asparagin se hydrolyzuje za katalýzy enzymem asparaginázou na kyselinu asparagovou a amoniak. Glutamin je nejhojnější AMK v těle a je metabolizován ve tkáních jater a střev. Glutamin je donorem dusíku při syntéze purinů a pyrimidinů, které jsou využívány pro syntézu nukleových kyselin. Je syntetizován v astrocytech, které jsou podpůrnými buňkami pro neurony. Asparagin a glutamin jsou také zdrojem neurotransmiteru, kyseliny γ -aminomáselné. Glutamin může být klasifikován jako esenciální AMK během těžkého traumatu nebo nemoci, protože pozitivně ovlivňuje imunitní funkce u pacientů zotavujících se z chirurgických zákroků [20].

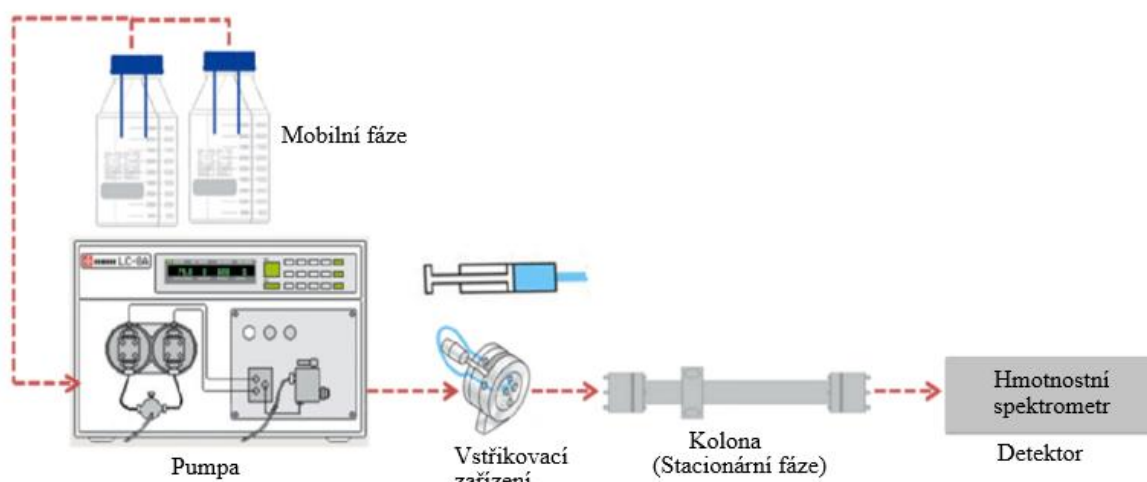
1.4 Metody pro stanovení aminokyselin v biologických vzorcích

Stanovení AMK v biologických vzorcích je náročné pro přítomnost mnoha dalších složek, jako jsou mastné kyseliny, kyselina mléčná atd. Měření koncentrací AMK v lidských biologických vzorcích je důležité pro diagnostiku a výzkum mechanismu nemocí. Pro stanovení AMK se běžně používají různé separační metody, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a kapilární elektroforéza (CE). V poslední době se rozvíjí mikrofluidní zařízení, které snižuje spotřebu vzorku. Jedná se o miniaturizovaný formát pro CE na čipu. Má vyšší separační účinnost a propustnost vzorku [22].

1.4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) byla zavedena v roce 1941. Pracuje na principu separace látek mezi mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF). SF je nejčastěji pevná látka, která je schopna držet částice kapaliny na svém vnějším povrchu. MF je čerpána ze zásobní lahve a prochází dávkovacím zařízením, kde se smíchá se vzorkem. Poté prochází kolonou, kde je vzorek rozdělen na jednotlivé složky. Každá sloučenina eluuje z kolony v pořadí závislém na síle její interakce se SF a MF. Tyto interakce mohou být založeny na velikosti molekuly (vylučovací chromatografie), náboji (iontově-výměnná chromatografie), hydrofobicitě (hydrofobní interakční chromatografie) nebo specifických vazebných interakcích (afinitní chromatografie). Jednotlivé složky jsou po uvolnění z kolony nesený MF do detektoru. Způsob detekce se liší podle detekovaného analytu. Často se používá UV/Vis detektor, který je připojen za kolonou pro nepřetržité sledování eluovaných látek z kolony. Monitorují se koncentrace

sloučenin eluovaných z kolony v průběhu času, čímž se získá chromatogram. Zjednodušené schéma LC je znázorněné na obrázku 2 [25-28].



Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu. Upraveno dle [29].

LC je používána pro separaci komplexních směsí za účelem stanovení přítomnosti a množství analytu v různých fyziologických materiálech, vzorcích z životního prostředí či potravinářských výrobcích. Tato metoda hraje důležitou úlohu v analytické chemii, biochemii, medicíně i ekologii [26].

Při LC analýze AMK se převážně používají kolony z monolitického oxidu křemičitého nebo kolony plněné částicemi pod 2 μm . Doba analýzy se výrazně zkrátila. Pro analýzu AMK byla také vyvinuta metoda LC ve formě čipu [22].

Chromatografie s obrácenými fázemi

Chromatografie s obrácenými fázemi je běžně používanou technikou při analýze AMK. Toto stanovení je založené na předkolonové derivatizaci AMK. Nevýhodou této metody je složité zpracování vzorku před analýzou a omezená stabilita vzniklých derivátů. Výhodou však zůstává, že se jedná o metodu, která je přístupná většině laboratoří, protože nevyžaduje žádné speciální nástroje. Automatizace metody se snaží eliminovat nevýhody. Derivatizace se provádí těsně před injekcí vzorku a omezuje se i ruční manipulace se vzorky [30]. Používá nepolární SF a polární MF. Nepolární SF může být připravena potažením silanizovaného silikagelu nepolární kapalinou. Nejpoleárnější sloučeniny v roztoku vzorku budou eluovány jako první. K eluci složek z kolony s obrácenými fázemi se používají směsi vody nebo vodných pufrů a

organických rozpouštědel. Tato chromatografie je dnes nejrozšířenějším typem LC. Používá se převážně při provádění HPLC, kde se jako SF používá vázaná kapalná fáze. Méně polární kapalina je chemicky vázána na polární silikagel v koloně [27, 28].

Chromatografie s normálními fázemi

V chromatografii s normálními fázemi je SF polární a MF nepolární. SF je obvykle oxid křemičitý nebo organické látky s kyanoskupinami nebo aminoskupinami. MF je hexan nebo heptan smíchaný s mírně polárnějším rozpouštědlem, jako je isopropanol, ethylacetát nebo chloroform. Nejprve eluují nejméně polární sloučeniny a jako poslední eluují nejvíce polární sloučeniny. Tento typ chromatografie se používá pro separaci sloučenin citlivých na vodu, *cis-trans* isomerů a chirálních sloučenin [27, 28].

Kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC) je relativně nový typ LC s normální fází. Separace je založena na polaritě analytů. Nejprve jsou eluovány AMK s nepolárním postranním řetězcem, a nakonec polární AMK, které mají větší retenci. HILIC je vhodná pro přímou a rychlou analýzu AMK. [31]

Iontově výměnná chromatografie

SF u iontově výměnné chromatografie obsahuje iontové skupiny (např. sulfonické) a MF je vodný pufr. Tento typ chromatografie lze dále rozdělit na kationtoměničovou a aniontoměničovou chromatografii. Iontově výměnná chromatografie se nejčastěji používá k separaci anorganických a organických aniontů a kationtů ve vodném roztoku [27, 28]. Moore a Stein [32] poprvé analyzovali AMK metodou iontově výměnné chromatografie s post-kolonovou derivatizací a jako derivatizační činidlo použili ninhydrin.

1.4.1.1 Derivatizace v kapalinové chromatografii

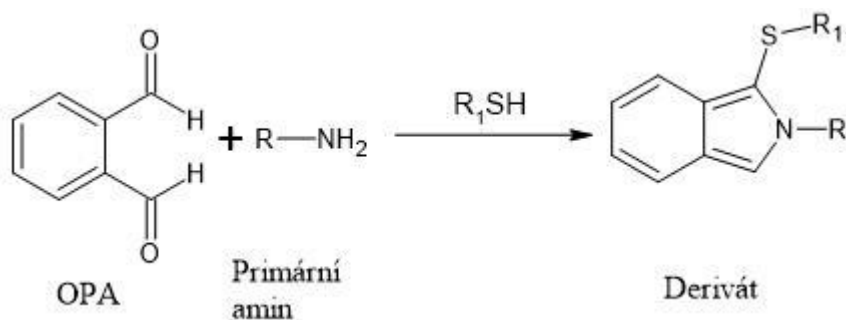
V moderní chemické analýze je poptávka po co nejcitlivějších, nejpresnějších a nejjednodušších metodách, které vyžadují co nejmenší zásah člověka. Jedním z možných postupů, jak zvýšit citlivost a přesnost analytické metody, je použití specifických chemických reakcí k převedení stanovovaných látek na deriváty, které lze snadněji separovat a detekovat [33]. Derivatizace může probíhat před kolonou (předkolonová) nebo za kolonou (post-kolonová). Předkolonová derivatizace probíhá před vstupem analytů na kolonu. Derivatizace před kolonou ovlivňuje separaci sloučenin. Pro takovou derivatizaci musí být vybrána kvantitativní reakce bez vedlejších produktů. Reakční podmínky lze optimalizovat bez časových omezení. Post-kolonová derivatizace se provádí mezi kolonou a detektorem.

Ovlivňuje detekci, zvyšuje citlivost a selektivitu. Tato technika se používá převážně pro sloučeniny s nízkou nebo žádnou odezvou na požadované detekční vlastnosti. Reakce nemusí být kvantitativní. Reakční čas je obvykle omezen konstrukcí reaktoru a měl by být dostatečně rychlý, aby nebylo zhoršeno rozlišení difúzí. [34].

Derivatizace se používá ke zvýšení citlivosti metody LC, zejména v kombinaci s laserem indukovanou fluorescencí (LIF), která poskytuje dobré detekční limity pro stanovení derivátů. Nejpoužívanějším derivatizačním činidlem používaným pro předkolonovou derivatizaci AMK je fenylisothiokyanát (PITC), lze použít i naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), dabsyl a dansylchlorid. Pro derivatizaci AMK v koloně a pro post-kolonovou derivatizaci se používá nejčastěji *o*-ftalaldehyd (OPA) [35, 36].

***o*-Ftalaldehyd**

Jedním z nejlépe charakterizovaných derivatizačních činidel pro derivatizaci AMK je OPA. Používá se pro post-kolonovou derivatizaci AMK, protože vzniklé isoindolové deriváty jsou nestabilní (obrázek 3). OPA je jedno z nejrozšířenějších derivatizačních činidel pro primární aminy z důvodu jeho nízkých nákladů, rychlé reakce a vysoce fluorescenčních aduktů. Nevýhodou tohoto typu derivatizace je jak nestabilita vzniklých derivátů, tak i nestabilita samotného OPA derivatizačního činidla. Sekundární AMK s tímto derivatizačním činidlem nereagují [37, 38].



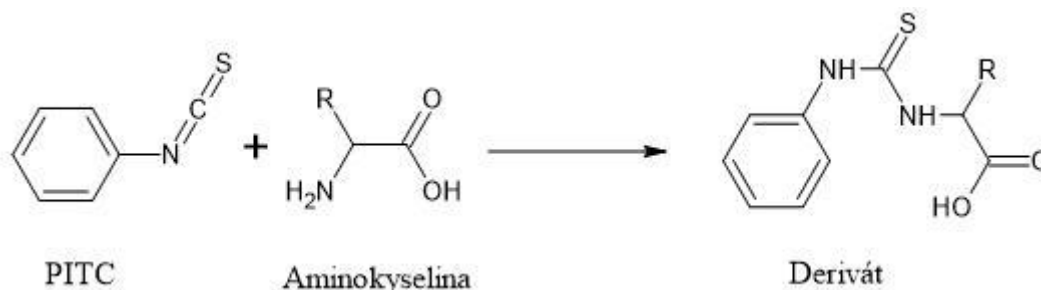
Obrázek 3 Schéma reakce *o*-ftalaldehydu s primárním aminem. Upraveno dle [39].

Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd

Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA) reaguje s AMK podobně jako OPA, vzniklé deriváty jsou však daleko stabilnější a vykazují vyšší fluorescenci oproti OPA derivátům. Excitační a emisní maxima derivátů jsou 440 nm a 490 nm. Nevýhodou je, že sloučeniny derivatizované na více než jednom místě vykazují zhášení, což vylučuje použití fluorescenční detekce [36].

Fenylisothiokyanát

Fenylisothiokyanát (PITC) se používá při předkolonové derivatizaci primárních i sekundárních aminů. Reakce PITC s AMK (obrázek 4) trvá asi 10-20 minut, poté je nutné nadbytek derivatizačního činidla odstranit ze směsi. Deriváty absorbují v UV oblasti. Nevýhodou tohoto typu derivatizace je složitá příprava vzorku a interference stopového množství solí a dalších sloučenin s derivatizačním krokem [37, 40, 41].



Obrázek 3 Schéma reakce fenylisothiokyanátu s aminokyselinou. Upraveno dle [40].

Dabsyl a dansylchlorid

Dabsyl a dansylchlorid tvoří deriváty s primárními i sekundárními aminokyselinami, které jsou fluorescenční (dansyl) nebo absorbují záření v rozsahu vlnových délek viditelného světla (dabsyl). Obě reakce jsou časově náročné a vyžadují vysoké teploty. Vzniklé deriváty jsou relativně nestabilní a reakce není příliš selektivní [41].

Ninhydrin

Ninhydrin je činidlo, které se používá pro post-kolonovou derivatizaci. Reaguje s primárními i sekundárními aminy při teplotě 100-120 °C a pH 5. Toto derivatizační činidlo se používá pro stanovení AMK metodou iontově výměnné chromatografie [37, 42].

1.4.1.2 Detektory používané v kapalinové chromatografii

Detektory slouží k detekci analytů, které vstupují do detektoru. Důležitými vlastnostmi detektorů jsou citlivost, šum, selektivita a linearita odezvy. [43].

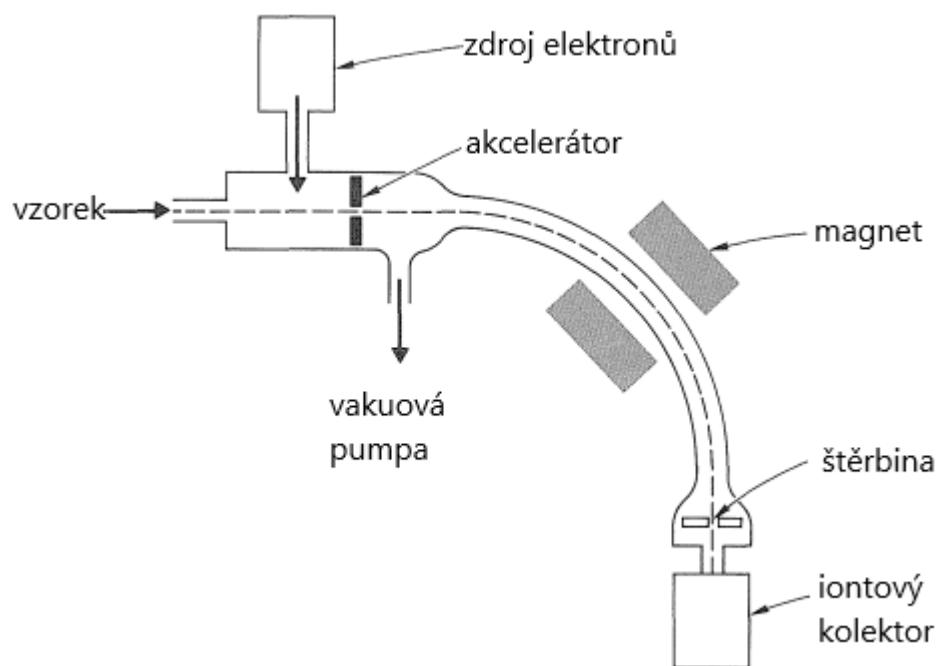
Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektory (FLD) jsou nejcitlivější HPLC detektory. Používají se pro analýzy, které vyžadují vysokou citlivost a selektivitu, zejména pokud analyt absorbuje UV záření málo

nebo vůbec. Pro danou molekulu jsou jak excitační, tak emisní vlnové délky specifické, proto mohou být fluorescenční detektory velmi selektivní. Nejpokročilejší FLD mají tepelně regulovanou celu, která zajišťuje stabilní analýzu, i když okolní teplota kolísá. Detekce je založena na fluorescenci neboli schopnosti látek absorbovat záření následně jej emitovat o vyšší vlnové délce. Molekula je vystavena záření o definované vlnové délce, jehož zdrojem bývá xenonová lampa, a dojde k excitaci. Při návratu molekuly z excitovaného stavu na nižší energetickou hladinu dojde k fluorescenci. Fotonásobič, který je v detektoru umístěn kolmo ke zdroji světla, detekuje fluorescenci dané molekuly [44, 45]. AMK s výjimkou Trp, Tyr a Phe nefluoreskují, proto je nutné před stanovením provést derivatizaci např. OPA derivatizačním činidlem nebo dansylchloridem. [22]

Hmotnostní detektory

Hmotnostní spektrometr je jediný detektor používaný v chromatografické analýze, který je schopen identifikovat jakoukoli organickou sloučeninu. Stal se tak vyhledávaným detektorem v analytických technikách, jako je LC, CE a GC [46, 47]. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (obrázek 6). Nejčastěji používanými hmotnostními detektory jsou s iontovou pastí a kvadrupólem [47].



Obrázek 4 Schéma hmotnostního spektrometru. Upraveno dle [48].

Jednotlivé látky jsou po vstupu do hmotnostního spektra ionizovány a fragmentovány na ionty. Tyto ionty jsou separovány podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následně detekovány. Separace probíhá ve vysokém vakuu, proto musí být MS nepřetržitě připojen

k vakuovému systému [46, 49]. Výhodou použití tohoto detektoru je, že často není nutná derivatizace před vlastní analýzou a příprava vzorku je tak jednodušší [22].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) může být aplikováno na širokou škálu biologických sloučenin. Začala se používat pro diagnostiku vrozených vad metabolismu v suché kapce krve novorozenců. Pro větší využití LC v klinických praxích a pro širší rozsah biologických molekul, které lze analyzovat, je LC-MS používanější než spojení MS s plynovou chromatografií. Výhodou tohoto spojení je vyšší citlivost metody, vyšší specifita a schopnost analýzy složitých směsí. Pro zlepšení citlivosti a specifity je vhodné provést derivatizaci [22, 50].

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) je technika vhodná pro analýzu metabolitů. Pro kvantitativní měření je nezbytné použít derivatizační činidlo. Nejpoužívanější ionizační technikou pro GC-MS je elektronová ionizace. CE-MS byla použita pro stanovení AMK v biologických vzorcích bez předchozí derivatizace. Pro citlivou analýzu byla použita ionizace elektrosprejem s analyzátozem trojitého kvadrupolu [22].

Iontové zdroje

- **Elektronová ionizace**

Zahřívání cívkou z wolframového vlákna emituje elektrony, které vstupují do komory iontového zdroje na základě rozdílu potenciálů mezi vláknem a komorou, ten se pohybuje většinou v rozmezí 50-70 V. Molekuly jsou ionizovány odstraněním elektronu, vzniká pozitivně nabitý ion, tzv. radikálový kation. První ionizační energie většiny organických sloučenin je řádově 10 eV. Standardní rozdíl potenciálu použitého k urychlení elektronů je obvykle 70 eV, díky tomu lze u metody GC-MS porovnávat získaná spektra s knihovnou hmotnostních spekter. Molekulární ionty generované v iontovém zdroji mají velkou vnitřní energii, proto dochází k jejich fragmentaci. Vytváří se tak hmotnostní spektra. Fragmentace pokračuje do té doby, dokud se neuvolní nadbytek vnitřní energie [46, 51].

- **Ionizace elektrosprejem**

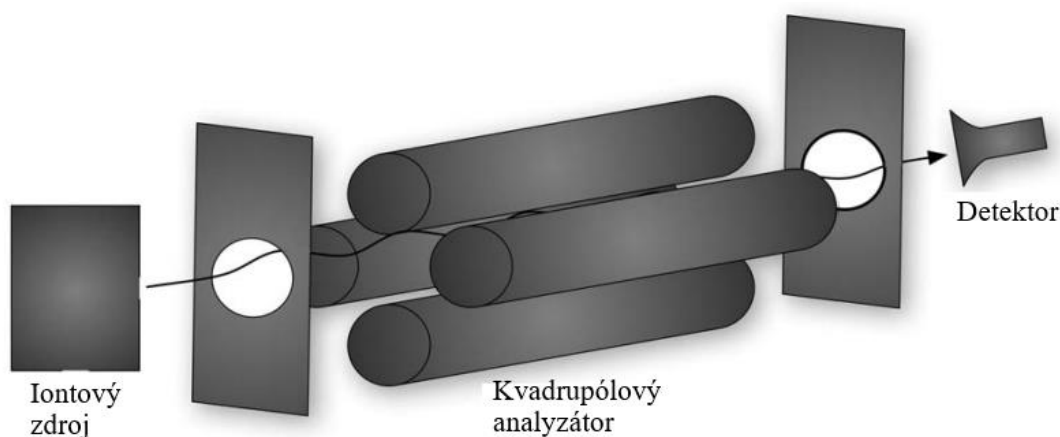
Ionizace elektrosprejem (ESI) je ionizační technika, která se používá při měření metabolitů v biologických vzorcích. Využívá elektrickou energii k přenosu iontů z roztoku do plynné fáze. Z kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí, se uvolňuje mlha vysoce nabitých kapiček se stejnou polaritou jako kapilární napětí. Použití rozprašovacího plynu zvyšuje průtok vzorku. Nabité kapičky procházejí tlakovým a potenciálovým gradientem do analyzátoru MS. S pomocí zvýšené teploty zdroje ESI se nabité kapičky neustále zmenšují, což vede k zvýšení hustoty povrchového náboje a ke snížení poloměru kapiček. Síla elektrického pole uvnitř nabitě

kapičky dosáhne kritického bodu a ionty z povrchu kapiček jsou vytlačeny do plynné fáze. Tento typ ionizace se běžně používá pro metabolické profiloání AMK z krevních skvrn [52].

Analyzátory hmotnostních detektorů

- **Kvadrupólový analyzátor**

Skládá se ze čtyř kovových tyčí, které jsou uspořádány kolem centrální osy (obrázek 7). Na 2 protilehlé tyče je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí a na zbylé dvě tyče je vloženo stejnosměrné napětí. Tím se vytváří kolem tyčí složité elektrostatické pole, které odchyluje ionty v závislosti na jejich poměru m/z [46, 51].



Obrázek 5 Schéma kvadrupólového analyzátoru. Upraveno dle [46].

Vzorek se zavede do ionizační komory, kde dochází k ionizaci a fragmentaci. Ionty jsou urychlovány směrem k hmotnostnímu analyzátoru. Jsou ovlivňovány elektrostatickým polem a jejich pohyb kolem tyčí lze přirovnat ke dvěma superponovaným sinusovým vlnám. Napětí na tyčích může být zvoleno tak, aby do detektoru prošly pouze ionty o určité hodnotě m/z , které budou mít stabilní trajektorii [46, 51]. Citlivost kvadrupólového analyzátoru se dá zvýšit rozšířením rozsahu hodnot m/z , čímž se však sníží jeho rozlišení. Tento analyzátor je snadno ovladatelný, skenuje dostatečně rychle, vyžaduje přiměřené vakuové podmínky, nabízí dostatečné rozlišení a je cenově dostupný [46].

- **Iontová past**

Iontová past pracuje na podobném principu jako kvadrupólový analyzátor. Obsahuje dva koncové kryty a prstencovou elektrodu, na kterou je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Koncové části jsou buď uzemněny, nebo je na ně vloženo střídavé či stejnosměrné napětí. Po ionizaci jsou ionty udržovány ve středu pasti a kmitají na stabilní oběžné dráze. Zvýšením amplitudy vysokofrekvenčního střídavého napětí jsou ionty postupně vytlačovány ze svých stabilních drah do detektoru [46, 51].

Detektor

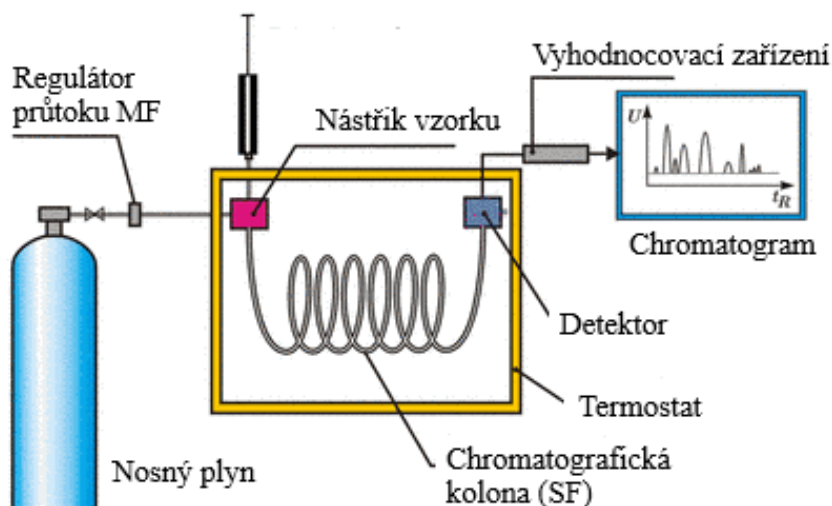
Detektor je poslední součástí hmotnostního spektrometru. Používá se pro monitorování a zaznamenávání přítomnosti oddělených iontů pocházejících z hmotnostního analyzátoru. V závislosti na analytických aplikacích a konstrukci přístroje lze použít různé detektory, jako je elektronový multiplikátor, Faradayův pohár, detekce negativních iontů a další. Signály se zaznamenávají do grafu vynesáním poměru signálu k poměru m/z [53].

Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce dokáže detekovat elektrické proudy generované oxidačními nebo redukčními reakcemi ve stanovovaných sloučeninách. Derivatizace je někdy nutná pro zvýšení citlivosti. Vhodným derivatizačním činidlem je OPA [22].

1.4.2 Plynová chromatografie

GC je nejdéle zavedená instrumentální chromatografická technika. Dominovala od počátku 50. let 20. století do poloviny 70. let, kdy jí začala konkurovat HPLC. Během těchto dvaceti let bylo vynaloženo značné úsilí k tomu, aby byly sloučeniny přístupnější pro analýzu GC. Nejdůležitější bylo zajistit, aby byly látky dostatečně těkavé, tepelně stabilní a méně polární [54]. GC je běžný typ chromatografie, který se používá v analytické chemii pro separaci a analýzu sloučenin, které mohou být odpařeny bez rozkladu. Typické použití GC zahrnuje testování čistoty konkrétní látky, separaci různých složek směsi nebo identifikaci sloučenin [46, 55]. GC zahrnuje separaci složek směsi na základě rozdílů v rovnovážném rozdělení složek mezi dvě fáze. Plynná (mobilní) fáze se pohybuje v daném směru, zatímco druhá fáze je pevná (stacionární) [12].



Obrázek 6 Schéma plynového chromatografu. Upraveno dle [56].

Chromatograf se skládá z tlakové lahve, která slouží jako zásobník nosného plynu, regulátoru průtoku MF, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, termostatu kolon, detektoru a vyhodnocovacího zařízení, které zpracovává signál z detektoru (obrázek 5). Vzorek je dávkován do přístroje, kde se vypaří a vstoupí do proudu nosného plynu, který ho unáší na kolonu. MF je inertní plyn, který s analyty neinteraguje. Nejčastěji používaným nosným plynem (MF) je helium, vodík a dusík. SF může být pevný adsorbent nebo kapalina navázaná na inertní nosič, ta je v současné době nejpoužívanější a slouží k separaci organických sloučenin [12, 46, 55, 57].

Při GC analýz AMK jsou nezbytné derivatizační procesy. Pro uspokojivou GC analýzu musí být derivatizovány všechny reaktivní skupiny AMK, což může být nevýhodu této metody. Naopak výhodou metod GC analýzy jsou nízké náklady, dostupnost nástroje GC, snadná obsluha a stabilita vzniklých derivátů. Kromě toho je relativně jednoduché propojení GC s hmotnostním spektrometrem. To umožňuje identifikaci derivátů AMK a odlišuje je od kontaminace ve vzorků [58].

1.4.2.1 Derivatizace v plynové chromatografii

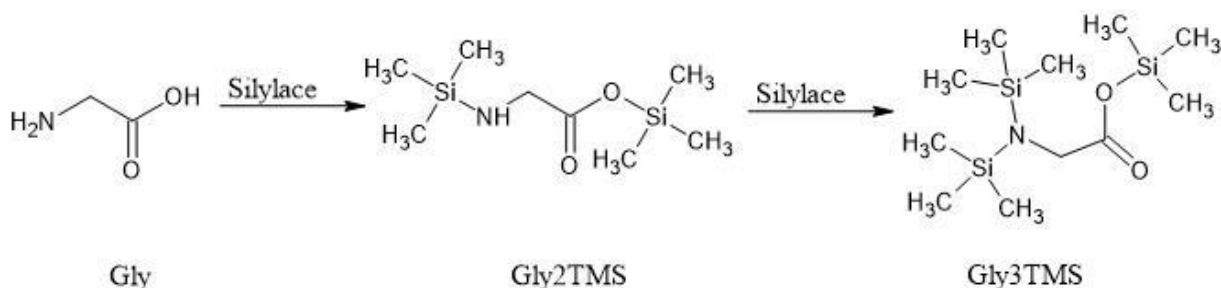
AMK nejsou dostatečně těkavé ani tepelně stabilní látky, proto nemohou být jako takové analyzovány metodou GC, a proto musí být před vlastní analýzou převedeny na vhodné těkavé a stabilní deriváty [59].

Acylace

Acylace se používá pro snížení polaritu a zlepšení separace AMK. Pouze derivatizace acetylovými skupinami nebo fluorovanými acylovými skupinami vede ke vzniku vhodných derivátů AMK, které jsou dostatečně těkavé a tepelně stabilní, jiné acylové skupiny nejsou vhodné. Například acylace trifluoroacetamidem (TFA) nebo anhydridem kyseliny heptafluorobutyrové (HFBA) se provádí při 100 °C nebo vyšších, nejčastěji v přítomnosti rozpouštědla, jako je dichlormethan [33, 54].

Silylace

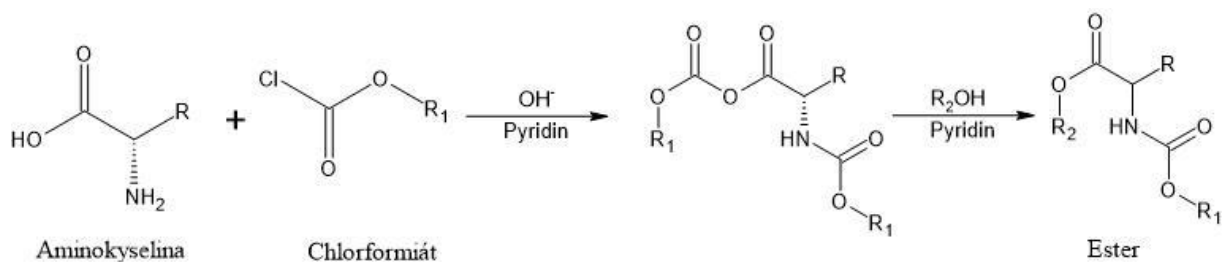
Silylace je chemická reakce, při níž dochází k nahrazení reaktivního atomu vodíku za silylovou skupinu, nejčastěji trimethylsilylem (TMS; obrázek 8). Účelem silylace je snížit polaritu analytu a zvýšit jeho stabilitu. Reaktivita funkčních skupin se silylačním činidlem klesá ve směru alkoholy → fenoly → kyseliny → aminy → amidy. Nevýhodou silylace je nutnost pracovat v bezvodém prostředí. Stanovované látky musejí být tedy ze vzorku extrahovány a extrakční médium se musí odpařit, až poté je možné v bezvodém prostředí provést derivatizaci [33, 54].



Obrázek 7 Schéma silylace glycinu. Upraveno dle [60].

Chlorformiáty

V 90. letech 20. století byly pro derivatizaci skupin s aktivním vodíkem použity chlorformiáty. Tuto techniku zavedl profesor Hušek. Chlorformiáty reagují s karboxylovými kyselinami za vzniku anhydridů, které jsou vhodné pro GC analýzu [54]. Alkylchlorformiáty se používají pro derivatizaci látek obsahujících aminoskupinu nebo karboxylovou skupinu [61].



Obrázek 8 Schéma reakce chlorformiátu s aminokyselinou. Upraveno dle [61].

Methyl- a ethylchlorformiát (MCF a ECF) jsou vhodná derivatizační činidla pro derivatizaci AMK. Derivatizace je jednostupňová, probíhá ve vodném prostředí v přítomnosti pyridinu při laboratorní teplotě a za mírných podmínek prakticky okamžitě, čímž je zabráněno možné racemizaci. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 9. Alkylová skupina derivatizačního činidla a alkoholu nemusí být stejná, výsledkem je vznik různých esterů. K detekci těchto derivátů AMK se používá FID či MS [23, 54, 62].

1.4.2.2 Detektory používané v plynové chromatografii

Plamenově ionizační detektor

Plamenově ionizační detektor (FID) je nejpoužívanějším detektorem v GC. Je vysoce citlivý, spolehlivý a poskytuje lineární odezvu. GC-FID je velmi rychlá metoda a je vhodná pro rutinní analýzu AMK. FID schopen detekovat téměř všechny organické látky. Je tvořen hořákem a elektrodami. Na spodní části hořáku se mísí nosný plyn s vodíkem. Tato směs je následně přivedena na trysku hořáku. Vzduch se přivádí do spodní části hořáku. Elektrické pole je aplikováno buď na dvě rovnoběžné elektrody umístěné na obou stranách plamene, nebo mezi trysku a sběrnou elektrodu obklopující plamen. S nosným plynem je do detektoru přivedena i stanovovaná látka, která se spálí ve vodíkovém plameni. Při spálení vzniknou iontové fragmenty a elektrony, které zvyšují elektrickou vodivost plamene. Tím se zvýší i ionizační proud [43].

Detektor elektronového záchytu

Detektor elektronového záchytu (ECD) je vhodný pro detekci molekul se silnou afinitou k elektronům, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, molekuly se systémem konjugovaných dvojných vazeb nebo sloučeniny obsahující atomy halogenu (pesticidy). ECD je vysoce citlivý detektor, detekční limity mohou být u ECD desetkrát nižší než u FID. K ionizaci nosného plynu se používá beta zářič jako je tritium (^3H) nebo isotope niklu ^{63}Ni . Ten emituje elektrony, které se srazí s molekulami nosného plynu nebo stanovované látky a ionizují

je. Těmito nárazy vznikají volné elektrony, které jsou pomalé a vytvářejí rovnoměrný měřitelný proud pozadí. Při eluci analytu reagují jeho molekuly s elektrony a zachycují je, což vede k tvorbě aniontů. Záporné ionty driftují mnohem pomaleji v elektrickém poli a s kladnými ionty reagují rychleji než elektrony. Pozorovaný proud takto klesá o množství odpovídající počtu zachycených elektronů [39]. ECD se používá pro detekci AMK po předchozí derivatizaci 1-fluor-2,4-dinitrobenzenem za vzniku stabilních dinitrofenylových derivátů. Metoda GC-ECD je citlivá a přesná [63].

1.4.3 Kapilární elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která je založena na migraci a separaci nabitých částic vlivem elektrického pole. Elektroforetický systém je tvořen dvěma elektrodami opačného náboje (anoda a katoda), které jsou spojené vodivým médiem (elektrolytem). Látky jsou separovány podle náboje a velikosti částic [64]. Sestava CE se skládá z úzké skleněné kapiláry, nádobky se základním elektrolytem, nádobky se vzorkem, dvou elektrod připojených k vysokonapětovému napájecímu zdroji, detektoru, který je nejčastěji připojen ke kapiláře a počítače se softwarem. CE zahrnuje techniky, kterými jsou kapilární izoelektrická fokusace, kapilární gelová elektroforéza a kapilární zónová elektroforéza [65]. Separace látek je obvykle rychlá s vysokou účinností [66].

CE se používá pro stanovení čistoty AMK, pro sledování jejich syntézy, izolace, chemické derivatizace a také pro zkoumání jejich interakcí s ligandy. Metoda je vysoce citlivá a je oblíbená díky své vysoké účinnosti separace, sníženým provozním nákladům a malé spotřebě rozpouštědla [67]. Spojení CE s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací byla použita pro stanovení a kvantifikaci malých nabitých sloučenin v biologických vzorcích. CE nabízí velkou hmotnostní selektivitu a citlivost a MS poskytuje možnost strukturálních informací, propojení CE-MS zvyšuje spolehlivost analýzy bez potřeby rozsáhlého a komplikovaného zpracování vzorku [68].

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zavést a validovat metody plynové a kapalinové chromatografie pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce.

3 Experimentální část

3.1 Seznam přístrojů a pomůcek

- Analytické váhy AdventureTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Automatické pipety Biohit (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)
- Odstředivka Sorvall TC6 (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA)
- Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
 - Čerpadla LC-20AD
 - Termostat kolon CTO-20AC
 - Odvzdušňovač mobilní fáze DGU-20A5
 - Fluorescenční detektor RF-20A
 - Řídicí systém CBM-20A
 - 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)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Laboratorní sklo (kádinky, zkumavky, odměrné baňky, nálevky)
- Magnetické míchadlo Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Odpařovací zařízení Thermo Scientific, model TS-18825 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- pH-metr inoLab, level 2, (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo)
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Kapilární kolona HP-5, 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

- Polypropylenové (PP) zkumavky s víčkem typu eppendorf; 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Předvážky Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Zkumavky z pyrex skla s teflonovým těsněním, 10ml (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Velká Británie)
- Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Skleněné vialky s krimpovacím uzávěrem (Fisher Scientific Pardubice, ČR)
- Termoblok, model 18821, (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Termoblok PIERCE, model 18971 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Ultrazvuková čistička Ecoson (Ecoson, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)
- Odběrové karty Protein Saver™ 903™ (Whatman™, GE Healthcare Bio-Sciences, Dassel, Německo)

3.2 Seznam chemikálií

- Acetonitril (C₂H₃N); Mr 41,05; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Deionizovaná voda (H₂O); Mr 18,00; G = 0,055 μS
- Diethylether (C₄H₁₀O); Mr 74,12; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Dichlormethan (CH₂Cl₂); Mr 84,93; (Sigma Chemical Company, St. Luis, MI, USA)
- Ethanol (C₂H₆O); Mr 46,07; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Ethylacetát (C₄H₈O₂); Mr 88,11; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ethylchlorformiát (C₃H₅ClO₂); Mr 108,52; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chloroform (CHCl₃); Mr 119,38; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Helium 5.0 (Linde Gas, Praha, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄); Mr 119,98; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Hydrogenuhličitan draselný (KHCO₃); Mr 100,12; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Hydroxid sodný (NaOH); Mr 40,00; (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

- Kyanid draselný (KCN); Mr 65,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina boritá (H₃BO₃); Mr 65,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Alanin (C₃H₇NO₂); Mr 89,09; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Arginin (C₆H₁₄N₄O₂); Mr 174,20; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagin (C₄H₈N₂O₃); Mr 132,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagová kyselina (C₄H₇NO₄); Mr 133,11; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-2-Aminomáselná kyselina (C₄H₉NO₂); Mr 103,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Citrulin (C₆H₁₃N₃O₃); Mr 175,20; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Fenylalanin (C₉H₁₁NO₂); Mr 165,191; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamin (C₅H₁₀N₂O₃); Mr 146,14; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamová kyselina (C₅H₉NO₄); Mr 147,13; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glycin (C₂H₅NO₂); Mr 75,07; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Histidin (C₆H₉N₃O₂); Mr 155,15; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Isoleucin (C₆H₁₃NO₂); Mr 131,17; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Leucin (C₆H₁₃NO₂); Mr 131,17; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Lysin (C₆H₁₄N₂O₂); Mr 146,19; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Methionin (C₅H₁₁NO₂S); Mr 149,21; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Norleucin (C₆H₁₃NO₂); Mr 131,17; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Prolin (C₅H₉NO₂); Mr 115,13; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Serin (C₃H₇NO₃); Mr 105,09; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Taurin (C₂H₇NO₃S); Mr 125,15; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Threonin (C₄H₉NO₃); Mr 119,1192; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tyrosin (C₉H₁₁NO₃); Mr 181,19; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tryptofan (C₁₁H₁₂N₂O₂); Mr 204,23; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Valin (C₅H₁₁NO₂); Mr 117,151; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- n-Butanol (C₄H₉OH); Mr 74,12; (Merck, Darmstadt, Německo)
- n-Hexan (C₆H₁₂); Mr 86,18; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (C₁₂H₈O₂); Mr 184,19; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- Pyridin (C_5H_5N); Mr 79,10; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Síran sodný (Na_2SO_4); Mr 142,04; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Uhličitan draselný (K_2CO_3); Mr 138,21; (Sigma Chemical Company, St. Louis, MI, USA)

3.3 Pracovní roztoky

Deionizovaná voda

Deionizovaná voda určená na propláchnutí HPLC systému byla přefiltrována skrz nylonový filtr s porozitou 0,2 μm a odvzdušněná ultrazvukem.

Směs acetonitrilu a 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného (5:95, v/v, pH 7,2)

V 950 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 1,35 g Na_2HPO_4 . Po úplném rozpuštění bylo přidáno 50 ml ACN a pH bylo upraveno 6 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,2. Takto připravená mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr s porozitou 0,2 μm a odvzdušněna ultrazvukem.

Směs acetonitrilu a 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodného (65:35, v/v, pH 7,2)

V 350 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 0,5 g Na_2HPO_4 . Po úplném rozpuštění bylo přidáno 650 ml ACN a pH bylo upraveno 6 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,2. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr s porozitou 0,2 μm a odvzdušněna ultrazvukem.

Borátový pufr (asi 0,1 mol/l)

Navážka 0,31 g kyseliny borité byla rozpuštěna v 50 ml deionizované vody, pH bylo upraveno asi 6 mol/l hydroxidem sodným na hodnotu 9,3. Pufr byl uchován při teplotě 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

Roztok kyanidu draselného (asi 40 mmol/l)

Navážka 0,0130 g kyanidu draselného byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody. Roztok kyanidu byl uchován v chladničce při teplotě 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

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

Navážka 0,0100 g NDA byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu. Roztok byl uchován při teplotě -80 °C maximálně po dobu 1 měsíce.

Zásobní roztok hydroxidu sodného (asi 6 mol/l)

Navážka 2,4 g NaOH byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody.

Pracovní roztok hydroxidu sodného (asi 2 mol/l)

K 200 μ l asi 6 mol/l NaOH bylo přidáno 400 μ l deionizované vody. Roztok byl uchován při 4 °C.

Směs uhličitanu draselného a hydrogenuhličitanu draselného (asi 1 mol/l)

Navážky 6,30 g uhličitanu draselného a 3,40 g hydrogenuhličitanu draselného byly rozpuštěny v 100 ml deionizované vody. Směs byla uchována při 4 °C.

Zásobní roztok 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 uchován při -80 °C.

Pracovní roztok norleucinu (asi 10 μ mol/l)

Objem 90 μ l 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.

Pracovní roztok norleucinu (asi 2,25 mmol/l)

Zásobní roztok norleucinu byl 10x naředěn deionizovanou vodou v množství potřebném pro přípravu vzorků v jednom dni.

Zásobní roztoky aminokyselin

Navážky jednotlivých aminokyselin, které jsou uvedeny v tabulce 5, byly rozpuštěny v 10 ml deionizované vody kromě tyrosinu a kyseliny glutamové, které byly rozpuštěny v 50 ml deionizované vody. Zásobní roztoky byly pipetovány po 1 ml do 1,5 ml PP zkumavek a uchovány při -80 °C.

Tabulka 5 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	2-AB	0,1061	102,9

Směsný pracovní roztok aminokyselin, standard S₅

Směsný pracovní roztok aminokyselin byl připraven pipetováním odpovídajícího množství zásobního roztoku jednotlivé aminokyseliny, který je uveden v tabulce 6, do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn po rysku deionizovanou vodou.

Tabulka 6 Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin, standard S₅

AMK	Objem [μl]	Koncentrace [μmol/l]	AMK	Objem [μl]	Koncentrace [μmol/l]
Ala	250	1018,1	Leu	80	259,8
Arg	15	59,8	Met	10	38,6
Asn	25	100,6	Phe	35	112,5
Asp	120	102,1	Ser	125	512,4
Cit	15	59,7	Tau	125	507,8
Gln	125	509,1	Thr	65	259,5
Glu	1700	2047,4	Trp	25	30,4
Gly	120	501,3	Tyr	1200	51,9
His	25	101,1	Val	65	253,2
Ile	25	101,0	2-AB	15	61,7

3.4 Vzorky mateřského mléka

Bylo analyzováno 20 vzorků mateřského mléka. Od každé ženy bylo získáno přibližně 500 µl zadního mléka. Od osmnácti žen byl získán vzorek kolostra nebo zralého mléka technikou suché kapky. Mléko (mlezivo) bylo kápnuto na speciální odběrovou kartu Protein Saver™ 903™ (Whatman™, GE Healthcare Bio-Sciences, Dassel, Německo). Po uschnutí vzorku mléka (mleziva) při pokojové teplotě, během asi 3 hodin, byly odběrové karty v den odběru dopraveny do laboratoře a před zpracováním uchovávány při -20 °C. Studie byla odsouhlasena etickou komisí Krajské nemocnice Pardubice a dárkyně poskytl informovaný souhlas.

3.5 Postup stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce metodou plynové chromatografie

Aminokyseliny byly před GC-MS analýzou derivatizovány ECF.

3.5.1 Příprava vzorků

K 200 µl Vzorku mateřského mléka (standardu) bylo přidáno 400 µl ACN, 200 µl EtOH a 20 µl roztoku norleucinu o koncentraci 2,25 mmol/l. Směs byla inkubována 5 min při -20 °C, a odstředěna (2058 x g, 5 minut, laboratorní teplota). Do čisté zkumavky bylo přeneseno 600 µl supernatantu, přidány 3 µl 2 mol/l NaOH a 500 µl hexanu, směs byla intenzivně třepána 3 minuty na vortexu a poté odstředěna (1563 x g, 3 minuty, laboratorní teplota). Vrchní hexanová vrstva byla odstraněna a 500 µl vodné fáze přeneseno do čisté zkumavky, přidáno 40 µl pyridinu a 40 µl ECF, směs promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě, poté přidáno 500 µl směsi KHCO₃ a K₂CO₃ a 300 µl chloroformu s 1 % ECF, směs třepána 3 min a odstředěna (1563 x g, 3 minuty, laboratorní teplota). Vrchní vodná vrstva byla odstraněna, 250 µl organické fáze (chloroform) přeneseno do čisté zkumavky a vysušeno přidáním 50-80 mg síranu sodného. Směs byla odstředěna (1563 x g, 3 minuty, laboratorní teplota) a 200 µl organické fáze přeneseno do čisté zkumavky. Chloroform byl při laboratorní teplotě odpařen v atmosféře dusíku, odparek rozpuštěn v 200 µl dichlormethanu a směs přenesena do insertu vialky s uzávěrem.

3.5.2 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky

Ředěním směsného standardu AMK S₅ deionizovanou vodou byly připraveny standardní roztoky AMK S₁-S₄ (tabulka 7).

Tabulka 7 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Standard	S ₅ [μl]	H ₂ O [μl]
S ₄	100	100
S ₃	40	160
S ₂	20	180
S ₁	10	190
S ₀	0	200

3.5.3 Podmínky pro stanovení aminokyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

- Průtok nosného plynu: 20,4 ml/min
- Teplota nástřiku: 300 °C
- Mód nástřiku: split v poměru 10:1
- Teplota iontového zdroje: 200 °C
- Teplota interface: 280 °C
- Ionizační energie: 70 eV
- Objem dávkovaného vzorku: 2 μl
- Teplotní gradient:
 - 0,01 – 5 min, 50 °C
 - 5 – 30 min, nárůst 10 °C/min do 300 °C
 - 30 – 32 min, 300 °C
- Doba analýzy: 32 min
- Typ snímání: SIM

V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty m/z iontů, které byly použity pro vytvoření SIM metody. Uvedené hodnoty byly získány proměřením standardů jednotlivých derivátů AMK metodou SCAN, kdy pro jejich identifikaci byla použita knihovna spekter. V tabulce je uveden poměr m/z nejintenzivnějšího iontu ve spektru pro daný derivát AMK (Identifikátor), retenční

čas (RT) a poměr m/z referenčních iontů, které slouží k zajištění selektivity. Poměr m/z určuje hmotnost částic. Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima píku. V Příloze 1 je zobrazen chromatografický záznam stanovených AMK ze vzorku mateřského mléka, zpracovaného podle kapitoly 3.5.1, metodou SIM.

Tabulka 8 Retenční časy a poměry hmotnosti k náboji (m/z) derivátů aminokyselin určených metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

AMK	Identifikátor m/z	RT [min]	Referenční ionty m/z
Ala	116.00	13.020	70.00; 72.00
Gly	102.00	13.100	74.00; 56.00
2-AB	130.00	14.110	58.00; 84.00
Val	144.00	14.725	72.00; 116.00
Leu	158.00	15.670	102.00; 86.00
Ile	158.00	15.880	102.00; 86.00
Nleu (IS)	158.00	16.280	86.00; 58.00
Asp	188.00	17.900	116.00; 142.00
Met	129.00	18.710	101.00; 175.00
Glu	128.00	19.220	156.00; 202.00
Phe	91.00	19.980	176.00; 192.00
Gln	84.00	20.855	128.00; 173.00
His	154.00	23.870	238.00; 254.00
Tyr	107.00	24.900	192.00; 264.00
Trp	130.00	25.750	131.00; 77.00

m/z = poměr hmotnosti a náboje, RT = retenční čas

3.5.4 Kalibrace

Pro kvantitativní analýzu vybraných AMK v mateřském mléce byla použita metoda kalibrační křivky. Na osu x byla vynesena koncentrace v $\mu\text{mol/l}$ a na ose y poměr ploch píků konkrétního derivátu AMK k ploše píku derivátu norleucinu. Proložení závislosti těchto dvou proměnných byla získána rovnice kalibrační křivky.

3.6 Stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci naftalen-2,4-dikarboxaldehydem

3.6.1 Příprava vzorků pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce

K 10 μl vzorku (standardu) bylo přidáno 190 μl pracovního roztoku norleucinu o koncentraci asi 10 $\mu\text{mol/l}$, směs důkladně promíchána a inkubována 5 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubaci byla směs odstředěna (4430 \times g, 5 minut, laboratorní teplota), 100 μl supernatantu přeneseno do vialky z hnědého skla a přidáno 300 μl borátového pufru, 20 μl roztoku KCN a 20 μl roztoku NDA v ethanolu. Směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.

3.6.2 Příprava vzorků pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce, získaných technikou suché kapky

Pro analýzu AMK v DMS byl ze středu odběrové karty vyseknut terčík o průměru 6 mm (odpovídá 10 μl mléka) 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 $\mu\text{mol/l}$) a PP zkumavka byla umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně. Po vyjmutí zkumavky z ultrazvukové lázně byl obsah zkumavky inkubován 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavky odstředěn (1 minuta, 1000 \times 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 mléka v 6 mm terčíku) jednotlivého směšného standardu AMK a přidáno namísto 50 μl deionizované vody, jen 40 μl .

3.6.3 Příprava směšných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky

Ředěním směšného standardu AMK S_5 deionizovanou vodou byly připraveny standardní roztoky S_1 - S_4 (tabulka 9).

Tabulka 9 Příprava směsných standardních roztoků aminokyselin pro konstrukci kalibrační křivky metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Standard	S₅ [μl]	H₂O [μl]
S ₀	0	10
S ₁	20	380
S ₂	20	180
S ₃	20	80
S ₄	50	50
S ₅	10	0

3.6.4 Podmínky pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce metodou vysokoučinné 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:
 - λ (excitační) 420 nm
 - λ (emisní) 480 nm
 - teplota cely: 37 °C
 - citlivost: nízká
 - zesílení: x4
- Eluce: gradientová
 - Mobilní fáze A: směs acetonitrilu a 10 mmol/l Na₂HPO₄ (5:95, v/v), pH 7,2
 - Mobilní fáze B: směs acetonitrilu a 10 mmol/l Na₂HPO₄ (65:35, v/v), pH 7,2
 - 0,01 min, 20 % B
 - 20 min, 32 % B
 - 35 min, 54,5 % B
 - 35,01 min, 100 % B
 - 40 min, 100 % B

- 40,01 min, 20 % B
- 45,00 min, STOP

3.6.5 Analytické parametry

Linearita

Linearita vyjadřuje schopnost metody poskytovat v určitém rozmezí koncentrací měřený signál přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Je popisována jako interval mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou koncentrací standardního roztoku, kde můžeme s určitou přesností a správností stanovit koncentraci analyzované látky. Kalibrační závislost tak můžeme znázornit křivkou. Koncentraci analytu, která je vyšší než horní hranice linearity, můžeme vyřešit vhodným naředěním vzorku nebo snížením dávkovaného objemu vzorku.

Přesnost

Přesnost metody je definována jako míra shody mezi opakovanými měřeními stejného vzorku za předem stanovených podmínek. Počet opakování měření musí být dostatečně velký, aby bylo umožněno statistické vyhodnocení. Podle podmínek, za kterých analýza probíhá, rozlišujeme opakovatelnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost je míra shody mezi výsledky měření stejného analytu jednou metodou, stejnou osobou, za stejných laboratorních podmínek, na stejném přístroji a v krátkém časovém intervalu. Reprodukovatelnost vyjadřuje míru shody mezi výsledky získanými měřeními stejného analytu ve stejném vzorku, stejnou metodou, ale za různých podmínek. Liší se pracovník, přístroj, čas či místo.

Přesnost metody je statistické vyhodnocení náhodných chyb. Směrodatná odchylka (SD) neboli míra nepřesnosti se uvádí jako odchylka naměřených hodnot od hodnot skutečných. Míra přesnosti je posuzována variačním koeficientem (CV).

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

AVG – aritmetický průměr, x_i – koncentrace analytu ve vzorku, n – počet vzorků v sérii

Rovnice 1 Výpočet směrodatné odchylky

$$CV[\%] = \frac{SD}{AVG} \times 100$$

SD = směrodatná odchylka, AVG = aritmetický průměr

Rovnice 2 Výpočet variačního koeficientu

3.7 Zpracování výsledků

Při analýze metodou HPLC s FLD byly pro identifikaci jednotlivých píků AMK (derivátů AMK) ve vzorcích použity retenční časy získané proměřením standardních roztoků AMK. Při analýze GC-MS byly standardy AMK (deriváty AMK) identifikovány použitím knihovny spekter (NIST 14 Mass Spectral Library), čímž byly získány specifické ionty pro jednotlivé deriváty AMK, společně s retenčními časy.

Pro vyhodnocení záznamů byl použit program LabSolution od firmy Shimadzu a pro zpracování výsledků byl použit program MS Excel a Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o., Praha, ČR).

4 Výsledky a diskuze

Pro stanovení hladin AMK v mateřském mléce byly použity dva typy vzorků. Jedny byly získány technikou suché kapky a druhé byly uchovány v tekuté formě. Metodou GC-MS se nám nepovedlo stanovit hladiny AMK ve vzorcích získaných technikou suché kapky, protože obsahují pouze malé množství mateřského mléka. Proto byly pro tuto metodu využity pouze tekuté vzorky. Prozatím neexistují ani žádné studie, které by popisovaly úspěšnou GC-MS analýzu derivátů AMK ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky. Tato metoda by mohla být v budoucnu velmi přínosná pro nízkou spotřebu vzorku, snadný odběr, transport i jeho uchování.

Metodou GC-MS, s použitím ECF jako derivatizačního činidla, se nám podařilo stanovit ve vzorcích mateřského mléka hladiny 14 aminokyselin. Deriváty argininu a citrulinu, zřejmě díky nedostatečné derivatizaci, nebyly detekovány [69, 70]. Další problém jsme měli s polárními AMK serinem, threoninem a asparaginem, jejichž derivatizace je silně ovlivněna pH reakční směsi, které se nám nepodařilo nastavit na optimální hodnotu. Řešením by mohla být dvoukroková derivatizace [71].

Metodou LC-FLD byly ve vzorcích mateřského mléka stanoveny hladiny celkem 20 AMK. Jako derivatizační činidlo byl použit NDA. Nevýhodou tohoto derivatizačního činidla je, že nereaguje se sekundárními aminy, tím pádem nebylo možné ve vzorcích stanovit hladinu prolinu. Dalšími AMK, jejichž hladiny lze s obtížemi stanovit, jsou ornithin a lysin, jelikož reakcí s NDA vzniká více derivátů [72].

4.1 Optimalizace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

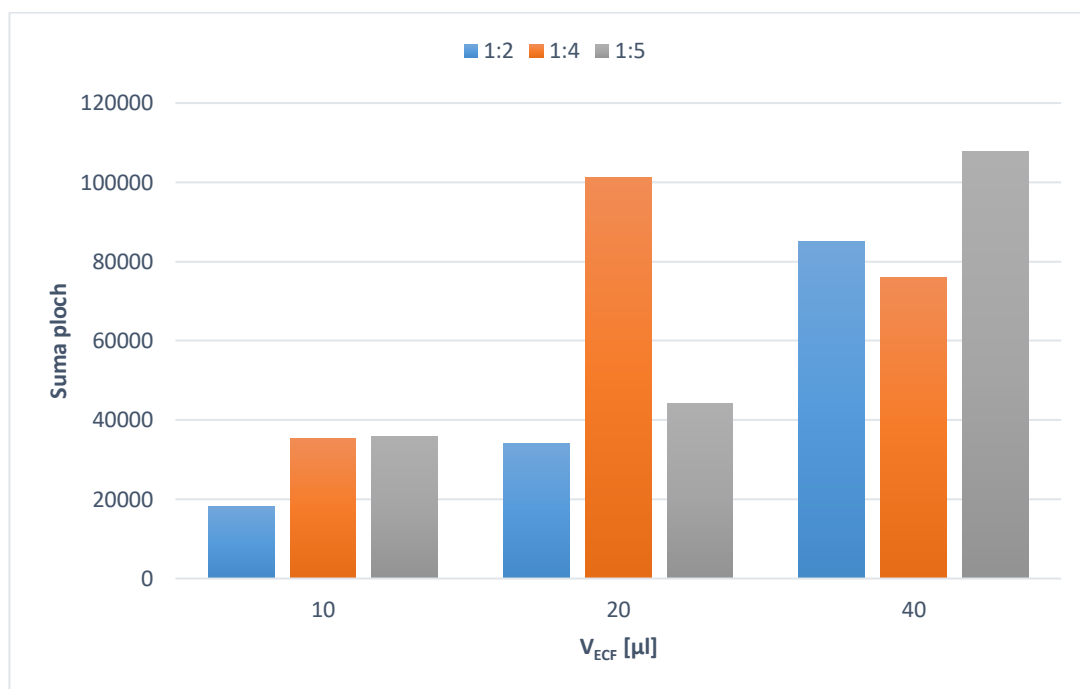
4.1.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Byly testovány dva možné postupy pro derivatizaci AMK před GC analýzou. Prvním z nich bylo převedení AMK na trimethylsilylderiváty použitím N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) s 1% trimethylchlorsilanem (TMCS). Nevýhodou této derivatizace je, že reakce musí probíhat v bezvodém prostředí při zvýšené teplotě, a navíc může vznikat více derivátů jednotlivých AMK, dimethylsilyl-, trimethylsilyl-, případně tetramethylsilylderiváty [73, 74]. Z těchto důvodů bylo od této derivatizace upuštěno.

Druhým postupem je derivatizace AMK ECF. Reakce probíhá ve vodném prostředí v přítomnosti alkoholu a pyridinu a při laboratorní teplotě za vzniku příslušných

ethoxyethylesterů AMK. Optimální poměr vodné a organické fáze je 3:2 (v/v). Co se týká poměru ethanolu a pyridinu, tak se jako optimální uvádí poměr 4:1 (v/v) nebo poměr methanolu, acetonitrilu a pyridinu 2:2:1 (v/v/v) [75].

Byly testovány různé poměry pyridinu a ethanolu (1:2, 1:4 a 1:5, v/v) a různé objemy derivatizačního činidla ECF (10, 20 a 40 μl). Z grafu 1 je patrné, že plochy píků se zvyšují s rostoucí koncentrací ECF v reakční směsi. Nejlepší odezvu dává poměr pyridinu a ethanolu 1:5 (v/v) se 40 μl ECF v reakční směsi. V tomto případě bylo dosaženo maximálních ploch píků odpovídajících derivátům AMK.

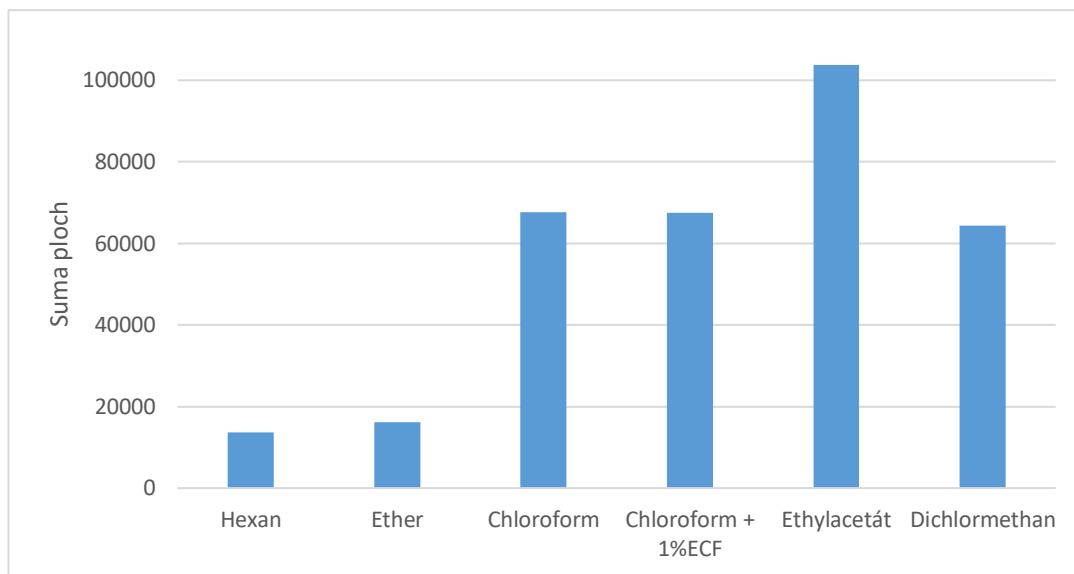


Graf 1 Závislost součtu ploch píků derivátů aminokyselin na objemu ethylchloroformiátu

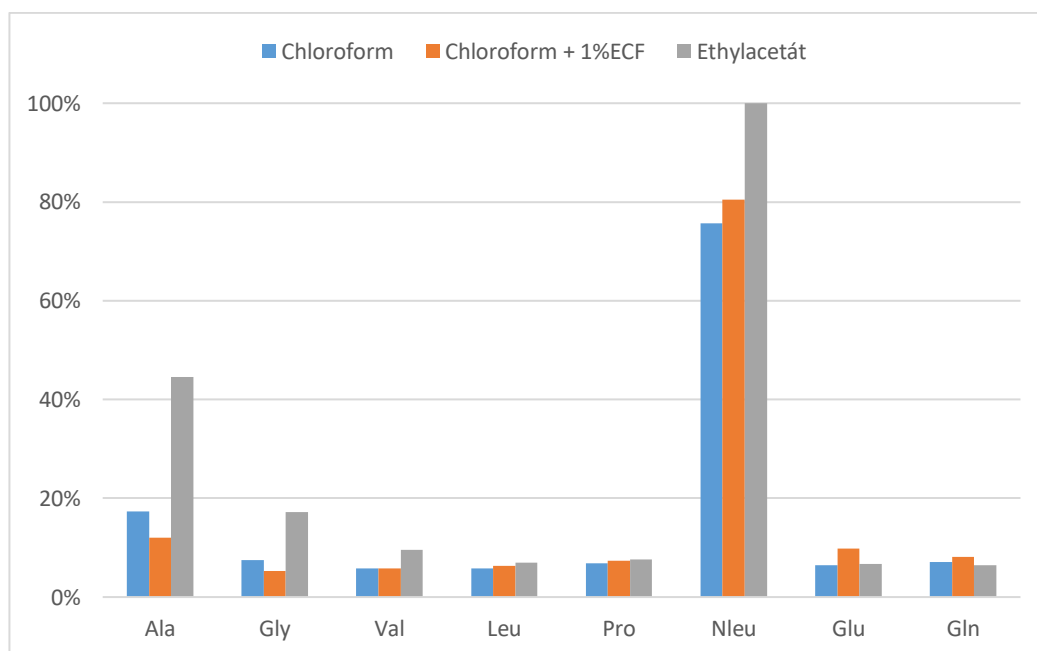
4.1.2 Optimalizace extrakce derivátů aminokyselin z reakční směsi

Bylo testováno šest typů extrakčních činidel, konkrétně n-hexan, diethylether, chloroform, chloroform s 1 % ECF, ethylacetát a dichlormethan. Z grafu 2 je patrné, že nejnižší plochy píků byly dosaženy při extrakci n-hexanem a ethyletherem, neboť do n-hexanu se obtížně extrahují polární deriváty, což je vidět například u derivátu glycinu [76].

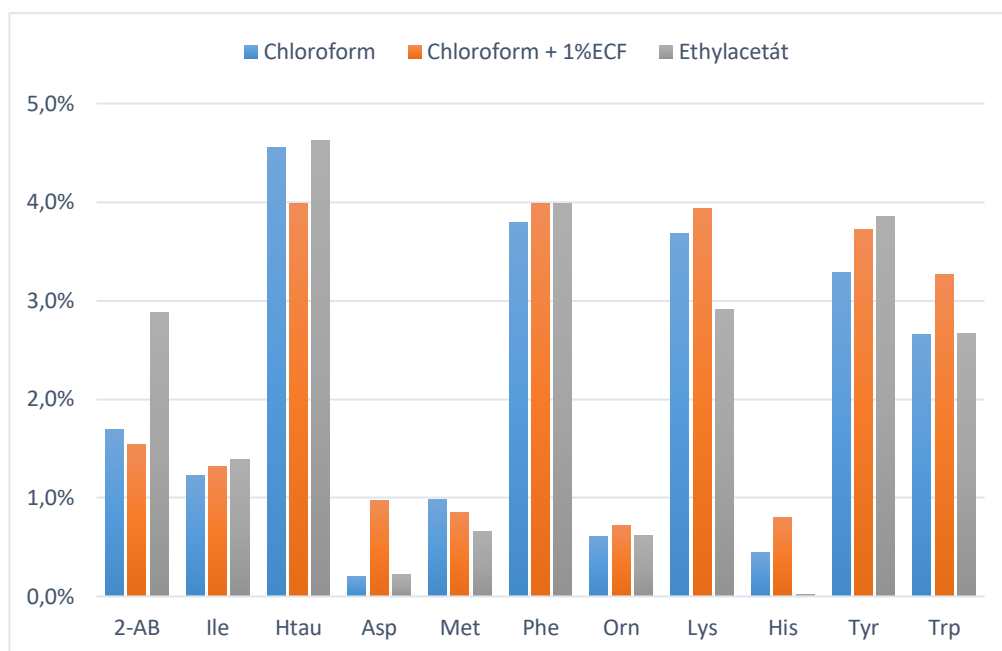
Nejvyšší plochy píků byly dosaženy při extrakci ethylacetátem, chloroformem s 1 % ECF a samotným chloroformem. U těchto tří extrakčních postupů byla vypočítána relativní výtěžnost vztažena k nejvyšší výtěžnosti, která je vynesena v grafech 3 a 4. Při porovnání těchto tří extrakčních činidel, byl jako nejvhodnější extrakční činidlo vybrán chloroform s 1 % ECF. Kromě toho se ethylacetátem neextrahuje derivát histidinu.



Graf 2 Závislost součtu ploch piků derivátů aminokyselin na použitém extrakčním činidle



Graf 3 Procentuální zastoupení jednotlivých derivátů aminokyselin při použití různých extrakčních činidel



Graf 4 Procentuální zastoupení jednotlivých derivátů aminokyselin při použití různých extrakčních činidel

4.1.3 Analytické parametry

4.1.3.1 Kalibrace

Pro kvantitativní stanovení AMK v mateřském mléce byla konstruována kalibrační křivka. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 Parametry kalibračních křivek pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

AMK	Směrnice	Intercept	Korelační koeficient
Ala	0,00003	0,0003	0,9916
Gly	0,00020	-0,0099	0,9687
2-AB	0,00020	0,0000	0,9998
Val	0,00010	0,0007	0,9945
Leu	0,00220	-0,0050	0,9939
Ile	0,00070	-0,0008	0,9927
Asp	0,00530	-0,0016	0,9998
Met	0,00050	0,0013	0,9999
Glu	0,00620	0,0064	0,9995
Phe	0,00570	-0,0638	0,9988
Gln	0,00150	-0,0018	0,9997
His	0,00003	0,0003	0,9916
Tyr	0,00020	-0,0099	0,9687
Trp	0,00020	0,0000	0,9998

4.1.3.2 Nepřesnost v sérii

Pro určení nepřesnosti v sérii byl stejný vzorek mateřského mléka analyzován desetkrát, ve stejný den, za stejných podmínek a při použití jedné kalibrační křivky. V tabulce 11 jsou uvedeny variační koeficienty, které vyjadřují nepřesnost metody. U všech AMK se variační koeficienty pohybovaly výrazně nad 10 %. Důvodem mohou být nízké koncentrace AMK ve vzorku mateřského mléka, ale spíše nereprodukovatelnost naměřených dat.

Tabulka 11 Nepřesnost v sérii metody stanovení aminokyselin plynovou chromatografií s hmotnostní 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 [%]
Ala	25,81	17,85	69,16	Met	7,50	4,67	62,23
Gly	14,46	3,88	26,83	Glu	19,36	8,77	45,31
2-AB	16,21	7,48	46,13	Phe	20,00	5,92	29,58
Val	22,18	10,99	49,55	Gln	65,13	21,29	32,68
Leu	13,65	1,62	11,88	His	30,09	17,54	58,28
Iso	15,02	2,46	16,36	Tyr	17,77	5,39	30,34
Asp	13,21	6,77	51,26	Trp	6,82	2,11	30,93

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

4.2 Optimalizace metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

4.2.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Pro citlivé a správné stanovení AMK byla optimalizována 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 bylo dosaženo po patnáctiminutové inkubaci při laboratorní teplotě, kdy složení reakční směsi bylo následující: 18 μg NDA a 52 μg KCN v 68mmol/l borátovém pufru, pH 9,3. Reakce je rychlá a probíhá za laboratorní teploty. Zjistili jsme, že CBI deriváty většiny AMK jsou stabilní minimálně 48 h při laboratorní teplotě. Výjimkou jsou deriváty methioninu, serinu a threoninu. Jejich 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 mateřského mléka, který byl smíchán z několika vzorků mateřského mléka dobrovolných 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.

4.2.2 Identifikace derivátů aminokyselin na základě retenčních časů

Analýzou jednotlivých standardů AMK byly určeny retenční časy derivátů AMK, které jsou uvedeny v tabulce 12. Variační koeficienty retenčních časů se pohybovaly pod 5 %. V příloze 2 je chromatografický záznam stanovení vybraných AMK v mateřském mléce metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, přílohy 3 a 4 jsou přiblížením přílohy 2.

Tabulka 12 Retenční časy derivátů stanovených aminokyselin za podmínek uvedených v experimentální části

AMK	RT [min]	AMK	RT [min]	AMK	RT [min]	AMK	RT [min]
Asp	2,9	Cit	12,1	Tau	20,8	Phe	31,8
Glu	3,8	Arg	14,2	2-AB	24,8	Leu	32,3
Asn	8,7	Gly	15,1	Val	28,1	Nleu	32,8
His	10,0	Thr	15,4	Met	28,6		
Gln	10,5	Ala	19,0	Trp	29,9		
Ser	11,1	Tyr	20,2	Ile	31,4		

RT = retenční čas

4.2.3 Analytické parametry

4.2.3.1 Linearita

Pro kvantitativní stanovení AMK ve vzorku mateřského mléka i vzorcích mateřském mléka či kolostru, získaných technikou suché kapky, byla použita metoda kalibrační křivky. Parametry pěti kalibračních křivek shrnuje tabulka 13.

Tabulka 13 Průměrné parametry kalibračních křivek, mez stanovitelnosti a mez detekce metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

AMK	Směrnice AVG (SD.10 ⁻⁶)	Intercept AVG (SD) [μmol/l]	Korelační koeficient	LOQ [μmol/l]	LOD [μmol/l]	Pracovní rozmezí [μmol/l]
Asp	0,0052 (91)	0,0007 (0,0029)	0,9998	5,6	1,8	5,6-212,6
Glu	0,0053 (340)	0,0346 (0,0106)	0,9998	20,1	6,6	20,1-2002,3
Asn	0,0050 (13)	0,0013 (0,0011)	0,9997	2,3	0,8	2,3-201,2
His	0,0048 (12)	0,0038 (0,0018)	0,9996	3,8	1,3	1,3-202,1
Gln	0,0049 (30)	0,0066 (0,0042)	0,9998	8,6	2,8	8,6-509,1
Ser	0,0044 (125)	0,0256 (0,0051)	0,9998	11,5	3,8	11,5-512,4
Cit	0,0058 (9)	0,0153 (0,0029)	0,9992	4,9	1,6	4,9-199,1
Arg	0,0051 (137)	0,0031 (0,0015)	0,9997	3,1	1,0	3,1-199,5
Gly	0,0055 (91)	0,0116 (0,0040)	0,9999	7,2	2,4	7,2-522,2
Thr	0,0045 (116)	0,0133 (0,0020)	0,9998	4,4	1,4	4,4-249,5
Ala	0,0051 (20)	0,0194 (0,0031)	0,9999	6,1	2,0	6,1-1018,1
Tyr	0,0050 (5)	0,0022 (0,0006)	0,9997	1,3	0,4	1,3-97,4
Tau	0,0056 (65)	0,0048 (0,0025)	0,9996	4,5	1,5	4,5-507,8
2-AB	0,0055 (30)	0,0011 (0,0020)	0,9997	3,6	1,2	3,6-205,8
Val	0,0054 (81)	0,0041 (0,0027)	0,9998	5,0	1,6	5,0-243,5
Met	0,0054 (44)	0,0011 (0,0011)	0,9997	2,1	0,7	2,1-193,0
Trp	0,0045 (9)	-0,0004 (0,0008)	0,9998	1,8	0,6	1,8-182,1
Ile	0,0056 (32)	0,0010 (0,0014)	0,9999	2,6	0,9	2,6-202,0
Phe	0,0054 (26)	0,0011 (0,0026)	0,9999	4,9	1,6	4,9-241,2
Leu	0,0055 (39)	0,0023 (0,0017)	0,9999	3,1	1,0	3,1-243,6

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 $y = 0$). AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka

4.2.3.2 Nepřesnost v sérii

Pro určení nepřesnosti v sérii byl stejný vzorek mateřského mléka analyzován desetkrát, ve stejný den, za stejných podmínek a při použití jedné kalibrační křivky. V tabulce 14 jsou uvedeny variační koeficienty, které vyjadřují nepřesnost metody. U všech AMK se variační

koeficienty nepřesnosti pohybovaly pod 10 %. Pro takto zpracované biologické vzorky, jakou je technika suché kapky, jsou výsledky uspokojivé.

Tabulka 14 *Nepřesnost v sérii pro stanovení vybraných aminokyselin v mateřském mléce a kolostru, získaných technikou suché kapky a stanovených metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí*

AMK	AVG [μmol/l]	SD [μmol/l]	CV [%]	AMK	AVG [μmol/l]	SD [μmol/l]	CV [%]
Asp	74,2	6,8	9,2	Ala	208,9	11,5	5,5
Glu	689,0	52,3	7,6	Tyr	8,2	0,5	6,1
Asn	22,1	2,1	9,5	Tau	201,5	11,1	5,5
His	33,2	2,4	7,2	Val	9,8	0,9	9,2
Gln	201,4	14,9	7,4	Met	35,6	2,0	5,6
Ser	98,9	7,0	7,1	Trp	4,9	0,3	6,1
Cit	10,2	0,8	7,8	Ile	3,1	0,3	9,7
Arg	124,5	8,2	6,6	Phe	8,5	0,3	3,5
Gly	94,5	6,3	6,7	Leu	10,6	0,6	5,7
Thr	66,9	4,1	6,1	2-AB			

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

4.3 Porovnání hladin aminokyselin v mateřském mléce získaných metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

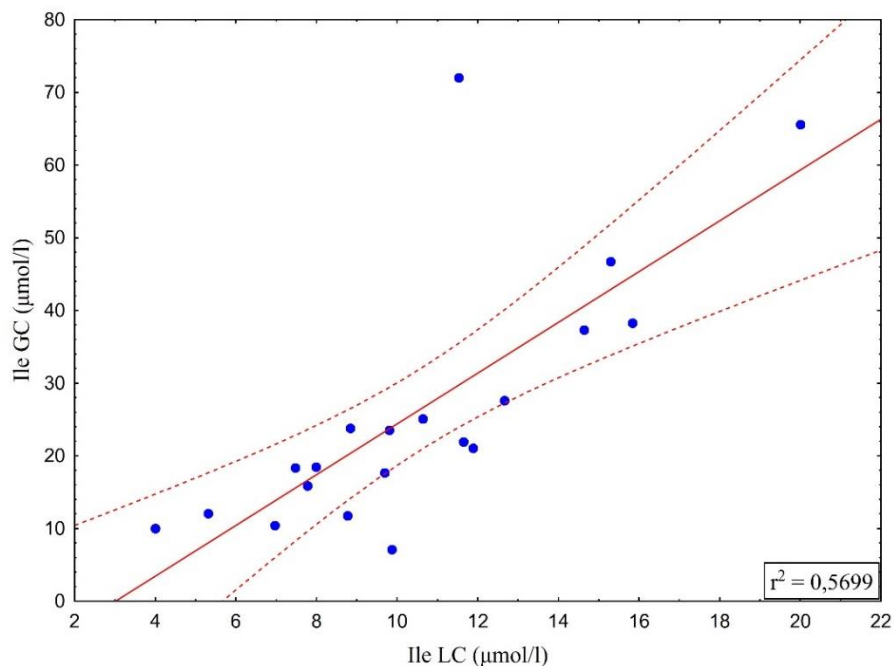
Bylo proměřeno 20 vzorků mateřského mléka metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. V tabulce 15 jsou uvedeny mediány a mezikvartilové rozpětí (IQR) hladin AMK v 20 vzorcích mateřského mléka.

Tabulka 15 Základní statistická analýza a korelace hladin vybraných aminokyselin ve vzorcích mateřského mléka (n = 20) dobrovolných dárcyň stanovených metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

AMK	Medián (IQR) LC-FLD [μmol/l]	Medián (IQR) GC-MS [μmol/l]	Korelační koeficientn
Ala	346,3 (198,5)	436,9 (405,5)	0,0003
Gly	138,8 (64,9)	266,4 (389,1)	0,0998
2-AB	15,7 (4,4)	31,3 (62,8)	0,0096
Val	52,5 (13,5)	216,9 (577,3)	0,3789
Leu	31,4 (7,4)	40,3 (20,4)	0,2035
Ile	9,8 (4,6)	21,5 (21,9)	0,5699
Asp	20,5 (10,9)	10,2 (12,2)	0,2018
Met	6,4 (1,9)	3,5 (1,7)	0,0262
Glu	933,2 (530,3)	474,9 (242,0)	0,1140
Phe	17,0 (5,1)	9,5 (5,6)	0,0007
Gln	362,8 (265,4)	209,5 (203,2)	0,1465
His	35,1 (17,1)	20,5 (12,8)	0,0127
Tyr	11,8 (4,1)	5,6 (3,4)	0,0809
Trp	2,1 (0,9)	1,4 (0,8)	0,0062
Asn	9,6 (6,8)		
Ser	100,9 (50,6)		
Cit	10,7 (2,3)		
Arg	4,6 (2,4)		
Thr	74,6 (22,9)		
Tau	215,0 (34,2)		

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

Účelem porovnání dvou metod je zjistit, zda výsledky získané jednou metodou jsou totožné s výsledky získanými druhou metodou. Pro porovnání byla použita metoda lineární regrese. Míra shody výsledků je dána korelačním koeficientem, kdy v případě shodných výsledků je roven 1, a všechny body vyneseny v grafu by ležely na jedné přímce. Do grafu se vynášejí závislost výsledků naměřených jednou metodou oproti výsledkům získaných druhou metodou při proměření stejných vzorků (graf 5).



Graf 5 Porovnání metod plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí při stanovení isoleucinu

Z výsledků, které jsou uvedeny v tabulce 15, je patrné, že metodou GC-MS byly získány naprosto odlišné koncentrace AMK než metodou HPLC-FLD. Metoda HPLC-FLD pro stanovení AMK v různých biologických vzorcích je na pracovišti Katedry biologických a biochemických věd používaná již řadu let, byla použita v mnoha studiích a hladiny AMK v různých biologických vzorcích jsou porovnatelné s literárními údaji, proto ji považujeme za správnou a dostatečně citlivou. Proto se domníváme, že metoda GC-MS pro stanovení AMK derivatizovaných ECF je v současné podobě nepoužitelná pro kvantifikaci hladin AMK v mateřském mléce. Problémem je i citlivost metody, jelikož ve vzorcích zralého mateřského mléka a kolostra, získaných technikou suché kapky, jsme prakticky nedetekovali žádnou z AMK.

4.4 Základní statistická analýza naměřených dat metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Základní statistická analýza naměřených dat je shrnuta v následujících tabulkách 16-19 a v přílohách 3-5.

V tabulce 16 jsou uvedeny hladiny AMK ve vzorcích kolostra a zralého mateřského mléka, získaných technikou suché kapky a stanovené metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Hladiny kyseliny glutamové a glutaminu jsou ve zralém mléce

statisticky významně vyšší než v kolostru (tabulka 18). Kyselina glutamová je nejvíce zastoupenou AMK v mateřském mléce a je zdrojem energie [77]. Naopak hladiny AMK asparaginu a argininu, se s délkou laktace snižují.

Tabulka 16 Základní statistická analýza hladin vybraných aminokyselin v kolostru (n = 8) a mateřském mléce (n = 10) dobrovolných dárcyň

Parametr [jednotka]	Medián (vše)	IQR (vše)	Medián (kolostrum)	IQR (kolostrum)	Medián (mléko)	IQR (mléko)
Asp [$\mu\text{mol/l}$]	35,3	14,9	28,0	19,8	37,4	7,4
Glu [$\mu\text{mol/l}$]	555,6	360,0	395,9	312,2	688,0	234,8
Asn [$\mu\text{mol/l}$]	9,5	10,8	14,5	13,3	7,2	8,2
His [$\mu\text{mol/l}$]	14,6	9,3	12,4	13,5	19,4	8,8
Gln [$\mu\text{mol/l}$]	153,7	164,0	68,4	72,8	229,0	214,0
Ser [$\mu\text{mol/l}$]	63,8	28,7	58,3	57,2	69,8	24,5
Cit [$\mu\text{mol/l}$]	9,7	6,5	8,5	1,6	11,4	5,8
Arg [$\mu\text{mol/l}$]	8,0	5,9	14,7	13,0	6,8	3,3
Gly [$\mu\text{mol/l}$]	71,4	27,9	54,8	42,2	76,4	53,1
Thr [$\mu\text{mol/l}$]	38,3	20,1	43,8	21,9	37,3	13,0
Ala [$\mu\text{mol/l}$]	139,3	61,2	121,1	159,4	151,1	43,4
Tyr [$\mu\text{mol/l}$]	11,8	6,1	12,1	9,9	11,6	3,6
Tau [$\mu\text{mol/l}$]	106,0	106,3	115,0	109,4	103,6	109,8
2-AB [$\mu\text{mol/l}$]	6,0	4,3	5,2	3,9	8,5	3,5
Val [$\mu\text{mol/l}$]	27,9	16,1	27,0	17,9	29,0	16,2
Met [$\mu\text{mol/l}$]	3,6	2,6	3,7	3,7	3,4	1,2
Trp [$\mu\text{mol/l}$]	2,6	1,2	2,9	3,2	2,3	0,9
Ile [$\mu\text{mol/l}$]	7,9	6,6	9,3	9,0	7,4	5,0
Phe [$\mu\text{mol/l}$]	9,8	5,5	9,5	7,5	10,4	4,2
Leu [$\mu\text{mol/l}$]	17,8	14,7	18,4	22,7	16,8	13,2

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

V tabulce 17 je uvedeno procentuální zastoupení námi stanovovaných AMK v mléce a kolostru. Sečetli jsme koncentrace všech stanovovaných AMK a uvedli procentuální zastoupení jednotlivé AMK. Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých AMK mezi kolostrum a mlékem jsou u 11 AMK (tabulka 19). V kolostru jsou statisticky významně více zastoupené esenciální aminokyseliny (arginin, threonin, methionin, tryptofan, isoleucin, fenylalanin a leucin), tedy všechny, kromě valinu.

Tabulka 17 Základní statistická analýza procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin v kolostru ($n = 8$) a mateřském mléce ($n = 10$) dobrovolných dárců

Parametr [jednotka]	Medián (vše)	IQR (vše)	Medián (kolostrum)	IQR (kolostrum)	Medián (mléko)	IQR (mléko)
Asp [%]	2,22	1,01	2,22	0,73	2,25	1,38
Glu [%]	40,27	7,72	36,14	13,52	41,01	2,25
Asn [%]	0,84	0,82	1,21	0,57	0,52	0,54
His [%]	1,08	0,36	1,14	0,39	0,98	0,33
Gln [%]	12,00	9,14	7,01	4,42	16,74	5,35
Ser [%]	5,03	0,83	5,71	1,80	4,74	0,96
Cit [%]	0,80	0,32	0,85	0,51	0,72	0,32
Arg [%]	0,54	0,46	1,10	1,36	0,43	0,13
Gly [%]	5,26	1,70	5,23	0,88	5,60	2,04
Thr [%]	3,16	1,14	4,00	1,13	2,79	0,87
Ala [%]	9,67	3,64	12,38	10,39	9,25	1,82
Tyr [%]	0,83	0,25	1,01	0,26	0,73	0,22
Tau [%]	8,64	3,55	8,92	8,06	8,48	3,45
2-AB [%]	0,51	0,18	0,48	0,32	0,54	0,15
Val [%]	2,23	0,88	2,52	0,71	2,01	0,45
Met [%]	0,25	0,11	0,33	0,13	0,23	0,06
Trp [%]	0,18	0,11	0,27	0,10	0,16	0,05
Ile [%]	0,67	0,32	0,84	0,40	0,48	0,15
Phe [%]	0,83	0,27	0,91	0,20	0,65	0,25
Leu [%]	1,35	0,68	1,81	0,77	1,15	0,34

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

Tabulka 18 Porovnání hladin vybraných aminokyselin mezi kolostrem a zralým mlékem

AMK	Kolostrum, n = 8 Medián (IQR)	Mléko, n = 10 Medián (IQR)	p*
Asp [$\mu\text{mol/l}$]	28,0 (19,8)	37,4 (7,4)	0,198
Glu [$\mu\text{mol/l}$]	395,9 (312,2)	688,0 (234,8)	0,029
Asn [$\mu\text{mol/l}$]	14,5 (13,3)	7,2 (8,2)	0,450
His [$\mu\text{mol/l}$]	12,4 (13,5)	19,4 (8,8)	0,625
Gln [$\mu\text{mol/l}$]	68,4 (72,8)	229,0 (214,0)	<0,001
Ser [$\mu\text{mol/l}$]	58,3 (57,2)	69,8 (24,5)	0,824
Cit [$\mu\text{mol/l}$]	8,5 (1,6)	11,4 (5,8)	0,143
Arg [$\mu\text{mol/l}$]	14,7 (13,0)	6,8 (3,3)	0,029
Gly [$\mu\text{mol/l}$]	54,8 (42,4)	76,4 (53,1)	0,100
Thr [$\mu\text{mol/l}$]	43,8 (21,9)	37,3 (13,0)	0,756
Ala [$\mu\text{mol/l}$]	121,1 (159,4)	151,1 (43,4)	0,689
Tyr [$\mu\text{mol/l}$]	12,1 (9,9)	11,6 (3,6)	0,824
Tau [$\mu\text{mol/l}$]	115,0 (109,4)	103,6 (109,8)	0,689
2-AB [$\mu\text{mol/l}$]	5,2 (3,9)	8,5 (3,5)	0,029
Val [$\mu\text{mol/l}$]	27,0 (17,9)	29,0 (16,2)	0,450
Met [$\mu\text{mol/l}$]	3,7 (3,7)	3,4 (1,2)	0,894
Trp [$\mu\text{mol/l}$]	2,9 (3,2)	2,3 (0,9)	0,450
Ile [$\mu\text{mol/l}$]	9,3 (9,0)	7,4 (5,0)	0,399
Phe [$\mu\text{mol/l}$]	9,5 (7,5)	10,4 (4,2)	0,564
Leu [$\mu\text{mol/l}$]	18,4 (22,7)	16,8 (13,2)	0,894

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

Tabulka 19 Porovnání procentuálního zastoupení vybraných aminokyselin mezi kolostrum a zralým mlékem

AMK	Kolostrum, n = 8 Medián (IQR)	Mléko, n = 10 Medián (IQR)	p*
Asp [%]	2,22 (0,73)	2,25 (1,38)	0,564
Glu [%]	36,14 (13,52)	41,01 (2,25)	0,046
Asn [%]	1,21 (0,57)	0,52 (0,54)	0,019
His [%]	1,14 (0,39)	0,98 (0,33)	0,100
Gln [%]	7,01 (4,42)	16,74 (5,35)	0,001
Ser [%]	5,71 (1,80)	4,74 (0,96)	0,004
Cit [%]	0,85 (0,51)	0,72 (0,32)	0,689
Arg [%]	1,10 (1,36)	0,43 (0,13)	<0,001
Gly [%]	5,23 (0,88)	5,60 (2,04)	0,505
Thr [%]	4,00 (1,13)	2,79 (0,87)	0,002
Ala [%]	12,38 (10,39)	9,25 (1,82)	0,230
Tyr [%]	1,01 (0,26)	0,73 (0,22)	0,003
Tau [%]	8,92 (8,06)	8,48 (3,45)	0,450
2-AB [%]	0,48 (0,32)	0,54 (0,15)	0,450
Val [%]	2,52 (0,71)	2,01 (0,45)	0,069
Met [%]	0,33 (0,13)	0,23 (0,06)	0,019
Trp [%]	0,27 (0,10)	0,16 (0,05)	0,002
Ile [%]	0,84 (0,40)	0,48 (0,15)	<0,001
Phe [%]	0,91 (0,20)	0,65 (0,25)	0,009
Leu [%]	1,81 (0,77)	1,15 (0,34)	0,007

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

Metodou korelační analýzy jsme zjišťovali, zda hladiny jednotlivých AMK v kolostru a mléku, jen v kolostru a jen v mléku, spolu statisticky významně korelují (přílohy 3-5). Z tak malého množství analyzovaných vzorků nelze činit žádné závěry, ale první výsledky naznačují, že některé AMK s jinými významně korelují a jiné vůbec.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zavést metody pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce. Byla zavedena metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kdy aminokyseliny byly před vlastní analýzou derivatizovány ethylchlorformiátem na odpovídající těkavé a tepelně stabilní deriváty. Další metodou pro kvantifikaci aminokyselin v mateřském mléce byla kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, aminokyseliny byly před vlastní analýzou derivatizovány naftalen-2,3-dikarboxaldehydem na odpovídající 1-kyano-2-substituované-benz[*f*]isoindolové deriváty.

Protože je metoda kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí dostatečně robustní a velmi citlivá, dokázali jsme kvantifikovat hladiny 20 aminokyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka a kolostra, získaných technikou suché kapky. To má pro klinickou praxi velký význam, protože technika suché kapky vyžaduje velmi malé množství vzorku, řádově desítky mikrolitrů, také transport a uchovávání takových vzorků je mnohem jednodušší než je tomu u vzorků kapalných.

Porovnáním metod plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí jsme zjistili, že hladiny aminokyselin se výrazně liší. Analytické parametry metody plynové chromatografie byly výrazně horší při porovnání s kapalinovou chromatografií a také citlivost metody plynové chromatografie je daleko horší, touto metodou jsme nedokázali detekovat aminokyselin ve vzorcích suché kapky mléka. Námi vyvinutá metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí je pro stanovení aminokyselin v mateřském mléce nevhodná.

Metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí jsme stanovili hladiny 20 aminokyselin ve vzorcích zralého mateřského mléka a kolostra, získaných technikou suché kapky, a i když byl soubor malý, získali jsme zajímavé výsledky, které budou předmětem dalšího zkoumání.

6 Použitá literatura

1. GARWOLIŃSKA, D., NAMIEŚNIK, J., KOT-WASIK, A. a kol.: State of the art in sample preparation for human breast milk metabolomics—merits and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, 114, s. 1-10. DOI: 10.1016/j.trac.2019.02.014. ISSN 01659936.
2. DEMMELMAIR, H. a KOLETZKO, B.: Variation of Metabolite and Hormone Contents in Human Milk. *Clinics in Perinatology*. 2017, 44(1), s. 151-164. DOI: 10.1016/j.clp.2016.11.007. ISSN 00955108.
3. TRUCHET, S. a HONVO-HOUÉTO, E.: Physiology of milk secretion. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017, 31(4), s. 367-384. DOI: 10.1016/j.beem.2017.10.008. ISSN 1521690X.
4. MCCLELLAN, H. L., MILLER, S. J. a HARTMANN, P. E.: Evolution of Lactation: Nutrition v. Protection with Special Reference to Five Mammalian Species. *Nutrition Research Reviews*. 2008, 21(2), s. 97-116. DOI: 10.1017/S0954422408100749. ISSN 09544224.
5. CARDIFF, R. D. a WELLINGS, S. R.: The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1999, 4(1), s. 105-22. ISSN 10833021.
6. HOVEY, R. C., MCFADDEN, T. B. a AKERS, R. M.: Regulation of Mammary Gland Growth and Morphogenesis by the Mammary Fat Pad: A Species Comparison. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1999, 4(1), s. 53-68. ISSN 10833021.
7. NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION: Breast anatomy and how cancer starts. 2020. Dostupné z: <https://nbcf.org.au/about-national-breast-cancer-foundation/about-breast-cancer/what-you-need-to-know/breast-anatomy-cancer-starts/>.
8. STIEG, C.: Where Does Breast Milk Come From? *Raifinery29*. 2017. Dostupné z: <https://www.refinery29.com/en-us/how-is-breast-milk-made-production>.
9. THAPA, B. R.: Health factors in colostrum. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2005, 72(7), s. 579-581. DOI: 10.1007/BF02724182. ISSN 0019-5456.
10. SUTTER HEALTH: Breast Milk Production. 2008. Dostupné z: http://www.babies.sutterhealth.org/breastfeeding/bf_production.html.

11. FIDLER, N. a KOLETZKO, B.: The fatty acid composition of human colostrum. *European Journal of Nutrition*. 2000, 39(1), s. 31-37. DOI: 10.1007/s003940050073. ISSN 1436-6207.
12. SEWELL, P. A.: CHROMATOGRAPHY: GAS | Theory of Gas Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, 2000, 2000, s. 558-566. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/00121-6. ISBN 9780122267703.
13. JENNESS, R.: The composition of human milk. *Seminars of perinatology*. 1979, 3t.
14. ZHANG, Z. a kol.: Amino Acid Profiles in Term and Preterm Human Milk through Lactation: A Systematic Review. *Nutrients*. 2013, 5(12), s. 4800-4821.
15. FISCHER, S., OBRIST, R. a EHLERT, U.: How and when to use dried blood spots in psychoneuroendocrinological research. *Psychoneuroendocrinology*. 2019, 108, s. 190-196. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.06.011. ISSN 03064530.
16. MAJDA, A., WIETECZA-POSŁUSZNY, R., ŚWIĄDRO, M. a kol.: Dried blood spots sampling in case samples deprived of hematocrit level information — Investigation and calculation strategy. *Journal of Chromatography B*. 2019, 1124, s. 308-312. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.06.025. ISSN 15700232.
17. SAMSONOVA, J. V., OSIPOV, A. P. a KONDAKOV, S. E.: Strip-dried whole milk sampling technique for progesterone detection in cows by ELISA. *Talanta*. 2017, 175, s. 143-149. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.07.032. ISSN 00399140.
18. MILLER, E. M., AIELLO, M. O., FUJITA, M. a kol.: Field and laboratory methods in human milk research. *American Journal of Human Biology*. 2013, 25(1), s. 1-11. DOI: 10.1002/ajhb.22334. ISSN 10420533.
19. OLAGUNJU, A., BOLAJI, O. O., AMARA, A. a kol.: Development, validation and clinical application of a novel method for the quantification of efavirenz in dried breast milk spots using LC-MS/MS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, 70(2), s. 555-561. DOI: 10.1093/jac/dku420. ISSN 0305-7453.
20. BHAGAVAN, N. V. a HA, CH.: Amino Acids. *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, 2015, 2015, s. 21-29. DOI: 10.1016/B978-0-12-416687-5.00003-8. ISBN 9780124166875.
21. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) SUBCOMMITTEE ON THE TENTH EDITION OF THE RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES: 6. Protein and Amino Acids. *Recommended Dietary Allowances*. 10. vydání. National Academies Press (US), 1989. ISBN 0-309-53606-5.

22. SONG, Y., XU, CH., KUROKI, H. a kol.: Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, 147, s. 35-49. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.08.050. ISSN 07317085.
23. MENESTRINA, F., OSORIO GRISALES, J. a CASTELLS, C. B.: Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography. *Microchemical Journal*. 2016, 128, s. 267-273. DOI: 10.1016/j.microc.2016.05.007. ISSN 0026265X.
24. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION: L-Alanine. *PubChem Database*. CID=5950, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Alanine>.
25. BIO-RAD LABORATORIES: Liquid Chromatography Principles. *Bio-Rad*. 2020. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/liquid-chromatography-principles?ID=MWHAS7E8Z>.
26. NESTERENKO, P. N. a PALAMAREVA, M. D.: Liquid Chromatography: Overview. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14214-3. ISBN 9780124095472.
27. LAM, T. T, LANMAN, J. K., EMMETT, M. R. a kol.: Mapping of protein: protein contact surfaces by hydrogen/deuterium exchange, followed by on-line high-performance liquid chromatography–electrospray ionization fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass analysis. *Journal of Chromatography A*. 2002, 982(1), s. 85-95. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01357-2. ISSN 00219673.
28. BETANCOURT, J. a GOTTLIEV, S.: Liquid Chromatography. *Chemistry LibreTexts*. Dec 5, 2019. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)
29. TORRE, C. A. L., BLANCO J. E., SILVA, J. T. a kol.: Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2015, 82. DOI: 10.1590/1808-1657000532013. ISSN 1808-1657.
30. BARTOLOMEO, M. P. a MAISANO, F.: Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J Biomol Tech*. 2006, 17(2), s. 131-137.
31. SCHRIEWER, A., HEILEN, K. J., HAYEN, H. a kol.: Direct Analysis of Amino Acids by HILIC–ESI-MS. *The Applications Notebook*. 2017, 30(2), s. 386-387.

32. MOORE, S. a STEIN, W. H.: Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.* 1951, 192, s. 663-681.
33. MACKENZIE, S. L.: AMINO ACIDS. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, 2000, 2000, s. 1990-1999. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/02481-9. ISBN 9780122267703.
34. MOLDOVEANU, S. C. a DAVID, V.: Derivatization Methods in GC and GC/MS. KUSCH, Peter, ed. *Gas Chromatography – Derivatization, Sample Preparation, Application*. IntechOpen, 2019, 2019-9-4. DOI: 10.5772/intechopen.81954. ISBN 978-1-83881-865-4.
35. WATERVAL, J. C., LINGEMAN, H., BULT, A. a kol.: Derivatization trends in CE. *Electrophoresis*. 2000, 21, s. 4029-4045. DOI: 10.1002/1522-2683(200012)21:18<4029::AID-ELPS4029>3.0.CO;2-S.
36. LINZ, T. H., SNYDER, CH. M. a LUNTE, S. M.: Optimization of the Separation of NDA-Derivatized Methylarginines by Capillary and Microchip Electrophoresis. *Journal of Laboratory Automation*. 2012, 17(1), S. 24-31. DOI: 10.1177/2211068211424551.
37. KANG, Y., ZHIHONG, S., ZIKUI, L. a kol.: Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs. *Springer-Verlag Wien*. 2019, s. 284-307. ISBN 9783709113288.
38. ZHANG, M., ZHANG, Y., REN, S. a kol.: Optimization of a Precolumn OPA Derivatization HPLC Assay for Monitoring of l-Asparagine Depletion in Serum during l-Asparaginase Therapy. *Journal of Chromatographic Science*. 2018, 56(9), s. 794-801. DOI: 10.1093/chromsci/bmy053. ISSN 0021-9665.
39. STEED, R.: Analysis of Amino Acids by HPLC. *Agilent Technologies*. 2010, Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Amino%20Acid%20Analysis_062410_Rita%20Steed.pdf.
40. ZHENG, G., JIN, W., FAN, P. a kol.: A novel method for detecting amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2015, 392, s. 1-6. DOI: 10.1016/j.ijms.2015.08.004. ISSN 13873806.
41. SCHUSTER, R.: Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988, 431, s. 271-284. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)83096-0. ISSN 03784347.

42. FRIEDMAN, M.: Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(3), s. 385-406. DOI: 10.1021/jf030490p. ISSN 0021-8561.
43. Chapter 10 Methodology Detectors for Gas Chromatography. *For Laboratory Analyses and On-Line Process Control*. Elsevier, 1988, 1988, s. 393-480. Journal of Chromatography Library. DOI: 10.1016/S0301-4770(08)70082-4. ISBN 9780444428578.
44. ROBINSON, S.: HPLC-Fluorescence Detection. *Lab Manager*. 2012. Dostupné z: <https://www.labmanager.com/laboratory-technology/hplc-fluorescence-detection-17356>.
45. LINGEMAN, H., UNDERBERG, W. J. M., TAKADATE, A. a kol.: Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 2006, 8(5), s. 789-874. DOI: 10.1080/01483918508067120. ISSN 0148-3919.
46. STAUFFER, E., DOLAN, J. A. a NEWMAN, R.: Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*. Elsevier, 2008, 2008, s. 235-293. DOI: 10.1016/B978-012663971-1.50012-9. ISBN 9780126639711.
47. POPEK, E.: Understanding the Analytical Laboratory. *Sampling and Analysis of Environmental Chemical Pollutants*. Elsevier, 2018, 2018, s. 227-302. DOI: 10.1016/B978-0-12-803202-2.00005-7. ISBN 9780128032022.
48. THE LIBRE TEXTS LIBRARIES: Mass Spectroscopy in Futher Detail. *Chemistry LibreTexts*. Jun 5, 2019. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Courses/Winona_State_University/Klein_and_Straumanis_Guided/6%3A_Infrared_Spectroscopy_and_Mass_Spectrometry_\(Chapter_15\)/6%3A5_Mass_Spectrometry_of_Small_Molecules%3A_Magnetic-Sector_Instruments/Mass_Spectroscopy_in_Further_Detail](https://chem.libretexts.org/Courses/Winona_State_University/Klein_and_Straumanis_Guided/6%3A_Infrared_Spectroscopy_and_Mass_Spectrometry_(Chapter_15)/6%3A5_Mass_Spectrometry_of_Small_Molecules%3A_Magnetic-Sector_Instruments/Mass_Spectroscopy_in_Further_Detail).
49. GRZEBYK, T., SZMAJDA, T., SZYSZKA, P. a kol.: A Glow-discharge ion source for MEMS mass spectrometer. *Vacuum*. 2020, 171. DOI: 10.1016/j.vacuum.2019.109008. ISSN 0042207X.
50. PITT, J. J.: Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2003, 30(1), s. 19-34.
51. CLENCH, M. R. a TETLER, L. W.: CHROMATOGRAPHY: GAS. Detectors. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, 2000, 2000, s. 448-455. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/00191-5. ISBN 9780122267703.
52. HO, C. S., LAM, C. W., CHAN, M. H. a kol.: Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev*. 2003, 24(1), s. 3-12.

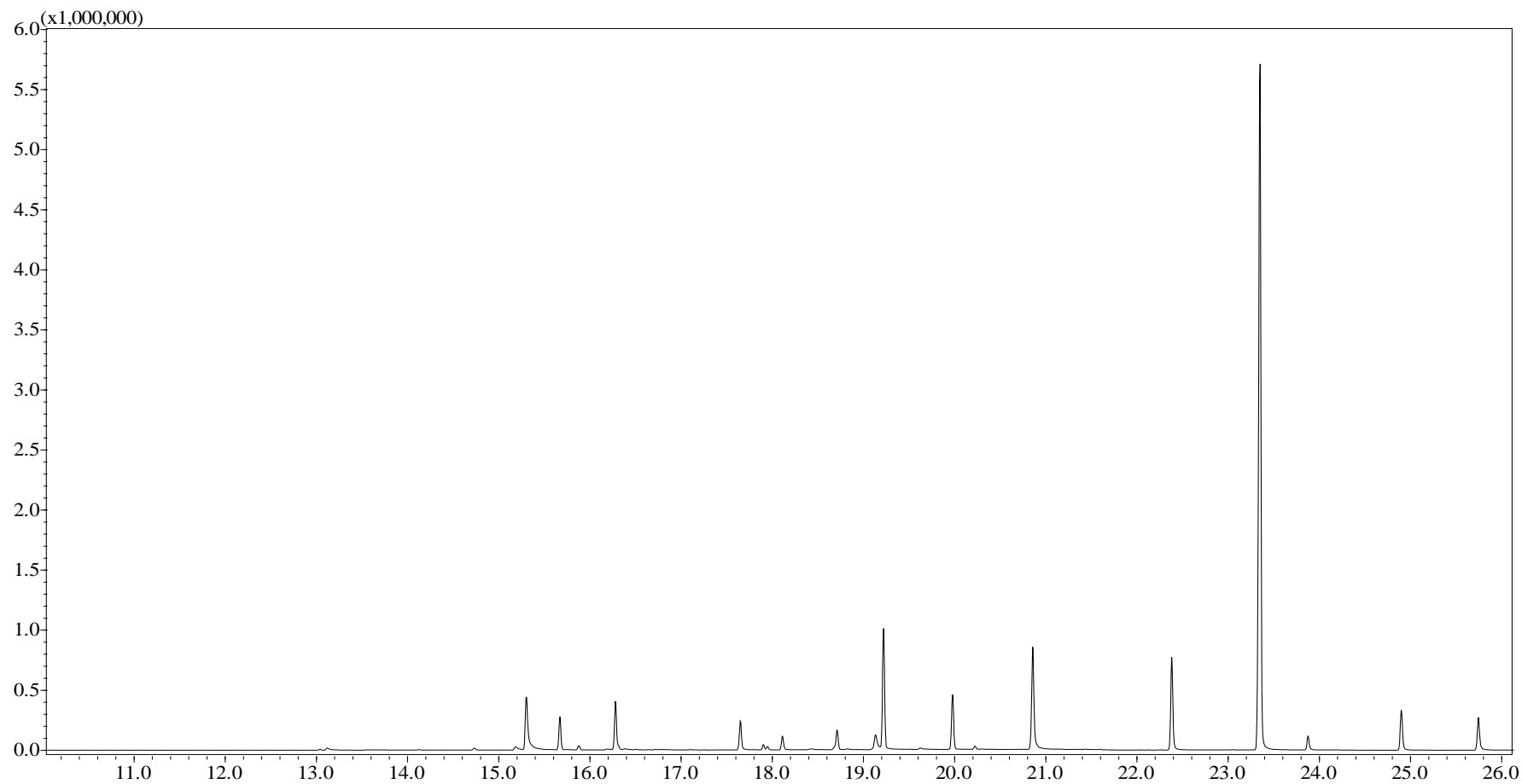
53. BÜYÜKKÖROĞLU, G., DORA, D. D., ÖZDEMİR, F. a kol.: Techniques for Protein Analysis. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Elsevier, 2018, 2018, s. 326-330. DOI: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00015-4. ISBN 9780128046593.
54. HUŠEK, P.: CHROMATOGRAPHY: GAS | Derivatization. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, 2000, 2000, s. 434-44. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/00201-5. ISBN 9780122267703.
55. PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ G. S., et. al.: Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Small Scale Approach. *Brooks/Cole-Thomson Learning*, 2005. ISBN 0-534-40833-8.
56. BRANDSMA, S.: *IVM Institute for Environmental Studies*. GC-MS and LC-MS methods for Flame Retardant (FR) analysis. Dostupné z: <https://www.birmingham.ac.uk/Documents/college-les/gees/inflame/consortium/atcs/Sicco-Brandsma.pdf>.
57. THET, K. a WOO, N.: Gas Chromatography, *Chemistry LibreTexts*. Dec 5, 2019, Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography).
58. COUTTS, R. T. a YEUNG, J. M.: Gas Chromatographic Analysis of Amino Acids. BOULTON, A. A., BAKER, G. B. a WOOD, J. D. *Amino Acids. Neuromethods (3)*. New Jersey: Humana Press, 1985, s. 29-50. DOI: 10.1385/0-89603-077-6:29. ISBN 0-89603-077-6.
59. POOLE, C. F.: Derivatization in Liquid Chromatography. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2013, 2013, s. 25-56. DOI: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00002-4. ISBN 9780124158061.
60. SALVATORE, F.: A Strategy for GC/MS Quantification of Polar Compounds via their Silylated Surrogates: Silylation and Quantification of Biological Amino Acids. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2015, 6(5). DOI: 10.4172/2155-9872.1000263. ISSN 21559872.
61. LUAN, H., YANG, L., JI, F. a kol.: PCI-GC–MS–MS approach for identification of non-amino organic acid and amino acid profiles. *Journal of Chromatography B*. 2017, 1047, s. 180-184. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.06.034. ISSN 15700232
62. HUŠEK, P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, 717(1-2), s. 57-91. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00136-4. ISSN 03784347.

63. MEHER, H.C., GAJBHIYE, V.T. a SINGH, G.: A GC-ECD method for estimation of free and bound amino acids, gamma-aminobutyric acid, salicylic acid, and acetyl salicylic acid from *Solanum lycopersicum* (L.). *JAOAC Int.* 2011, 94(1), s. 232-242.
64. FRITSCH, R. J. a KRAUSE, I.: Electrophoresis. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. vydání, 2003, pp. 2055-2062. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/01409-7.
65. BUTLER, J. M.: Capillary Electrophoresis. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier, 2012, 2012, s. 141-165. DOI: 10.1016/B978-0-12-374513-2.00006-3. ISBN 9780123745132.
66. SASTRE TORAÑO, J., RAMAUTAR, R. a DE JONG, G.: Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *Journal of Chromatography B.* 2019, 1118-1119, s. 116-13. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.04.020. ISSN 15700232.
67. KAŠIČKA, V.: CE and CEC of Amino Acids, Peptides and Proteins. *ELECTROPHORESIS.* 2007, 28(13), s. 2111-2112 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1002/elps.200790045. ISSN 01730835.
68. RODRIGUES, K. T., TAVARES, M. F. M. a VAN SCHEPDAEL, A.: CE-MS for the Analysis of Amino Acids. GIERA, Martin, ed. *Clinical Metabolomics*. New York, NY: Springer New York, 2018, 2018, s. 305-313. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-7592-1_23. ISBN 978-1-4939-7591-4.
69. HUŠEK, P. a ŠIMEK, P.: Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents. *Current Pharmaceutical Analysis.* 2006, 2(1), s. 23-43. DOI: 10.2174/157341206775474007. ISSN 15734129.
70. HUŠEK, P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1998, 717(1-2), s. 57-91. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00136-4. ISSN 03784347.
71. NAMERA, A., YASHIKI, M., NISHIDA, M. a kol.: Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2002, 776(1), s. 49-55. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00075-2. ISSN 15700232.
72. MANICA, D. P., LAPOS, J. A., DANIEL JONES, A. a kol.: Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytical Biochemistry.* 2003, 322(1), s. 68-78 [cit. 2020-06-18]. DOI: 10.1016/j.ab.2003.07.002. ISSN 00032697.

73. HALKET, J. M. a ZAIKIN, V. G.: Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2017, 9(1), s. 1-21. DOI: 10.1255/ejms.527. ISSN 1469-0667.
74. SOBOLEVSKY, T. G., REVELSKY, A. I., MILLER, B. a kol. Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids. *Journal of Separation Science*. 2003, 26(17), s. 1474-1478. DOI: 10.1002/jssc.200301492. ISSN 1615-9306.
75. HUŠEK, P.: Quantitation of Amino Acids as Chloroformates – A Return to Gas Chromatography. *Quantitation of amino acids and amines by chromatography - methods and protocols*. Elsevier, 2005, 2005, 70, s. 2-38. *Journal of Chromatography Library*. DOI: 10.1016/S0301-4770(05)80003-X. ISBN 9780444520500.
76. HUŠEK, P.: Letter to the Editor regarding “GC–MS with ethyl chloroformate derivatization for comprehensive analysis of metabolites in serum and its application to human uremia”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 403(9), s. 2785-2786. DOI: 10.1007/s00216-011-5615-x. ISSN 1618-2642.
77. AGOSTONI, C., CARRATÙ, B., BONIGLIA, C. a kol.: Free Amino Acid Content in Standard Infant Formulas: Comparison with Human Milk. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000, 19(4), s. 434-438. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718943. ISSN 0731-5724.

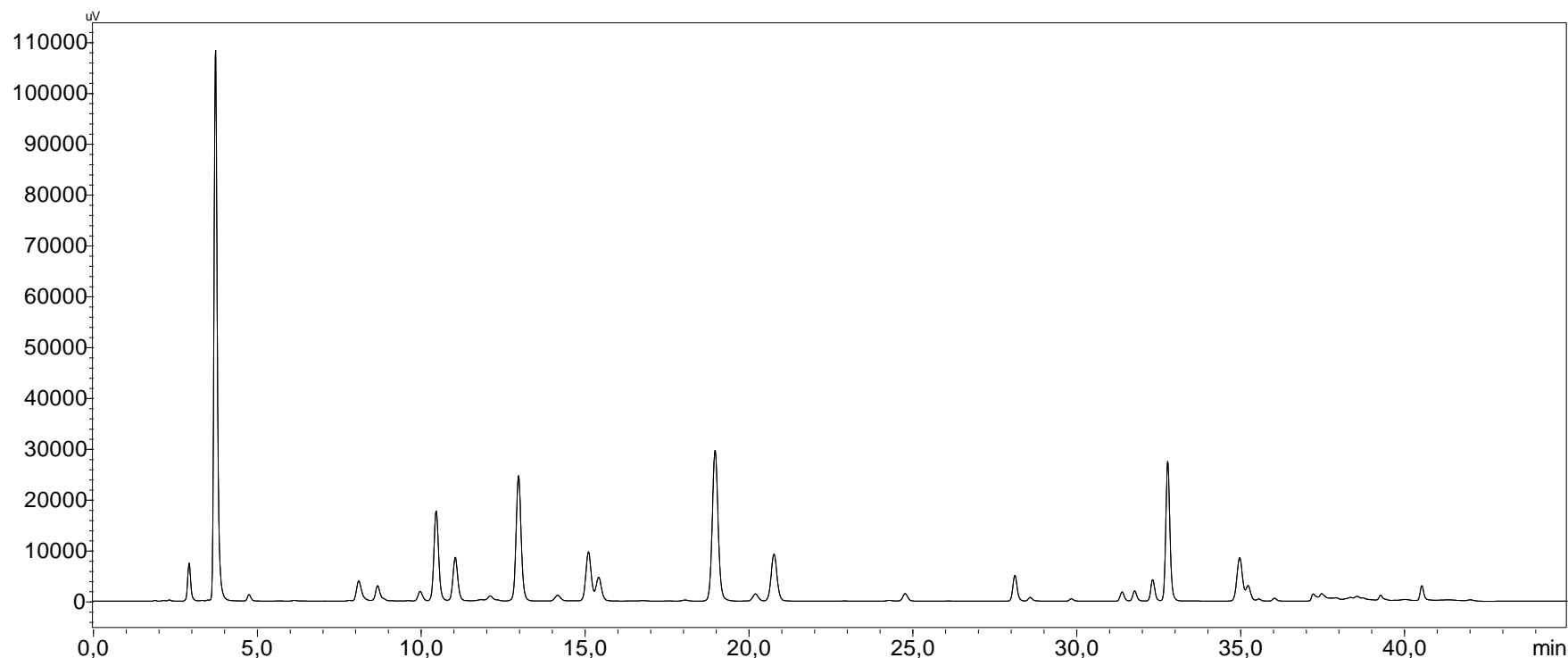
7 Přílohy

Příloha 1: Chromatografický záznam standardu S ₅ stanovení vybraných aminokyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	75
Příloha 2: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky	76
Příloha 2A: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)	77
Příloha 2B: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení).....	78
Příloha 2C: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)	79
Příloha 2D: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[f]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)	80
Příloha 3: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v mateřském mléce a kolostru dobrovolných dárkyň	81
Příloha 4: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v kolostru dobrovolných dárkyň	82
Příloha 5: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v mateřském mléce dobrovolných dárkyň.....	83



Příloha 1: Chromatografický záznam standardu S₅ stanovení vybraných aminokyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

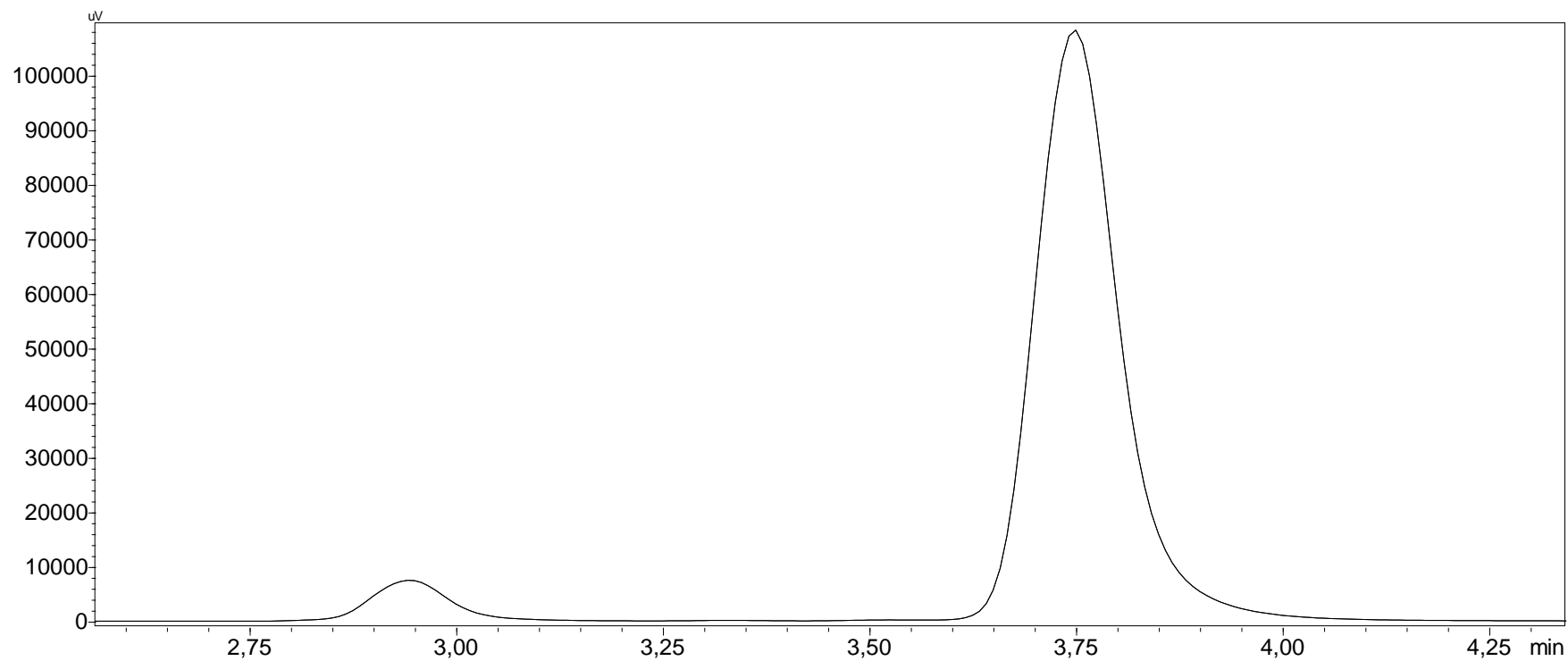
Ala (13,02 min); Gly (13,10 min); 2-AB (14,11 min); Val (14,72 min); Leu (15,67 min); Ile (15,88 min), Nleu (16,28), Asp (17,90 min), Met (18,71 min), Glu (19,22 min), Phe (19,98 min), Gln (20,85 min), His (23,87 min), Tyr (24,90 min), Trp (25,75 min)



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

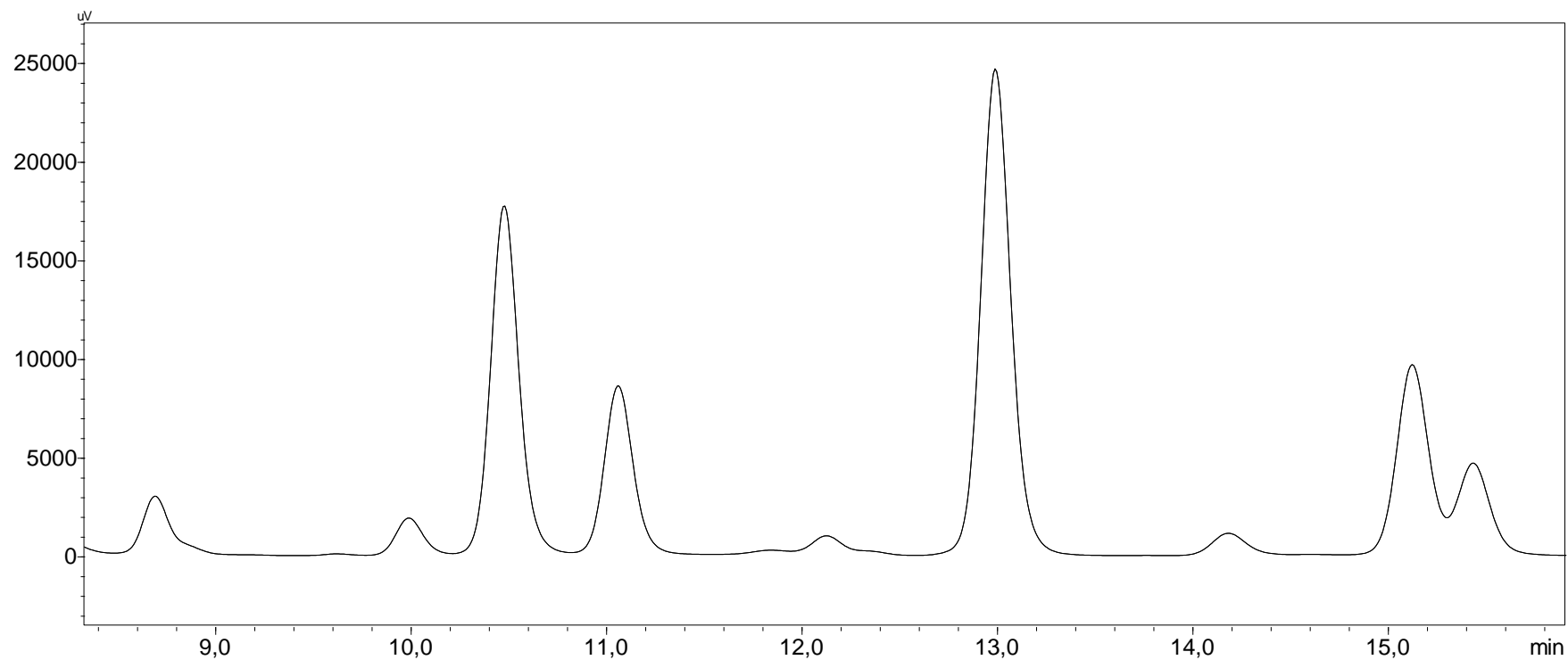
Asp (35,6 μmol/l, 2,94 min); Glu (599,2 μmol/l, 3,75 min); Asn (23,5 μmol/l, 8,69 min); His (16,6 μmol/l, 9,99 min); Gln (151,3 μmol/l, 10,48 min); Ser (83,8 μmol/l, 11,06 min); Cit (8,7 μmol/l, 12,13 min); Arg (12,5 μmol/l, 14,19 min); Gly (83,4 μmol/l, 15,13 min); Thr (50,6 μmol/l, 15,44 min); Ala (296,5 μmol/l, 18,99 min); Tyr (15,0 μmol/l, 20,22 min); Tau (86,5 μmol/l, 20,79 min); 2-AB (12,1 μmol/l, 24,79 min); Val (36,4 μmol/l, 28,14 min); Met (5,4 μmol/l, 28,60 min); Trp (4,2 μmol/l, 29,86 min); Ile (12,6 μmol/l, 31,41 min); Phe (14,7 μmol/l, 31,79 min); Leu (28,5 μmol/l, 32,34 min); Nleu (32,80 min)

HPLC podmínky: mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a 10mmol/l Na₂HPO₄ (5:95, v/v), pH 7,2, mobilní fáze B směs acetonitrilu a 10mmol/l Na₂HPO₄ (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 (λ_{EX} = 420 nm, λ_{EM} = 480 nm, nastavení citlivosti bylo nízké se zesílením 4x), nástřik byl 5 μl.



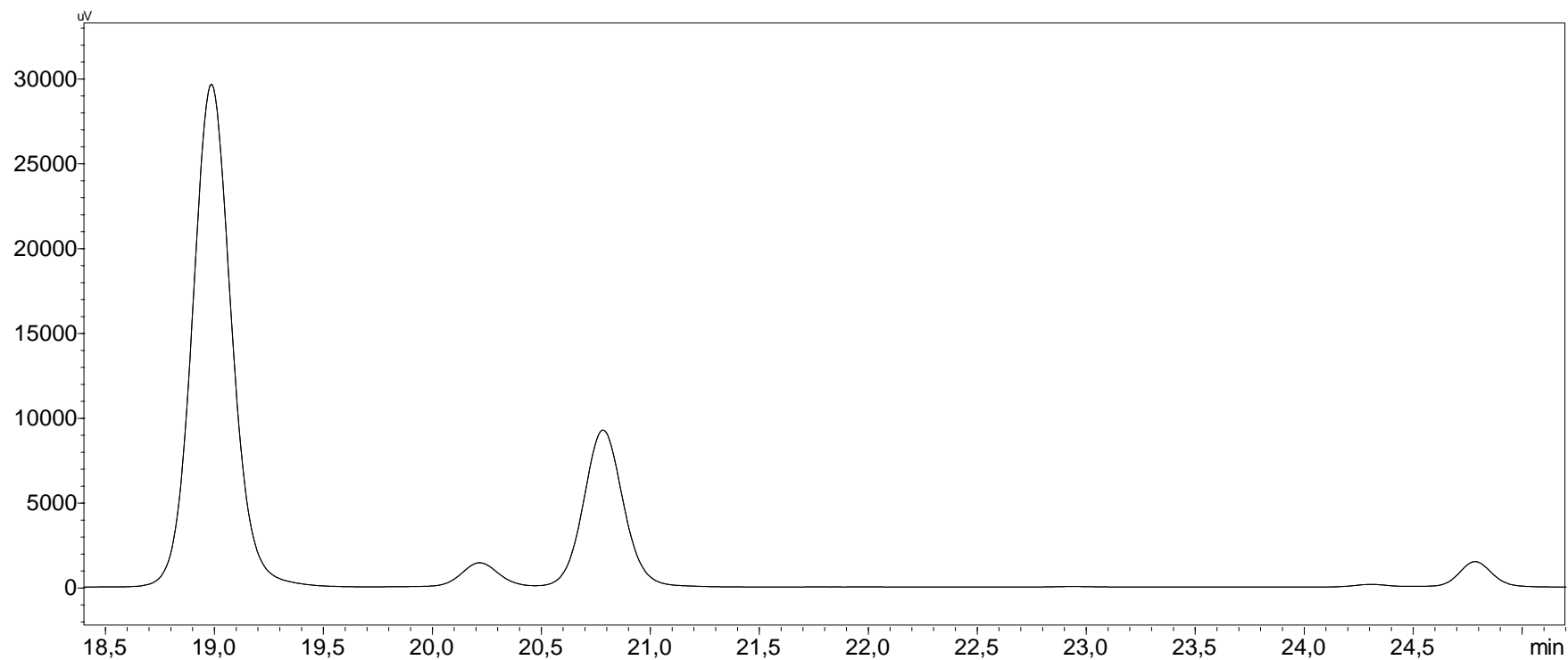
Příloha 2A: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přibližení)

Asp (35,6 $\mu\text{mol/l}$, 2,94 min); *Glu* (599,2 $\mu\text{mol/l}$, 3,75 min); HPLC podmínky: viz příloha 2



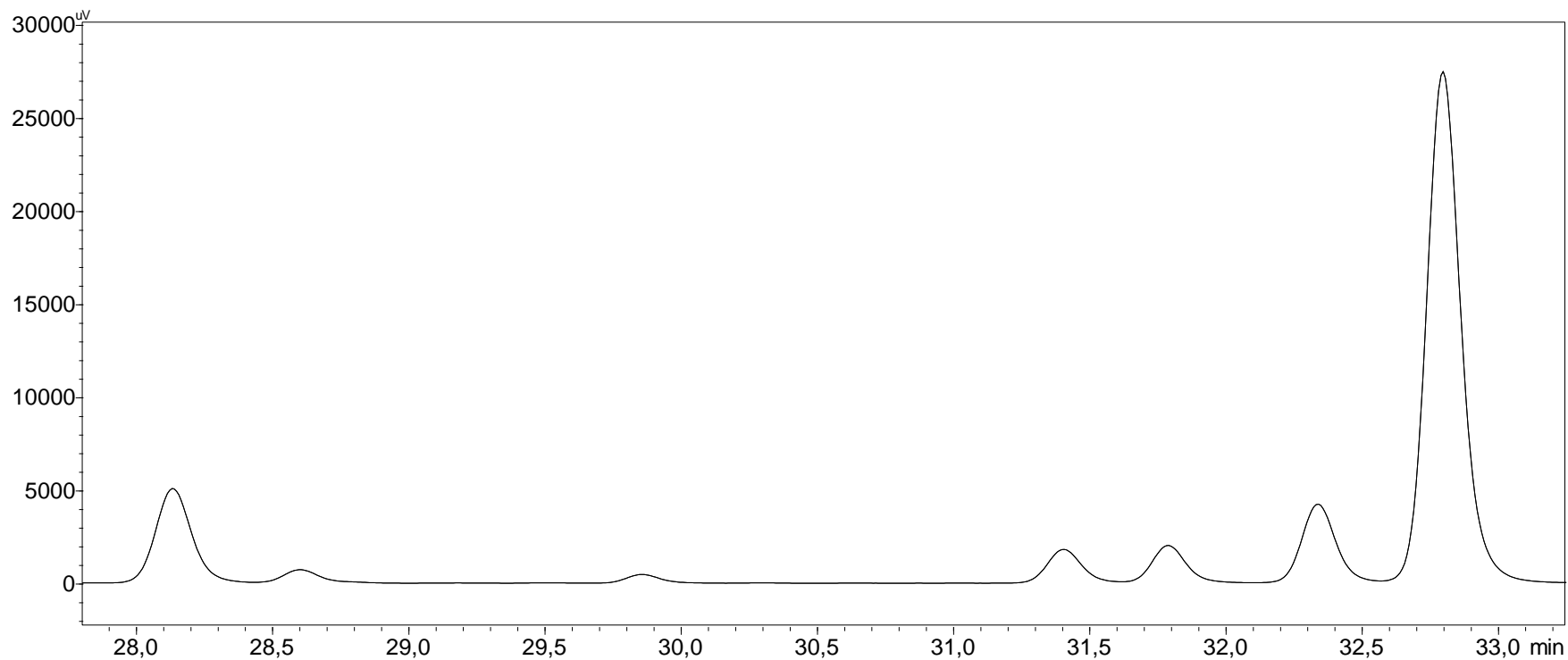
Příloha 2B: Chromatografický záznam stanovení vybraných aminokyselin (1-kyano-2-substituovaných-benz[*f*]isoindolových derivátů) ve vzorku mateřského mléka získaného technikou suché kapky (přiblížení)

Asn (23,5 $\mu\text{mol/l}$, 8,69 min); *His* (16,6 $\mu\text{mol/l}$, 9,99 min); *Gln* (151,3 $\mu\text{mol/l}$, 10,48 min); *Ser* (83,8 $\mu\text{mol/l}$, 11,06 min); *Cit* (8,7 $\mu\text{mol/l}$, 12,13 min); *Arg* (12,5 $\mu\text{mol/l}$, 14,19 min); *Gly* (83,4 $\mu\text{mol/l}$, 15,13 min); *Thr* (50,6 $\mu\text{mol/l}$, 15,44 min); HPLC podmínky: viz příloha 2



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

Ala (296,5 $\mu\text{mol/l}$, 18,99 min); *Tyr* (15,0 $\mu\text{mol/l}$, 20,22 min); *Tau* (86,5 $\mu\text{mol/l}$, 20,79 min); *2-AB* (12,1 $\mu\text{mol/l}$, 24,79 min); HPLC podmínky: viz příloha 2



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

Val (36,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,14 min); *Met* (5,4 $\mu\text{mol/l}$, 28,60 min); *Trp* (4,2 $\mu\text{mol/l}$, 29,86 min); *Ile* (12,6 $\mu\text{mol/l}$, 31,41 min); *Phe* (14,7 $\mu\text{mol/l}$, 31,79 min); *Leu* (28,5 $\mu\text{mol/l}$, 32,34 min); *Nleu* (32,80 min); HPLC podmínky: viz příloha 2

	Glu	Asn	His	Gln	Ser	Cit	Arg	Gly	Thr	Ala	Tyr	Tau	2-AB	Val	Met	Trp	Ile	Phe	Leu
Asp	0,823 ***	0,455 x	0,630 **	0,345 x	0,555 *	0,327 x	0,039 x	0,366 x	0,516 *	0,673 **	0,584 *	0,136 x	0,409 x	0,642 **	0,755 ***	0,448 x	0,491 *	0,759 ***	0,580 *
	Glu	0,436 x	0,510 *	0,640 **	0,488 *	0,366 x	-0,216 x	0,547 *	0,512 *	0,664 **	0,486 *	0,149 x	0,648 **	0,664 **	0,574 *	0,234 x	0,390 x	0,711 **	0,510 *
		Asn	0,424 x	-0,116 x	0,447 x	-0,040 x	0,175 x	0,488 *	0,484 *	0,672 **	0,461 x	0,105 x	0,090 x	0,301 x	0,487 *	0,474 *	0,502 *	0,547 *	0,469 *
			His	0,136 x	0,784 ***	0,456 x	0,577 *	0,460 x	0,661 **	0,412 x	0,779 ***	0,258 x	0,217 x	0,738 ***	0,787 ***	0,827 ***	0,823 ***	0,870 ***	0,861 ***
				Gln	0,272 x	0,534 *	-0,289 x	0,446 x	0,254 x	0,192 x	0,250 x	0,146 x	0,818 ***	0,569 *	0,216 x	-0,127 x	0,089 x	0,316 x	0,267 x
					Ser	0,509 *	0,618 **	0,619 **	0,805 ***	0,356 x	0,849 ***	0,216 x	0,332 x	0,745 ***	0,870 ***	0,825 ***	0,868 ***	0,788 ***	0,880 ***
						Cit	0,461 x	0,573 *	0,128 x	-0,001 x	0,505 *	0,088 x	0,206 x	0,369 x	0,353 x	0,411 x	0,371 x	0,416 x	0,510 *
							Arg	0,315 x	0,287 x	-0,161 x	0,577 *	0,189 x	-0,361 x	0,206 x	0,486 *	0,798 ***	0,641 **	0,350 x	0,604 **
								Gly	0,298 x	0,195 *	0,547 *	0,228 x	0,264 x	0,399 x	0,394 x	0,371 x	0,404 x	0,448 x	0,506 *
									Thr	0,485 *	0,743 ***	0,238 x	0,432 x	0,815 ***	0,801 ***	0,656 **	0,854 ***	0,801 ***	0,795 ***
										Ala	0,510 *	-0,009 x	0,485 *	0,558 *	0,568 *	0,373 x	0,455 x	0,698 **	0,510 *
											Tyr	0,224 x	0,318 x	0,804 ***	0,860 ***	0,873 ***	0,915 ***	0,872 ***	0,942 ***
												Tau	0,111 x	0,344 x	0,194 x	0,187 x	0,294 x	0,157 x	0,303 x
													2-AB	0,697 **	0,379 x	0,013 x	0,219 x	0,454 x	0,347 x
														Val	0,803 ***	0,601 **	0,790 ***	0,847 ***	0,862 ***
															Met	0,825 ***	0,870 ***	0,886 ***	0,894 ***
																Trp	0,929 ***	0,783 ***	0,897 ***
																	Ile	0,863 ***	0,967 ***
																		Phe	0,908 ***

Příloha 3: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v mateřském mléce a kolostru dobrovolných dárců

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

	Glu	Asn	His	Gln	Ser	Cit	Arg	Gly	Thr	Ala	Tyr	Tau	2-AB	Val	Met	Trp	Ile	Phe	Leu
Asp	0,920 ***	0,891 **	0,784 *	-0,096 x	0,770 *	0,177 x	0,241 x	0,507 x	0,879 **	0,744 *	0,821 *	0,034 x	0,326 x	0,930 ***	0,885 **	0,745 *	0,826 *	0,908 **	0,795 *
	Glu	0,962 ***	0,623 x	0,112 x	0,622 x	-0,082 x	-0,001 x	0,378 x	0,893 **	0,825 *	0,681 x	-0,128 x	0,579 x	0,880 **	0,794 *	0,588 x	0,720 *	0,880 **	0,678 x
		Asn	0,645 x	0,297 x	0,671 x	0,066 x	0,085 x	0,504 x	0,828 *	0,832 *	0,711 *	-0,170 x	0,642 x	0,849 **	0,785 *	0,623 x	0,700 x	0,888 **	0,692 x
			His	-0,202 x	0,992 ***	0,617 x	0,767 *	0,873 **	0,798 *	0,308 x	0,930 ***	0,124 x	-0,072 x	0,886 **	0,931 ***	0,970 ***	0,969 ***	0,896 **	0,971 ***
				Gln	-0,137 x	0,072 x	-0,199 x	0,146 x	-0,193 x	0,268 x	-0,039 x	-0,600 x	0,668 x	-0,115 x	-0,133 x	-0,158 x	-0,236 x	0,009 x	-0,138 x
					Ser	0,620 x	0,762 *	0,895 **	0,787 *	0,336 x	0,918 ***	0,114 x	-0,021 x	0,873 **	0,921 ***	0,966 ***	0,952 ***	0,901 **	0,964 ***
						Cit	0,914 ***	0,830 *	0,056 x	-0,245 x	0,602 x	0,096 x	-0,347 x	0,272 x	0,407 x	0,645 x	0,459 x	0,314 x	0,549 x
							Arg	0,874 **	0,266 x	-0,277 x	0,670 x	0,230 x	-0,457 x	0,421 x	0,554 x	0,780 *	0,652 x	0,445 x	0,702 x
								Gly	0,495 x	0,139 x	0,859 **	-0,018 x	0,001 x	0,677 x	0,770 *	0,901 **	0,799 *	0,739 *	0,868 **
									Thr	0,550 x	0,707 *	0,075 x	0,206 x	0,901 **	0,842 **	0,712 *	0,859 **	0,895 **	0,784 *
										Ala	0,473 x	-0,337 *	0,749 *	0,646 x	0,563 x	0,327 x	0,400 x	0,658 x	0,417 x
											Tyr	0,019 x	0,164 x	0,921 ***	0,965 ***	0,967 ***	0,938 ***	0,917 ***	0,972 ***
												Tau	-0,322 x	0,012 x	0,056 x	0,164 x	0,145 x	-0,058 x	0,061 x
													2-AB	0,296 x	0,219 x	0,025 x	0,058 x	0,344 x	0,090 x
														Val	0,985 ***	0,886 **	0,953 ***	0,985 ***	0,937 ***
															Met	0,949 ***	0,978 ***	0,974 ***	0,979 ***
																Trp	0,964 ***	0,889 **	0,987 ***
																	Ile	0,941 ***	0,985 ***
																		Phe	0,940 ***

Příloha 4: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v kolostru dobrovolných dárců

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

	Glu	Asn	His	Gln	Ser	Cit	Arg	Gly	Thr	Ala	Tyr	Tau	2-AB	Val	Met	Trp	Ile	Phe	Leu
Asp	0,709 *	0,092 x	0,343 x	0,423 x	0,251 x	0,395 x	0,021 x	0,088 x	0,092 x	0,684 *	0,305 x	0,286 x	0,369 x	0,372 x	0,689 *	0,271 x	0,200 x	0,537 x	0,380 x
	Glu	0,346 x	0,454 x	0,693 *	0,593 x	0,701 *	0,599 x	0,527 x	0,379 x	0,881 ***	0,596 x	0,594 x	0,538 x	0,546 x	0,681 *	0,572 x	0,586 x	0,717 *	0,715 *
		Asn	0,134 x	0,019 x	0,092 x	-0,002 x	0,094 x	0,794 **	-0,020 x	0,427 x	0,040 x	0,480 x	-0,070 x	-0,045 x	-0,051 x	-0,063 x	0,075 x	0,078 x	0,110 x
			His	0,336 x	0,302 x	0,224 x	0,597 x	-0,024 x	0,445 x	0,756 *	0,472 x	0,516 x	0,569 x	0,672 *	0,456 x	0,792 **	0,656 *	0,811 **	0,691 *
				Gln	0,828 **	0,694 *	0,745 *	0,350 x	0,830 **	0,538 x	0,815 **	0,498 x	0,851 **	0,842 **	0,825 **	0,668 *	0,855 **	0,718 *	0,880 ***
					Ser	0,455 x	0,675 *	0,487 x	0,851 **	0,415 x	0,704 *	0,399 x	0,890 ***	0,735 *	0,752 *	0,607 x	0,755 *	0,552 x	0,723 *
						Cit	0,572 x	0,270 x	0,314 x	0,509 x	0,519 x	0,076 x	0,400 x	0,394 x	0,413 x	0,613 x	0,560 x	0,598 x	0,614 x
							Arg	0,330 x	0,767 **	0,587 x	0,763 **	0,609 x	0,694 *	0,761 *	0,505 x	0,818 **	0,912 ***	0,749 *	0,884 ***
								Gly	0,258 x	0,424 x	0,413 x	0,493 x	0,180 x	0,165 x	0,113 x	0,153 x	0,331 x	0,171 x	0,330 x
									Thr	0,355 x	0,806 **	0,481 x	0,893 ***	0,861 ***	0,730 *	0,669 *	0,878 ***	0,670 *	0,805 **
										Ala	0,617 x	0,706 *	0,504 x	0,619 x	0,583 x	0,690 *	0,636 *	0,839 **	0,757 *
											Tyr	0,578 x	0,721 *	0,838 **	0,614 x	0,798 **	0,904 ***	0,809 **	0,886 ***
												Tau	0,478 x	0,656 *	0,467 x	0,413 x	0,613 x	0,524 x	0,686 *
													2-AB	0,925 ***	0,861 ***	0,740 *	0,845 **	0,706 *	0,842 **
														Val	0,783 **	0,819 **	0,926 ***	0,802 **	0,940 ***
															Met	0,521 x	0,644 *	0,711 *	0,719 *
																Trp	0,899 ***	0,880 ***	0,889 ***
																	Ile	0,847 **	0,974 ***
																		Phe	0,888 ***

Příloha 5: Korelace mezi hladinami jednotlivých aminokyselin v mateřském mléce dobrovolných dárců

Pearsonův korelační koeficient; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $x_p > 0,05$

