

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

ALENA LANGOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních analytických technik pro analýzu aminokyselin
v potravinových doplňcích

Bakalářská práce

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití moderních analytických technik pro analýzu aminokyselin v potravinových doplňcích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Jméno a příjmení autora

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Klikarové Ph.D. za výjimečnou trpělivost, za odborné vedení a rady, které mi věnovala v průběhu psaní bakalářské práce. V neposlední řadě taky za čas, který nad touto prací strávila. Dále bych chtěla poděkovat rodině, příteli a kamarádům, kteří mě soustavně podporují při studiu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je literární rešerší zaměřenou na stanovení aminokyselin v potravinových doplňcích. Nejprve byla popsána obecná charakteristika aminokyselin, včetně jejich klasifikace, a poté byly detailněji diskutovány významní zástupci. Následně byly charakterizovány a porovnávány vybrané sportovní doplňky stravy skládající se z různých druhů aminokyselin. Poslední část bakalářská práce se věnuje analytickému stanovení aminokyselin pomocí technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie a zónové elektroforézy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aminokyseliny, doplňky stravy, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza

TITTLE

Use of Modern Analytical Techniques for the Analysis of Amino Acids in Dietary Supplements

ANNOTATION

This bachelor thesis is a theoretical research focused on the determination of amino acids in dietary supplements. First, the general characteristics of amino acids, including their classification, were described, and then important representatives were discussed in more detail. Subsequently, selected dietary supplements for athletes comprising of different types of amino acids were characterized and compared. The final part of the bachelor thesis dealt with the analytical determination of amino acids using techniques of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis.

KEYWORDS

Amino acids, dietary supplements, high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 Aminokyseliny	12
1.1 Obecné informace	12
1.2 Stereochemie	13
1.3 Esenciální aminokyseliny s rozvětveným řetězcem.....	14
1.3.1 L-Valin.....	15
1.3.2 L-Leucin.....	16
1.3.3 L-Izoleucin.....	17
1.4 Neesenciální proteinogenní aminokyseliny	17
1.4.1 Glycin.....	19
1.4.2 L-Prolin.....	20
1.4.3 L-Glutamin.....	21
1.5 D-aminokyseliny	21
1.5.1 D-Valin	22
1.5.2 D-Aspartát.....	22
1.5.3 D-Serin.....	22
2 Doplnky stravy na bázi aminokyselin	23
2.1 Kreatin.....	23
2.2 Sывátkový protein	25
2.3 BCAA (Valin, Leucin, Izoleucin)	26
2.4 Hydroxymethylbutyrát	27
2.5 L-Karnitin.....	27
3 Stanovení aminokyselin v doplňcích stravy	29
3.1 Hydrolýza proteinu.....	29
3.2 Derivatizace AK.....	29
3.3 Analytické stanovení AK	32

3.3.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	32
3.3.2	Kapilární zónová elektroforéza.....	34
4	ZÁVĚR.....	37
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	38

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Obecný vzorec AK.	12
Obrázek 2: Schéma vzniku peptidové vazby.	12
Obrázek 3: Společná katabolická cesta BCAA. ^[14]	15
Obrázek 4: Chemická struktura valinu.	16
Obrázek 5: Strukturní vzorec leucinu. ^[24]	17
Obrázek 6: Strukturní vzorec izoleucinu.	17
Obrázek 7: Schéma syntézy NEAK znázorňuje meziprodukty glykolýzy a Krebsova cyklu. ^[6]	18
Obrázek 8: Strukturní vzorec glycinu.	19
Obrázek 9: Syntéza glycinu pomocí přímé aminace kyseliny chloroctové. ^[5]	19
Obrázek 10: Syntéza glycinu pomocí Bucherer-Bergsovy reakce. ^[5]	20
Obrázek 11: Struktura prolinu.	20
Obrázek 12: Strukturní vzorec glutaminu.	21
Obrázek 13: Struktura kreatinu.	24
Obrázek 14: Syntéza kreatinu. ^[40]	25
Obrázek 15: Struktura hydroxymethylbutyrátu.	27
Obrázek 16: Struktura L-karnitinu.	28
Obrázek 17: Chemická reakce derivatizačních činidel OPA (A), FMOC-Cl (B) a AQC (C) s primární aminy.	31
Obrázek 18: Chemická reakce ninhydrinu s α -AK.	32
Obrázek 19: Schéma HPLC instrumentace. ^[5]	33
Obrázek 20: Obecné schéma instrumentace kapilární elektroforézy. ^[62]	35

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
AQC	6-aminochinolyln-hydroxysukcinimidylkarbamát
ATP	adenosintrifosfát
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
BCAT	aminotransferáza s rozvětveným řetězcem
BCKDH	aktivovaný komplex α -ketokyseliny s dehydrogenázou s rozvětveným řetězcem
CP	kreatinfosfát
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DBS-Cl	dabsylchlorid
DEEMM	diethyl-ethoxymetylenmalonát
DNFB	2,4-dinitrofluorbenzen
EAK	esenciální aminokyseliny
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FMOC-Cl	9-fluorenylmethyl chlorformiát
GAA	kyselina guanidinoctová
HMB	hydroxymethylbutyrát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NEAK	neesenciální aminokyselina
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálním fázovým uspořádáním
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd

PITC fenylizothiokyanát

RP-HPLC vysokoučinná kapalinová chromatografie s obráceným fázovým uspořádáním

ÚVOD

Aminokyseliny patří mezi základní stavební jednotky peptidů a bílkovin, a jsou tak nepostradatelnou součástí lidského těla. Aminokyseliny obecně dělíme na postradatelné, nepostradatelné a částečně postradatelné, nicméně každá aminokyselina má své charakteristické vlastnosti jedinečné pro správné fungování organismu.

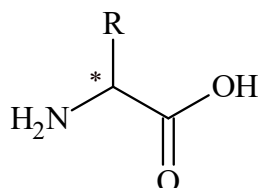
Jednotlivé aminokyseliny jsou v těle zastoupeny v různém množství a jejich nedostatek je možné řešit potravinovými doplňky, kterých je na světovém trhu bohatý výběr. Mohou si zde vybrat jak sportovci, kteří upřednostňují látky pro zlepšení tělesné kondice, regenerace či k potlačení fyzické únavy, tak i běžní lidé užívající spíše různé druhy minerálů nebo vitamínů pro preventivní účely.

Pro stanovení aminokyselin se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo elektroforéza. Jelikož aminokyseliny nemají vhodné chemické vlastnosti pro jejich analytické stanovení, je před vlastní analýzou nutná jejich derivatizace pomocí derivatizačních činidel.

1 Aminokyseliny

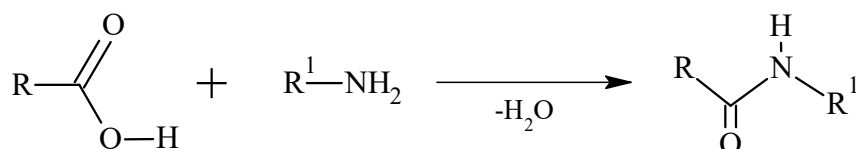
1.1 Obecné informace

Aminokyseliny (AK) jsou substituční deriváty karboxylových kyselin obsahující ve své struktuře aminovou skupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu $-COOH$, obě vázané na tzv. α -uhlík (obrázek 1). Alfa uhlíkem se rozumí takový uhlík, který se nachází jako první za funkční karboxylovou skupinou.



Obrázek 1: Obecný vzorec AK.

V přírodě se nachází více než 300 druhů AK, které plní různé nutriční, sensorické nebo regulační funkce. AK mohou být ve všech živých organismech ve formě volné nebo vázané pomocí amidové (peptidové) vazby. Vznik peptidové vazby spočívá v reakci α -karboxylové skupiny jedné AK s α -aminoskupinou druhé AK. Při reakci dochází k odštěpení molekuly vody (obrázek 2). Peptidovou vazbou mohou být spojeny AK v proteinech, peptidech i v některých bioaktivních molekulách.^[1]



Obrázek 2: Schéma vzniku peptidové vazby.

AK můžeme rozdělit na kódované a nekódované. Kódovaných neboli proteinogenních AK je pouze 20, mají výhradně L- konfiguraci a tvoří základní stavební jednotky všech bílkovin. Děj, při kterém dochází ke vzniku proteinů, je nazýván proteosyntéza.^[2] Nekódované AK se nepodílejí na proteosyntéze. Vznikají většinou posttranslačními modifikacemi a jsou součástí nebílkovinných struktur, jako jsou hormony, enzymy či koenzymy. Mohou se také v lidském těle vyskytovat jako metabolické meziprodukty.^[3]

Dle významu ve výživě člověka můžeme proteinogenní AK rozdělit do tří skupin: esenciální (nepostradatelné), neesenciální (postradatelné) a semiesenciální (částečně postradatelné). Esenciální AK si tělo nedokáže syntetizovat samo, a proto je jejich příjem výhradně podmíněn stravou. Jedná se o devět AK: valin, leucin, izoleucin, lysin, treonin, fenylalanin, tryptofan, methionin a v poslední době byl zařazen i histidin.^[4] Opakem jsou pak AK neesenciální, které jsou lidským organismem produkovány v dostatečném množství de novo. Mezi tyto AK řadíme glycin, alanin, serin, kyselina asparagová, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, tyrosin a prolin. Speciální skupinu tvoří tzv. semiesenciální neboli podmíněně esenciální AK, jež organismus syntetizuje jen v omezeném množství (hlavně u kojenců), a proto musí být současně přijímány i potravou. Patří mezi ně cystein a arginin.^[5]

Nadbytek AK v těle je metabolizován za vzniku příslušných metabolitů. Většina AK je metabolizována na glukózu. Tyto AK nazýváme glukogenní. Výjimku tvoří leucin a lysin, které při degradaci tvoří acetoacetát a acetylkoenzym A, jež jsou prekurzorem ketolátek, a proto tyto AK nazýváme ketogenní. Některé AK dokážou tvořit oba produkty degradace, a řadíme je tedy do obou skupin zároveň. Mezi takové AK patří fenylalanin, tryptofan, izoleucin, tyrosin a treonin. Neesenciální AK (NEAK) lze degradovat i jinou cestou, a to pomocí oxidativní deaminace, při níž dojde k odstranění aminoskupiny za uvolnění amoniaku ve formě amonného iontu, který je dále metabolizován v močovinovém cyklu na močovinu.^[6]

AK jsou pochopitelně i nezbytnou součástí těla zvířat i rostlin. Pro rostliny mají AK největší význam v půdě, čímž rostlinu vyživují a umožňují její růst.^[7] Jsou také sekundárními metabolity některých syntéz nebo meziproducty při tvorbě vitamínů.^[8] U zvířat mají AK podobné funkce jako u člověka, a hrají tak velmi významnou roli v jejich fyziologii.^[2]

1.2 Stereochemie

Stereochemie je vědní obor, který se zabývá prostorovým uspořádáním (konfigurací) atomů v molekulách. Stereoizomery jsou chemické struktury se stejnou konstitucí, ale rozdílnou konfigurací. Každá molekula, která ve své struktuře obsahuje alespoň jedno chirální centrum (atom) charakterizované přítomností různých substituentů na každé vazbě, je schopna tvořit stereoizomery. V biologii tvoří chirální centra většinou uhlík, avšak chirální může být jakýkoli jiný atom se čtyřmi valenčními elektrony.

Chirální látky můžeme dělit na diastereoizomery a enantiomery.^[9] Diastereoizomery jsou látky lišící se konfigurací na jednom nebo více chirálních centrech (ne však na všech).^[10] Zvláštním případem diastereoizomerů jsou pak enantiomery, které mají opačnou konfiguraci na všech

chirálních centrech, a jsou tedy svými zrcadlovými obrazy.^[9,10] Enantiomery se vyznačují identickou chemickou strukturou, díky které mají stejné fyzikální i chemické vlastnosti. Jedinou rozdílnou vlastností enantiomerů je odlišný směr stáčení roviny polarizovaného světla^[10], čímž následně rozlišujeme L- a D- izomery. D-izomery (z latinského slova dexter = vpravo) nazýváme pravotočivé, jelikož stáčí polarizované světlo ve směru hodinových ručiček. Naopak L-izomery (z latinského slova laevus = vlevo) stáčí polarizované světlo proti hodinovým ručičkám, a jsou tedy levotočivé.

Většina α -AK jsou opticky aktivní látky s jedním chirálním centrem. Výjimku tvoří aminokyseliny glycin, izoleucin a treonin. Zatímco glycin neobsahuje ve své struktuře žádný chirální uhlík, izoleucin s treoninem mají naopak centra chiralitativity dvě, a to na α - i β -uhlíku.^[11] V přírodě je zastoupení levotočivých aminokyselin daleko častější než pravotočivých, které mají většinou mikrobiální původ.^[12]

Optickou otáčivost látek lze měřit pomocí jednoduché analytické metody zvané polarimetrie nebo ji lze vypočítat podle rovnice:

$$[\alpha] = [\alpha]_{spec} \cdot L \cdot c$$

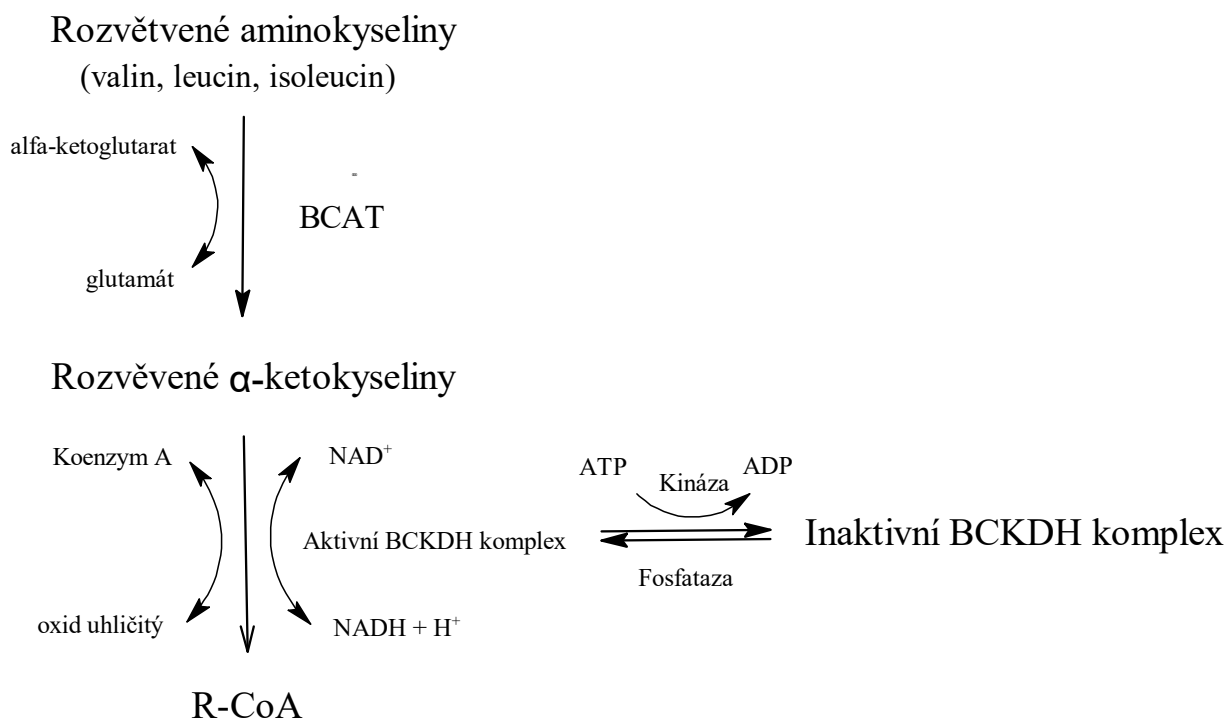
Veličina α udává celkovou otáčivost, která se mění v závislosti na specifické otáčivosti (α_{spec}), délce kyvety (L) a koncentraci zkoumané látky (c). Specifická otáčivost je pak úhel, o který se otočí rovina polarizovaného světla (o vlnové délce 590 nm), při jednotkové tloušťce (1 dm) a jednotkové koncentraci zkoumané látky při teplotě 20 °C.

1.3 Esenciální aminokyseliny s rozvětveným řetězcem

Speciální podskupinu esenciálních aminokyselin (EAK) představují tři hydrofobní alifatické aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, valin, leucin a izoleucin, většinou označované zkratkou BCAA. Ačkoli tyto AK tvoří především stavební kameny tkáňových bílkovin (asi 35 % EAK ve svalech), mají v organismu i další funkce. Regulují energetickou homeostázu těla, zvyšují absorpci glukózy a zlepšují sliznici střev.^[13] Na druhou stranu BCAA snižují hladinu dvou enzymů (izoformu kreatinkinázy a fosfáty aktivovanou glutaminázu) zodpovědných za metabolismus neurotransmiterů a energie.

BCAA se od ostatních AK liší zejména místem, kde probíhá jejich katabolický metabolismus. Většina AK je katalyzována v játrech, zatímco BCAA jsou primárně oxidovány v kosterním svalstvu za pomoci enzymů produkovaných mitochondriemi.^[14] Během jejich katabolismu pak vznikají koenzymy NADH (nikotinamidadeninukleotid) a FADH₂

(flavinadenindinukleotid), které jsou následně využívány pro syntézu sloučeniny ATP (adenosintrifosfát), jež slouží jako univerzální zdroj energie pro buňku.^[15] První dva katabolické kroky jsou pro všechny tři BCAA stejné (obrázek 3). V první reakci probíhá reverzibilní transaminace katalyzovaná aminotransferázou (BCAT), při které z aminokyselin skupiny BCAA vzniká příslušná rozvětvená α -ketokyselina. Druhou reakcí je následná nevratná oxidační dekarboxylace α -ketokyselin katalyzovaná aktivovaným komplexem α -ketokyseliny s dehydrogenázou s rozvětveným řetězcem (BCKDH) za vzniku příslušných sloučenin koenzymu A (R-CoA), které se dále účastní různých metabolických cyklů. Aktivní komplex BCKDH vzniká z jeho inaktivní formy vratným procesem fosforylace pomocí fosfatázy.^[14] Následně se katabolická cesta BCAA rozchází. Během celého procesu je přítom nutná aktivní účast různých enzymů, které jsou pro každou AK specifické.^[15,16]

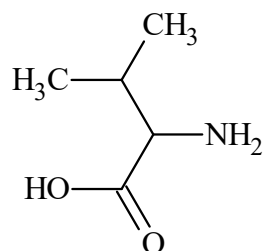


Obrázek 3: Společná katabolická cesta BCAA.^[14]

1.3.1 L-Valin

Valin je α -aminokyselina, jejíž boční řetězec tvoří izopropyl (obrázek 4). V lidském organismu ho nalezneme v elastinu (15%), který je hlavním komponentem elastických vláken v tkáních živočichů.^[17] Dále ho můžeme nalézt v kosterním svalstvu, kde podporuje růst svalové hmoty, opravu tkání a v neposlední řadě zvyšuje vytrvalost organismu při tělesné činnosti.^[5] Valin je

také hojně využíván průmyslově. V kosmetických produktech je zvlhčující složkou různých krémů či šamponů, ve farmaceutickém průmyslu je součástí antibiotik či antivirotik, a v posledních letech se rovněž využívá i v zemědělství, a to jako přísada do krmiv pro zvířata.^[18]



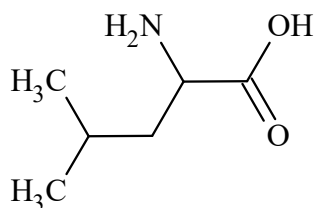
Obrázek 4: Chemická struktura valinu.

Valin lze vyrábět chemickou syntézou či technologií mikrobiální kultivace vycházející z mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, méně často potom z kmene *Escherichia Coli*. *Corynebacterium glutamicum* byl původně znám jako producent kyseliny L-glutamové. Pomocí genového inženýrství byla tato grampozitivní půdní bakterie během několika let postupně vyšlechtěna ve velice efektivního průmyslového výrobce i jiných L-aminokyselin.^[19]

Biosyntéza valinu spočívá ve čtyřstupňové reakci. Výchozí sloučeninou je pyruvát, který se v těle získává dekarboxylací koenzymu-A. Nejprve je pyruvát převeden pomocí enzymu syntáza acetoxykyseliny na 2-acetylacetát, který je enzymem izomero-reduktázou následně transformován na 2,3-dihydroxyizovalerát., jež je dehydratázou převeden na 2-ketoizovalerát. Posledním krokem této syntézy je transaminázou katalyzovaná reakce 2-ketoizovalerátu za vzniku valinu.^[18,19]

1.3.2 L-Leucin

Dalším zástupcem BCAA je leucin, jehož postranní řetězec tvoří izobutyl (obrázek 5). Na rozdíl od valinu a izoleucinu je leucin čistě ketogenní AK. Leucin se v organismu nachází hlavně v kosterním svalstvu a mozku. V mozku může být leucin enzymaticky degradován za vzniku důležitých ketolátek (acetoacetát, acetyl-CoA, β -hydroxybutyrát apod.), které mohou následně nahradit funkci glukózy, jakožto energetického paliva pro metabolismus. Leucin se dále podílí na metabolismu neurotransmiteru glutamátu.^[20] Dále je součástí peptidového hormonu oxytocinu, který ovlivňuje funkčnost mléčné žlázy a regulaci děložního svalstva.^[21]



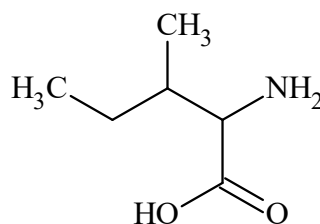
Obrázek 5: Strukturální vzorec leucinu. [24]

Joshua C. Anthon je považován za průkopníka ve výzkumu leucinu. Od roku 1999 provedl mnoho studií týkajících se účinků leucinu na syntézu bílkovin ve svazech. Anthon zjištil, že leucin stimuluje regeneraci proteinů kosterního svalstva po cvičení. Od té doby bylo uskutečněno několik experimentů, které potvrzují jeho výsledky. [22]

Syntéza leucinu probíhá obdobně jako syntéza valinu, pouze jsou do reakce zapojeny odlišné enzymy, specifické jen pro leucin. [5]

1.3.3 L-Izoleucin

Poslední BCAA aminokyselinou je izoleucin, jež má stejný sumární vzorec jako leucin, nicméně se liší polohou jedné methylové skupiny (obrázek 6). Izoleucin je tedy pozičním izomerem leucinu, čímž vykazují stejné fyzikálně-chemické vlastnosti. Izoleucin zabraňuje zvyšování hladiny glukózy v krevní plazmě, [23] podporuje sekreci hormonů, hojení ran a detoxikaci těla od dusíkatých látek. [24] Hraje také důležitou roli při syntéze hemoglobinu, [25] tvoří prekurzor propionyl-koenzymu A při β -oxidaci nenasycených mastných kyselin, který se následně přemění na významný substrát citrátového cyklu sukcinyl-koenzym A. [26]



Obrázek 6: Strukturální vzorec izoleucinu.

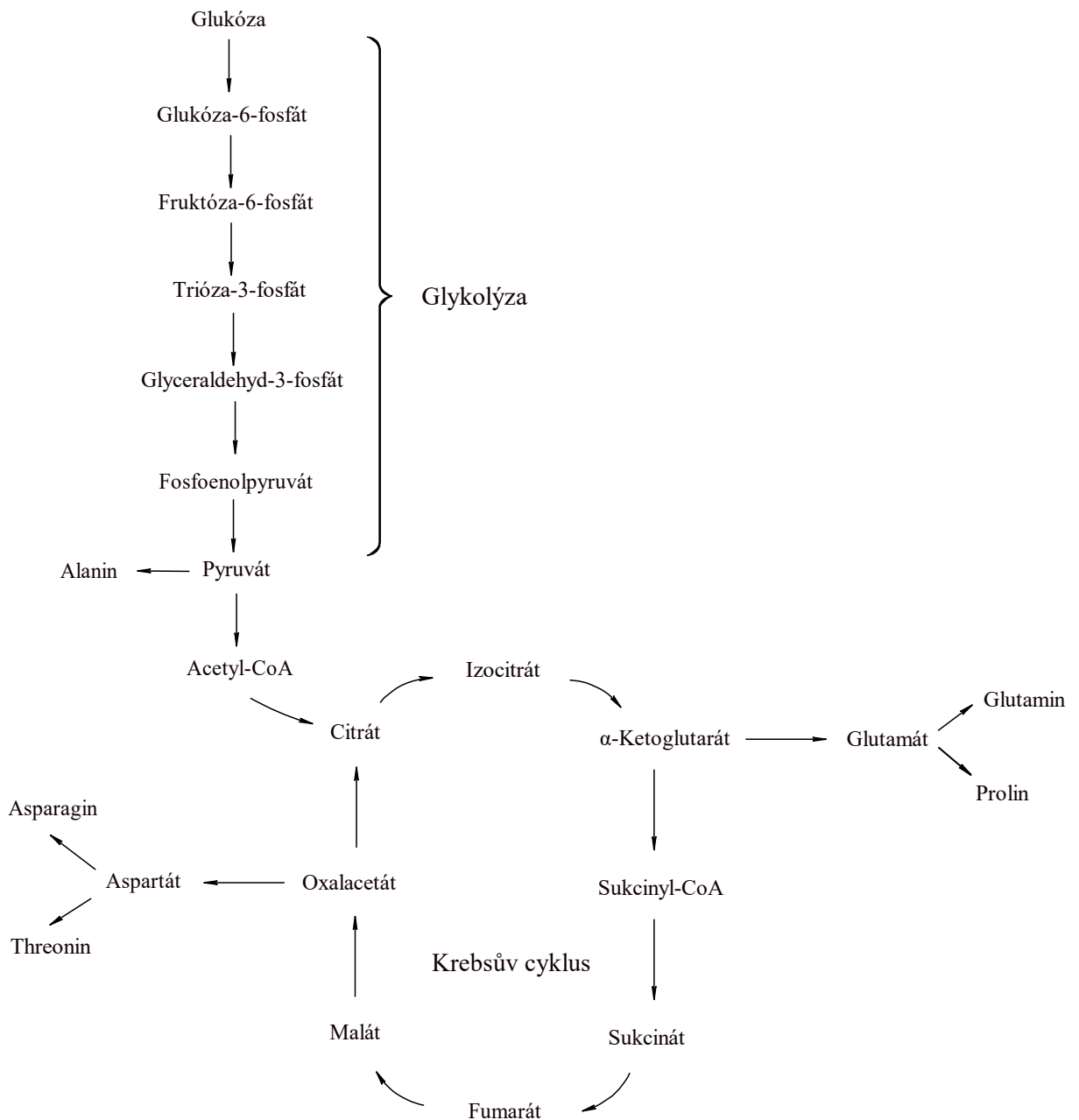
Výroba izoleucinu kopíruje syntézu valinu, a to včetně zapojení stejných enzymů. Rozdílná je pouze výchozí látka, kterou je v tomto případě 2-ketobutyryát vzniklý katalýzou treoninu pomocí treonindeaminázy. [19]

1.4 Neesenciální proteinogenní aminokyseliny

Neesenciální proteinogenní AK jsou důležité pro vývoj a fungování organismů. Jedná se o 11 látek, jež se vedle genové exprese mohou aktivně podílet také na buněčné signalizaci,

antioxidačních dějích, utváření imunity a regulaci syntézy oxidu dusného, oxidu uhličitého či sirovodíku. Většina NEAK může sloužit jako substrát pro syntézu jiných dusíkatých sloučenin.^[2]

V lidském organismu jsou syntetizovány z uhlíkových struktur vznikajících během glykolýzy nebo Krebsova cyklu. Aminoskupiny jsou pak do uhlíkových struktur navázány enzymaticky katalyzovanou transaminací z již hotových AK. NEAK se mohou tvořit např. z pyruvátu, α -ketoglutarátu nebo oxaloacetátu. Popis jednotlivých kroků glykolýzy a Krebsova cyklu k získání potřebných prekurzorů znázorňuje obrázek 7.^[6]

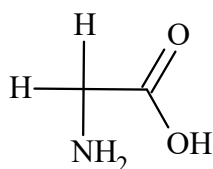


Obrázek 7: Schéma syntézy NEAK znázorňuje meziproducty glykolýzy a Krebsova cyklu.^[6]

V následující části jsem vybrala několik zajímavých proteinogenních NEAK a podrobněji popsala jejich význam v organismu.

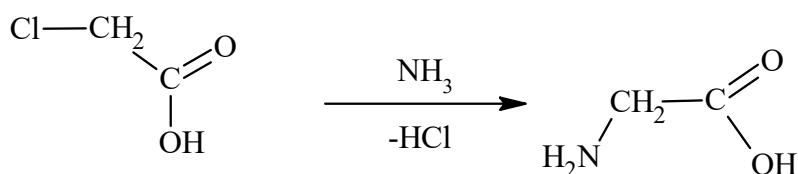
1.4.1 Glycin

Glycin byl izolován z želatiny v roce 1820, čímž se stal první objevenou AK vůbec.^[11] Jeho název byl odvozen od řeckého slova *glykys* (v překladu sladké), protože svou sladkostí připomínal glukózu. Glycin je nejjednodušší α -aminokyselinou, neobsahuje chirální centrum, a netvoří tedy žádné izomery (obrázek 8). Glycin je NEAK nejen pro lidi, ale i pro zvířata. Tvoří zhruba 11,5% všech AK v lidském těle a asi 20% celkového dusíku v bílkovinách. Ve velké míře se podílí na metabolických reakcích v organismu a je hlavní aminokyselinou extracelulárních bílkovin, jako jsou například kolagen či elastin. Ve velké koncentraci je přítomen i v centrální nervové soustavě, kde plní funkci neurotransmiteru, a pomáhá tak řídit příjem potravy nebo udržovat homeostázu celého těla.^[27]

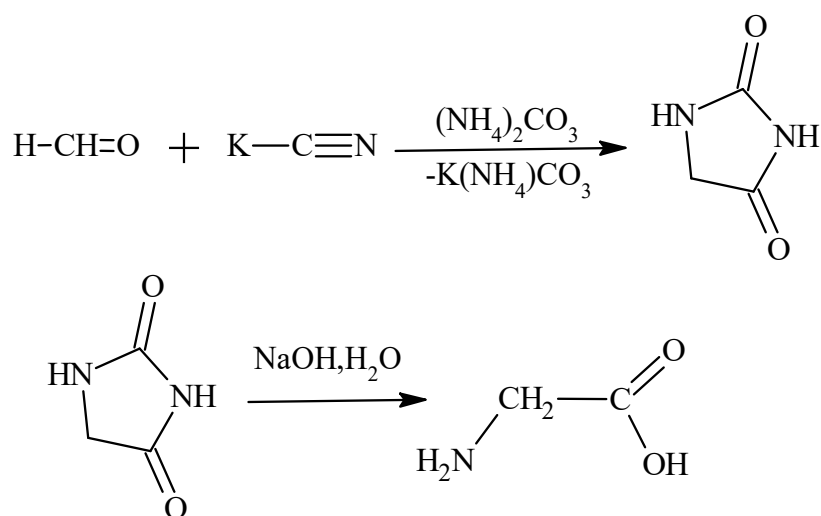


Obrázek 8: Strukturní vzorec glycinu.

Glycin se v dnešní době vyrábí výhradně chemickou syntézou, při které se využívají dva reakční mechanismy. První využívanou metodou je přímá aminace kyseliny chloroctové s velkým přebytkem amoniaku (obrázek 9). Tato syntéza poskytuje velmi dobré výtěžky bez vedlejších produktů. Alternativní metodou je Bucherer-Bergsova reakce (obrázek 10), při které dochází k reakci formaldehydu s kyanidem draselným za vzniku hydantoinu. Tato reakce je katalyzovaná uhličitánem či hydrogenuhličitánem amonným. Výsledný produkt získáme následnou hydrolýzou hydantoinu.^[5]



Obrázek 9: Syntéza glycinu pomocí přímé aminace kyseliny chloroctové.^[5]

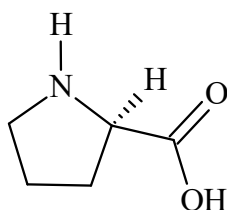


Obrázek 10: Syntéza glycinu pomocí Bucherer-Bergsovy reakce.^[5]

1.4.2 L-Prolin

Prolin se od ostatních AK odlišuje svou strukturou, v níž je primární aminová funkční skupina nahrazena iminoskupinou vázanou v pyrrolidinovém kruhu (obrázek 11), což vede k neobyčejným konformačním vlastnostem.^[27] Prolin je významnou součástí zejména pojivových tkání či globulárních bílkovin, v nichž tvoří charakteristické cis-peptidové vazby. Spolu s hydroxyprolinem tvoří z velké části kolagen. Prolin je i hlavním strukturním prvkem některých pankreatických hormonů a neuropeptidů.^[28] Pomáhá udržovat buněčnou homeostázu a redoxní rovnováhu.^[29]

Důležitou roli hraje prolín i ve farmaceutickém a chemickém průmyslu, kde se podílí na tvorbě několika krátkých peptidových léčivých.



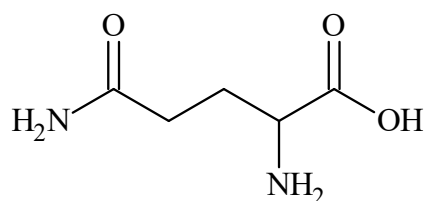
Obrázek 11: Struktura prolínu.

Prolin je syntetizován z glutamátu v cytosolu buňky. Glutamát je enzymem pyrrolin-5-karboxylát syntetázou nejprve redukován na glutamát-semialdehyd. Následuje spontánní reakce za vzniku pyrrolin-5-karboxylátu, který se redukuje na prolín pomocí enzymu pyrrolin-5-karboxylát reduktázy. Alternativně lze prolín syntetizovat transaminací ornithinu pomocí

ornithin-delta-aminotransferázy za vzniku meziprojektu glutamát-semialdehydu. Další kroky syntézy jsou shodné jako v případě glutamátu jako substrátu.^[30]

1.4.3 L-Glutamin

Glutamin je velmi rozšířená NEAK, jejíž strukturu znázorňuje obrázek 12. V lidském těle je nejrozšířenější volnou AK nacházející se především v intracelulárních zásobách těla a kosterním svalstvu, odkud je transportována do krevního řečiště. V lidském organismu má glutamin převážně řídicí funkce. Ovlivňuje funkčnost vnitřních orgánů, jako jsou játra, ledviny i srdce. V játrech například zachycuje a následně odbourává amoniak. Velký vliv má i na buněčný metabolismus, kde slouží jako palivo pro řadu rychle se dělících buněk a tkání. Glutamin je prekurzorem řady klíčových syntéz, mezi které patří i syntéza glutathionu, a patří také mezi důležité signální molekuly. Jednou z dalších funkcí glutaminu je stimulace anaboličkových funkcí, ze kterých vychází například syntéza proteinů, či růst a diferenciacie buněk. Převážná část glutaminu v organismu hydrolyzuje a stává se substrátem pro močovinový cyklus, lipogenezi nebo jaterní glukoneogenezi.^[31]



Obrázek 12: Strukturální vzorec glutaminu.

Syntéza glutaminu vychází z glutamátu, v jehož struktuře dojde k přeměně postranní karboxylové skupiny na amidovou funkční skupinu. Celá reakce je katalyzována pomocí enzymu glutaminsyntetázy za přítomnosti energie ATP a amoniového iontu. Reakcí vzniká amoniak, který je následně katalyzován enzymem glutaminázou a zapojen do močovinového cyklu.^[32]

1.5 D-aminokyseliny

D-aminokyseliny jsou neproteinogenní molekuly, které se ale rovněž podílí na fyziologii a patologii člověka. Jelikož je lze enzymaticky převádět na jejich L-izomer, tvoří zásobárnu AK nezbytných pro syntézu proteinu a pro anaplerotické reakce v Krebsově cyklu (převážně glutaminu a asparaginu).

D-aminokyseliny jsou produkovány, využívány i metabolizovány mikroby, a to především bakteriemi rodu *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* a *Streptococcus*, jež se používají jako výchozí kultury při výrobě fermentovaných potravin a nápojů.

Některé syntetické nebo přírodní peptidy obsahující D-aminokyseliny mají antimikrobiální vlastnosti, a jsou proto součástí některých antibiotik, jako je například valinomycin, aktinomycin, gramicidin a mnoho dalších. Mechanismus účinku těchto D-antibiotik je narušování bakteriálních membrán prostřednictvím tvorby iontových kanálů, a to má za následek smrt buňky.^[33]

1.5.1 D-Valin

D-valin je velmi důležitým substrátem pro průmyslovou syntézu některých polosyntetických veterinárních antibiotik, farmaceutických léků nebo zemědělských pesticidů, jako je například pyrethroidový širokospektrální insekticid fluvaninát. Deriváty D-valinu mají velký význam v oblasti klinické léčby. Využívají se pro onemocnění spojené s imunitním deficitem nebo pro protinádorovou terapii.^[34] Při průmyslové výrobě D-valinu je výchozí látkou aldehyd, který následně reaguje s kyanovodíkem a uhličitánem amonným za vzniku hydantoinu substituovaného v poloze 5 příslušnou aldehydovou skupinou. Tento meziprodukt následně podléhá enzymatické hydrolyze za vzniku D-valinu.^[35]

1.5.2 D-Aspartát

D-aspartát neboli sůl kyseliny asparágové je endogenní AK nacházející se u bezobratlých i obratlovců. Hraje důležitou roli v neuroendokrinním systému. Působí jako neurotransmitter/neuromodulátor uvolňující se po chemických nebo elektrických podnětech. V endokrinním systému se D-aspartát podílí na regulaci syntézy hormonů. Nachází se ve varlatech v Leydigových buňkách, kde uvolňuje hormony testosteron a progesteron. V hypofýze pak stimuluje sekreci hormonu prolaktinu a růstového hormonu.^[33]

1.5.3 D-Serin

D-serin je významnou látkou ve fyziologii a patologii mozkové kůry. Nachází se zde jako neuromodulátor glutamatergické neurotransmise, což je proces excitační signalizace centrální nervové soustavy. V mozku savců působí D-serin jako antagonist glutamátových receptorů odpovědných za učení, paměť a chování. Můžeme ho také najít v sítnici všech obratlovců.^[33]

2 Doplnky stravy na bázi aminokyselin

Doplňky stravy jsou komerčně dostupné produkty, které se využívají nad rámec obvyklé, pestré stravy. Druhů doplňků stravy existuje nepřeberné množství. Často se jedná o aminokyseliny, vitamíny, minerály či vybrané proteiny, sacharidy nebo tuky, a to v různých formách. Podávání doplňků stravy může vést ke zlepšení kognitivních funkcí, fyzických výkonů, ke snížení nadváhy, k utlumení svalové bolesti či obecně ke zlepšení celkového zdravotního stavu. Nejvyužívanější jsou ale doplňky stravy, které ovlivňují metabolické procesy těla.

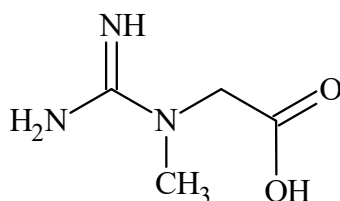
Suplementaci využívají nejvíce sportovci, a to jak profesionálové, tak i amatéři, kteří díky tomu mohou zvýšit svou fyzickou výkonnost a regeneraci po náročném tréninku. K nejrozšířenějším doplňkům stravy pro sportovce patří kreatin, BCAA a v neposlední řadě i syrovátkový protein. Vše má ale své pro i proti a doplňky stravy nejsou výjimkou. Nadměrné užívání potravinových doplňků může způsobovat poruchy či dokonce kolabování nejen jednotlivých orgánů, ale i celého organismu. Nejčastějšími poškozenými orgány bývají ledviny a játra. Dalším nežádoucím účinkem může být vzájemná interakce dvou a více látek, které mohou svůj účinek násobit nebo negativně ovlivnit, což bezprostředně vede ke vzniku zdravotních problémů.^[36]

2.1 Kreatin

Kreatin je semiesenciální makroergní dusíkatá látka (obrázek 13), která se syntetizuje v játrech, ledvinách nebo ve slinivce břišní ze tří AK: glycinu, argininu a methioninu. Jelikož tato syntéza není pro potřeby organismu dostatečná, je kreatin nutné přijímat i z potravy. Hlavním zdrojem kreatinu je maso, vnitřnosti a ryby, tedy výhradně živočišné produkty. Denně bychom měli z potravy přijmout něco mezi 1-1,5 g kreatinu.^[37,38] Kreatin je uložen hlavně v kosterním svalstvu, a to ve formě volné (40 %) i vázané na fosfát (60 %, tzv. fosforylovaná forma). Kreatin je důležitá látka pro svalovou kontrakci, během které je za přítomnosti inzulínu a sodíku převáděn z krevního řečiště do svalu.^[38]

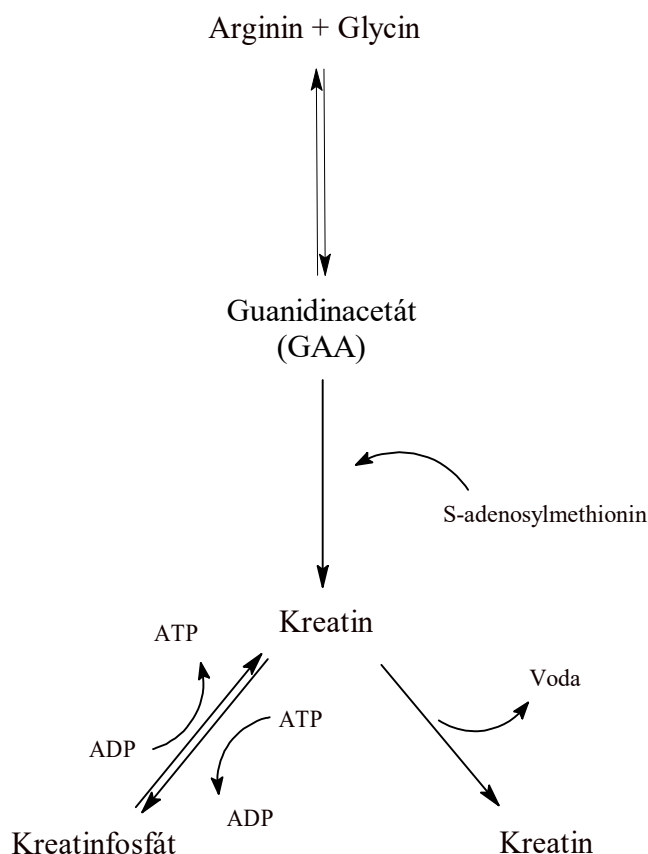
Suplementaci kreatinu by měli využívat zejména vegetariáni a vegani, avšak velké oblibě se těší i u sportovců, u nichž je to velmi diskutované téma. Bylo totiž prokázáno, že zvýšený příjem kreatinu vede v kombinaci s vhodným tréninkem k lepší odolnosti svalů vůči fyzické zátěži, a tedy ke zvyšování síly. Trh dnes nabízí široké spektrum různých forem kreatinu, z nichž nejpoužívanější je kreatin monohydrát ve formě tablet, kapslí nebo prášku. Můžeme se však setkat i s tekutou formou kreatinu nebo ho suplementovat ve formě organických solí, jako například kreatin pyruvát, citrát, malát či fosfát.

Na druhou stranu si ale musíme dát pozor na nadužívání kreatinu, které vede k řadě onemocnění ledvin. Z tohoto důvodu by jeho denní příjem měl být hlídán a neměl by překračovat dávku cca 20 g (v závislosti na tělesné hmotnosti a fyzickém výkonu).^[39]



Obrázek 13: Struktura kreatinu.

Biosyntéza kreatinu je relativně jednoduchý proces zahrnující pouze dvě enzymatické reakce (obrázek 14). Výchozími látkami pro syntézu kreatinu jsou glycin, arginin a methionin. V prvním kroku dochází ke kondenzaci glycinu a argininu za vzniku guanidinoacetátu (GAA). Tato reakce je katalyzovaná pomocí arginin-glycin amidinotransferázy, která je přítomna v ledvinách, mozku a slinivce břišní. Druhým krokem syntézy je přenesení methylové skupiny z S-adenosylmethioninu, který si tělo vyrobilo z methioninu, na GAA za vzniku kreatinu. Tento krok je katalyzovaný pomocí enzymu guanidinoacetát-N-methyltransferáza, který je přítomný v játrech, mozku a slinivce břišní. Potravou či endogenně získaný kreatin je v mitochondriích přeměňován na kreatinfosfát (CP) za uvolnění energie ATP (obrázek 14). Stabilizace zásob CP je řízena tzv. kyvadlovou dopravou kreatinfosfátu z mitochondrií do cytosolu buňky, která omezuje nežádoucí metabolickou přeměnu kreatinu na kreatinin.^[37]



Obrázek 14: Syntéza kreatinu.^[38]

2.2 Syrovátkový protein

Syrovátkový protein je nejoblíbenějším doplňkem stravy podporující růst svalové hmoty. Ve srovnání s ostatními bílkovinnými zdroji se v syrovátkovém proteinu nachází velká koncentrace BCAA (až 26 %). Dále je v něm přítomné velké množství cysteinu a methioninu, které zlepšují imunitní systém prostřednictvím intracelulární přeměny na silný antioxidant glutathion.^[40]

Syrovátka je vedlejším produktem při srážení mléka. Představuje zdroj mnoha významných bílkovin, jako je laktoferin, β -laktoglobulin, α -laktalbumin apod. Největší zastoupení v hovězí syrovátce má právě již zmiňovaný β -laktoglobulin (50%), který je obrovským zdrojem BCAA. Surová syrovátka se dále zpracovává různými dělicími metodami, jako je mikrofiltrace, ultrafiltrace, iontová výměna nebo také reverzní osmóza. V závislosti na metodě zpracování, množství bílkovin, sacharidů či laktózy dělíme syrovátkový protein do tří základních skupin. Do první skupiny spadá tzv. syrovátkový koncentrát, který obsahuje 25-90% bílkoviny a poměrně velké množství minerálů, tuků a cukrů, přičemž s rostoucí koncentrací proteinu se snižuje množství těchto vedlejších látek. Do druhé skupiny řadíme tzv. syrovátkové izoláty,

kteře se vyznačují extrémně vysokou koncentrací proteinu (většinou 95%) a žádným nebo velmi malým množstvím vedlejších produktů. Ve třetí skupině jsou zastoupeny tzv. syrovátkové hydrolyzáty, jež se od předešlých dvou druhů odlišují zejména svou strukturou. Hydrolyzáty jsou totiž už při svém zpracování štěpeny na menší peptidy, a jsou tedy lépe stravitelné.^[40]

Dodnes již bylo provedeno několik studií týkajících se vlivu syrovátkového proteinu na růst svalové hmoty. Například studie uskutečněná vědeckou skupinou kolem Burkeho prokázala,^[41] že muži užívající syrovátkový protein vykazovali mnohem větší zlepšení v silovém tréninku než muži užívající placebo. Studie byla prováděna po dobu 6 týdnů na skupině 36 mužů ve věku 18–31 let. Aktuálně se studuje využití syrovátkového proteinu v klinických aplikacích, a to při léčbě rakoviny, obezity, žloutenky typu B a C, kardiovaskulárních onemocnění nebo osteoporózy.^[40]

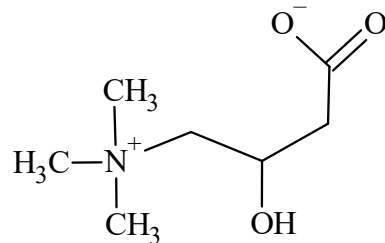
2.3 BCAA (Valin, Leucin, Izoleucin)

Nejdůležitější aminokyselinou ze skupiny BCAA je leucin, který hraje velmi důležitou roli při regeneraci a ochraně kosterního svalstva. Právě proto se také v komerčních BCAA produktech vyskytuje až v pětinasobně vyšším množství, než je množství valinu a izoleucinu. Trh nabízí velké množství různých BCAA doplňků lišících se právě poměrem přítomných AK. Bohužel zde neplatí přímá úměra, že čím je větší poměr mezi leucinem a zbylými AK, tím je efektivita produktu vyšší.^[42] Nejúčinnějším, a proto i nejrozšířenějším poměrem jednotlivých AK je poměr 2:1:1 (leucin: valin: izoleucin).^[43]

Během tréninku využívá mozek neesenciální AK zvanou tryptofan. Tato AK se během fyzické aktivity vyplavuje a je v těle přeměňována na 5-hydroxytryptamin, obecně známý jako serotonin. Tato látka patří spolu s amoniakem a laktátem mezi sloučeniny, které jsou pro tělo ukazatelem únavy a vyčerpanosti svalů. BCAA regulují produkci serotoninu v organismu, což má za následek potlačení svalové únavy při zvýšené námaze. BCAA mají současně vliv i na rychlejší regeneraci namáhaných svalových partií po tzv. svalové únavě. Tento děj se odborně nazývá zpožděný nástup svalové bolestivosti a projevuje se po dobu 24–48 hodin od ukončení fyzické aktivity. Vyznačuje se pocitem ztuhlosti, citlivosti svalů nebo také bolesti při pohybu.^[42]

Studie ukázala, že dlouhodobé podávání BCAA brání předčasné únavě, která je obvykle způsobena vyčerpáním glykogenu ze svalů v pozdější fázi cvičení. Glykogen je ve svalů nahrazen právě BCAA, které se zde oxidují a následně tělu dodávají potřebnou energii.^[44]

V potravě jsou jeho hlavními zdroji mléčné výrobky a červené maso. V těle se nachází v intracelulárních i v extracelulárních tkáních a jeho celkové množství se odhaduje na 300 mg/kg. Největší zásobárnou L-karnitinu je bezpochyby kosterní svalstvo.^[50]



Obrázek 16: Struktura L-karnitinu.

L-karnitin reguluje hladinu glukózy v krvi, čímž podporuje léčbu obezity. Významnou roli však hraje především v mitochondriální matrici při procesu tzv. β -oxidace, během níž dochází k odbourávání mastných kyselin za vzniku energie. Karnitin je totiž nezbytný pro transport mastných kyselin s dlouhým postranním řetězcem přes mitochondriální membránu právě do mitochondriální matrice. Mezi laickou veřejností je proto L-karnitin označován jako „spalovač tuků“. Při jeho nedostatku může dojít ke zhoršení oxidace mastných kyselin nebo dokonce k nervosvalovému onemocnění zvané myopatie.^[49]

Komerčně je dostupný ve formě kapslí či sirupu. Suplementace L-karnitinu je ale stále velice diskutované téma. Některé studie dokazují,^[51] že suplementace karnitinu urychlí oxidaci tuků, čímž následně dojde k postupnému snižování tukové tkáně. Jiné studie to vyvrací a tvrdí, že perorální užívání L-karnitinu nemá u zdravých jedinců žádný vliv na hubnutí.^[52]

3 Stanovení aminokyselin v doplňcích stravy

Aminokyseliny tvoří velkou skupinu látek, kterou je nezbytné sledovat v různých chemicko-biologických oblastech. Nejčastěji jsou ale AK stanovovány v potravinách a potravinových doplňcích.^[53] Společným krokem při stanovení je správné zvolení přípravy vzorku k analýze a vhodně zvolená analytická metoda.^[53,54]

3.1 Hydrolýza proteinu

AK se v potravinových doplňcích nachází ve volné formě, či jsou vázány v polypeptidickém řetězci, z kterého je nutné jednotlivé AK nejprve hydrolyticky uvolnit. Rozlišujeme různé typy hydrolýzy, kyselou, bazickou a enzymovou.

Kyselá hydrolýza peptidové vazby probíhá za vakua při 110–185 °C v přítomnosti vody a 6M HCl. Rychlost hydrolýzy závisí na zvolené teplotě, primární struktuře a stabilitě proteinu a v neposlední řadě na síle peptidové vazby v polypeptidovém řetězci bílkoviny. Tento způsob hydrolýzy je vhodný pro všechny AK kromě tryptofanu, u kterého kyselou hydrolýzou dochází k celkové destrukci. Některé AK však vyžadují přidavek pomocných látek. Například sirné AK (cystein a methionin) potřebují k úplné oxidaci přidavek kyseliny performové. BCAA pak spolu s fenylalaninem vyžadují prodlouženou hydrolýzu za přítomnosti fenolu.^[53,54]

Pro alkalickou hydrolýzu se nejčastěji využívá 4,2M hydroxid sodný, popřípadě 4M hydroxid lithný nebo 2M hydroxid barnatý. Tato reakce probíhá při 110 °C po dobu 22 hodin. Během alkalické hydrolýzy však rovněž dochází k destrukci některých AK, jako je například cystein a arginin, a proto je dnes využívána výhradně pro tryptofan.^[3]

Enzymatická hydrolýza je komplikovaný několikastupňový proces nevyužívající žádná organická rozpouštědla, čímž nedochází k znečištění finálního produktu.^[55] Doba trvání závisí na požadovaném stupni hydrolýzy, velikosti AK a složení proteinu. Mezi nejběžnější používané proteázové enzymy patří pepsin, chymotrypsin či trypsin.^[56] Například syrovátkový protein může být enzymaticky hydrolyzován za použití pepsinu při 400 MPa, 37 °C po dobu 30 minut. Výsledkem této hydrolýzy je velké množství peptidů <10 kDa, které následně degradují na menší fragmenty (AK).^[57]

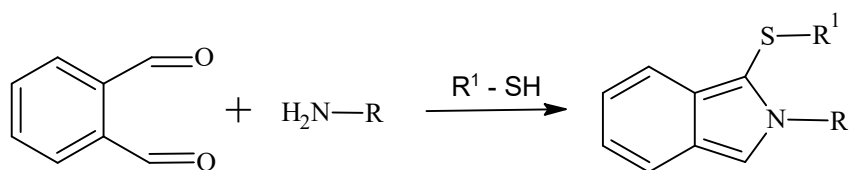
3.2 Derivatizace AK

AK jsou netěkavé, vysoce polární látky neobsahující chromofor, elektrofor nebo fluorofor, což velice ztěžuje jejich analytické stanovení.^[58,59] Z tohoto důvodu jsou AK často podrobeny

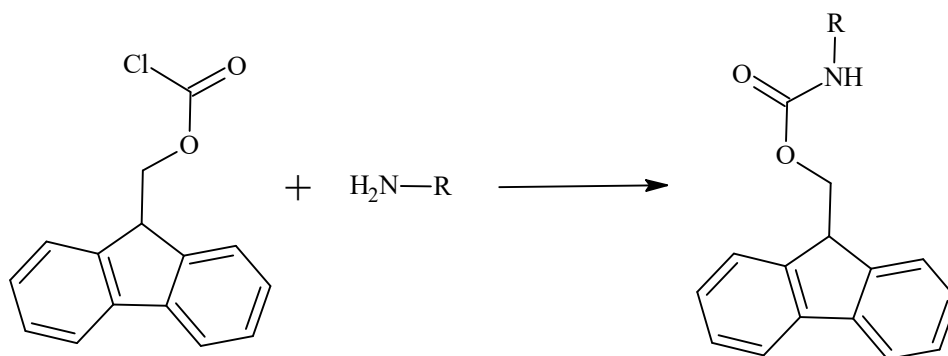
procesu derivatizace, díky které je jejich struktura chemicky modifikována. Vzniká tak nová látka s vhodnějšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi pro separaci či detekci.^[59]

Obecně rozlišujeme dva typy derivatizací, předkolonovou a postkolonovou. Předkolonová derivatizace se provádí před samotnou separací analytu na koloně, a to buď v off-line (manuálním) nebo on-line (automatizovaném) režimu. Pomocí předkolonové derivatizace můžeme ovlivnit nejen citlivost detekce, ale i separační chování látky, jako je její selektivita, či rozlišení. Výhodou předkolonové derivatizace je vysoká flexibilita při optimalizaci reakčních podmínek a široká dostupnost různých derivatizačních činidel.^[60] Předkolonová derivatizační reakce musí být dostatečně selektivní, kvantitativní, s vysokým výtěžkem, bez vedlejších produktů a výsledkem musí být dlouhodobě stabilní derivát.^[58] Velmi využívaným předkolonovým derivatizačním činidlem je *o*-ftalaldehyd (OPA), který se stejně jako 6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC) nebo 9-fluorenylmethyl chlorformiát (FMOC-Cl) využívá pro fluorescenční detekci. Hlavní nevýhodou OPA je jeho neschopnost reagovat se sekundárními aminy (nelze stanovit prolinu a hydroxyprolinu). Detekce OPA derivátů pak probíhá při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 440 nm.^[61] Oproti tomu činidlo AQC reaguje se všemi AK za vzniku stabilních fluorescenčních derivátů a jeho detekce probíhá při excitační vlnové délce 250 nm a emisní vlnové délce 395 nm.^[62] Činidlo FMOC-Cl reaguje s AK v alkalickém prostředí velmi rychle a detekce probíhá při excitační vlnové délce 260 nm a emisní vlnové délce 310 nm. Dalšími často používanými derivatizačními činidly AK jsou dabsylchlorid (DBS-Cl), fenylozothiokyanát (PITC) či diethyl-ethoxymetylenmalonát (DEEMM), jejichž deriváty se detekují pomocí UV záření.^[61] DBS-Cl se primárně využívá pro derivatizaci lysinu, histidinu a tyrosinu. Tyto tři AK při derivatizaci DBS-Cl vykazují podstatně vyšší absorpční signál oproti ostatním AK, kde se absorpční maximum pohybuje v rozmezí 448-468 nm.^[63] PITC se využívá pro svou vyšší citlivost při derivatizaci prolinu a hydroxyprolinu. PITC reaguje jak s primárními, tak se sekundárními AK, za vzniku velmi stabilních derivátů absorbujících při vlnové délce 254 nm.^[64] Mezi novější a komerčně dobře dostupné derivatizační činidlo patří DEEMM. Derivatizace pomocí DEEMM absorbujících při vlnové délce 280 nm, může poskytovat chromatografickou separaci až 25 AK (s výjimkou prolinu, který se pomocí DEEMM detekuje špatně) Pro většinu činidel je velice obtížné separovat takové velké množství AK, a proto lze říct, že pro derivatizaci AK je neoptimálnější.^[65] Reakce vybraných derivatizačních činidel (OPA, FMOC a AQC) s primárními aminy jsou znázorněny na obrázcích 17A–C.^[58]

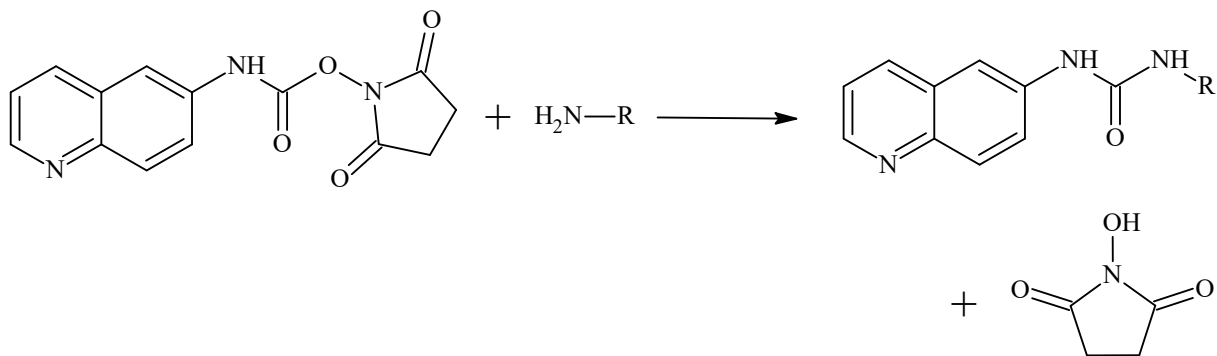
A



B



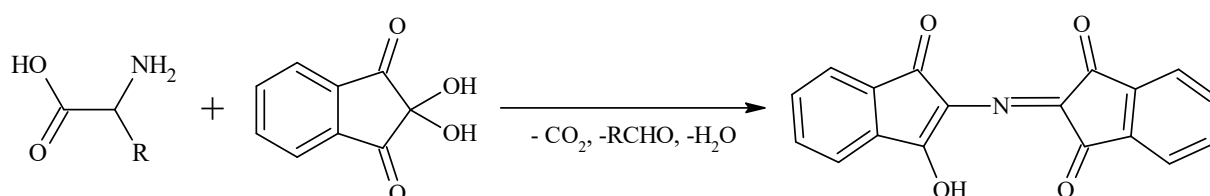
C



Obrázek 17: Chemická reakce derivatizačních činidel OPA (A), FMOC-Cl (B) a AQC (C) s primární aminy.

Postkolonová derivatizace je prováděna až po separaci analytu na koloně, těsně před detekčním systémem, což s sebou přináší vysoké nároky na instrumentaci a na rychlost derivatizační reakce probíhající často i za extrémních reakčních podmínek (teplota, pH). Postkolonová derivatizační reakce sice nemusí být selektivní a kvantitativní bez vedlejších produktů a ani nevyžaduje zručnost a zkušenost operátora, ale musí poskytovat velmi dobrou

reprodukovatelnost. Typickým postkolonovým derivatizačním činidlem AK je ninhydrin, který reaguje s primárními nebo sekundárními aminosloučeninami za vzniku barevných derivátů. Derivatizace ninhydrinu je znázorněna na obrázku 18. Primární AK dávají po reakci s ninhydrinem modrofialové až hnědé komplexy s absorpčním maximem při 570 nm. Sekundární AK, prolin nebo hydroxyprolin, poskytují žluté komplexy, které můžeme detekovat při 440 nm.^[59]



Obrázek 18: Chemická reakce ninhydrinu s α-AK.

3.3 Analytické stanovení AK

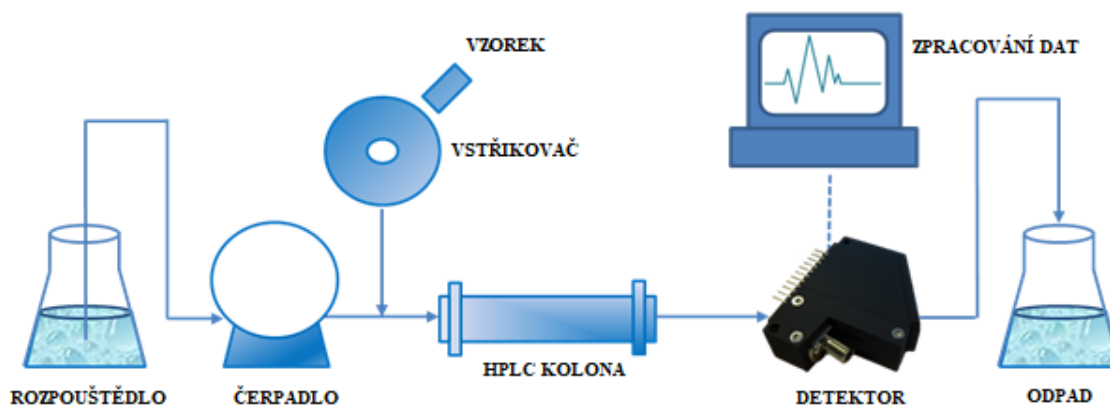
Pro stanovení AK jsou nejvíce používané separační techniky, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza, iontově výměnná chromatografie a méně často pak plynová chromatografie, s různými typy detekce. Běžně se již využívá spojení separačních technik s moderní hmotnostní spektrometrií.^[54]

3.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační analytická technika vyvinutá již v roce 1960 z klasické sloupcové chromatografie. V dnešní době patří mezi jednu z nejdůležitějších analytických technik, a to zejména díky její aplikovatelnosti na sloučeniny nejrozličnějšího charakteru. Z tohoto důvodu má HPLC nezaměnitelné místo v mnoha průmyslových oblastech (potravinářství, farmacie apod.), v nichž se používá ke stanovení AK, bílkovin, sacharidů, vitamínů, organických kyselin, lipidů, léčiv, ale i pesticidů nebo toxinů.^[66]

3.3.1.1 HPLC instrumentace

Instrumentace HPLC zahrnuje čerpadlo, dávkovací systém, kolonu, detektor a počítač (obrázek 19).



Obrázek 19: Schéma HPLC instrumentace. [5]

První částí přístroje je vysokotlaké čerpadlo sloužící k pumpování mobilní fáze do systému. V HPLC se používají převážně pístová čerpadla, která jsou vyrobena z oceli odolné vůči oxidačním účinkům. Tato čerpadla jsou citlivá na přítomnost vzduchu, prachu a pevných částic v eluentu, a proto se doporučuje mobilní fázi před použitím zfiltrovat a odplynit. Jednou z nevýhod pístových čerpadel je produkce pulzního toku, který vyžaduje přítomnost pulzních tlumičů k potlačení kolísání průtoku mobilní fáze. Další částí systému je dávkovací ventil, jehož úlohou je aplikace vzorku na kolonu. Nejběžnějším typem ventilu je šesticestný ventil se smyčkou definovaného objemu. Dnes se již běžně setkáváme i s automatickými dávkovači, tzv. autosamplery, které jsou ovládány počítačem, a jejichž využití může snížit náklady a zejména výrazně zpřesnit stanovení. Nedílnou součástí instrumentace je analytická kolona. Kolony jsou většinou vyrobeny z nerezové oceli, skla, oxidu křemičitého nebo titanu. Jejich délka se pohybuje mezi 5 až 25 cm a vnitřní průměr je do 5 mm. Pro urychlení separace se může využít i kratších kolon o délce 3 cm. Většina kolon je naplněna příslušnou stacionární fází, na které probíhá vlastní separace analytů. Nejběžnější náplní je chemicky modifikovaný silikagel různé zrnitosti. Méně často se využívá i syntetické organické pryskyřice. Jednou z posledních částí celého systému je detektor, který převádí informace o změnách eluátu z kolony na elektrický signál. Výsledkem je chromatogram s příslušnými píky jednotlivých látek, který je zobrazen v programu na počítači. Nejčastěji se používají spektrofotometrické detektory absorbující ultrafialové a viditelné spektrum záření (UV-Vis) nebo citlivější a selektivnější fluorescenční detektory.

Princip separace látek metodou HPLC je založen na distribuci analytu mezi mobilní (vždy kapalnou) a stacionární (dnes již výhradně pevnou) fází, která je zakotvena v chromatografické koloně. V průběhu celé separace dochází k různým druhům interakcí (analyt - mobilní fáze, mobilní - stacionární fáze a analytu - stacionární fáze) a k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi jednotlivými fázemi, čímž následně dojde k separaci analytu. Po průchodu analytickou kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru.^[66]

3.3.1.2 Fázové systémy HPLC

Dle fázových systémů může být HPLC rozdělena na několik podskupin, z nichž nejznámější je separace v systémech s normálními a obrácenými fázemi. Při normálním fázovém uspořádání HPLC (NP-HPLC) je stacionární fáze polárnější než mobilní a obvykle ji tvoří oxid křemičitý. Jako mobilní fáze jsou využívána nepolární rozpouštědla, často hexan či heptan, do nichž se ve většině případů přidávají polárnější modifikátory (methylenchlorid, chloroform nebo ethylacetát). Toto fázové uspořádání se využívá zejména při stanovení vitamínů či přírodních karotenoidových pigmentů.^[66] Při obráceném fázovém uspořádání HPLC (RP-HPLC) je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární. Stacionární fází je chemicky modifikovaný silikagel, oproti tomu polární mobilní fázi tvoří většinou voda smíchaná s methanolem, tetrahydrofuranem anebo acetonitrilem.^[67] V dnešní době se metoda RP-HPLC využívá mnohem častěji, a to díky jejímu univerzálnějšímu použití na různé druhy analytů, včetně AK.

3.3.1.3 Analýza AK pomocí HPLC

Pro analýzu AK v potravinových doplncích se v dnešní době z velké části používá RP-HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí. Klíčovou roli hraje derivatizace a výběr derivatizačního činidla. (viz. derivatizace AK). Dalším velmi důležitým aspektem je volba mobilní fáze, která se skládá z vodné a organické fáze. Vodnou fází nejčastěji tvoří pufr (př. boritanový,^[62] fosfátový^[64,68]) případně vodné roztoky organických kyselin o velmi nízké koncentraci (0,05% kyselina mravenčí).^[64] Organickou fází pak nejčastěji tvoří acetonitril^[62-64,68] či metanol^[63,64,68] s malým podílem vody. Velmi časté jsou i jejich kombinace v různém poměru. K samotné separaci AK se pak využívají především oktadecyl-silikagelové kolony o teplotě maximálně do 40°C.^[68] Celková doba separace se může lišit v závislosti na zvoleném elučním gradientu mobilní fáze.

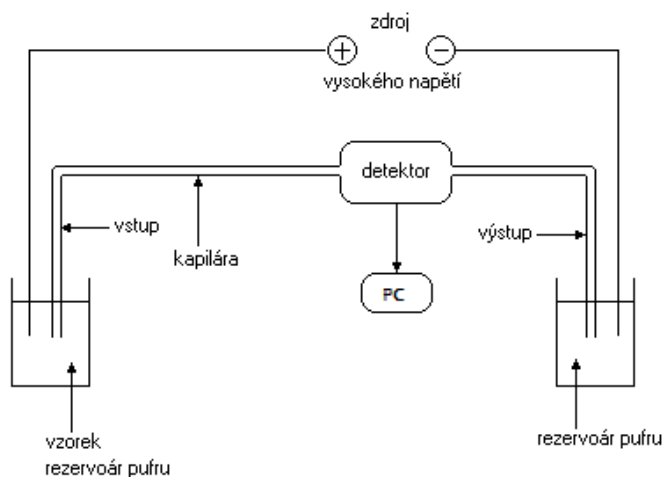
3.3.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) patří na rozdíl od HPLC mezi elektromigrační separační techniky, v nichž se látky separují na základě pohybu částic v elektrostatickém poli.

3.3.2.1 Princip a instrumentace CZE

CZE separace analytů je založena na dvou dějích, elektroforéze (pohyb iontů) a elektroosmóze (pohyb elektroosmotického toku). Principem elektroforézy je rozdílná mobilita jednotlivých nabitých částic v elektrickém poli, jež je dána velikostí iontů a jejich nábojem při daném pH. Separace probíhá v elektrolytem naplněné křemenné kapiláře, jejíž silanolové skupiny jsou vlivem elektrolytu ionizovány (nesou negativní náboj), a mohou tak přitahovat kationty z roztoku za vzniku elektrické dvojvrstvy. Po zavedení elektrického proudu dochází k pístovému toku těchto kationtů směrem ke katodě, který s sebou strhává neutrální látky i k anodě mířící anionty. Tomuto jevu se říká elektroosmóza, jejíž tok způsobuje zrychlení kationtů, a naopak zpomalení aniontů. Mobilita neutrálních molekul je pak dána mobilitou elektroosmotického toku. Vhodně zvolenými podmínkami separace lze tedy separovat neutrální molekuly i kladně a záporně nabitě ionty. Výhodou CZE oproti ostatním technikám je zejména rychlost analýzy bez ztráty rozlišení a také malá spotřeba vzorku a chemikálií.

CZE instrumentace je jednoduchá a skládá se z vysokonapěťového napájecího zdroje ($\pm 20\text{--}60\text{ kV}$), dvou zásobníků elektrolytu, separační kapiláry z taveného křemene, detektoru a počítače (obrázek 20). Přesné a reprodukovatelné dávkování je pak zajištěno autosamplery.^[69]



Obrázek 20: Obecné schéma instrumentace kapilární elektroforézy.^[70]

3.3.2.2 *Analýza AK pomocí CZE*

I když CZE nepatří mezi nejběžnější metody pro stanovení AK, disponuje řadou benefitů. Oproti ostatním metodám má velmi dobré rozlišení a krátkou dobu analýzy, která netrvá déle jak 10 minut.^[71] Ještě před samotnou separací musí dojít k promytí kapiláry, nejdříve hydroxidem sodným a následně vodou po dobu minimálně 10 minut.

Jelikož CZE může využívat stejné detekční systémy jako HPLC, musí se vzorek s AK rovněž derivovat pomocí již zmíněných derivatizačních činidel. Velmi častým derivatizačním činidlem je PICT, jehož deriváty tvoří v neutrálních a alkalických médiích aniontové formy.^[72] K separaci hotových derivátů se často využívají pufrovací systémy (uhličitan, fosfát, boritan) o různé iontové síle a pH. Separace AK probíhá v kapiláře z taveného oxidu křemičitého^[72,73] nebo ze skla,^[73] na kterou je přiváděno napětí v rozmezí +20–25 kV.^[72,74]

Analyzovat AK pomocí této metody lze i pomocí přímé UV detekce. Při tomto způsobu separace není nutná předchozí derivatizace. Absorpční vlnová délka se pohybuje kolem 190 nm.^[72,75,76] Pro analýzu nederivovaných AK se jako základní elektrolyt nejčastěji využívá tetraboritan sodný s malým přídatkem cyklodextrinu. Během přímé separace mohou některé AK (zejména methionin, tyrosin a fenylalanin) tvořit skupiny neoddělitelných složek. To lze vyřešit přidáním cyklodextrinu k základnímu elektrolytu. Cyklodextrin je totiž schopen tvořit komplexy s neutrálními i nabitými analyty, čímž změní jejich selektivitu.^[72]

4 ZÁVĚR

Bakalářská práce pojednává o aminokyselinách přítomných v potravinových doplňcích stravy pro sportovce. Nejprve byly v práci shrnuty všeobecné informace o aminokyselinách týkající se zejména jejich struktury, stereochemie či rozdělení. Dále byl diskutován význam, výskyt a syntéza vybraných aminokyselin. Velká pozornost byla přitom věnována hlavně aminokyselinám s rozvětveným řetězcem (valin, leucin, izoleucin), zajímavým neesenciálním proteinogenním aminokyselinám (glycin, prolin a glutamin) a některým D-aminokyselinám podílejících se rovněž na fyziologii a patologii člověka. V další části bakalářské práce byly popsány nejčastěji používané doplňky stravy pro sportovce, kterými je kreatin, syrovátkový protein, BCAA, hydroxymethylbutyrát a L-karnitin. U každého doplňku je vysvětlena jeho charakteristika, katabolické a anabolické metabolické reakce a přínosy či negativní účinky pro organismus. Poslední část práce je věnována dnes nepoužívanějším analytickým technikám sloužícím ke stanovení AK, včetně vysvětlení jejich instrumentace a základních principů.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] AKRAM M., ASIF H.M., UZAIR M., AKHTAR N., MADNI A., ALI SHAH S.M., UL HASAN Z., ULLAH A. Amino acids: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research* [online]. 2011, **5** (17), 3997-4000 [cit.20.03.2021]. ISSN 1996-0875. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Akhtar-Naveed/publication/260210809_Amino_acids_A_review_article/links/0a85e5302ef7563ae400000/Amino-acids-A-review-article.pdf
- [2] WU G., WU Z., DAI Z. a spol. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* [online]. 2013, **44**(4), 1107-1113 [cit.19.03.2021]. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-012-1444-2
- [3] KODÍČEK M. aminokyseliny neproteinogenní. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit.10.04.2021]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es_002/ebook.html?p=aminokyseliny_neproteinogenni
- [4] MITSUHASHI S. Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **26**, 38-44 [cit.28.03.2021]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2013.08.020
- [5] KARAU A., GRAYSON I. Amino Acids in Human and Animal Nutrition. *Biotechnology of Food and Feed Additives* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014, **3**(28), 189-228 [cit.27.03.2021]. ISBN 978-3-662-43760-5
- [6] LITWACK G. Proteins. *Human Biochemistry* [online]. Elsevier, 2018, 63-94 [cit.7.05.2021]. ISBN 9780123838643. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-383864-3.00004-1
- [7] FIGALA J., FORMÁNEK P., REJŠEK K., VRÁNOVÁ V. Aminokyselina cystin v půdě. *Listy cukrovarnické a řepářské* [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2013 [cit.27.03.2021]. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2013/PDF/236-237.pdf
- [8] VELÍŠEK J., KUBEC R., CEJPEK K. Biosynthesis of food constituents: Amino acids. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2011, **24**(3), 93-109 [cit.27.03.2021]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/3304-CJFS

- [9] CALDWELL J., WAINER I.W. Stereochemistry: definitions and a note on nomenclature. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* [online]. 2001, **16**(S2), S105-S107 [cit.31.03.202]. ISSN 0885-6222. Dostupné z: doi:10.1002/hup.334
- [10] NASIPURI D. Stereochemistry of organic compounds: principles and applications. [online] New Deli: New Age International, 1994, 2 [cit.7.03.2021] ISBN 8122405703
- [11] ARAKI K., OZEKI T. Amino Acids, Survey. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online]. John Wiley, 4.12.2000 [cit.7.03.2021]. ISSN 9780471238966. Dostupné z: doi:10.1002/0471238961
- [12] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. Chemie potravin. Rozšířené a přepracované 3. vydání Tábor: OSSIS, 2009 [cit.7.03.2021]. ISBN 978-80-86659-15-2
- [13] NIE C., HE T., ZHANG W., ZHANG G., MA X. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(4) [cit.15.03.2021]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19040954
- [14] SHIMOMURA Y., YAMAMOTO Y., BAJOTTO G., SATO J., MURAKAMI T., SHIMOMURA N., KOBAYASHI H., MAWATARI K. Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *The Journal of Nutrition* [online]. 2006, **136**(2), 529-532 [cit.15.03.2021]. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/136.2.529S
- [15] Isoleucin. *DrugBank* [online], [cit.17.03.202]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00167>
- [16] WANDERS R.J.A., DURAN M., LOUPATTY F.J. Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2012, **35**(1), 5-12 [cit.30.03.2021]. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-010-9236-x
- [17] GUNTER A., HEIDRUN A., WILHELM B. a spol. L-valin. *Rompp encyclopedia natural products* [online]. Stuttgart: Wolfgang Steglich, 2000, 683 [cit.12.03.2021]. ISBN 0-86577-988-0
- [18] OLDIGES M., EIKMANN B.J., BLOMBACH B. Application of metabolic engineering for the biotechnological production of l-valine. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(13), 5859-5870 [cit.11.04.2021]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5782-8

- [19] HOLÁTKO J., ELIŠÁKOVÁ V., PROUZA M., SOBOTKA M., NEŠVERA J., PÁTEK J. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *Journal of Biotechnology* [online]. 2009, **139**(3), 203-210 [cit.6.05.2021]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2008.12.005
- [20] MURÍN R., HAMPRECHT B. Metabolic and Regulatory Roles of Leucine in Neural Cells. *Neurochemical Research* [online]. 2008, **33**(2), 279-284 [cit.6.05.2021]. ISSN 0 364-3190. Dostupné z: doi:10.1007/s11064-007-9444-4
- [21] STEFAN-VAN STADEN R.I., SHIRLEY MUVHULAWA L. Determination of L - and D -Enantiomers of Leucine Using Amperometric Biosensors Based on Diamond Paste [online]. 2006, **34**(4), 475-481 [cit.15.03.2021]. ISSN 1073-9149. Dostupné z: doi:10.1080/10739140600648886
- [22] ZHANG S., ZENG X., REN M., MAO X., QIAO S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2017, **8**(1) [cit.29.03.2021]. ISSN 2049-1891. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-016-0139-z
- [23] MASAKO D., YAMAOKA I., NAKAYAMA M. Isoleucine, a Blood Glucose-Lowering Amino Acid, Increases Glucose Uptake in Rat Skeletal Muscle in the Absence of Increases in AMP-Activated Protein Kinase Activity. *Journal of nutrition* [online]. Anglie: OXFORD UNIV PRESS, 2005, **135** (9), 2103 [cit.16.03.2021]. ISSN 1541-6100. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=8&SID=E3LwoF7IxkttLUtU9x3&page=4&doc=36
- [24] L-isoleucin. PubChem: *Národní centrum pro biotechnologické informace* [online]. USA, 2004, 2021 [cit.17.03.2021]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-isoleucine>
- [25] Isoleucin. *DrugBank* [online]. [cit. 17.03.2021]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00167>
- [26] HROMÁDKA R., HYŠPLER R., TICHÁ A., ZADÁK Z. Proteiny a aminokyseliny: zdroje energie a funkční mediátory. *Nutrition News* [online]. We Make Media, 2016, **4**(2), 6-8 [cit. 17.03.2021]. ISSN 2694-7226. Dostupné z: <https://www.worldmednet.cz/wp-content/uploads/2019/07/1409-Nutrition-News-02-2016-online.pdf#page=5>

- [27] WYSE A.T.S., NETTO C.A. Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metabolic Brain Disease* [online]. 2011, **26**(3), 159-172 [cit. 19.03.2021]. ISSN 0885-7490. Dostupné z: doi:10.1007/s11011-011-9246-x
- [28] WILLIAMSON M P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical Journal* [online]. 1994, **297**(2), 249-260 [cit.12.04.2021]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2970249
- [29] LONG M., XU M., QIAO Z. a spol. Directed Evolution of Ornithine Cyclodeaminase Using an EvolvR-Based Growth-Coupling Strategy for Efficient Biosynthesis of L-Proline. *ACS Synthetic Biology* [online]. 2020, **9**(7), 1855-1863 [cit.12.04.2021]. ISSN 2161-5063. Dostupné z: doi:10.1021/acssynbio.0c00198
- [30] SZABADOS L., SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* [online]. 2010, **15**(2), 89-97 [cit.7.05.2021]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009
- [31] SMITH RJ. Glutamine metabolism and its physiologic importance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* [online]1990;14; 40S-44S.[cit.12.4.2021] Dostupné z: doi:10.1177/014860719001400402
- [32] KUSUMOTO I. Industrial Production of L-Glutamine. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001, **131**(9), 2552S-2555S [cit.29.03.2021]. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/131.9.2552S
- [33] GENCHI G. An overview on d-amino acids. *Amino Acids* [online]. 2017, **49**(9), 1521-1533 [cit.12.04.2021]. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-017-2459-5
- [34] CHEN M., SHI C., ZHAO J., GAO Z., ZHANG Ch. Application and microbial preparation of d-valine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **32**(10) [cit.14.03.2021]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-016-2119-z
- [35] BATTILOTTI M., BARBERINI U. Preparation of D-valine from D,L-5-isopropylhydantoin by stereoselective biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis* [online]. 1988, **43**(3), 343-352 [cit.7.05.2021]. ISSN 03045102. Dostupné z: doi:10.1016/0304-5102(88)85145-9

- [36] KNAPIK J.J., STEELMAN R.A., HOEDEBECKE S.S., AUSTIN K.G., FARINA E.K., LIEBERMAN H.R. Prevalence of Dietary Supplement Use by Athletes. *Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Medicine* [online]. 2016, **46**(1), 103-123 [cit.15.04.2021]. ISSN 0112-1642. Dostupné z: doi:10.1007/s40279-015-0387-7
- [37] ENGELHARDT M., NEUMANN G., BERBALK A., REUTER I. Doplnění kreatinu ve vytrvalostních sportech. *Medicína a věda ve sportu a cvičení* [online]. Frankfurt. 1998. **30**(7), 1123-1129 [cit. 15.4.2021]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/9662683>
- [38] BROSANAN M.E., BROSANAN J.T. The role of dietary creatine. *Amino Acids* [online]. 2016, **48**(8), 1785-1791 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-016-2188-1
- [39] COOPER R., NACLERIO F., ALLGROVE J., JIMENEZ A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* [online]. 2012, **9**(1) [cit. 20.04.2021]. ISSN 1550-2783. Dostupné z: doi:10.1186/1550-2783-9-33
- [40] KERI M.N. D. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative medicine review* [online], 2004, **9**(2), 136-156. [cit. 25.04.2021]
- [41] BURKE D.G, CHILIBECK P.D, DAVIDSON K.S, CANDOW D.G, FARTHING J, SMITH-PALMER T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* [online]. 2001, **11**(3), 349-64 [cit.21.04.2021]. Dostupné z: doi: 10.1123/ijsnem.11.3.349. PMID: 11591884.
- [42] NEGRO M., GIARDINA S., MARZANI B., MARZATICO, F. Branched-Chain Amino Acid Supplementation does Not Enhance Athletic Performance but Affects Muscle Recovery and the Immune System. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* [online], 2008, **48**(3), 347-51 [cit.21.04.2021]. ProQuest Central. ISSN 00224707
- [43] LA BOUNTY P., a spol. The effects of oral BCAAs and leucine supplementation combined with an acute lower-body resistance exercise on mTOR and 4E-BP1 activation in humans: preliminary findings. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* [online]. 2008, **5**(1), 21 [cit.13.07.2021]

- [44] KIM D.H., KIM S.H., JEONG W.S., LEE H.Y. Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry* [online]. 2013, **17**(4), 169-180 [cit.21.04.2021]. ISSN 2233-6834. Dostupné z: doi:10.5717/jenb.2013.17.4.169
- [45] BLOMSTRAND, Eva, Jörgen ELIASSON, Haåkan K. R. KARLSSON a Rickard KÖHNKE. Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise. *The Journal of Nutrition* [online]. 2006, **136**(1), 269S-273S [cit.21.04.2021]. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/136.1.269S
- [46] HOLEČEK M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements [online]. 2018, **15**(1) [cit.23.04.2021]. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s12986-018-0271-1
- [47] HOLEČEK M. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation and skeletal muscle in healthy and muscle-wasting conditions. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* [online]. 2017, **8**(4), 529-541 [cit.18.04.2021]. ISSN 21905991. Dostupné z: doi:10.1002/jcsm.12208
- [48] HSIEH L.C., CHOW C.J., CHANG W.C., LIU T.H., CHANG C.K. Effect of Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on Protein Metabolism in Bed-ridden Elderly Receiving Tube Feeding. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2010, **19**(2), 200–208 [cit.13.07.2021] Dostupné z: <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.146418869760956>
- [49] WÄCHTER S., VOGT M., KREIS R., BOESCH Ch., BIGLER P., HOPPELER H., KRÄHENBÜHL S. Long-term administration of l-carnitine to humans: effect on skeletal muscle carnitine content and physical performance. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2002, **318**(1-2), 51-61 [cit.19.04.2021]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(01)00804-X
- [50] ADEVA-ANDANY M. M., CALVO-CASTRO I., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ C., DONAPETRY-GARCÍA C., PEDRE-PIÑEIRO A.M. Significance of l -carnitine for human health. *IUBMB Life* [online]. 2017, **69**(8), 578-594 [cit.20.04.2021]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1646

- [51] BARNETT Ch., COSTILL D.L, VUKOVICH M.D., COLE K.J., GOODPASTER B.H., TRAPPE S.W., FINK W.J. Effect of L-Carnitine Supplementation on Muscle and Blood Carnitine Content and Lactate Accumulation during High-Intensity Sprint Cycling. *International Journal of Sport Nutrition* [online]. 1994, **4**(3), 280-288 [cit.7.07.2021]. ISSN 1050-1606. Dostupné z: doi:10.1123/ijnsn.4.3.280
- [52] KARLIC H., LOHNINGER A. Supplementation of l-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition* [online]. 2004, **20**(7-8), 709-715 [cit.19.04.2021]. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2004.04.003
- [53] SHI F., LI K., HUAN X., WANG X. Expression of NAD(H) Kinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Improve NADPH Supply and l-isoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. lactofermentum. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2013, **171**(2), 504-521 [cit.10.04.2021]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-013-0389-6
- [54] SMITH D.M. Protein Separation and Characterization Procedures. *Food Analysis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017,431-453 [cit.1.05.2021]. Food Science Text Series. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-45776-5_24
- [55] VALENCIA P., ESPINOZA K., CEBALLOS A., PINTO M., ALMONACID S. Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry* [online]. 2015, **50**(4), 589-597 [cit.24.06.2021]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.028
- [56] MARCINIAK A., SUWAL S., NADERI N., POULIOT Y., DOYEN A. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology [online]. 2018, **80**, 187-198 [cit.8.07.2021]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tifs.2018.08.013
- [57] LOZANO-OJALVO D., PÉREZ-RODRÍGUEZ L., PABLOS-TANARRO A., LÓPEZ-FANDIÑO R., MOLINA E. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates [online]. 2017, **43**, 154-162 [cit.8.07.2021]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2017.07.032
- [58] SONG Y., XU Ch., KUROKI H., LIAO Y., TSUNODA M. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical*

and Biomedical Analysis [online]. 2018, 147, 35-49 [cit.26.04.2021]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.08.050

[59] OMAR M.A., ELBASHIR A.A., SCHMITZ O.J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. *Food Chemistry* [online]. 2017, 214, 300-307 [cit.26.04.2021]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.060

[60] BARDELMEIJER H.A., WATERVAL J.C.M., LINGEMAN H., HOF R., BULT A., UNDERBERG W.J.M. Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 1997, 18(12-13), 2214-2227 [cit.22.6.2021]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.1150181212

[61] GHESLAGHI R., SCHARER J.M., MOO-YOUNG M., DOUGLAS P.L. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. *Analytical Biochemistry* [online]. 2008, 383(1), 93-102 [cit.23.6.2021]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2008.07.032

[62] CALLEJÓN R. M., TESFAYE W., TORIJA M. J., MAS A., TRONCOSO A. M., MORALES M.L. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology* [online]. 2008, 227(1), 93-102 [cit.13.07.2021]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-007-0697-6

[63] JANSEN E.H.J.M., VAN DEN BERG R.H., BOTH-MIEDEMA R., DOORN L. Advantages and limitations of pre-column derivatization of amino acids with dabsyl chloride. *Journal of Chromatography A* [online]. 1991, 553, 123-133 [cit. 13.07.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)88480-6

[64] ZHENG G., JIN W., FAN P., FENG X., BAI Y., TAO T., YU L. 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* [online]. 2015, 392, 1-6 [cit. 13.07.2021]. ISSN 13873806. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijms.2015.08.004

- [65] REBANE R., OLDEKOP M.L., HERODES K. Comparison of amino acid derivatization reagents for LC–ESI-MS analysis. Introducing a novel phosphazene-based derivatization reagent. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, 904, 99-106 [cit. 13.07.2021]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jchromb.2012.07.029
- [66] REUHS B.L. High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analysis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 213-226 [cit. 1.05.2021]. Food Science Text Series. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-45776-5_13
- [67] PEACE R.W., GILANI S.G. Chromatographic determination of amino acids in foods. *Journal of AOAC International* [online]. 1992, **88**(3), 877-87 [cit.7.06.2021]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001866>
- [68] HENDERSON J. W., RICKER R. D., BIDLINGMEYER B. A., WOODWARD C. Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids [online], *Agilent Technical Note*. 5980-1193E, 2000 [cit.8.07.2021]
- [69] SOGA T., ROSS. G.A Simultaneous determination of inorganic ions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **837**(1-2), 231-239 [cit.3.05.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)00092-8
- [70] FEKETE A., SCHMITT-KOPPLIN P. Capillary electrophoresis. *Food Toxicants Analysis* [online]. 2007, 561-597 [cit.2.05.2021]. ISBN 9780444528438. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452843-8/50016-X
- [71] SOGA T., HEIGER D.N. Amino Acid Analysis by Capillary Electrophoresis Electro spray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2000, **72**(6), 1236-1241 [cit. 23.06.2021]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac990976y
- [72] KOMAROVA N. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **800**(1-2), 135-143 [cit.8.07.2021]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2003.08.052
- [73] HJERTÉN S., ELENBRING K., KILÁR F., LIAO J.L., CHEN A.J.C., SIEBERT Ch.J., ZHU M.D. Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus. *Journal of Chromatography A* [online]. 1987, **403**, 47-61 [cit. 13.07.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)96340-4

[74] MATSUBARA N., TERABE S. Separation of 24 dansylamino acids by capillary electrophoresis with a non-ionic surfactant. *Journal of Chromatography A* [online]. 1994, **680**(1), 311-315 [cit.13.07.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(94)80081-2

[75] KLAMPFL Ch.W, BUCHBERGER W., TURNER M., FRITZJ.S. Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, **804**(1-2), 349-355 [cit. 13.07.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00047-8

[76] CANCELON P.F., BRYAN Ch.R. Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition. *Journal of Chromatography A* [online]. 1993, **652**(2), 555-561 [cit. 13.07.2021]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(93)83278-Z