

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

*Analýza sacharidů v tělních tekutinách*

Bakalářská práce

2021

Kateřina Steidlová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Steidlová**  
Osobní číslo: **C18189**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Analýza sacharidů v tělních tekutinách**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši zabývající se sacharidy, jejich rozdělením a stěžejní část práce zaměřte na jejich stanovení v tělních tekutinách.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza sacharidů v tělních tekutinách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 30.6.2021

Kateřina Steidlová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za její konzultace, odbornou pomoc a cenné rady, které mi velmi usnadnily psaní bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá sacharidy a jejich stanovením v tělních tekutinách. První část je věnována sacharidům jako takovým, jejich rozdělení. Dále se zabývá tělními tekutinami, jejich rozdělení a metodami, které se používají při stanovení sacharidů a jejich konkrétnímu využití.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

sacharidy, stanovení, plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, spektrofotometrie, glukóza, xylóza, fruktóza, sacharóza, inulin

## **TITLE**

Analysis of saccharides in body fluids

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with saccharides and their determination in body fluids. First of all, saccharides themselves are described, their division into groups, and chemical structures are introduced. In further chapters, the bachelor thesis deals with body fluids and with methods usually used for saccharides determination and the real usage of that methods.

## **KEYWORDS**

saccharides, determination, gas chromatography, high performance liquid chromatography, spectrophotometry, glucose, xylose, fructose, sucrose, inulin

# Obsah

Úvod.....	11
1 SACHARIDY.....	12
1.1 Monosacharidy .....	12
1.1.1 Xylóza .....	12
1.1.2 Ribóza.....	13
1.1.3 Glukóza .....	14
1.1.4 Fruktóza.....	15
1.1.5 Galaktóza.....	16
1.2 Disacharidy .....	17
1.2.1 Sacharóza .....	17
1.2.2 Laktóza .....	18
1.3 Oligosacharidy.....	19
1.3.1 Rafinóza .....	19
1.4 Polysacharidy.....	20
1.4.1 Škrob .....	20
1.4.2 Inulin .....	21
2 TĚLNÍ TEKUTINY .....	22
2.1 Krev .....	22
2.1.1 Plná krev.....	22
2.1.2 Plazma .....	23
2.1.3 Sérum .....	23
2.2 Moč.....	24
3 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ.....	25
3.1 Spektrofotometrie .....	25
3.2 Plynová chromatografie.....	26
3.2.1 Kolony v plynové chromatografii .....	27

3.2.2	Detektory v plynové chromatografii .....	27
3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	28
3.3.1	Vysokotlaká čerpadla pro HPLC.....	29
3.3.2	Kolony HPLC.....	30
3.3.3	Detektory HPLC.....	30
3.4	Ramanova spektroskopie .....	30
4	STANOVENÍ GLUKÓZY .....	32
4.1	Stanovení glukózy v krvi.....	32
4.1.1	Stanovení glukózy Ramanovou spektroskopií .....	32
4.1.2	Stanovení glukózy s glukózaoxidázou a peroxidázou.....	32
4.1.3	Stanovení glukózy pomocí izotopového ředění a následné plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	34
4.2	Stanovení glukózy v moči .....	34
4.2.1	Stanovení glukózy v moči pomocí testovacích proužků a poloautomatických analyzátorů .....	34
5	STANOVENÍ XYLÓZY .....	35
5.1	Stanovení xylózy v séru a moči.....	35
5.1.1	Stanovení xylózy kolorimetrickou metodou s floroglucinolem.....	35
6	STANOVENÍ FRUKTÓZY A SACHARÓZY .....	36
6.1	Stanovení fruktózy a sacharózy v moči.....	36
6.1.1	Stanovení fruktózy a sacharózy plynovou chromatografií.....	36
7	STANOVENÍ INULINU .....	37
7.1	Stanovení inulinu v plazmě .....	37
7.1.1	Stanovení inulinu v plazmě pomocí HPLC.....	37
7.1.2	Stanovení inulinu v séru pomocí spektrofotometrie .....	37
8	ZÁVĚR.....	39
9	SEZNAM LITERATURY .....	40



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec D-xylózy

Obrázek 2: Strukturní vzorec D-ribózy

Obrázek 3: Strukturní vzorec D-glukózy

Obrázek 4: Strukturní vzorec D-fruktózy

Obrázek 5: Strukturní vzorec D-galaktózy

Obrázek 6: Strukturní vzorec sacharózy

Obrázek 7: Strukturní vzorec laktózy

Obrázek 8: Strukturní vzorec rafinózy

Obrázek 9: Strukturní vzorec amylopektinu

Obrázek 10: Strukturní vzorec inulinu

Obrázek 11: Příprava plazmy (A) a séra (B)

Obrázek 12: Základní schéma spektrofotometru

Obrázek 13: Schéma plynového chromatografu

Obrázek 14: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu

Obrázek 15: Blokové schéma systému NIR Ramanovy spektroskopie

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Primární složky normální zdravé moči včetně popisu a vzniku

## Úvod

Jedny ze základních přírodních látek v rostlinných a živočišných organismech jsou sacharidy. Jsou to organické sloučeniny, které patří do skupiny polyhydroxyderivátů karbonylových sloučenin, jinak nazývaných aldehydy nebo ketony. Většina sacharidů jsou významné přírodní látky, ale mnoho dalších se připravuje synteticky. Sacharidy se nejvíce využívají pro svoji sladkost ve formě sladidel, a to jak přírodních, tak syntetických.

Nejčastější sacharid, který se analyzuje ve vzorcích krve, je glukóza. Glykémie je koncentrace glukózy v krvi, která je za fyziologických podmínek se svými hodnotami v úzkém rozmezí, a proto se sledují odchylky od těchto hodnot. Nadměrná přítomnost tohoto sacharidu se nazývá hyperglykémie, což je základní projev různých onemocnění, jako je například diabetes mellitus.

Tato bakalářská práce bude zaměřena na využití různých analytických metod, které se používají ke stanovení obsahu sacharidů v tělních tekutinách, jako je krev nebo moč. Dále bude popisovat, jaký význam mají tyto sacharidy pro analýzu.

# 1 SACHARIDY

Sacharidy jsou organické sloučeniny, které jsou jako jedny z mála organických sloučenin nejvíce přítomny ve většině živých organismů a také v přírodě. Sacharidy jsou v organismech využívány nejen jako hlavní zdroje energie, ale také jsou základními strukturními složkami v dalších živých organismech, například jako část struktury nukleových kyselin, které jsou obsaženy v deoxyribonukleové kyselině, jinak označované jako DNA. V přírodě jsou sacharidy tvořeny rostlinami pomocí fotosyntézy [1].

Sacharidy jsou ve velké míře obsaženy ve všech rostlinách. Udává se, že rostliny obsahují 85 až 90 % sušiny sacharidů. Naproti tomu v buňkách nebo živočišných tkáních toto množství nepřesahuje 2 % sušiny. Základními prvky, ze kterých jsou sacharidy složeny, jsou uhlík, kyslík a vodík. Základem molekuly je uhlíkový řetězec, který obsahuje 3 - 9 atomů uhlíku [1].

Sacharidy jsou dále rozdělovány podle počtu cukerných jednotek. Cukerné jednotky jsou nejjednodušší sacharidy - tzv. monosacharidy. Monosacharidy obsahují právě jednu cukernou jednotku, disacharidy obsahují 2 stejné nebo různé cukerné jednotky, oligosacharidy obsahují 2 - 10 různých nebo stejných cukerných jednotek a poslední skupinou jsou polysacharidy, obsahující více než 10 cukerných jednotek [2].

## 1.1 Monosacharidy

Monosacharidy jsou nejjednoduššími sacharidy. Obsahují jednu cukernou jednotku, která je dále základní stavební jednotkou pro složitější sacharidy. Tato cukerná jednotka obsahuje uhlíkový řetězec se 3 - 9 atomy uhlíku, dále obsahuje alkoholovou skupinu a aldehydickou nebo ketonickou skupinu. Monosacharidy s aldehydickou skupinou se nazývají aldózy, s ketonickou ketózy. Nejjednodušší monosacharid je glycerinaldehyd obsahující trojúhelníkový řetězec [1].

### 1.1.1 Xylóza

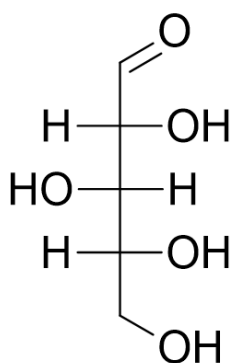
Xylóza, neboli dřevný cukr, je pentóza, viz obrázek 1. Ve svém řetězci má 5 atomů uhlíku. Vyskytuje se v zemědělském odpadu, jako je rýžová sláma, kukuřičné klasy a části tvrdého dřeva [3].

Xylóza je také část polysacharidu hemicelulózy. Používá se jako sladidlo, a to ve formě xylitolu [4]. Je to druhý nejhojnější cukr, který se vyskytuje v přírodě [5].

Xylitol je cukerný alkohol, který se připravuje z xylózy, vyskytuje se v tvrdých dřevinách, slámě, rýži, cukrové třtině a v různé zelenině a ovoci [6].

Průmyslovému využívání xylózy je v současné době věnována velká pozornost kvůli vysoce hodnotnému využití biomasy [4]. Efektivní fermentace xylózy totiž vede k přeměně obnovitelných zdrojů biomasy na biopaliva a další chemikálie [5].

Hlavním cílem současného výzkumu se stává otázka využívání xylózy k výrobě ethanolu. Pokud by se při fermentaci použila jako zdroj uhlíku xylóza, bylo by možné vyřešit energetickou i potravinovou krizi. [4] K fermentování cukrů se v průmyslu hojně využívají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ty ale nejsou schopné xylózu metabolizovat, ale díky výzkumům se ukázalo, že různé nerekombinantní kmeny *S. cerevisiae* jsou schopny na xylóze růst. Tímto by pak bylo možné xylózu fermentovat na ethanol [5].



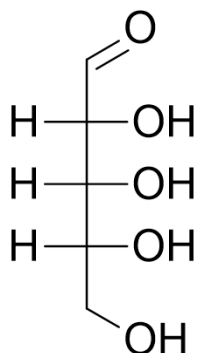
Obrázek 1: Strukturní vzorec D-xylózy

### 1.1.2 Ribóza

Ribóza je velmi významný monosacharid. Je to pentóza, jelikož obsahuje ve svém řetězci 5 atomů uhlíku. Strukturní vzorec ribózy je znázorněn na obrázku 2. Ribóza se v lidském těle nachází v kyselině ribonukleové (RNA) [7].

RNA je komplexní sloučenina, která se podílí na syntéze buněčných proteinů a nahrazuje DNA, jako nosič genetických kódů v některých virech. RNA se skládá z nukleotidů, které obsahují dusíkaté báze a ribózu. Celá molekula je propojena fosfodiesterovými vazbami. Dusíkaté báze, které obsahuje RNA, jsou adenin, guanin, cytosin a uracil [7].

Ribóza se skládá z pětiuhlíkatého řetězce, který tvoří „páteř“ polymeru RNA [7]. Ribóza se využívá k syntéze antivirových a protirakovinných léčiv právě kvůli jejímu výskytu v molekule RNA [8].



Obrázek 2: Strukturní vzorec D-ribózy

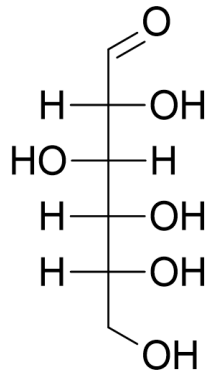
### 1.1.3 Glukóza

Glukóza, jinak nazývána jako hroznový cukr, krevní cukr nebo dextróza, je jeden z nejvýznamnějších monosacharidů v přírodě. Její strukturní vzorec je zobrazen na obrázku 3. Glukóza vzniká v rostlinách jako produkt při fotosyntéze a je v nich následně využívána jako zdroj energie nebo jako stavební složka pro složitější polysacharidy [9].

Glukóza je hexóza, obsahuje tedy 6 atomů uhlíku. Nejvíce se vyskytuje v ovoci, ovocných šťávách, medu, ale také volně v krvi. Glukóza je rozpustná ve vodě a je také součástí složitějších sacharidů. Například disacharidy laktóza a sacharóza a polysacharidy celulóza a škrob obsahují ve své struktuře glukózu [2]. Redukcí glukózy vzniká glucitol (alkoholický cukr), který je používán diabetiky [9].

V lidském těle se glukóza využívá jako zdroj energie pro každou buňku v těle. Nezbytná je pro mozek a červené krvinky, pokles její hladiny může způsobit jejich následnou poruchu. Hladina glukózy - neboli glykemie, se u zdravého jedince nijak nemění. Jelikož na ní závisí mnoho pochodů v lidském těle, její hladina je udržována v úzkém rozmezí [10].

Pro lidské tělo je glukóza rychlým zdrojem energie, proto ji využívají například sportovci. Ve formě infúzí se používá při umělé výživě [9].



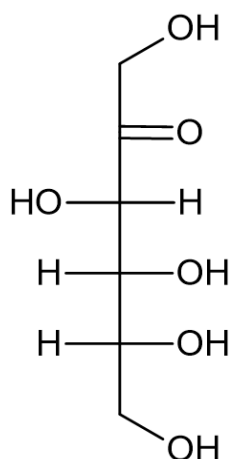
Obrázek 3: Strukturální vzorec D-glukózy

#### 1.1.4 Fruktóza

Fruktóza - neboli ovocný cukr, je monosacharid obsahující ve své struktuře 6 atomů uhlíku, je to tedy, stejně jako glukóza, hexóza. Strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 4. Nejvíce fruktózy lidské tělo získává z ovoce a medu, částečně také ze zeleniny. V ovoci se nachází z části volná forma fruktózy, ale z větší části se vyskytuje v podobě disacharidu sacharózy [11].

Fruktóza se hojně používá jako sladidlo, její sladivost je vyšší v porovnání s ostatními sacharidy. Fruktóza má nízký glykemický index, proto je často doporučována pro pacienty trpící diabetem [12].

Fruktóza se velmi proslavila s příchodem kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktózy, který je hojně používaným sladidlem. Kukuřičný sirup je významným spouštěčem obezity a metabolického syndromu, chemicky se skládá z glukózy a fruktózy [13].



Obrázek 4: Strukturální vzorec D-fruktózy

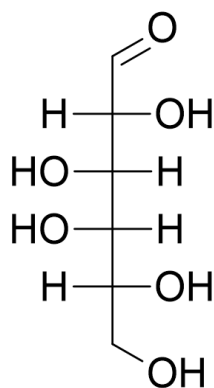
### 1.1.5 Galaktóza

Galaktóza je přírodní aldohexóza. Je to hexóza obsahující ve svém řetězci 6 uhlíků. Strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 5. V přírodě je všudypřítomná, vyskytuje se například v bakteriích, rostlinách, ale i zvířatech. Vyskytuje se jako volná, nebo vázaná. Vázaná forma obsahuje oligosacharidy, polysacharidy, glykoproteiny a glykolipidy. Galaktóza se nejvíce vyskytuje v disacharidu laktóze. Laktóza se skládá z molekuly glukózy a molekuly galaktózy a vyskytuje se v mateřském mléce u většiny savců [14].

Galaktóza má stejný sumární vzorec jako glukóza a také má podobnou strukturu. Její odlišnost se vyznačuje pouze v poloze jedné hydroxylové skupiny. Právě tento nepatrný rozdíl ve struktuře tohoto monosacharidu mu dává možnost různých chemických i biochemických vlastností [14].

Galaktóza také slouží jako živina nebo výchozí látka pro syntézu laktózy, glykolipidů, glykosaminoglykanů a dalších [14].





Obrázek 5: Strukturální vzorec D-galaktózy

## 1.2 Disacharidy

Disacharidy jsou látky rozpustné ve vodě s charakteristickou sladkou chutí, stejně jako monosacharidy. Disacharidy se skládají ze dvou molekul stejných, nebo různých monosacharidů, které jsou k sobě připojeny glykosidovou vazbou. Ke štěpení této glykosidové vazby dochází v přítomnosti enzymu známým jako glykosidáza [15].

Mezi nejvýznamnější zástupce disacharidů patří sacharóza, maltóza a laktóza [15]. Disacharidy se ve své volné formě v přírodě příliš nevyskytují. Nejvíce v přírodě zastoupeným cukrem je sacharóza. Sacharóza je produkována chlorofylními rostlinami a její obsah v rostlinách je vyšší než u ostatních disacharidů nalezených v přírodě [16].

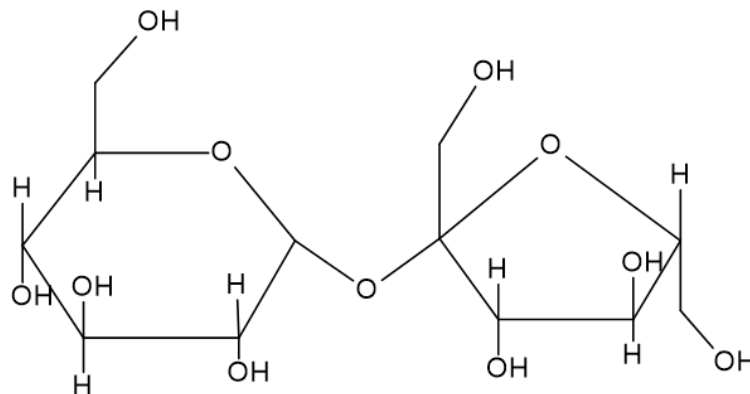
### 1.2.1 Sacharóza

Sacharóza, známá také jako řepný či třtinový cukr, je neredukující disacharid. Její systematický název je  $\beta$ -D-fruktofuranosyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid, z čehož vyplývá, že je to disacharid složený z molekuly glukózy a fruktózy [15]. Její strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 6. Sacharózu lidské tělo přijímá jako jednu z mála v čisté krystalické formě [17].

Je to nejčastěji používané sladidlo ve světě. Při zahřátí se rozkládá na uhlík a vodu, což se projevuje tmavnutím do hnědé barvy, tzv. karamelizováním. Sacharóza je také jeden z hlavních produktů fotosyntézy rostlin. Je to jedna z nejběžnějších forem sacharidů, které jsou transportovány při fotosyntéze [18]. V rostlinách se nejčastěji vyskytuje v listech, stoncích nebo plodech [15].

V České republice se jako zdroj sacharózy používá nejčastěji cukrová řepa, ze které se získává průmyslově. Sacharóza obsahuje vysokou koncentraci zdroje energie, ale nemá žádnou výživovou hodnotu, čemuž se jinak říká „prázdná kalorie“ [19]. V případě nadměrné

konzumace sacharózy může docházet k častým zdravotním komplikacím, jako je například cukrovka, vznik zubního kazu nebo obezita [20].



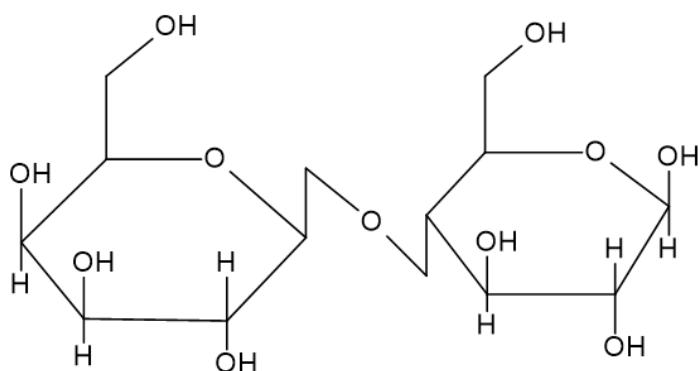
Obrázek 6: Strukturní vzorec sacharózy

### 1.2.2 Laktóza

Laktóza - neboli mléčný cukr, je disacharid složený z molekuly galaktózy a glukózy. Tyto dva monosacharidy jsou spojeny glykosidovou vazbou. Strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 7. Laktóza je obsažena výhradně v mateřském mléce všech savců [21]. Laktóza není příliš sladká, ale v mléku se projevuje nasládlou chutí [22]. V porovnání se sacharózou se laktóza hůře rozpouští ve vodě a pomaleji se vstřebává v zažívacím traktu [22].

Laktóza je důležitým zdrojem energie a podporuje absorpci vápníku. Tento proces je podporován produktem štěpení laktózy, kyselinou mléčnou. Využitelnost vápníku v těle závisí na hladině pH ve střevech, čím nižší pH, tím se využitelnost i rozpustnost zlepšuje [22].

V případě nedostatku enzymu laktáza, který štěpí laktózu, vzniká laktózová intolerance. Laktóza, která se nedokáže rozštěpit, přestupuje do střev, kde se mění na kyseliny, a tam působí dráždivě. Způsobuje křeče, bolesti a nadýmání [23].



Obrázek 7: Strukturní vzorec laktózy

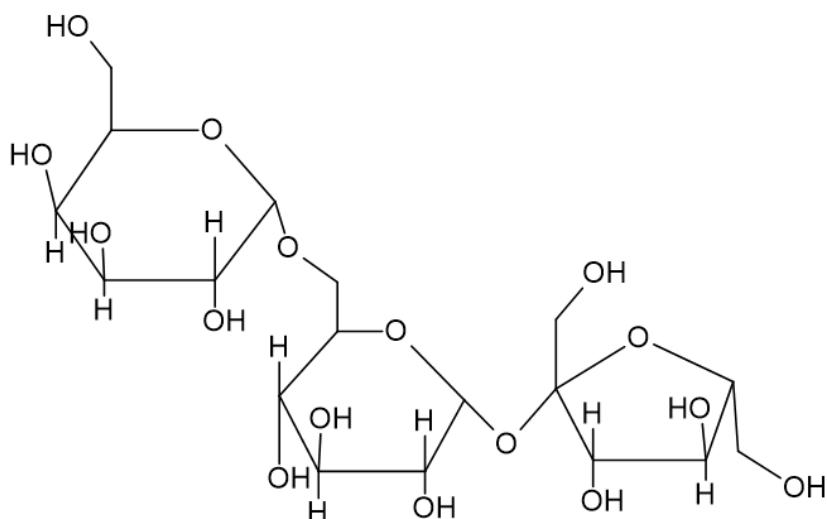
## 1.3 Oligosacharidy

Oligosacharidy, často označovány jako prebiotika [9], se skládají ze 3 - 10 různých nebo stejných monosacharidů. Oligosacharidy se připravují štěpením polysacharidů, nebo se vyskytují volně v přírodě. Některé oligosacharidy se vyskytují v rostlinách, například trisacharid rafinóza. Jeho molekula se skládá z galaktózy, glukózy a fruktózy [1].

### 1.3.1 Rafinóza

Rafinóza je trisacharid složený z molekuly glukózy, galaktózy a fruktózy. Tyto monosacharidy jsou navzájem propojeny glykosidovou vazbou [1]. Strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 8.

Rafinóza i ostatní oligosacharidy se nejvíce vyskytují v luštěninách. Ty způsobují po konzumaci nadýmání. Jelikož nejsou štěpeny v tenkém střevě, přecházejí do tlustého střeva ve své původní formě a jsou mikroflórou fermentovány za vzniku různých plynů a nižších mastných kyselin. Pro snížení obsahu oligosacharidů v luštěninách se luštěniny namáčejí do vody, aby v nich byl snížen obsah oligosacharidů, a tím také jejich nadýmavý účinek [24].



Obrázek 8: Strukturální vzorec rafinózy

## 1.4 Polysacharidy

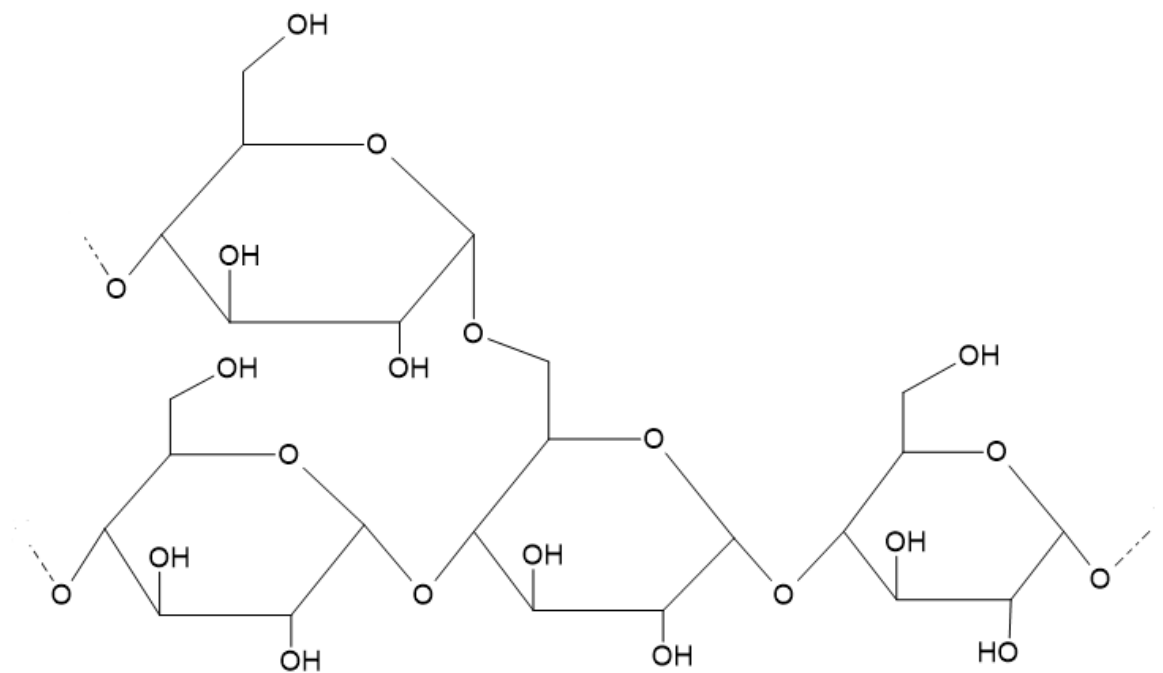
Polysacharidy jsou přírodní polymery. Skládají se z více než 10 monosacharidů spojených kovalentní glykosidovou vazbou [17,25]. Polysacharidy složené ze sacharidů stejného druhu se nazývají homopolysacharidy, mezi které se řadí například škrob, glykogen, inulin, celulóza nebo dextran. Polysacharidy složené z různých sacharidů se nazývají heteropolysacharidy. Heteropolysacharidy jsou složené ze dvou a více různých jednotek. Mezi ně patří například agar nebo glykosaminoglykany [26].

Polysacharidy jsou důležité pro všechny organismy [25]. V přírodě tvoří asi 75 % veškeré organické hmoty, proto je rozdělujeme podle funkce na zásobní, stavební nebo plnicí funkci fyziologicky aktivních látek [27]. Významné jsou jako stavební materiál pro rostliny a pro živočichy představují důležitou zásobní látku [25].

### 1.4.1 Škrob

Škrob je nejvýznamnější polysacharid, který slouží rostlinám jako zásobní látka. Je to homopolysacharid, složený z amylosy a amylopektinu. Amylosa tvoří okolo 20 – 30 % škrobů a její molekula je složena z glukosových zbytků spojených  $\alpha$ -1,4-glykosidovými vazbami. Amylopektin je hlavní složkou molekuly škrobu, tvoří 70 – 80 %. Jeho strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 9. Tak jako amylosa, i amylopektin je složen z glukosových zbytků spojených  $\alpha$ -glykosidovými vazbami [26].

Amylopektin se hydrolyticky štěpí enzymem amylázou na limitní dextriny a maltózu, které dále difundují z buňky a vyživují rostlinné tkáně [15].

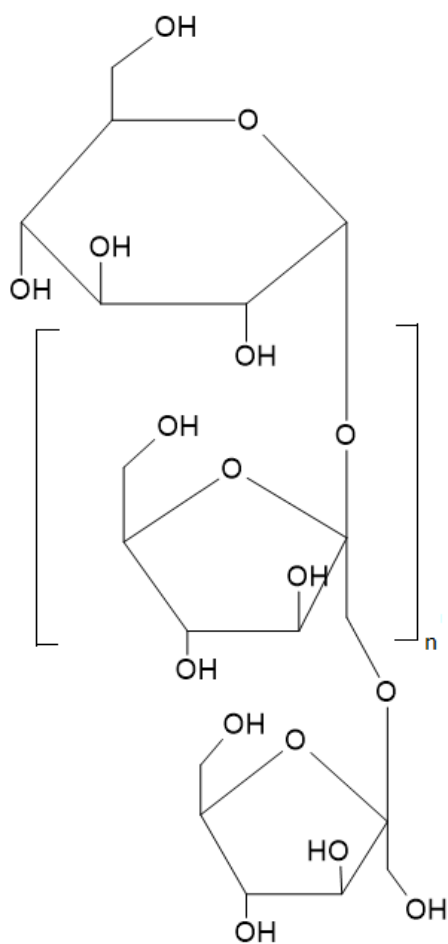


Obrázek 9: Strukturální vzorec amylopektinu

### 1.4.2 Inulin

Inulin je polysacharid nacházející se v kořenech a hlízách rostlin. Strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 10. Je složen z malého množství D-fruktózy, proto je rozpustný ve vodě. Inulin se používá pro vyšetření inulinové clearance (vyšetření filtrační funkce ledvin) nebo pro určování extracelulárních prostorů. Inulin totiž při intravenózním podání vstupuje do intersticia místo do buněk [26].

Inulin se také řadí mezi vlákniny. V trávicím traktu je částečně rozpouštěn a dále se štěpí až v tlustém střevě, kde vznikají nižší mastné kyseliny. Ty jsou pro střevní buňky zdrojem energie. Charakteristickou vlastností vlákniny je její nabobtnávání ve střevech a v důsledku toho snižuje pH. Díky nabobtnání brání ke vstřebání cholesterolu a glukózy [28].



Obrázek 10: Strukturální vzorec inulinu

## 2 TĚLNÍ TEKUTINY

### 2.1 Krev

Krev je viskózní kapalina červené barvy. Její charakteristická barva je dána hemoglobinem, což je krevní barvivo obsahující ve své struktuře železitý kation. Krev je součástí intravaskulárního oddílu extracelulárních tělních tekutin a její celkový objem v lidském těle odpovídá asi 6-8 % tělesné hmotnosti [29]. Krev se nachází uvnitř cévního oběhu každého živočicha. Slouží k transportu živin, kyslíku a odstraňování odpadních látek [28]. Pro analýzu se používá plná krev, plazma nebo sérum.

#### 2.1.1 Plná krev

Plná krev se skládá ze dvou složek, a to z krevní plazmy a krevních elementů. Mezi krevní elementy patří erythrocyty, leukocyty a trombocyty. Krevní plazma obsahuje převážně

vodu a organické a anorganické látky. Mezi anorganické složky patří anionty a kationty, mezi organické složky patří důležité bílkoviny [30].

### 2.1.2 Plazma

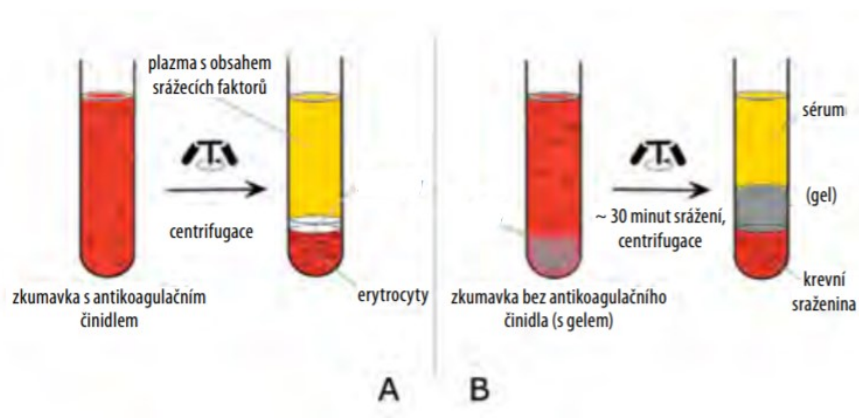
Krevní plazma je vodný roztok nažloutlé barvy, který obsahuje anorganické a organické látky. Anorganickými látkami jsou anionty a kationty. Hlavními anionty krevní plazmy jsou chloridy a bikarbonát. Kationty vyskytujícími se v největší míře jsou sodík, draslík a vápník. K hlavním organickým složkám plazmy patří bílkoviny, jako například albuminy, globuliny nebo fibrinogen [29,30].

Krevní plazma vzniká z nesrážlivé plné krve. Přidávají se k ní protisrážlivá činidla, která zabraňují hemokoagulaci. Nesrážlivá krev se následně centrifuguje, přičemž dochází k oddělení plazmy od krevních elementů a vzniká výsledný vzorek krevní plazmy [29].

### 2.1.3 Sérum

Sérum je nažloutlá nebuněčná tekutá složka krve. Je velmi podobná krevní plazmě, ale na rozdíl od ní neobsahuje fibrinogen ani jiné koagulační faktory. Sérum vzniká po vysrážení plné krve a následným odstraněním krevní sraženiny. Příprava séra a plazmy je znázorněna na obrázku 11 [29].

Pro analýzu se používají spíše vzorky séra, jelikož ve vzorcích nedochází k problémům s protisrážlivými činidly, ty totiž sérum neobsahuje [30].



Obrázek 11: Příprava plazmy (A) a séra (B) (převzato a upraveno z [31])

## 2.2 Moč

Moč je světle žlutá až tmavě žlutá kapalina, která je z pohledu analýzy velmi dobrým vzorkem. Její odběr je neinvazivní, lze ji získat ve velkém množství, je velmi stabilní a vyznačuje se vysokou výpovědní hodnotou [31].

Moč slouží v lidském těle k vylučování odpadních a toxických látek. V důsledku metabolických procesů v těle vzniká velké množství katabolitů, neboli odpadních látek, které jsou nepotřebné nebo dokonce toxické. Těchto škodlivin se lidské tělo zbavuje pomocí ledvin, které produkují moč. Odpadní látky jsou taktéž vylučovány kůží nebo plícemi [32,33].

Moč se skládá z 95 % vody a z 5 % rozpuštěných látek. Její látkové složení je znázorněno v tabulce 1. Rozpuštěné látky se skládají převážně z močoviny, jež je metabolickým odpadním reziduem produkovaným v játrech. Močovina vzniká rozkladem bílkovin a aminokyselin a její obsah v rozpuštěných látkách je téměř polovinou z celkového množství. Mezi ostatní organické látky, které se v moči nacházejí, patří kreatinin a kyselina močová. Moč obsahuje také glukózu a aminokyseliny [30]. Mezi anorganické složky moči patří chloridy, sodík, draslík, fosfáty a další [34].

Tabulka 1: Primární složky normální zdravé moči včetně popisu a vzniku [34]

<b>Složka moči</b>	<b>Popis a vznik</b>
Močovina	Primární organická složka. Produkt metabolismu proteinů a aminokyselin.
Kreatinin	Produkt metabolismu kreatinu ve svalech.
Kyselina močová	Produkt rozkladu nukleových kyselin.
Chloridy	Primární anorganická složka.
Draslík	Vyskytuje se v kombinaci s chloridy a dalšími solemi.
Sodík	Odlišnosti obsahu podle příjmu soli v potravě.
Fosfát	Slouží se sodíkem jako pufr krve.
Amonné soli	Regulují kyselost krve.



### 3 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ

Nejčastěji využívané metody pro stanovení sacharidů v tělních tekutinách jsou spektrofotometrie, plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Méně často jsou využívány kolorimetrické metody a Ramanova spektroskopie.

#### 3.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je kvantitativní analytická metoda z odvětví spektroskopie. Využívá toho, že každá sloučenina absorbuje nebo alespoň propouští světlo v určitém rozsahu vlnových délek. Měří se tedy, kolik světla látka absorbuje nebo propouští. Díky tomu je možné pomocí spektrofotometrie určit vlastnosti měřeného analytu, jakou je například koncentrace. Pro měření může být například používán spektrofotometr znázorněný na obrázku 12 [35].

Většina přístrojů používá filtry, pak se jedná o fotometry. Hranoly nebo mřížky využívají spektrofotometry. Ty pak slouží k výběru rozsahu vlnové délky. Energie, která prochází skrze vzorek, je následně částečně odražena, absorbována a propouštěna [36].

Lambert-Beerův zákon, který se uplatňuje ve spektrofotometrii, popisuje vztah mezi absorbancí a koncentrací analyzovaného roztoku. Ten uvádí, že koncentrace analyzované látky je přímo úměrná množství absorbovaného světla. Lambert-Beerův zákon zavádí veličiny, jimiž jsou transmittance (T) a absorbance (A). Transmittance je množství propuštěného záření vzorkem, to je popsáno následující rovnicí (1) [36].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

kde: T= transmittance; I= intenzita záření, které prošlo vzorkem, I<sub>0</sub>= intenzita záření, které do vzorku vstoupilo

Absorbance je rovna zápornému přirozenému logaritmu transmittance, což vyjadřuje rovnice (2):

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

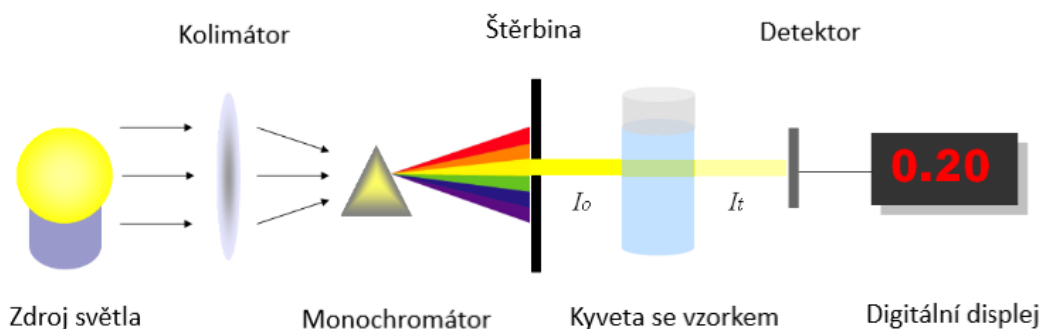
kde: A= absorbance, T= transmittance

Celý Lambert-Beerův zákon je vyjádřen následující rovnicí (3):

$$A = \varepsilon * c * l \quad (3)$$

kde:  $A$ = absorbance;  $\varepsilon$ = molární extinkční koeficient [ $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ],  $c$ = látková koncentrace [ $\text{mol/l}$ ],  $l$ = délka kyvety [ $\text{cm}$ ]

Lambert-Baarov zákon platí pouze pro velmi zředěné roztoky, protože tvrdí, že molární extinkční koeficient je nezávislý na koncentraci. Toto tvrzení platí pouze u zředěných roztoků do koncentrace  $10^{-2} \text{ mol/l}$ . Molární extinkční koeficient je pro každou látku charakteristický [37].



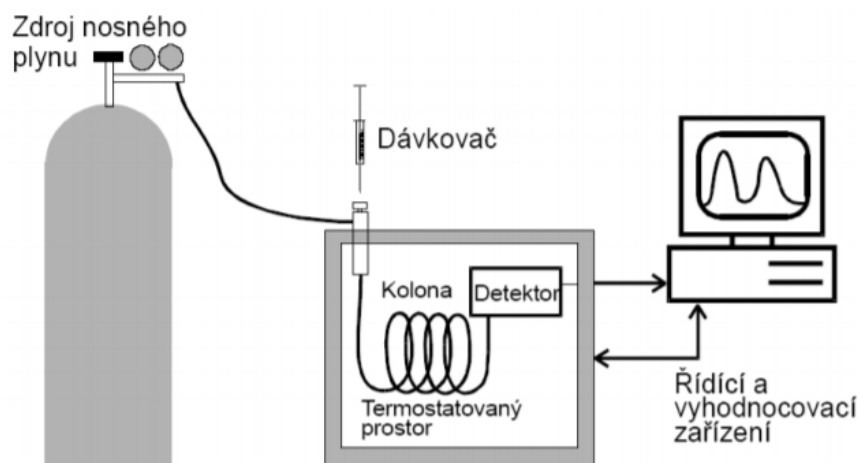
Obrázek 12: Základní schéma spektrofotometru (převzato a upraveno z [35])

## 3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie může být používána pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Zařazuje se do separačních analytických metod. Základním principem této metody je rozdělení složek směsi do stacionární a mobilní fáze na základě absorpce a rozpouštění. V případě plynové chromatografie je stacionární fáze umístěna v koloně, skrze kterou prochází mobilní fáze, v tomto případě nosný plyn. Nosný plyn unáší dávkovaný vzorek kolonou [38]. V koloně jsou složky separovány a po výstupu z kolony jsou detekovány detektorem. Nejčastěji se plynová chromatografie používá pro rozdělení těkavých látek [39].

Plynový chromatograf (znázorněný na obrázku 13) se skládá z:

- dávkovače vzorku - zajišťuje vpravení vzorku pomocí injekční stříkačky do proudu nosného plynu
- tlakové lahve, ve které je nosný plyn
- chromatografické kolony
- detektoru
- termostatu
- systému zajišťující zpracování dat (počítač přes A/D převodník) [40]



Obrázek 13: Schéma plynového chromatografu (převzato a upraveno z [41])

Jako nosný plyn se používají inertní plyny, které nemohou ve velké míře reagovat s analytem. Nejčastěji se používá dusík, dále také argon, helium a vodík [42].

### 3.2.1 Kolony v plynové chromatografii

Kolony se dělí na dva typy. Prvním typem jsou kolony náplňové, které obsahují stacionární fázi složenou z různých typů látek, a to buď kapalného nebo pevného skupenství. Dalším typem jsou kolony kapilární, ve kterých je stacionární fáze nanášena přímo na povrchu uvnitř kapiláry [42].

Stacionární fázi v plynové chromatografii dělíme na GSC (Gas-Solid Chromatography) a GLC (Gas-Liquid Chromatography). Při GSC je stacionární fáze tvořena tuhou látkou, která slouží k adsorpci analytů. Při GLC se analyt rozděluje podle rozpustnosti a těkavosti mezi kapalnou stacionární fázi a plynnou mobilní fázi. Náplňové kolony jsou svým průměrem větší (2 – 5 mm) než kapilární (0,2 – 0,7 mm). Jejich délka je ale menší (0,5 – 4 m) v porovnání s kapilární (10 – 100 m). Dalším odlišností je, že náplňové kolony jsou vyráběny z oceli nebo ze skla. Kapilární kolony jsou vyráběny z křemene, vnitřní strana kapiláry je upravena takovým způsobem, aby na ní mohla být zakotvena stacionární fáze [42].

### 3.2.2 Detektory v plynové chromatografii

Detektor převádí množství zachyceného analytu na elektrický signál, který je odesílán do sběrnice dat na konci kolony. Výsledkem je chromatogram, který analyty zobrazuje v podobě píků [38].

Mezi nejčastěji aplikované detektory v plynové chromatografii patří plamenoionizační detektor. Vyznačuje se vysokou citlivostí a detekuje všechny látky obsahující uhlík. Principem

plamenoionizačního detektoru je měření elektrického proudu elektrodami, tento tok elektrického proudu je způsoben nabitými částicemi v nosném plynu. Vznik těchto částic je způsobený spalováním analytu v kyslíko-vodíkovém plamenu. Hlavní výhodou detektoru je jeho univerzálnost a jeho schopnost se samočistit [38].

Kvalitativní charakteristikou plynové chromatografie, resp. chromatogramu, je retenční čas. Kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem nebo výška chromatografického píku. Retenční čas ( $t_R$ ) nám říká, jakou dobu analyt setrvává v separačním systému. Mrtvý čas ( $t_M$ ) vypovídá, jak dlouho prochází mobilní fáze chromatografickým systémem [42].

### 3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je analytická metoda založena na separaci látek. Mobilní fáze je kapalná, jejím principem je separace založena na rovnovážné distribuci analytů mezi vzájemně nemísitelnými fázemi. Stacionární fáze není pohyblivá a je ukotvena uvnitř chromatografické kolony na pevném nosiči [43]. Mobilní fáze je pod vysokým tlakem tlačena okolo stacionární fáze. Rozdělení analytu mezi kolony závisí na afinitě k nim [44].

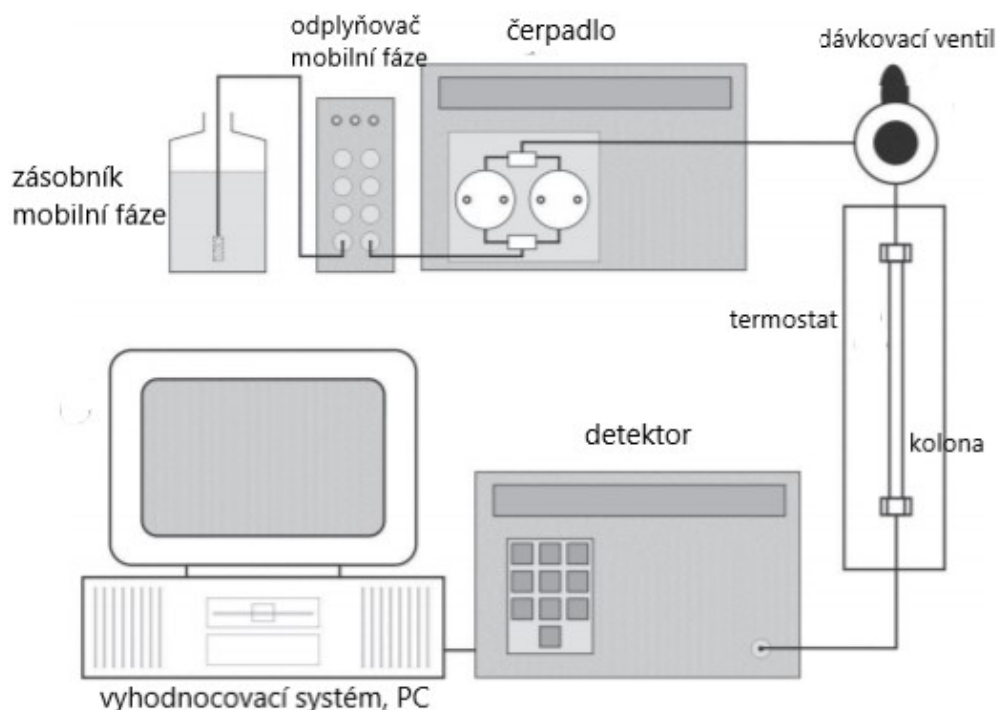
Pokud je stacionární fáze vysoce nepolární a mobilní fáze polární, jedná se o HPLC s obrácenými fázemi (RP-HPLC, Reversed-Phase-High Performance Liquid Chromatography). Jako polární mobilní fáze se používají organické složky ve směsi s vodou, aby se částečně snížila jejich eluční síla, která je velmi vysoká. Nejčastěji se používají nitrily (acetonitril), alkoholy (methanol) nebo ethery. Nepolární stacionární fáze, která se používá nejčastěji, je tvořena silikagelem s chemicky vázanou uhlovodíkovou skupinou [45].

Méně často aplikovaná je HPLC s normálními fázemi, kdy stacionární fázi bývá většinou látka polární povahy, jako například aminopropyl nebo silikagel. Mobilní fáze je oproti stacionární méně polární, například chloroform [44].

Čistota mobilní fáze může ovlivňovat kvalitu a účinnost separace, proto je nutné, aby byla připravována z látek s vysokým stupněm čistoty. Zdrojem nečistot v mobilní fázi mohou být chemikálie sloužící k úpravě pH. Mobilní fáze může být odplyňována pomocí ultrazvukové lázně nebo degaséru, aby rozpuštěné plyny neovlivňovaly separaci látek [45].

Základní přístrojové vybavení kapalinového chromatografu, znázorněného na obrázku 14, se skládá ze zásobníku s mobilní fází, odplyňovače mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla,

dávkovače vzorku, termostatu, chromatografické separační kolony, detektoru a vyhodnocovacího systému, kterým je ve většině případů počítač [47].



Obrázek 14: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu (převzato a upraveno z [46])

### 3.3.1 Vysokotlaká čerpadla pro HPLC

Jako nejpoužívanější čerpadla pro HPLC se využívají vysokotlaké pumpy sloužící k čerpání mobilní fáze pomocí pístových nebo membránových čerpadel. Ty umožňují čerpání vodné či organické mobilní fáze pod vysokým tlakem. Pístové pumpy jsou používány nejčastěji, jelikož jejich prací je možno dosáhnout stabilního a konstantního tlaku. Tyto pístové pumpy jsou složeny ze dvou pohybujících se pístů, které se pohybují v protifázi. Existuje i řada dalších typů čerpadel, jedním z nich je čerpadlo, které pracuje na principu injekční stříkačky, kdy je naplněno mobilní fází. Nevýhodou těchto čerpadel je omezený objem vyžadující opětovné naplňování mobilní fází. Naopak jejich výhodou je práce s konstantně nízkým průtokem rozpouštědla [48].

### 3.3.2 Kolony HPLC

Chromatografická kolona je trubice z nerezové oceli, která je naplněna stacionární fází, lišící se podle účelu použití. Většinou se jedná o náplň v podobě částicových sorbentů, jako je například silikagel, oxid hlinitý nebo jiné druhy gelů. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 50 až 250 mm, vnitřní průměr odpovídá 3 – 4,6 mm. Sorbenty, kterými jsou kolony naplněny, mají většinou průměr do 10  $\mu\text{m}$ . Pro běžný průtok mobilní fáze se volí rychlost 0,5 – 5 ml za minutu [48].

Kolony, které jsou v dnešní době velmi často používány, jsou tzv. monolitické kolony. Jsou naplněny jedním kusem pórovitého anorganického nebo organického materiálu. Nejvyšší účinnost mají při nižších tlacích a vyšším průtoku mobilní fáze. Předkolona, která je umístěná mezi dávkovačem a kolonou, slouží k ochraně kolony před nečistotami a jinými nežádoucími materiály [48].

### 3.3.3 Detektory HPLC

Detektor je zařízení monitorující analyt vycházející z kolony. Ukazuje nám, jakou koncentraci mají separované látky. Tyto údaje nám předává v podobě chromatografických píků, které zobrazují intenzitu signálu v závislosti na čase. Detektor je umístěn ihned za kolonou, aby byly analyty detekovány ihned po eluci z kolony. Díky jeho umístění jsou výsledky měření přesné a je dosažena nejvyšší možná detekční citlivost. Vlastnosti, jako je vysoká citlivost a rychlá odezva, představují nejdůležitější analytické faktory [38].

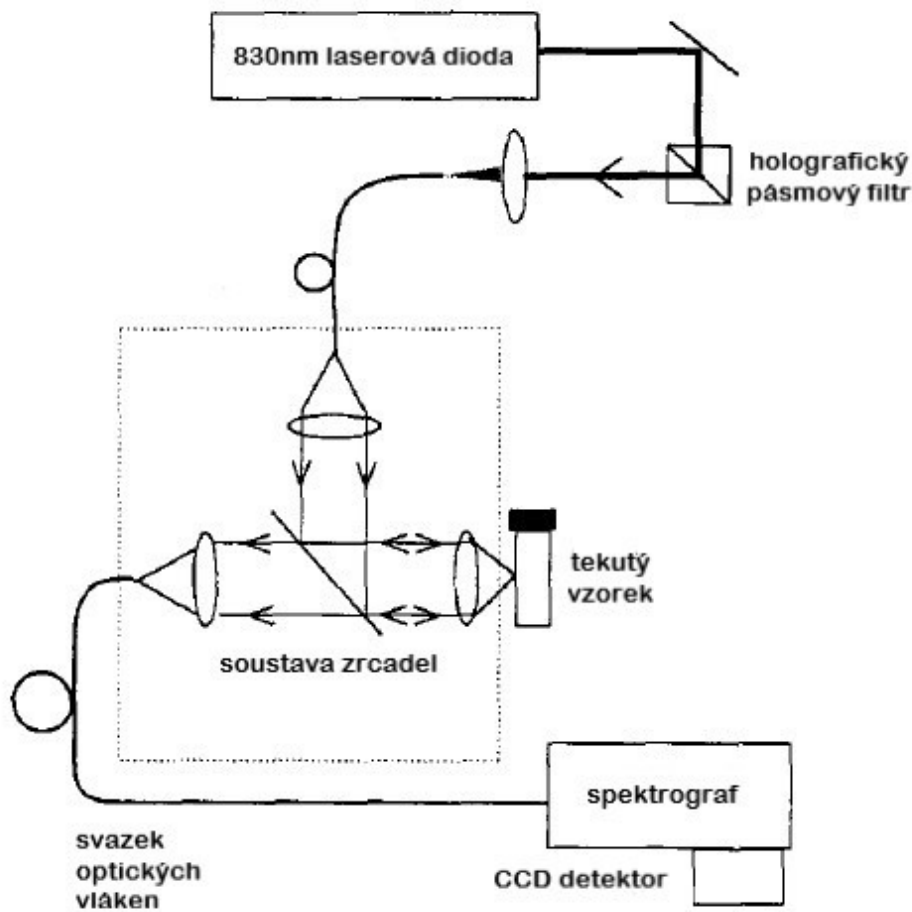
Mezi detektory využívané k detekci v kapalinové chromatografii, patří například UV/VIS detektory, fluorescenční, elektrochemické, radiochemické, turbidimetrické a vodivostní. Nejvíce používanými detektory jsou spektrofotometrické, refraktometrické nebo fluorescenční. Nejběžnější je ovšem spektrofotometrický detektor, jelikož má mnoho výhod, jako detekce široké škály analytů, dobrá citlivost a jednoduchost. Spektrofotometrické detektory, které dokáží nejdokonaleji proměřit celá absorpční spektra detekovaných látek, pracují na principu detekce pomocí diodového pole [44].

## 3.4 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je optická metoda. Systém NIR Ramanovy spektroskopie, který se využívá pro analýzu, je popsán na obrázku 15.

Skládá se ze:

- zdroje monochromatického záření (excitační laserová dioda s vlnovou délkou 830nm),
- holografického pásmového filtru s propustností 80 %,
- křemenné kyvety, skrze jejíž stěny je pomocí optických vláken měřen vzorek,
- soustavy zrcadel,
- CCD detektoru, kam je dispergováno světlo,
- spektrografu, který měří výsledné hodnoty,



Obrázek 15: Blokové schéma systému NIR Ramanovy spektroskopie (převzato a upraveno z [49])

Při měření dochází k tomu, že světelný paprsek vycházející z laserové diody, prochází pásmovým filtrem. Tento paprsek dále prochází přes paraboloidní zrcadla a malý hranol na křemennou kyvetu se vzorkem. Rozptýlené světlo z povrchu vzorku krve je sbíráno zrcadlem do svazku optických vláken a převádí jej do spektrografu. Spektra jsou sbírána detektorem, čímž je získáno spektrum [50].

## 4 STANOVENÍ GLUKÓZY

Diabetes mellitus je onemocnění spojené s poruchou hladiny glukózy v krvi. Patří mezi nejrozšířenější metabolická onemocnění na celém světě. Aby se předešlo závažným komplikacím spojených s cukrovkou, jako je například slepota, kardiovaskulární problémy, ztráta končetin a mnoho dalších, je potřeba hladinu glukózy pravidelně monitorovat a také včas diagnostikovat nové pacienty s tímto onemocněním [51].

### 4.1 Stanovení glukózy v krvi

Stanovení glukózy v krvi lze provádět pomocí Ramanovy spektroskopie, spektrofotometrie a pomocí kombinace plynové chromatografie s izotopovým ředěním a následnou hmotnostní spektrometrií (ID-GC/MS).

#### 4.1.1 Stanovení glukózy Ramanovou spektroskopií

Stanovení plné krve pomocí Ramanovy spektroskopie je velmi výhodnou metodou nejen pro analýzu hladiny glukózy, je to rovněž metoda, při které je možné provádět simultánní analýzu více složek v systému [50].

Příprava vzorku pro tuto metodu je následující: pro analýzu plné krve se vzorek nijak upravovat nemusí, pouze se odebírá do zkumavky s antikoagulačním činidlem, jako je EDTA nebo heparin [51]. Pro analýzu vzorku séra se připravuje odebráním krve od pacienta, následným vysrážením a centrifugací. Tímto je dosaženo oddělení krevních komponentů od séra, které slouží dále k analýze [52].

Při srovnání více studií lze konstatovat, že pokud je jako matrice použita plná krev nebo sérum, laserová dioda má vlnovou délku 830nm a velikost spektrálního rozsahu odpovídá 700-1800  $\text{cm}^{-1}$ , výsledky měření jsou si velice podobné [49,50,52,53].

Ramanovu spektroskopii lze použít pro kvantitativní analýzu a získání relevantních informací o biomolekulárních strukturách s akceptovatelnou přesností [50].

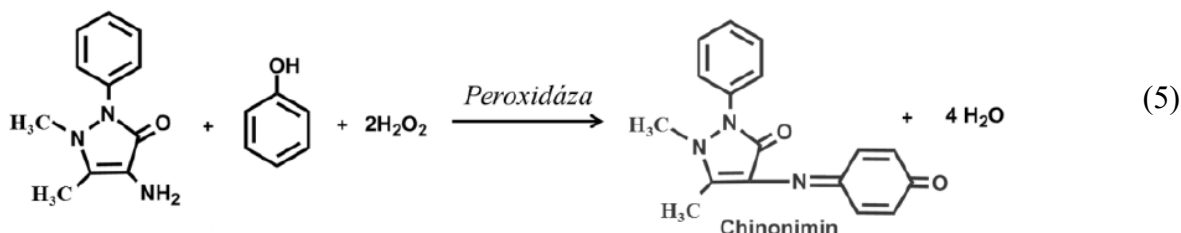
#### 4.1.2 Stanovení glukózy s glukózaoxidázou a peroxidázou

Další metodou, která je velmi často využívána v klinické biochemii, pro analýzu glukózy v krvi je enzymatické stanovení pomocí glukózaoxidázy a peroxidázy pomocí spektrofotometrie.

V současnosti je tato metoda stanovení nejvíce rozšířená. Glukóza je v plazmě spektrofotometricky analyzována s glukózaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD). Principem této metody je reakce glukózy za vzniku D-glukonolaktanu za katalýzy glukózaoxidázy,



(popsáno rovnicí 4) a následné oxidační kopulaci peroxidu vodíku s 4-aminofenazonem a fenolem za katalýzy peroxidázy. Vzniká chinoniminové barvivo (popsáno rovnicí 5), jehož intenzita je spektrofotometricky měřena. Tato metoda je také označována jako Trinderova reakce. [54,55].



Příprava vzorku začíná odběrem krve od pacientů nalačno [56]. Vzorky jsou upravovány přidáním směsi fluoridu sodného a oxalátu draselného. Tato směs slouží k inhibici glykolýzy, která může nastat, pokud vzorek není ihned zpracován [55]. Pro následnou analýzu slouží krevní plazma, proto se upravená plná krev centrifuguje a plazma je oddělena od krevních elementů [56].

Stanovení se provádí pomocí měření absorbance vzorku při vlnové délce 505 nm [56]. Nejprve je v kyvetě změřen vzorek destilované vody, ten slouží jako „blank“, tedy tzv. slepý vzorek. Následně se měří standard, jehož koncentraci známe, a nakonec měříme vzorek. Absorbance vzorku se měří po 15 minutové inkubaci s přidanou reagentií při 37°C. Intenzita výsledného zbarvení je úměrná koncentraci glukózy [57].

Na stejném principu pracují i glukometry. Testovací proužek obsahuje všechny komponenty reakce. Jakmile je na něj aplikována kapka krve, dochází ke vzniku barevného produktu. Intenzita zbarvení je následně měřena fotometricky [57].

Jako hodnotící kritérium pro spektrofotometrické měření je připravována kalibrační řada. Ta se skládá z roztoků o známých koncentracích, které jsou následně proměřovány. Naměřené hodnoty absorbancí jsou zaneseny do grafu v závislosti na koncentraci roztoků. Výsledným grafem je přímka, u které sledujeme její linearitu, velikost směrodatné odchylky (SD) a variačního koeficientu (CV). Zjištěná průměrná odchylka při této metodě činí pouze -0,97 %. Metoda s glukózaoxidázou a peroxidázou je tedy velmi citlivá, jednoduchá a vystačí si pouze s jednoduchou instrumentací [56].

### 4.1.3 Stanovení glukózy pomocí izotopového ředění a následné plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

ID-GC/MS, neboli izotopové ředění s následnou plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií, je velmi specifická kvantitativní analytická metoda. Využívá se pro referenční měření vyššího řádu. Z pohledu rutinního měření není použitelná, jelikož příprava vzorku je časově náročná [58].

Princip stanovení glukózy v krvi touto metodou spočívá v použití vnitřního standardu, který je chemickým složením a vlastnostmi podobný vzorku. Požadavky pro ideální vnitřní standard nejlépe splňuje analyt, který je synteticky vyrobený a značený izotopem. To znamená, že některé atomy analytu jsou substituovány za těžší izotopy oproti jejich přirozenému složení. V této metodě se do vnitřního standardu přidává izotopově značená glukóza  $C^{13}$ . Do vzorku pacientova séra se tedy přidává již připravený vnitřní standard [58,59].

Vzorky séra, odebrané od pacienta, jsou nejprve analyzovány rutinní metodou, jako je například enzymatická hexokinázová metoda. Ta slouží k odhadu koncentrace glukózy v daném vzorku. Samotná analýza probíhá nejprve přípravou vzorků a kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky jsou připravovány se značenou i neznačenou glukózou. Tyto roztoky jsou dále analyzovány, rozděleny pomocí plynové chromatografie a obsah glukózy je následně určen vyhodnocením pomocí hmotnostní spektrometrie [59].

## 4.2 Stanovení glukózy v moči

Glykosurie, neboli nadměrný obsah glukózy v moči pacienta, je onemocnění, které může, ale nemusí být spojeno s onemocněním diabetes mellitus. Je způsobeno poruchou tubulární resorpce v ledvinách. Glukóza v moči může být stanovena pomocí enzymatické metody s glukózooxidázou a peroxidázou na diagnostickém proužku. Touto metodou lze analyzovat glukózu i v krvi, viz kapitola 4.1.2 [60].

### 4.2.1 Stanovení glukózy v moči pomocí testovacích proužků a poloautomatických analyzátorů

Pro rychlou analýzu moči se nejčastěji používají testovací proužky nebo poloautomatické analyzátory. Pro testování pomocí testovacích proužků není moč nijak upravována. Pro analýzu v poloautomatických analyzátorech se vzorky odebrané moči centrifugují, následně je moč používána k analýze [60].

Diagnostické proužky se používají pro rychlou a jednoduchou analýzu, kterou si pacient může provést i doma. Jsou založeny na změně zbarvení diagnostického papírku. Papírky jsou napuštěny glukózaoxidázou, peroxidázou, chromogenem a puftrem. Jak již bylo popsáno v kapitole 4. 1. 2, glukóza reaguje se vzdušným kyslíkem za katalýzy glukózaoxidázy, za vzniku peroxidu vodíku a glukonolaktanu. Peroxid vodíku v dalším kroku reaguje s chromogenem za katalýzy peroxidázy a vzniká barevné zbarvení, které se projeví na diagnostickém papírku. Zbarvení papírku se vizuálně srovnává s barevnou stupnicí od výrobce, která nám udává obsah glukózy v moči [61].

Analýza na poloautomatických analyzátoch je založena na stejném principu jako diagnostické proužky. Je ale přesnější a používá se rutinně v laboratořích. Analyzátor snímá změnu barvy moči ve zkumavce pomocí reflektanční fotometrie detekující koncentraci glukózy [61].

## 5 STANOVENÍ XYLÓZY

Stanovení xylózy je velmi významné pro diagnostiku malabsorpčního syndromu [60]. Xylóza se ve své nezměněné podobě vstřebává v tenkém střevě v duodedu a jejunu. Pokud je absorpce tohoto monosacharidu narušena, vypovídá to o abnormálním střevním vylučování. Malabsorpční syndrom způsobuje porušení normálního vstřebávání živin v tenkém střevě. Dochází tak k onemocněním jako je například celiakie, Crohnova nemoc a další [62].

### 5.1 Stanovení xylózy v séru a moči

Pro stanovení xylózy v séru je nejčastěji používaná kolorimetrická metoda s floroglucinolem. Tuto metodu lze využít pro analýzu moči i séra.

#### 5.1.1 Stanovení xylózy kolorimetrickou metodou s floroglucinolem

Kolorimetrie je optická metoda založena na měření intenzity zbarvení. Je to velmi jednoduchá a časově nenáročná analytická metoda. Srovnává zbarvení vzorku o neznámé koncentraci s kalibrační řadou o známé koncentraci a daného zbarvení [63]. Je založena na měření zbarvení vzorku. Vzorky jsou obarveny barvicím činidlem, který je obohacen floroglucinolem. Při analýze moči nebo séra je jediným rozdílem příprava vzorků [64].

Při přípravě vzorků byl pacientům perorálně podáván roztok vody a xylózy. Krev byla odebírána po 1-2 hodinách, moč byla odebírána v průběhu 5 hodin [60]. Krev byla zpracovávána do formy séra, to bylo zbaveno proteinu (deproteinizováno). Připravené vzorky moči a séra byly doplněny o deionizovanou vodu a barvicí činidlo s floroglucinolem. Byla

vytvořena kalibrační řada roztoků obsahující D-xylózu v různých koncentracích. Následnou čtyřhodinovou inkubací při 100° C bylo docíleno zbarvení všech roztoků, jak vzorků, tak kalibračních roztoků. Roztoky byly zchlazeny a měřeny při vlnové délce 554 nm [64].

U vyhodnocení naměřených dat byla vytvořena kalibrační křivka. Z ní bylo určeno, kolik xylózy vzorek pacienta obsahoval [65]. Snížené vylučování močí a nízké koncentrace xylózy v krvi svědčí o poruše resorpce xylózy v tenkém střevě. To může poukazovat na malabsorpční syndrom, nebo to může indikovat stavy po resekcii tenkého střeva [60]. Tato metoda se osvědčila jako velmi přesná a citlivá [65].

## 6 STANOVENÍ FRUKTÓZY A SACHARÓZY

Pro stanovení fruktózy a sacharózy v moči jako biomarkerů pro celkový příjem sacharidů se nejčastěji používá plynová chromatografie.

### 6.1 Stanovení fruktózy a sacharózy v moči

V poslední době byl vyvinut nový biomarker, který určuje celkový příjem sacharidů. Těmito biomarkery jsou fruktóza a sacharóza [66]. Bylo zjištěno, že hodnoty vylučované sacharózy a fruktózy v moči úzce souvisí s celkovým denním příjmem sacharidů v potravě [67]. Celkové sacharidy, které tělo přijímá, zahrnovaly monosacharidy (glukóza, fruktóza, galaktóza) a disacharidy (sacharóza, laktóza, maltóza). Vlastní cukry, které jsou přijímány z potravy, byly vypočteny sčítáním celkových cukrů z ovoce, zeleniny, obilovin atd. Fruktóza a sacharóza, obsažené ve vyloučené moči, byly následně stanoveny pomocí plynové chromatografie [68].

#### 6.1.1 Stanovení fruktózy a sacharózy plynovou chromatografií

V této studii byly sledovány vzorky moči. Dobrovolníci, kteří se do této studie zapojili, měli za úkol shromážďovat vzorky moči za celých 24 hodin. K tomuto účelu byl použit plastový kontejner, který obsahoval kyselinu boritou. Ta slouží jako konzervant sacharózy, aby byly vzorky s tímto sacharidem při pokojové teplotě stabilní. Jakmile byla všechna moč shromážděna, následovala její další úprava [66]. Vzorky moči byly zcentrifugovány, aby byl odstraněn sediment, a následně odpařeny v proudu dusíku. Roztok hydroxylaminu v pyridinu byl do vzorku přidán před jeho hodinovou inkubací při 70° C. Následovala opětovná centrifugace, po níž byl supernatant vzorku odebrán do ependorfky se sytilačním roztokem. Poté následovala opět inkubace, odpaření v proudu dusíku, přidání roztoku hydroxylaminu

v pyridinu a centrifugace. Sled těchto kroků byl zopakován celkem třikrát. Takto připravený vzorek byl vpraven do injektoru plynového chromatografu [68].

Pro detekci byl použit plamenoionizační detektor. Teplota vstupního injektoru měla 250°C, teplota detektoru 280°C. Jako nosné médium, které vzorek unášelo kolonou, bylo použito helium. Doplnkovým plynem byl dusík [68].

## 7 STANOVENÍ INULINU

Stanovení inulinu je možno provádět jak ze vzorků plazmy, tak moči. Častěji se ale používají vzorky plazmy. Metodami, kterými se hladina inulinu analyzuje, je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo spektrofotometrie.

### 7.1 Stanovení inulinu v plazmě

Stanovení inulinu v séru má své výhody. V lékařství se díky svým vlastnostem používá k funkčnímu vyšetření ledvin. Inulin dokáže zpomalovat růst několika patogenů v intestinálním traktu, zvyšovat absorpci hořčíku, vápníku a dalších živin a také je nejvýznamnějším zdrojem vlákniny. Jeho analýzy je využíváno v oborech zabývajících se obezitou a onemocněním diabetes mellitus [69].

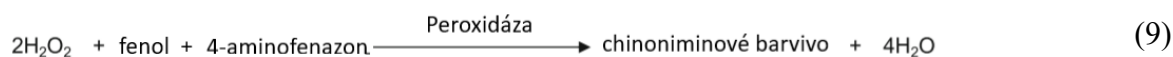
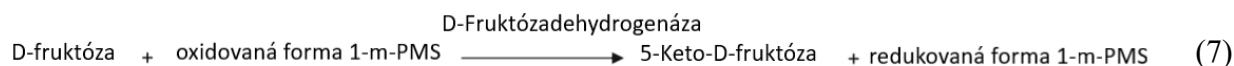
#### 7.1.1 Stanovení inulinu v plazmě pomocí HPLC

Vzorky krevní plazmy, odebrány od řady pacientů, byly upravovány následovně: nejprve byly denaturovány, následně byly smíchány s octanem zinečnatým a fosfowolframovou kyselinou. Mobilní fází byla deionizovaná voda. Následná separace byla prováděna po dobu 16 minut při průtoku 0,6 ml/min. Aby bylo dosaženo přesného měření, byla vytvořena kalibrační řada roztoků o známé koncentraci. Po separaci vzorku byla data získána z analýzy vyhodnocena a posouzena citlivost a účinnost této metody. Bylo zjištěno, že tato metoda je dostatečně citlivá a vhodná pro diagnostiku pacientů s renálním onemocněním [70].

#### 7.1.2 Stanovení inulinu v séru pomocí spektrofotometrie

Inulin lze v séru stanovit enzymatickou metodou a následným měřením pomocí spektrofotometrie. Vzorky séra odebrané od pacientů byly upraveny deproteinizací, následně byla přidána kyselina chloristá, která působí na odstranění bilirubinu. Její použití má výhodu v tom, že nemění pH [71].

Principem je reakce inulinu katalyzovaného inulinázou (popsáno rovnicí 6). Inulin se rozloží na fruktózu a glukózu. D-fruktóza je spolu s 1-methoxy-5-methylfenazinium methylsulfátem (1-m-PMS), což je fotochemicky stabilní mediátor přenosu elektronů mezi NADPH a dalšími akceptory elektronů, katalyzována D-fruktózadehydrogenázou a přeměněna na 5-keto-D-fruktrózu a redukovanou formu 1-m-PMS (popsáno rovnicí 7). Vzniklá redukovaná forma 1-m-PMS interaguje s kyslíkem za vzniku oxidované formy 1-m-PMS a peroxidu vodíku (popsáno rovnicí 8). Peroxid vodíku reaguje s fenolem a 4-aminofenazonem za katalýzy peroxidázy (popsáno rovnicí 9). Vzniká chinonimové barvivo, které je měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 555 nm [72].



## 8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zaměřit se na možnost stanovení sacharidů v tělních tekutinách. Nejprve bylo popsáno rozdělení sacharidů a jejich detailnější popis. Tělní tekutiny a jejich rozdělení bylo popsáno v následujících kapitolách. Nejpoužívanější matricí pro analýzu sacharidů a obecně pro rutinní analýzu biochemickými testy je moč a krevní sérum.

Mezi nejvýznamnější metody pro stanovení sacharidů patří spektrofotometrie, plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Metody, které jsou více specifické a nepříliš běžné, jsou například Ramanova spektroskopie nebo analýza pomocí izotopového ředění a následné plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Touto prací bylo popsáno, že nejvýznamnějším sacharidem pro analýzu v tělních tekutinách a pro následnou diagnostiku je glukóza. Ta slouží jako marker pro onemocnění diabetes mellitus, které je nejčastějším metabolickým onemocněním na světě. Další sacharidy slouží také jako markery různých onemocnění a jejich zvýšené nebo snížené hodnoty mají významnou informační hodnotu. Glukóza v moči značí, že pacient může trpět právě zmíněnou cukrovkou; xylóza nám říká, zda pacient netrpí malabsorpčním syndromem, který zapříčiňuje abnormální vstřebávání živin v tenkém střevě. Fruktóza a sacharóza slouží jako marker pro celkový příjem cukru. Tato informace pak dále slouží k dietologickým účelům. Inulin se v lékařství používá pro funkční vyšetření ledvin.

V této bakalářské práci byly popsány analytické metody využívané pro detekci již zmíněných sacharidů, které slouží k následnému určení diagnózy pacienta. Důležitým faktorem při rutinních analýzách je citlivost metody pro správnou interpretaci výsledků. Popsané metody jsou dostatečně citlivé, a proto jsou jejich výsledky validní. Současně splňují požadavky rutinních analýz, díky nimž je určení diagnózy snadnější.

## 9 SEZNAM LITERATURY

- [1] FERENČÍK, Miroslav. *Biochémiá*. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000. ISBN 80-88908-58-2.
- [2] KOTLÍK, Bohumír a Květoslava RŮŽIČKOVÁ. *Chemie v kostce*. 2. vyd. Havlíčkův Brod: Fragment, 1997. V kostce (Fragment). ISBN 80-720-0342-9.
- [3] BATT, Carl A. a Mary-Lou TORTORELLO, *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, 2014, 2nd April 2014. 1. ISBN 9780123847331.
- [4] CHEN, Hongzhang a Lan WANG. Sugar Strategies for Biomass Biochemical Conversion. *Technologies for Biochemical Conversion of Biomass*. Elsevier, 2017, 137—164. ISBN 9780128024171.
- [5] PATIÑO, Margareth Andrea, Juan Pablo ORTIZ, Mario VELÁSQUEZ a Boris U. STAMBUK. D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Yeast*. 2019. doi:10.1002/yea.3429.
- [6] KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii*. 2. rozš. vyd. Praha: Galén, 1999. ISBN 8072620223.
- [7] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-808-6960-234.
- [8] WULF, Peter De a Erick J. VANDAMME. Production of d-ribose by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 48(2), 141—148. doi:10.1007/s002530051029.
- [9] ODSTRČIL, Jaroslav. *Biochemie*. 2. vyd., upr. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-701-3425-9.
- [10] LEBL, Jan. *Abeceda diabetu: příručka pro děti, mladé dospělé a jejich rodiče*. Praha: Maxdorf, 1998. Medica. ISBN 80-858-0086-1.
- [11] BIRÓ, György. Human biological characteristics of fructose. *Journal of Food Investigation*. 2018, 64(1) 1894—1917.
- [12] PAPEŽOVÁ, Klára, Veronika MLČOCHOVÁ a Halina MATĚJOVÁ. Zdravotní rizika nadměrného příjmu fruktózy. *Praktický lékař*. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2011, roč. 91, č. 7, s. 385—388. ISSN 0032-6739.



- [13] KRIEBS, Anna. Fructose and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020, **16**(8), 402—402. doi:10.1038/s41574-020-0383-3.
- [14] COELHO, Ana I., Gerard T. BERRY a M. Estela RUBIO-GOZALBO. Galactose metabolism and health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2015, **18**(4), 422—427. doi:10.1097/MCO.000000000000189.
- [15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5903-8.
- [16] AVIGAD, Gideon. Sucrose and Other Disaccharides. *Plant Carbohydrates I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1982, 217—347. doi:10.1007/978-3-642-68275-9\_7.
- [17] BLATNÁ, Jarmila. *Výživa na začátku 21. století, aneb, O výživě aktuálně a se zárukou*. Praha: Společnost pro výživu, 2005. ISBN 80-239-6202-7.
- [18] LUNN, John E. Sucrose Metabolism. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2008. doi:10.1002/9780470015902.a0021259.
- [19] PÁNEK, Jan. *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis, 2002. ISBN 80-863-2023-5.
- [20] ČERNÝ, Tomáš a Tomáš TRNKA. *Sacharidy*. Praha: SciTech, 1995. ISBN 80-901-3044-5.
- [21] LOMER, Miranda C. E., Gareth C. PARKES a Jeremy SANDERSON. *Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities*. 2008, **27**(2), 93—103. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x.
- [22] STRÁNSKÝ, Miroslav a Lydie PECHAN. *Fyziologie a patofyziologie výživy*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2014. ISBN 978-80-7394-478-0.
- [23] MAŠEK, Libor. *Potraviny a nápoje v kostce*. Úvaly: Ratio, [1997]. Gastronomie. ISBN 80-238-1585-7.
- [24] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Sacharidy pro funkční potraviny: probiotika - prebiotika - symbiotika*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000. ISBN 80-727-1001-X.

- [25] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [26] DOSTÁL, Jiří. *Lékařská chemie II: bioorganická chemie*. 2., zcela přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3789-X.
- [27] KROISOVÁ, Dora. *Biodegradovatelné polymery - úvod do problematiky*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. ISBN 978-80-7372-468-9.
- [28] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-802-0006-004.
- [29] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
- [30] IVANENKO, Nikolay, Alexander GANEEV, Nikolay SOLOVYEV a kol. Determination of trace elements in biological fluids. *Journal of Analytical Chemistry*. 2011, **66**(9), 78—799. doi: 10.1134/S1061934811090036.
- [31] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [32] MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1190-7.
- [33] SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., 3. vyd. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
- [34] STRASINGER, Susan King a Marjorie Schaub DI LORENZO. *Urinalysis and body fluids*. 6. vyd. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2014. ISBN 978-0803639201.
- [35] Spectrophotometry. *Chemistry Library* [online]. 2020 [cit. 2021-6-25]. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431>
- [36] BISHOP, Michael L., Edward P. FODY a Larry E. SCHOEFF, *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6. vyd. Baltimore: Wolters Kluwer, 2010. ISBN 978-1-4511-0900-9.
- [37] PERKAMPUS, Heinz-Helmut. *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlin: Springer, 1992. Springer laboratory. ISBN 978-3-642-77479-9.

- [38] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [39] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [40] SMOLKOVÁ, Eva a Ladislav FELTL. *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1991. ISBN 80-030-0604-X.
- [41] *Chromatografie* [online]. [cit. 2021-6-25]. Dostupné z: [http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11\\_chromatografie.pdf](http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf)
- [42] VOLKA, Karel. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [43] COUFAL, Pavel. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 1995 [cit. 2021-6-25]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [44] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. ISBN
- [45] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7647-6.
- [46] FISHER, Jan a Petr ČESLA. *Kapalinová chromatografie* [online]. [cit. 2021-6-25]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapalinova-chromatografie.pdf>
- [47] KŘÍŽEK, Martin a Jan ŠÍMA. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [48] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [49] BERGER, Andrew J., Irving ITZKAN a Michael S. FELD. Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1997, **53**(2), 287—292. doi:10.1016/S1386-1425(96)01779-9.

- [50] ENEJDER, Annika M. K., Tae-Woong KOO, Jeankun OH, a kol. Blood analysis by Raman spectroscopy. *Optics Letters*. 2002, **27**(22). doi:10.1364/OL.27.002004.
- [51] WANG, Qiaoyun, Guangfei WU, Peng SHAN, a kol. Detection of Whole Blood Glucose Concentration by Fourier-Transform Raman Spectroscopy and Artificial Neural Networks. *Proceedings of the 2017 7th International Conference on Applied Science, Engineering and Technology (ICASET 2017)*. Paris, France: Atlantis Press, 2017. doi:10.2991/icaset-17.2017.3. ISBN 978-94-6252-340-1.
- [52] BERGER, Andrew J., Tae-Woong KOO, Irving ITZKAN, a kol. Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. *Applied Optics*. 1999, **38**(13). doi:10.1364/AO.38.002916.
- [53] SILVEIRA, Landulfo, Rita de Cássia Fernandes BORGES, Ricardo Scarparo NAVARRO, a kol. Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. *Lasers in Medical Science*. 2017, **32**(4), 787—795. doi:10.1007/s10103-017-2173-2.
- [54] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 1999. ISBN 80-726-2023-1.
- [55] ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka, Pavla KRÁLOVCOVÁ a Roman KANĎÁR. *Laboratorní cvičení z obecné a klinické biochemie*. 2. doplněné vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2018. ISBN 978-80-7560-174-2.
- [56] AMBADE, Vivek, Yagya Valkya, SHARMA a Babu Lal SOMANI. METHODS FOR ESTIMATION OF BLOOD GLUCOSE: A COMPARATIVE EVALUATION. *Medical Journal Armed Forces India*. 1998, **54**(2), 131-133. doi:10.1016/S0377-1237(17)30502-6.
- [57] Glukóza (GOD-POD): Laboratorní příručka. *BioVendor* [online]. 2015 [cit. 2021-6-25]. Dostupné z: [https://www.biovendor.cz/download/16173/Navod\\_11601.pdf](https://www.biovendor.cz/download/16173/Navod_11601.pdf)
- [58] ANDREIS, Elisabeth, Kai KÜLLMER a Matthias APPEL. Application of the Reference Method Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry (ID/GC/MS) to Establish Metrological Traceability for Calibration and Control of Blood Glucose Test Systems. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2014, **8**(3), 508—515. doi:10.1177/1932296814523886.

- [59] ZHANG, Tianjiao, Chuanbao ZHANG, Haijian ZHAO, a kol. Determination of serum glucose by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a candidate reference measurement procedure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, **408**(26), 7403—7411. doi:10.1007/s00216-016-9817-0.
- [60] DZÚRIK, Rastislav. *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Martin: Osveta, 1996. ISBN 80-217-0256-7.
- [61] STRASINGER, Susan King a Marjorie Schaub DI LORENZO. *Urinalysis and body fluids*. 6. vyd. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2014. ISBN 978-0803639201.
- [62] NIKAKI, Kornilia a Girish GUPTA. *Assessment of intestinal malabsorption*. 2016, **30**(2), 225—235. doi:10.1016/j.bpg.2016.03.003.
- [63] MALÁT, Miroslav. *Kolorimetrie*. Praha: Československá akademie věd, 1956.
- [64] HERMIDA, Carmen, Oscar H. MARTÍNEZ-COSTA, Guillermo CORRALES, a kol. Improvement and Validation of d-Xylose Determination in Urine and Serum as a New Tool for the Noninvasive Evaluation of Lactase Activity in Humans. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2014, **28**(6), 478—486. doi:10.1002/jcla.21713.
- [65] SÁNCHEZ-MORENO, Israel, Carmen MONSALVE-HERNANDO, Ana GODINO, a kol. Analytical Validation of a New Enzymatic and Automatable Method for d-Xylose Measurement in Human Urine Samples. *BioMed Research International*. 2017, **2017**, 1—9. doi:10.1155/2017/8421418.
- [66] TASEVSKA, Natasa. *Urinary Sucrose and Fructose as Biomarkers for Sugar Consumption*. 2005, **14**(5), 1287—1294. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0827.
- [67] MACK, Carina I, Christoph H WEINERT, Björn EGERT, a kol. The complex human urinary sugar profile: determinants revealed in the cross-sectional KarMeN study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018, **108**(3), 502—516. doi:10.1093/ajcn/nqy131.
- [68] SONG, Xiaoling, Sandi L. NAVARRO, Pho DIEP, a kol. Comparison and validation of 2 analytical methods for measurement of urinary sucrose and fructose excretion. *Nutrition Research*. 2013, **33**(9), 696—703. doi:10.1016/j.nutres.2013.05.017.
- [69] VAN ROSSUM, Lyonne K., Karlien CRANSBERG, Yolanda B. DE RIJKE, Robert ZIETSE, Jan LINDEMANS a Arnold G. VULTO. Determination of inulin clearance by

- single injection or infusion in children. *Pediatric Nephrology*. 2005, **20**(6), 777—781. doi:10.1007/s00467-004-1782-8.
- [70] MARSILIO, Renzo, Paolo MANGHI, M NATURALE, a kol. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, **744**(2), 241—247. doi:10.1016/S0378-4347(00)00226-7.
- [71] PETKOVA, Nadezhda a Panteley DENEV. *Methods for determination of inulin*. University of Food Technologies, 2015. doi:10.13140/RG.2.1.1790.4088.
- [72] KIMATA, Shinsuke, Katsuhiko MIZUGUCHI, Shizuo HATTORI, Shinichi TESHIMA a Yoshimasa ORITA. Evaluation of a new automated, enzymatic inulin assay using d-fructose dehydrogenase. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2009, **13**(4), 341—349. doi:10.1007/s10157-009-0174-6.