

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Diplomová práce

Jedlý hmyz jako součástí jídelníčku pro osoby trpící dnou

Autor práce: Bc. Jana Matlášková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Jedlý hmyz jako součást jídelníčku pro osoby trpící dnou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. a Ing. Monice Sabolové, Ph.D. za cenné rady, za poskytnutí důležitých informací, konzultací a za pomoc při laboratorních měřeních a při psaní samotné diplomové práce.

Jedlý hmyz jako součástí jídelníčku pro osoby trpící dnou

Souhrn

V mé práci jsem se zabývala tématem jedlého hmyzu a obsahem purinových látek v něm. Zjištění obsahu purinových látek v hmyzu je důležité pro rozhodnutí, zda je vhodné jeho zařazení do nízkopurinové diety, která se používá jako jedna z léčebných postupů. Obsah purinů v potravinách je důležitý pro lidi trpící dnou. Dna je onemocnění, které je způsobeno zvýšenou hladinou močové kyseliny v krevním séru. Léčba tohoto onemocnění je možná medikací, nízkopurinovou dietou nebo kombinací obojího.

Pro zjištění hodnot purinů v jednotlivých potravinách, v našem konkrétním případě v jedlém hmyzu (cvrček domácí), jsem zjišťovala pomocí laboratorní metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nejdříve byla však nutná validace této metody. Použitá metoda byla dostatečně lineární, citlivá, přesná, správná a selektivní. Obsah purinových bází se pohyboval v rozmezí od 73 mg/100g vzorku u adeninu až po hodnotu 101 mg/100 g vzorku u hypoxantinu. Mezi těmito hodnotami se ještě pohyboval obsah guaninu s hodnotou 93 mg/100g vzorku a xantinu s hodnotou 80 mg/100 g vzorku.

Téměř všechny potraviny, které konzumujeme, obsahují puriny. Proto potraviny z pohledu obsahu purinů dělíme do tří skupin. Konkrétně na nízkopurinové potraviny, středně vysoké purinové potraviny a vysoko purinové potraviny. Vhodné je, aby jídelníček obsahoval třešně a nízkotučné mléčné výrobky. Jejich konzumací se snižuje hladina močové kyseliny v krevním séru. Podle našich výsledků by se jedlý hmyz (cvrček domácí) řadil do skupiny vysoko purinové potraviny.

Do budoucna bude potřeba více zkoumat jedlý hmyz z pohledu konkrétních látek v nich obsažených. Teprve poté budeme moci s vysokou mírou jistoty rozhodnout, zda je jedlý hmyz vhodný pro konzumaci z pohledu problematiky léčby dny a s tím spojeným snižováním hladiny močové kyseliny v krevním séru. Nejvýznamnější hodnotou, kterou je potřeba sledovat je obsah purinových bází (adeninu, guaninu, hypoxantinu a xantinu) v konkrétním hmyzu.

Klíčová slova: Dna, purinové látky, jedlý hmyz, kapalinová chromatografie, močová kyselina

Edible insects as part of a diet for people suffering from gout

Summary

In my dissertation, I dealt with an issue of edible insects and with associated purine compounds contained in them. A detection of the purine compounds is important for making any decision about suitability of an inclusion of the insects into a low-purine diet that is used as one of the methods of treatments. The content of purines in human food is important for people suffering from gout. The gout is a disease caused by an increased level of the uric acid in the blood. There are several methods of treatment of this disease: a medication, low-purine diet or by a combination of both.

For the discovery of levels of the purines, in our specific edible insect, the domestic cricket, I used the high performance, liquid chromatography method. First of all, a validation of this method was required. The used method was sufficiently linear, sensitive, accurate, reproducible and specific. The content of purines in the samples ranged from 73 mg/100 g for the adenine content to 101 mg/100 g for the hypoxanthine content. In between these values, there were the guanine (93 mg/100 g) and the xanthine (80 mg/100 g) contents in the measured sample.

Almost all of the foods we consume contain the purines. For that reason, we divide our foods into three groups based on purines content, specifically into a low-purine, medium-high-purine and high-purine groups. It is appropriate to include cherries and low-fat dairy products in our menu. By their consumption, the level of the uric acid in the blood stream is reduced. Based on our test results, the edible insect (the domestic cricket) belongs to the group of the high-purine foods.

In future, there will be a need to examine the edible insects for specific substances contained in them. Only then we will be able to decide, with a high degree of certainty, if the edible insects are suitable for consumption and a reduction of the uric acid levels in the blood. The most significant value, that is required to be watched, is the content of purines (i.e. adenine, guanine, hypoxanthine and xanthine) in the edible insects.

Keywords: Gout, purine compounds, edible insects, liquid chromatography, uric acid

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Puriny.....	9
3.1.1 Struktura purinů.....	9
3.1.2 Zástupci	10
3.1.3 Syntéza purinů.....	12
3.1.4 Odbourávání purinů	13
3.1.5 Puriny v potravinách	14
3.1.5.1 Puriny v mase	15
3.1.6 Stanovení purinů v potravinách	16
3.1.6.1 Chromatografické metody	16
3.1.6.2 Kapilární elektroforéza	18
3.2 Jedlý hmyz.....	19
3.2.1 Puriny v hmyzu	22
3.3 Dna	23
3.3.1 Charakteristika onemocnění	23
3.3.2 Patogeneze.....	24
3.3.3 Klinické projevy	25
3.3.4 Diagnostika.....	26
3.3.5 Léčba	26
3.3.5.1 Srovnání urikogenního působení purinových bází	29
4 Materiál a metody.....	31
4.1 Chemikálie a činidla.....	31
4.2 Použité přístroje a pomůcky	31
4.3 Vzorky	32
4.4 Příprava roztoků k analýze.....	32
5 Výsledky.....	35
5.1 Validace metody.....	35
6 Diskuze.....	40
7 Závěr	43
8 Seznam použité literatury	44
9 Seznam obrázků	52
10 Seznam tabulek	53

1 Úvod

Tato diplomová práce pojednává o využití jedlého hmyzu při onemocnění dnou. Dna je metabolické onemocnění, na kterém se může podílet, jak genetická predispozice, tak nevhodný jídelníček spojený se špatnou funkcí enzymu urikázy. Dříve se ji říkalo nemoc králů proto, že je způsobena nadměrnou konzumací masa a alkoholu, kterou si v dřívějších dobách mohli dovolit právě jen králové a bohatí. Tato nemoc je známá již od starověkého Řecka od Hippokrata. Tehdy byl zaznamenán první popis nemoci.

Dna se projevuje nahromaděním močové kyseliny, díky nedostatečnému odbourávání purinů. Tato kyselina se hromadí hlavně v menších kloubech horních a dolních končetin a to ve formě krystalků, které mohou způsobit nepříjemnou bolest, při jejich zabodávání do kloubů. V některých případech dochází až k zánětům kloubů a dnavým záchvatům.

V České republice postihuje toto onemocnění zhruba 10 % populace a to hlavně muže ve věku nad 40 let. Prevalence tohoto onemocnění stoupá s věkem. Ve vyspělých zemích toto onemocnění postihuje zhruba 1-4 % populace dospělých.

Jedlý hmyz je budoucností našich jídelníčků, vzhledem k rostoucímu počtu lidské populace. Existuje přes 2000 druhů jedlého hmyzu, který konzumuje přes 2 miliardy lidí hlavně v Asii, Africe a v Latinské Americe. Postoj Evropanů ke konzumaci jedlého hmyzu je poměrně konzervativní a k jeho konzumaci dochází ve většině případů jen v rámci experimentálních restaurací. Jedlý hmyz je konzumován nejen kvůli nutriční hodnotě, ale i kvůli jeho chuti. Hmyz má uspokojivý obsah energie a je snadno dostupným zdrojem bílkovin, lipidů, sacharidů, některých vitaminů a minerálních látek.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Jedlý hmyz jako potravina nového typu je vhodný pro osoby trpící dnou.

Cílem mé diplomové práce bylo v teoretické části zpracovat literární rešerši, ve které jsem se zaměřila na obsah základních živin a hlavně purinových látek u jednotlivých druhů jedlého hmyzu. V praktické části jsem u vybraných druhů jedlého hmyzu sledovala pomocí kapalinové chromatografie obsah purinových látek. Tyto hodnoty jsem navzájem porovnávala a v diskuzi rozebrala vhodnost konzumace jedlého hmyzu u osob trpících dnou.

3 Literární rešerše

3.1 Puriny

Puriny se nacházejí v jádru jakékoliv rostlinné nebo živočišné buňky. Jsou to specifické typy molekul tvořené atomy uhlíku a dusíku, které se nacházejí v buněčné DNA a RNA (jelikož jsou součástí nukleových kyselin). V podstatě jsou puriny základními kameny všech živých bytostí (Frank, 2014). Jak již bylo řečeno, jsou součástí nukleových kyselin, ve kterých jsou zastoupeny hlavními purinovými bázemi adeninem a guaninem. Tyto báze jsou spojeny pomocí vodíkových můstků s pyrimidinovými bázemi, mezi které patří cytosin, uracil a thymin. Jak puriny, tak pyrimidiny jsou nezbytné pro přenos genetické informace, patří mezi hlavní biomolekuly pro skladování energie ve formě ATP (adenosintrifosfát) a GTP (guanosintrifosfát), účastní se buněčné signalizace v cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a v cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) dále působí jako kofaktory pro mnoho enzymů (Chitrakar et al., 2017).

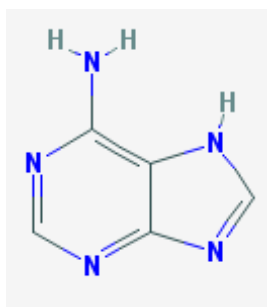
Puriny přítomné v lidském těle lze rozdělit do dvou kategorií. Endogenní puriny vznikající *in vivo* při odbourávání buněk v těle a exogenní puriny, které vstupují do těla skrz dietní expozici. Jak endogenní tak exogenní puriny pocházející z dietního příjmu, jsou v lidském organismu metabolizovány játry, které rozkládají puriny a produkují odpadní produkt nazývaný močová kyselina. Tato kyselina je uvolňována do krevního oběhu a nakonec je filtrována ledvinami a vylučována močí. (Frank, 2014).

3.1.1 Struktura purinů

Z chemického hlediska jsou puriny, heterocyklické aromatické organické sloučeniny sestávající z pyrimidinového kruhu fúzaného k imidazolovému kruhu. Puriny jsou jednoduché hydroxy, amino nebo methylové deriváty hlavního purinového kruhu (Faeron, 2014; Chitrakar et al., 2017). Hydroxypuriny, mezi které patří hypoxanthin a xantin, se vyskytují v tkáních a tkáňových tekutinách mnoha zvířat. Močová kyselina je hlavním dusíčnanovým exkrečním produktem a je vždy přítomna v moči savců. Amino puriny, mezi které patří adenin a guanin, jsou komponenty nukleových kyselin a nukleosidů. Methyl puriny (např. kofein tj. 1,3,7-trimetylxantin) jsou charakteristické alkaloidy čaje, kávy a kakaa. Hydroxy a amino puriny jsou odvozeny hlavně z nukleoproteinů (složených proteinů, u kterých je nebílkovinnou složkou nukleová kyselina) pocházejících ze stravy, ačkoli existuje důkaz, že organismus může syntetizovat purinový kruh z aminokyseliny histidin (Faeron, 2014).

3.1.2 Zástupci

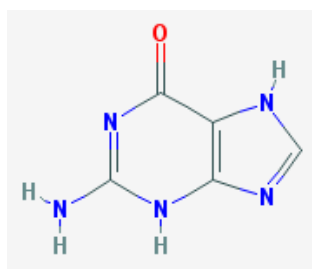
Adenin, sumárním vzorcem $C_5H_5N_5$, je jedním ze základních stavebních kamenů DNA a RNA. Molekula adeninu obsahuje šestičlenný (purinový) a pětičlenný (imidazolový) kruh, které jsou mezi sebou spojeny. Tato molekula má 5 různých aktivních míst ve formě dusíku a k uhlíku v pozici 6 je připojena aminová skupina (Rad et al., 2017). Adenin se účastní různých procesů v živých organismech, jako je například energetická transdukce (přenos genetického materiálu z jedné buňky do druhé, pomocí bakteriofága). Slouží jako metabolický kofaktor a účastní se buněčné signalizace. Adenin má také významnou úlohu při syntéze bílkovin (Švorc a Kalcher, 2014).



Obrázek 1: adenin

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/190>

Guanin, sumárním vzorcem $C_5H_5N_5O$, podobně jako adenin, patří k dusíkatým bázím purinového typu. V RNA se nachází ve formě ribonukleotidového zbytku a v DNA ve formě deoxynukleotidového zbytku. Guanin se váže pomocí tří vodíkových můstků z pyrimidinovým cysteinem a tvoří spolu s dalšími bázemi genetický kód (Somerville, 2013).

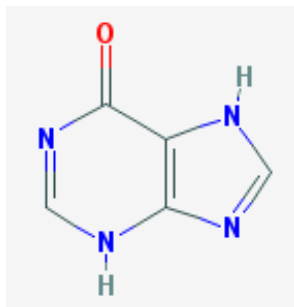


Obrázek 2: guanin

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/764>

Hypoxantin, sumárním vzorcem $C_5H_4N_4O$, patří mezi purinové heterocyklické sloučeniny. Skládá se z atomů dusíku a kyslíku. Jeho molekula obsahuje pyrimidinový a imidazolový kruh (Huang et al., 2015). Hypoxantin se kumuluje v biologických tkáních, neboť je hlavním metabolitem degradace adeninových nukleotidů v biologických materiálech (Devi et al., 2013). Hypoxantin se nachází nejen v tkáních, ale i v tělních tekutinách, jako je

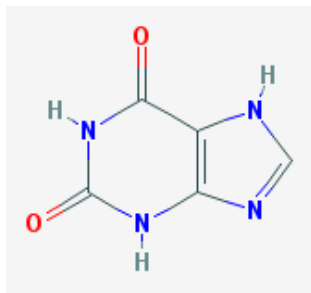
krev a moč. Je to nejčastěji mutagenní purinová báze, která vzniká z přeměny adenosin-5-trifosfát na adenosin-5-monofosfát (Xie et al., 2008).



Obrázek 3: hypoxantin

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/790>

Xantin, sumárním vzorcem $C_5H_4N_4O_2$, je purinová báze vznikající katabolismem guaninu a adenosin-3-fosfátu. Nejdříve je ATP hydrolyzována za vzniku adenosinu, následně se přemění na inosinmonofosfát, inosin, hypoxantin, xantin a ten je poté enzymaticky přeměněn pomocí xanthinoxidázy na močovou kyselinu (Dervisevic et al., 2017). Xantin může být také vytvořen z guaninu pomocí guanindeaminázy. Koncentrace xantinu v lidských tělních tekutinách se používá jako marker patologických stavů jako je xanthinurie (zvýšené vylučování xantinu močí), renální nedostatečnost (selhání ledvin) nebo dna. V potravinářském průmyslu může jeho monitorování také sloužit pro hodnocení čerstvosti nebo znehodnocení masa (Dalkiran et al., 2017).

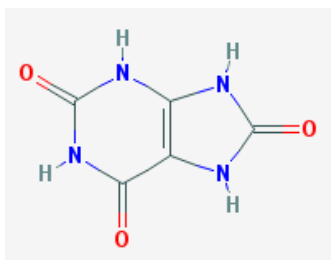


Obrázek 4: xantin

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1188>

Močová kyselina, sumárním vzorcem $C_5H_4N_4O_3$ je jednou z nejdůležitějších sloučenin dusíku v tělech zvířat a rostlin. Skládá se z 2,6,8 trihydroxypurinu, který za fyziologických podmínek lze snadno převést na odpovídající urát (sůl kyseliny močové) (Hafez et al., 2017). Močová kyselina, která je nejvíce syntetizována hlavně v játrech, střevech, svalech a ledvinách, je konečným produktem hlavně exogenních (dietárních) purinů získaných převážně

z živočišných zdrojů bílkovin a také z umírajících buněk, které degradují nukleové kyseliny, adenin a guanin (Ridi a Tallima, 2017).

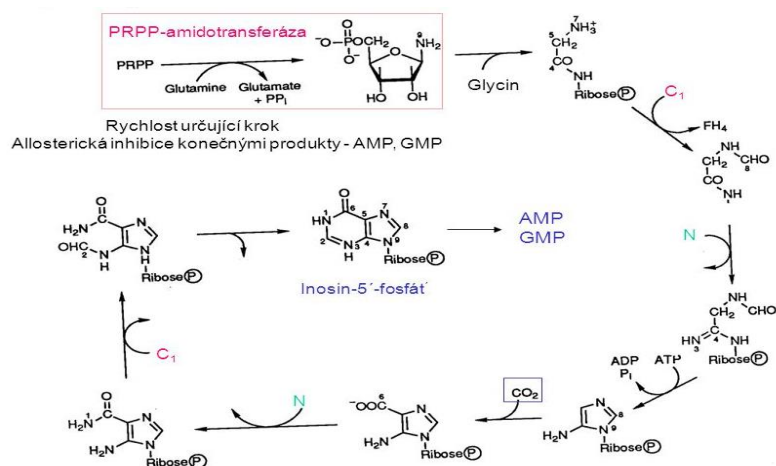


Obrázek 5: močová kyselina

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1175>

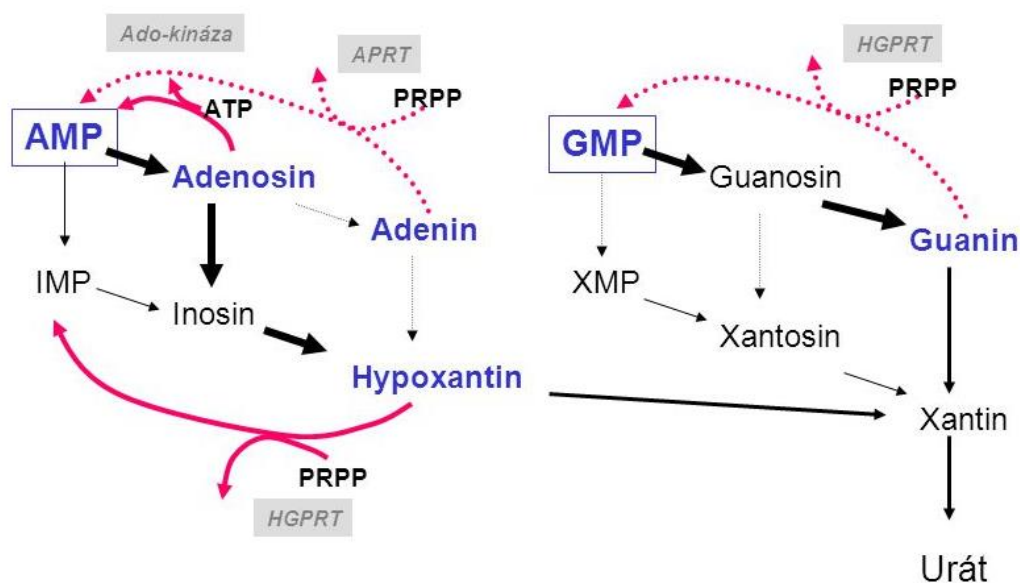
3.1.3 Syntéza purinů

Syntéza purinů probíhá dvěma způsoby (záchranná biosyntéza a *de novo*). Ústředním produktem obou cest je kyselina inosinová (IMP, inosinmonofosfát) (Nyhan, 2005). Záchranná cesta je mechanismus s nízkým energetickým využitím (syntéza nukleotidů je energeticky náročná - nukleové báze se zcela neodbourávají, využijí se znovu), který využívá předem vytvořené báze (adenin, guanin, hypoxanthin) nahromaděné v důsledku degradace nukleotidů pro udržení purinové hladiny za normálních buněčných podmínek. Pokud se však zvyšuje potřeba purinů během buněčného růstu, je nezbytná biosyntetická dráha *de novo* (Chitrakar et al., 2017). Touto cestou se vytváří fosforylované kruhové struktury z jednoduchých prekurzorů jako je CO_2 , glycin a glutamin (Nyhan, 2005). Purinové kruhy jsou syntetizovány na platformě ribosa-5-fosfátu za vzniku nukleotidů. Syntéza *de novo* probíhá v 10 enzymatických krocích (Kumari, 2018). Zatímco bakterie používají deset až dvanáct enzymů k dokončení přeměny PRPP (fosforibosylpyrofosfát) na IMP, lidé používají pouze šest. Jedná se o 3 monofunkční enzymy (PPAT, FGAMS a ASL), 2 bifunkční enzymy (PAICS a ATIC) a jeden trifunkční enzym (TGART) (Chitrakar et al., 2017).



Obrázek 6: Syntéza purinového skeletu de novo

Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/5643219/>



Obrázek 7: Pomocné cesty syntézy purinových nukleotidů

Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/5643219/>

3.1.4 Odbourávání purinů

Odbourávání adeninu a guaninu na močovou kyselinu se účastní mnoho enzymů (Maiuolo et al., 2016). Purinový katabolismus začíná degradací nukleových kyselin na nukleotidy a nukleosidy (Blanco a Blanco, 2017). Zpočátku se adenosinmonofosfát (AMP) převede na inosin prostřednictvím dvou různých mechanismů. Buď je nejprve odstraněna aminoskupina deaminázou za vzniku inosinmonofosfát (IMP) a pak následuje defosforylace s nukleotidázou za vzniku inosinu, nebo je nejprve odstraněna fosfátová skupina nukleotidázou za vzniku adenosinu a následnou deaminací vznikne inosin.

Guanosinmonofosfát (GMP) se přemění na guanosin pomocí nukleotidázy. Nukleosidy guanosin a inosin se dále převedou na purinovou bázi hypoxantin a guanin za účasti purinové nukleosid fosforylázy. Hypoxantin se potom oxiduje xantin-oxidasou za vzniku xantinu a guanin se deaminuje xantin-deaminázou za vzniku xantinu (Maiuolo et al., 2016). Xantin, který je tvořen jak adeninem, tak guaninem, je oxidován na konečný produkt močovou kyselinu, která se vylučuje močí prostřednictvím ledvin (Blanco a Blanco, 2017).

3.1.5 Puriny v potravinách

Tabulka 1: Obsah purinů v potravinách (mg/100 g) dle Chlupa (2009)

Ovoce		Mléko, vejce	
Borůvky	2	Mléko	1
Hrušky	1	Vejce	2
Jablka	1	Bílek	1
Jahody	5	Žloutek	5
Meruňky	0	Maso, uzeniny	
Švestky	1	Telecí	48
Hroznové víno	1	Vepřové	48
Pomeranč	1	Kuřecí	40
Zelenina		Králičí	38
Zelený hrášek	80	Skopové	46
Kapusta	6	Zvěřina	35 – 39
Květák	10	Šunka	24
Špenát	23	Anglická slanina	25
Zelí	5 – 8	Ryby	
Ředkvičky	6	Kapr	54
Mrkev	2	Losos	22
Rajčata	4	Pstruh	56
Luštěniny		Sardinky	120
Čočka	70	Sled'	69
Hrách	45	Štika	48
Fazole	44	Vnitřnosti	
Mouka, pekárenské výrobky		Játra	95
Žitná, pšeničná mouka	0	Ledvinky	80
Celozrnný chléb	14	Jazyk	55
Bílé pečivo	8	Telecí brzlík	400
Ovesné vločky	30		

Tabulka 2: Obsah purinů ve vegetariánských „masech“ (mg/100 g) dle Havlík et al. (2010)

Potravina	Obsah
Párek veget'ák	122,9
Sójový granulát	203,6
Šmakoun uzený	13,1
Tofu burger	173,8
Párky vegetariánské	44
Vegetariánské hovězí maso	132
Vegetariánská pikantní klobása	65,6
Vegetariánské nugety	94,4
Vegetariánská sekaná	138,5

Tabulka 3: Obsah purinů v potravinách (mg/100 g) dle Kaneko et al. (2014)

Potravina	Obsah
Vejce a mléčné výrobky	< 13
houby	2,1 - 3
70 % druhů zeleniny	< 50
petržel	289
Kuřecí játra	312
Hovězí játra	220
Vepřová játra	285
Ryby	> 100

3.1.5.1 Puriny v mase

Rong et al. (2015) se ve své studii zabývali obsahem purinů v různých částech vepřového a hovězího masa za použití vysoko účinné kapalinové chromatografie. Výsledky ukázaly, že celkové množství purinů ve vepřové a hovězí svíčkové, bylo vyšší než v ostatních částech. Hlavními purinovými bázemi byly hypoxantin a adenin. Obsah hypoxantinu byl ve všech vzorcích nejvyšší. Vzhledem k vysokým hodnotám purinů ve vepřovém a hovězím mase autoři doporučují lidem trpícím dnou vyhnout se jeho nadměrné konzumaci.

Clariana et al. (2010) se ve své studii zaměřili na stanovení sedmi purinových a pyrimidinových bází (inosin, guanosin, adenosin, hypoxantin, xantin, močová kyselina a uridin) ve vepřovém mase (vařená šunka, sušená šunka, vepřové maso). Hypoxantin a inosin byly hlavními bázemi ve všech vzorcích s nejvyšší koncentrací hypoxantinu v sušené šunce a inosinu ve vařené šunce. Koncentrace těchto bází se pohybovaly v rozmezí 721–469 µg/g

u inosinu a 33–77 $\mu\text{g/g}$ u hypoxantinu. Koncentrace guanosinu byla 7 $\mu\text{g/g}$ a močové kyseliny 16 $\mu\text{g/g}$. V sušené šunce se ve srovnání se syrovým vepřovým masem zvýšila koncentrace téměř všech bází, kromě inosinu. Podobně i vzorky vařené šunky ukázaly zvýšení obsahu všech bází, v tomto případě včetně inosinu, v porovnání se syrovým vepřovým masem. Množství bází v jednotlivých vzorcích souvisí i se stářím masa, neboť koncentrace hypoxantinu se zvyšuje s dobou stárnutí.

Brulé et al. (1989) ve své studii sledovali celkový obsah purinů i obsah jednotlivých bází v čerstvém a tepelně upraveném (vaření, pečení) mase (hovězí steak, hovězí játra, treska). Syrová a vařená hovězí játra obsahovala nejvyšší hladiny volných i celkových purinových bází. Jak vaření, tak pečení, vedlo ke zvýšení množství volného nebo celkového adeninu a guaninu ve steaku a v játrech. Hladina volného hypoxantinu se zvýšila jen v hovězím steaku. V tresce byly po tepelné úpravě pozorovány jen malé změny v hladinách volných a celkových purinů.

Lawal a Adeloju (2010) uvádí, že hypoxantin se akumuluje v biologických tkáních, jelikož je hlavním metabolitem degradace adeninových nukleotidů v biologických materiálech. Jakmile ryba zemře, nebo je chycena, začne docházet k jejímu znehodnocení, jelikož ve svazech ryb dochází při úmrtí k degradaci nukleotidů, která pokračuje po celou dobu skladování. V raných stádiích dochází k rozpadu ATP v rybích svazech. Výsledkem je uvolňování ADP a dalších produktů, jako jsou AMP, IMP, inosin a močová kyselina, které vznikly při jejím rozkladu. IMP je jedním z hlavních faktorů přispívajících k příjemné chuti čerstvých ryb, zatímco akumulace hypoxantinu/xantinu během skladování přispívá k nepříjemné chuti. Koncentrace hypoxantinu, která byla zjištěna u třech různých vzorků během 7 dnů vzrostla z 2,1 až na 8,7 $\mu\text{mol/g}$.

3.1.6 Stanovení purinů v potravinách

3.1.6.1 Chromatografické metody

Chromatografie je důležitá biofyzikální technika, která umožňuje separaci, identifikaci a čištění složek směsi pro kvalitativní a kvantitativní analýzu (Cosken, 2016). Tuto metodu objevil ruský botanik Michail S. Tsvet v roce 1901, když poznal fyzikálně-chemický základ separace a aplikoval ji na rostlinném pigmentu (karotenoidy, chlorofyly). Chromatografie slouží k oddělení jednotlivých složek vzorku mezi pohyblivým proudem tekutiny nazývaným mobilní fází a stacionární fází (Giddings a Keller, 2016). Mobilní fází může být kapalina (v případě kapalinové chromatografie) nebo plyn (v případě plynové chromatografie), zatímco stacionární fáze může být kapalina nebo obvykleji pevná látka. Oblast chromatografie může

být rozdělena nebo uspořádána několika různými způsoby podle fyzikálně chemických principů separace nebo podle různých použitých postupů. Vzhledem k tomu, že povaha interakcí mezi molekulami rozpuštěné látky a mobilními nebo stacionárními fázemi se liší, mají tyto metody schopnost oddělit různé druhy molekul. Stacionární fáze je vybrána tak, aby umožňovala diferenciální interakci se složkami vzorku, který má být separován (Nielsen, 2017).

Chromatografické metody jsou velmi účinné při separaci a identifikaci malých molekul jako jsou aminokyseliny, sacharidy a mastné kyseliny. Plynová a kapalinová chromatografie se používá při separaci alkoholů, esterů, lipidů, aminoskupin a dále také slouží k pozorování enzymatických interakcí (Coskun, 2016).

Plynová chromatografie je technika separace založená na vzájemných interakcích mezi mobilní fází (nosný plyn) a stacionární fází. V dnešní době je vyspělou metodou separace s vysokou separační účinností, citlivostí, dobře provedenou selekcí (Sun et al., 2016) a nízkou mezí detekce (Siddiqui et al., 2017). Nosný plyn musí být vždy suchý, zbavený kyslíku a musí být chemicky inertní. Jako nosný plyn se nejčastěji využívá hélium a dusík. Hélium bývá používáno častěji, protože je bezpečnější, má větší rozsah průtoků a je kompatibilní s mnoha detektory. V závislosti na požadovaném výkonu a použitém detektoru lze jako nosný plyn použít i argon a vodík (Thet a Woo, 2015). Mobilní fáze, která je inertním plynem, prochází kolonou pod vysokým tlakem. Vzorek, který má být analyzován se odpaří a vstoupí do plynné fáze (mobilní fáze). Složky obsažené ve vzorku jsou rozptýleny mezi mobilní fází a stacionární fází na pevném nosiči (Coskun, 2016).

Kapalinová chromatografie je technika, která se používá k oddělení vzorku od jednotlivých částí. Tato separace nastává na základě interakcí vzorku mezi mobilní a stacionární fází. Protože existuje mnoho kombinací stacionární a mobilní fáze, které lze použít pro oddělení směsi, existuje několik různých typů chromatografie, které jsou klasifikovány na základě fyzikálních stavů těchto fází (Betancourt a Gottlieb, 2017). Rozpuštěné látky jsou rozděleny mezi dvě kapalně fáze podle jejich rozdělovacího koeficientu. Rozdělovací systém je ovládán změnou povahy dvou kapalných fází, obvykle kombinací rozpouštědel nebo úpravou pH pufrů. Většinou polárnější ze dvou kapalin je držena na inertním nosiči stacionární fáze a méně polární rozpouštědlo se používá k eluci složek vzorku (Nielsen, 2017).

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) slouží k separaci a identifikaci aminokyselin, sacharidů, lipidů, nukleových kyselin, proteinů, steroidů a dalších biologicky aktivních molekul. Při HPLC mobilní fáze prochází kolonou pod 10–400 atm (atmosfér) tlaku a vysokou průtokovou rychlostí 0,1–5 cm/s (Coskun, 2016). Základními komponentami HPLC systému jsou – čerpadlo, nástríkové zařízení, kolona, detektor a počítač (Nielsen, 2017).

V tabulce č. 4 můžeme vidět přesné podmínky analýzy při stanovení purinů pomocí HPLC podle jednotlivých autorů.

Tabulka 4: Příklady chromatografických podmínek při stanovení purinů

Vzorek	MF	SF	Detektor	Citace
Maso	10mM mravenčan amonný a methanol (99:1)	Luna (20 mm x 5 mm x 0,25 μm), 30°C	UV	Rong et al. (2015)
Larvy hmyzu, vaječný bílek, kuřecí prso	0,05M hydrogenfosforečnan amonný (pufr) a acetonitril (pH 7,78)	Luna (5 μm, 25 cm x 0,46 cm), 35°C	UV	Bednářová et al. (2013)
Moč	0,01M fosforečnan draselný (pufr) a metanol (gradientová eluce od 0 do 20 %, pH 5,5)	Supelcosil LC- 18 (250 mm x 4,6 mm ID x 5 μm), pokojová teplota	UV	Di Pietro et al. (2001)
Potraviny (cereálie, fazole, mořské řasy, sójové produkty)	150mM fosforečnan sodný (pufr), (pH 2,5 – 2,8)	Shodex Asahipak GS- 320HQ 7,6 mm x 300 mm, 35°C	UV	Kaneko et al. (2014)
Náhražky masa	50mM dihydrogenfosforečnan draselný (isokratická eluce)	Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), 35°C	UV	Havlík et al. (2010)

3.1.6.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce výkonná separační metoda běžně používaná pro analýzu biologických vzorků, jako jsou polypeptidy, aminokyseliny, bílkoviny, lipidy a fragmenty DNA, kvůli rychlým časům analýzy a malým objemům vzorků (Durney et al., 2015). Kapilární elektroforéza byla zavedena v 80. letech. Využívá kapiláry s úzkými otvory, které umožňují velmi účinné oddělení molekul (velké i malé). Dělení je založeno na rozdílech

v elektroforetické mobilitě rozpuštěných látek v elektroosmotickém toku roztoku elektrolytu pod vysokým napětím (Ben et al., 2015). U elektroforézy je hnací silou elektrické pole, které vyvíjí různé síly na různé látky, které jsou iontově nabitě (Giddings a Keller, 2016). Mechanismus separace v CE je podobný mechanismu při tradiční gelové elektroforéze, ve které nabitě molekuly migrují směrem k opačnému pólu a jsou od sebe odděleny pod elektrickým polem na základě molekulové hmotnosti. Dělení v systému CE se však může rychle provádět pod vysokým napětím, protože se používá kapilára o malém průměru. Získané údaje jsou ve formě elektroferogramu, který se podobá chromatogramu získaného pomocí HPLC (Ban et al., 2015). CE umožňuje dělení strukturně podobných molekul, dále poskytuje nízkou spotřebu vzorku materiálu a pufrů, krátký čas analýzy a vysoký stupeň automatizace. Také lze u této metody upravit různé faktory, které vedou ke zlepšení rozlišení. Mezi negativa této metody patří relativně špatná opakovatelnost, reprodukovatelnost a citlivost (Nowak et al., 2017). Přístroje kapilární elektroforézy obvykle využívají absorbanci, laserovou flouescenci nebo hmotností spektrometrii pro detekci a analýzu (Huge et al., 2014).

Například Wang a Ren (2004) využili kapilární elektroforézu s UV detektorem k analýze purinových a pyrimidinových bází ve standardech. Chen et al. (2002) použil k analýze močové kyseliny v moči a adenin a guanin ve spermatu (v DNA) kapilární elektroforézu v kombinaci s elektrochemickou detekcí.

3.2 Jedlý hmyz

Maso hraje důležitou roli ve spotřebě potravin většiny západních zemí. Konzumace potravin na bázi živočišného původu se od šedesátých let zvýšila po celém světě, a to především díky smyslovým vlastnostem masa, zvýšené produkci masného průmyslu, zvýšení průměrného celosvětového příjmu potravin a životní úrovni v rostoucí populaci, která se mění v závislosti na preferovaných potravinách. Uvádí se, že spotřeba masa by se měla v příštích třiceti letech, více než zdvojnásobit (Megido et al., 2016). Proto se předpokládá, že v budoucnu bude hmyz tvořit podstatnou část potravinářského trhu, jakožto alternativní zdroj bílkovin. Hmyz se pravidelně konzumuje v mnoha zemích po celém světě, avšak v západních zemích je spotřeba jedlého hmyzu omezena jen na experimentální restaurace, jako lahůdka a jako součást speciálních potravin, které obsahují bílkoviny z hmyzu (Gere et al., 2017). V současnosti žije na světě přibližně 870 milionů podvyživených lidí. Jedlý hmyz by jako potravina mohl pomáhat rozvojovým zemím podporovat jejich potřeby základních složek stravy, mohl by ale také poskytovat doplňkové potraviny pro populace rozvinutých zemí (Zielińska et al., 2015). Hmyz se považuje za potravinu s uspokojivým obsahem energie, bílkovin, dobrým profilem

aminokyselin, mastných kyselin a s vysokým obsahem nejrůznějších mikroživin (Ca, Fe, Zn) a vitaminů (Gere et al., 2017). Zpráva z FAO (Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství) z roku 2013 vysvětluje výhody konzumace bílkovin hmyzu ve srovnání s bílkovinami z hospodářských zvířat. Mnoho komerčních potravinářských produktů je ve skutečnosti obohaceno o bílkoviny získané z luštěnin, přitom bílkovina z hmyzu by byla lepší z hlediska nutričních vlastností, jelikož obsahuje všechny esenciální aminokyseliny. Kromě toho je hmyz více bohatší na bílkoviny než například fazole, čočka nebo sója (Zielińska et al., 2015). Podle FAO je první z výhod využití hmyzu jako potravin pro člověka ekologický přínos v chovu hmyzu. Hmyz vyžaduje pouze nízký příjem krmiva, a navíc se může chovat na vedlejších organických produktech lidského a živočišného odpadu. Hmyz vykazuje méně emisí v podobě skleníkových plynů a méně čpavku než skot nebo prasata. Oproti chovu dobytka vyžaduje hmyz podstatně méně půdy a vody. Ve srovnání se savci a ptáky, může hmyz představovat mnohem menší riziko v přenosu zoonóz (přenosné infekce mezi zvířaty a lidmi). Další z výhod je nutriční hodnota jedlého hmyzu, vysoký obsah tuku, bílkovin, vitaminů, vlákniny a minerálních látek. Jedlý hmyz by se mohl stát součástí krmiv. Dostupné důkazy naznačují, že krmivo na bázi hmyzu je srovnatelné s rybí moučkou či sójovou krmnou výživou. V rozvojových zemích se mohou někteří nejchudší členové společnosti snadno zapojit do shromažďování, chování, zpracování a prodeje hmyzu. Mohou ho využít jak ke stravování, tak k prodeji (Huis et al. 2013 FAO)

Hmyz má také pozitivní vliv na životní prostředí. Hraje důležitou roli při biodegradaci odpadu a jako opylovač v reprodukci rostlin. Kromě toho má vysokou účinnost na konverzi krmiva. Jejich produkce je méně závislá na půdě než konvenční hospodářská zvířata, což z nich činí potraviny a krmivo šetřící zdroje. Je pravděpodobné, že produkují méně skleníkových plynů a potřebují významně méně vody než konvenční hospodářská zvířata (Nowak et al., 2016).

Hromadění nebezpečných chemických látek (dioxiny, retardéry hoření, polychlorované bifenyly, organochlorové pesticidy, DDT, hexachlorcyklohexany, hexachlorbenzen) a těžkých kovů v těle hmyzu můžeme zařadit mezi rizika související s jeho konzumací. Zatím ale nejsou zveřejňovány údaje o nebezpečných chemických látkách u chovaného hmyzu a v potravinách na bázi hmyzu. Na akumulaci kontaminantů může mít vliv to, o jaký druh hmyzu jde, jakým způsobem probíhá jeho produkce a na složení jeho výživy (Poma et al., 2017). Hmyz je schopen syntetizovat přírodní toxiny (karboxylové kyseliny, alkoholy, aldehydy, alkaloidy, ketony atd). Například dospělci potemníka moučného produkují toxické chinony. Proto je při výběru důležité myslet na to, v jaké metamorfozní fázi hmyz právě je. Stejně jako u ostatních potravin

se i u jedlého hmyzu vyskytují alergické reakce. Bílkoviny hmyzu mohou vykazovat zkříženou alergii s krevetami a roztoči. Roztoči se běžně vyskytují v domácím prachu (Spiegel, 2016).

Vzhledem k široké škále jedlých druhů hmyzu je jeho výživová hodnota velmi variabilní. Dokonce i ve stejné skupině druhů se nutriční hodnoty mohou lišit v závislosti na jeho metamorfní fázi, jeho životním prostředí a na jeho stravě. Mezi celosvětově nejčastěji konzumovaný hmyz patří brouci (Coleoptera) 31 %, housenky (Lepidoptera) 18 %, včely, vosy a mravenci (Hymenoptera) 14 %. Za nimi jsou v pořadí sarančata, kobylky a cvrčci 13 %, cikády, svítilky, červci, ploštice (Hemiptera) 10 %, termiti (Isoptera), vážky 3 % a další druhy 5 %. Odhaduje se, že více než dvě miliardy lidí spotřebují více než 2000 druhů hmyzu asi v 80 zemích Asie, Afriky a Latinské Ameriky (Zielińska et al., 2015). Ve většině evropských zemí je konzumace jedlého hmyzu velmi nízká a často kulturně nevhodná nebo dokonce tabu (Kouřimská a Adámková, 2016). Marberg et al. (2017) uvádí, že v Evropě jsou dostupné tyto druhy hmyzu: larvy bráněnky (*Hermetia illucens*), cvrček domácí (*Acheta domestica*), cvrček stepní (*Gryllus assimilis*), kobylky (*Ensifera*) a potěmník moučný (*Tenebrio molitor*).

Obsah bílkovin se liší podle druhů hmyzu, ale obecně mají vysokou kvalitu a jsou dobře stravitelné. Analýza ukázala, že u vejce, larvy, kukly a dospělce se obsah bílkovin v sušině pohybuje od 15 do 81 %. Obsah bílkovin u některých druhů hmyzu může být dokonce vyšší než ve vejcích nebo mase. Obsah tuku se obvykle pohybuje mezi 10–50 %. To závisí například na druhu hmyzu, reprodukčním stádiu, věku, pohlaví, lokalitě nebo stravě. V larvách a kuklách bývá obvykle obsah tuku vyšší než v dospělci. Ve srovnání s živočišnými tuky obsahuje jedlý hmyz vyšší podíl esenciálních mastných kyselin (MK). Sacharidy v hmyzu tvoří hlavně chitin, jehož obsah se pohybuje od 6,71 % do 15,98 %. Chitin je makromolekulární sloučenina, která má vysokou nutriční a zdravotní hodnotu. Jedlý hmyz je dále bohatý na minerální prvky, jako je draslík, sodík, vápník, měď, železo, mangan a fosfor. Obsah vitaminů v hmyzu ještě není plně prozkoumán, ale je známo, že obsahuje hlavně karoteny, a vitaminy B₁, B₂, B₆, D, E, K a C. Pokud jde o vitamin A, data se liší nejen v závislosti na druhu, ale také v závislosti na původu, používaných metodách analýzy a způsobu přípravy (Mlcek et al., 2014).

Rumpold a Schlüter (2013) uvádí že, průměrný obsah vlákniny termitů (Isoptera) činí 5 %, u ploštic (Hemiptera) 14 % a nejvyšší obsah mají černí mravenci (*Polyrhachis vicina*) a larvy můry *Latebraria amphipyrioides* 29 %. Průměrný energetický obsah jedlého hmyzu se pohybuje v rozmezí od 410 do 509 kcal/100 g sušiny. Nejvyšší energetickou hodnotu (762 až 777 kcal/100 g) měl *Phasus triangularis* (Lepidoptera). Obsah bílkovin, které představují hlavní složku živinového složení hmyzu, činí u termitů 35 % a u cvrčků, kobytek a sarančat (Orthoptera) 61 %. Nejvyšší obsah bílkovin, až kolem 70 %, byl sledován u druhů *Melanoplus*

Femurrubrum (kobyłka), *Sphenarium histrio* (saranče) a *Melanoplus mexicana* (kobyłka). Hmyz, zejména sarančata, tak představují potencionálně vynikající alternativní zdroj bílkovin. Průměrný obsah tuku se pohybuje od 13 % u Orthoptera, 33 % u Coleoptera, 30 % u Hemiptera, 33 % u Isoptera, 30 % u Blattodea (švábů) a 28 % u některých druhů Lepidoptera. Druhy s nejvyšším obsahem tuku jsou housenky (*P. larvae*) se 77 %, larvy *Rhynchophoru phoenicis* až s 70 % a vosy (*P. instabilis*) s 62 %. Průměrné množství nasycených mastných kyselin (SFA) v jedlém hmyzu se pohybuje od 31 % pro Hymenoptera až po 42 % pro Isoptera. Nejvíce zastoupenými SFA jsou palmitová a stearová kyselina. Výjimku tvoří housenky *Imbrasia eritii*, u kterých převládá arachidonová kyselina. Průměrný obsah monoenoových MK je od 22 % u Isoptera, až po 49 % u Hymenoptera. U polyenoových MK mezi 16 % u Diptera (dvoukřídle hmyz), až po 40 % u Lepidoptera (motýli, můry). Složení MK v hmyzu je obecně srovnatelné s MK v rybím masu. Jedlý hmyz však obsahuje více polyenoových MK.

Kouřimská a Adámková (2016) se ve své studii zabývaly senzoryckou kvalitou jedlého hmyzu. Uvádí, že v mnoha zemích světa se hmyz konzumuje okamžitě po chycení. V případě dalšího zpracování je nejlepší metodou jejich humanitního zabíjení spaření horkou vodou po 1 až 3 dny trvajícím hladověním. Další kulinářské zpracování může být vaření, pečení, smažení nebo sušení. Chuť hmyzu je ovlivněna především feromony, které se vyskytují na povrchu těla. Dále chuť závisí na prostředí, kde hmyz žije a také na krmivu. Exoskelet hmyzu způsobuje křupavost během jeho konzumace, díky němu je hmyz téměř bez zápachu. Příjemná barva vždy neznamená, že je hmyz chutný. Během vaření se jeho barva obvykle mění z původních odstínů šedé, modré nebo zelené na červenou. Hmyz obsahující značné množství oxidovaného tuku nebo špatně vysušený hmyz může být černý. Správně sušený hmyz je zlatý nebo hnědý a lze ho snadno rozdrtit prsty.

3.2.1 Puriny v hmyzu

Konvenční maso obsahuje poměrně vysoké množství purinů, což vyvolává otázky, zda i hmyz se srovnatelným obsahem bílkovin je také tak bohatý na puriny (Bednářová et al., 2013). Bednářová et al. (2013) sledovali obsah vybraných purinových derivátů (močové kyseliny, xyntinu, hypoxantinu a adeninu) u tří druhů jedlého hmyzu *Tenebrio molitor* (potemník moučný), *Zophobas atratus* (potemník brazilský) a *Gryllus assimilis* (cvrček stepní), které jsou dobře dostupné i v České republice.

Výsledky této studie ukázaly, že poměr (hypoxantin+adenin)/bílkovina byl v hodnocených druzích hmyzu významně vyšší, než jsou doporučené limity – maximální množství purinů, které mohou konzumovat lidé trpící dnou (0,5 g / kg bílkoviny). Obvyklá

porce kuřecího masa 100 g obsahuje 23 g bílkovin a 103,6 kcal energie. Stejný obsah bílkovin (tj. 23 g) je obsaženo v porci hmotnosti 41,9 g *T.molitor*, 41,7 g *Z. atratus* nebo 40,7 g *G. assimilis*. Pokud vezmeme v úvahu poměr hypoxantin + adenin a celkové množství bílkovin, připadá v úvahu pouze druh *Z. atratus*. Autoři studie došli k závěru, že sledované druhy hmyzu mají potenciál jako alternativní zdroj bílkovin. Pro osoby trpící hyperurikémií nebo dnou by však bylo nutné vybrat ze zdrojů hmyzu bohatých na bílkoviny pouze ty, které jsou vhodné svým obsahem purinů (Bednářová et al. 2013).

3.3 Dna

3.3.1 Charakteristika onemocnění

Dna je porucha purinového metabolismu, která vede k dlouhodobé hyperurikémii, tj. zvýšené hladině močové kyseliny, jejíž důsledkem se tvoří urátové krystaly v kloubech a kolem kloubů (Richette a Bardin, 2010). Regab et al., (2017) uvádí, že dna je systémové onemocnění, které je způsobeno ukládáním urátu monosodného v tkáních. Zvýšená hladina močové kyseliny nad určitou prahovou hodnotu způsobuje tvorbu krystalů. Přesto, že se dna projevuje především hyperurikémií, mnoho lidí s hyperurikémií dnu nemá. Ve skutečnosti pouze 5 % lidí s hyperurikémií nad 9 mg/dl trpí tímto onemocněním. Proto se předpokládá, že musí působit i další faktory, jako například genetická predispozice.

Hyperurikemie je onemocnění, při kterém je hladina močové kyseliny vyšší než 420 $\mu\text{mol/l}$ u mužů a 360 $\mu\text{mol/l}$ u žen. Může být způsobena zvýšenou tvorbou urátu (solí močové kyseliny), častější příčinou je však snížené vylučování urátu ledvinami, které je zapříčiněné zřejmě kombinací mechanismů snížené glomerulární filtrace, snížené tubulární sekrece a zvýšené tubulární reabsorpce močové kyseliny v ledvinách (Žurek a Horák, 2007). Snížení hladiny močové kyseliny pod prahovou hodnotu můžeme dosáhnout dodržováním diety a užíváním léků snižujících močovou kyselinu v séru. Výsledkem je rozpuštění krystalů urátu monosodného (Ragab et al., 2017).

Krystaly urátu monosodného mohou být uloženy ve všech tkáních, ale především se ukládají v kloubech. Dnavému záchvatu předchází akutní zánět kloubů.

Poprvé se objevuje dna nejčastěji v prvním metatarzofalangeálním kloubu. Bývá označována jako „podagra“. Následně bývají postihnuty i další klouby, jako je například kolenní kloub, také může dojít až k vývoji tzv. tofu (Robinson a Horsburgh, 2014). Tofus je uzlík, ve kterém se hromadí urát monosodný, a vzniká nejčastěji v okolí kloubů. Byly však nalezeny i na netypických místech, jako jsou srdeční chlopně, hlasivky, prsa, tlusté střevo, oči

a mícha (Katoch et al., 2014). Kromě tofu může dna nakonec přejít až do chronické fáze, kdy přetrvává zánět kloubů – artritida (Robinson a Horsburgh, 2014). Mezi pozdější příznaky patří i ledvinové kameny (Regab et al., 2017). Charakteristickým rysem napadení touto nemocí je rychlý nástup akutní bolesti, která může být spojena s nadměrným erytémem (zarudlé zbarvení pokožky) a otokem kloubů. Někteří jedinci mohou mít dnové záchvaty denně a někteří třeba i měsíc od sebe. Ve většině případů budou tyto záchvaty častější a častější. Dnové záchvaty mohou napodobovat kloubní nebo systémovou infekci a rozsáhlé záchvaty mohou způsobit horečku (Robinson a Horsburgh, 2014).

Celková prevalence dny je 1 až 4 % světové populace. V západních zemích se vyskytuje u 3 % až 6 % mužů a 1 % až 2 % žen. U osob starších 80 let se prevalence zvyšuje u mužů až na 10 % a u žen na 6 %. U mužů se objevuje dvakrát až šestkrát častěji než u žen. Celosvětový výskyt dny se postupně zvyšuje z důvodů špatných stravovacích návyků, jako je např. konzumace jídel z rychlého občerstvení, nedostatek pohybu, zvýšený výskyt obezity a metabolické syndromy (Ragab et al., 2017).

3.3.2 Patogeneze

Lidská strava obsahuje malé množství urátu, ten je produkován hlavně v játrech a v menší míře v tenkém střevě. Produkce urátu závisí na rovnováze mezi konzumací potravin obsahujících puriny, syntézou v buňkách, opětovným využitím a degradační funkcí xantin oxidasy na distálním konci purinové dráhy (Richette a Bardin, 2010).

Navíc živé a umírající buňky degradují své nukleové kyseliny adenin a guanin na kyselinu močovou. Deaminace a defosforylace převedou adenin a guanin na inosin a guanosin. Enzym purin nukleosid fosforyláza převádí inosin a guanosin na purinové báze (Ridi a Tallima, 2017). Přebytek purinů může být také způsoben zvýšeným rozkladem buněk a tkání. To platí hlavně u hemato-onkologických onemocnění, protože nukleové kyseliny uvolněné z poškozených buněk jsou metabolizovány na urát (Kochman a Stompór, 2016).

Většina močové kyseliny se vylučuje ledvinami (70 %), zbytek (30 %) se vylučuje ve střevě. Na úrovni glomerulů je kyselina močová volně filtrována z krve. U zdravých lidí je zhruba 90 % filtrovaného urátu reabsorbováno v proximálních spirálovitých tubulech a přibližně 10 % se vylučuje močí (Liu et al., 2017).

Lidé nemohou oxidovat močovou kyselinu do více rozpustné alantoinové sloučeniny, kvůli nedostatku enzymu urikázy. Enzym urikáza může metabolizovat močovou kyselinu až na vysoce rozpustný 5-hydroxyisourát, který se dále degraduje na kyselinu allantovou a čpavek, které se snadno vylučují ledvinami. Nicméně několik primátů, včetně člověka, ztratilo funkční

aktivitu enzymu urikázy. Urikázová mRNA může být detekována v lidských játrech, ale obsahuje dva předčasné stop kodony a kódovací gen je tedy pseudogenní. Savci, kteří mají funkční urikázu, mají obvykle hladinu močové kyseliny v séru 10–20 µg/ml. Zatímco savci, kteří tento enzym funkční nemají, mají tyto hodnoty 3x až 10x vyšší (Ridi a Tallima, 2017).

Nedostatek enzymů podílejících se na purinovém metabolismu vede k nadprodukci močové kyseliny. Například Lesch – Nyhanův syndrom je vrozená metabolická porucha, způsobená kritickým nedostatkem či nefunkčností enzymu, který se podílí na metabolismu močové kyseliny. Nazývá se hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa. Jedná se o genetickou poruchu (Ragab et al., 2017).

3.3.3 Klinické projevy

Dalbeth et al., (2016) uvádí, že vývoj dny může být definován čtyřmi patofyziologickými stádii: hyperurikémií bez důkazu dny a ukládání urátu monosodného, ukládání krystalů bez symptomatické dny, ukládání krystalů s akutními výskyty dny a pokročilá dna charakterizována tofii a chronickou dnovou artritidou. Přejít z jedné fáze do druhé není nezbytný. Ragab et al. (2017), uvádí podobné rozdělení stádií dny: asymptomatická hyperurikemie, akutní dnová artritida, interkritické období a chronická tofózní dna.

Pro asymptomatickou hyperurikémií je typická zvýšená hladina močové kyseliny v krvi, avšak nevzniká artritida, tofy, ani ledvinové koliky (Růžička, 2003).

Akutní dnová artritida je charakterizována náhlým nástupem, který často začíná v noci. Pacient se tedy ráno probudí s bolestí v kloubu. Tento klasický projev dnové artritidy je spojen s kloubním otokem a kůže v okolí kloubu je horká. U menších kloubů může dojít k zarudnutí. Největší otok a bolest přichází přibližně po 6 až 12 hodinách od nástupu záchvatu. Příznaky dnové artritidy mohou být nerozeznatelné od klinických příznaků infekce kloubů, zejména proto, že dnový záchvat se může projevit symptomy, jako jsou únava či horečka, které připomínají známky systémového zánětu (Desai et al., 2017).

Interkritické období představuje stádium mezi akutními dnavými atakami po dobu 6 až 24 měsíců. Jsou však i nemocní, kteří mají jen jeden dnový záchvat za život (Růžička, 2003).

Chronická tofózní dna: pokud dna není dlouhodobě léčená a krystaly se ukládají ve formě tzv. dnavých tofů do měkkých tkání, kloubů a jejich okolí, může toto onemocnění dospět až do chronického tofózního stádium. Dnavé tofy mohou v kloubech způsobit porušení, až erozi přilehlé kosti. Tyto tofy se mohou vyskytovat i v měkkých tkáních a to v místech drobných kloubů rukou a nohou, v okolí kolen a kotníků, ve výběžku loketní kosti, na přední části předloktí a na ušních boltcích (Svobodová, 2016). Někdy se objevují na pokožce vředy,

ze kterých vytéká bílá tekutina, kterou tvoří krystalky urátu monosodného. Tato forma dny se objevuje u 30 % neléčených pacientů během 5 let (Richette a Bardin, 2010).

3.3.4 Diagnostika

Pokud se u člověka objeví kloubní bolest nebo opakovaně se vracející ataky kloubní bolesti, je potřeba kontaktovat lékaře, nejlépe revmatologa. Ten provede anamnestické, somatické, kloubní a další vyšetření. Zlatým standardem pro diagnózu dny je potvrzení krystalů urátu monosodného v synoviální tekutině (Sivera et al., 2017). Smith et al. (2010) uvádí, že mezi nejrozšířenější diagnostická kritéria dny podle ARA (American Rheumatism Association) patří přítomnost charakteristických krystalů urátu monosodného v synoviální tekutině, přítomnost urátových krystalů v tofech a/nebo přítomnost šesti z 12 klinických, laboratorních a rentgenových jevů.

Mezi tyto jevy patří:

- maximální zánět kloubu se vyvinul první den artritidy
- více jak jeden záchvat akutní artritidy
- monoartikulární artritida (postižen jeden kloub)
- pozorované zarudnutí na kloubech
- bolestivý otok prvního MTP (metatarzofalangeální kloub)
- jednostranný první dnavý záchvat v oblasti I. MTP kloubu
- jednostranný dnavý záchvat v oblasti tarzálního kloubu
- přítomnost tofů
- asymetrický otok v kloubu
- negativní výsledek kultivace výpotku
- subkortikální cysty na noze bez eroze na rentgenovém snímku

3.3.5 Léčba

Vlivem urbanizace, modernizace, globalizace a technologického pokroku došlo ke změně prostředí a chování v celosvětovém měřítku. Tyto globální změny negativně ovlivnily tradiční stravovací návyky lidstva, které vedly k radikálnímu posunu od tradičních nízkotučných diet bohatých na vlákninu, ovoce, zeleninu, složité sacharidy, celozrnné pečivo, luštěniny a ořechy k západní dietě, která se vyznačuje velkým obsahem purinů, cukrů, rafinovaných cukrů, sladidel, nízkým příjmem ovoce, zeleniny a celozrnných výrobků. Moderní životní styl navíc zahrnuje i nadměrnou konzumaci alkoholických nápojů společně s nedostatkem fyzické aktivity. Tato strava není příčinou jen zvýšené hladiny močové kyseliny,

ale i dalších onemocněních jako je vysoký krevní tlak, cukrovka druhého typu, kardiovaskulární onemocnění nebo i rakovina (Ekpenyong a Neybuk, 2015).

Při akutní dně jsou využívány k léčbě hlavně protizánětlivé léky. Při chronické dně je terapeutickým cílem zabránit dalšímu kloubnímu poškození a to udržením hladin sérového urátu dostatečně nízko, aby došlo k rozpuštění monosodoných krystalů a netvořily se nové. Ze začátku se doporučuje nefarmakologický přístup tj. léčba pomocí dietních opatření (Corp a Pendry, 2013).

Cílem léčby pomocí protizánětlivých léků je snížit hodnotu močové kyseliny pod bod nasycení. Inhibitor xanthin oxidasy allopurinol je nejčastěji užívaným hypourikemickým lékem. Podává se po malých dávkách, která se postupně zvyšuje, abychom se vyhnuli případným nežádoucím účinkům nebo alergickým reakcím. Dále se využívá k léčbě febuxostat, uricosurics, urikáza, glukokortikoidy, kolchicin a další (Sivera et al., 2017).

Mezi nefarmakologickou léčbu se řadí dietní opatření vedoucí ke snížení hmotnosti, jelikož riziko dny se zvyšuje, je-li BMI vyšší než 35. Jelikož puriny přijímáme hlavně z živočišných bílkovin (Ridi a Tallima, 2017), v jídelníčku je potřeba, vyhnout se potravinám jako je maso, ryby, mořské plody, droby a extrakt z kvasnic (Marianayagam et al., 2014). Denní příjem živočišných bílkovin ve formě masa či ryb by měl být omezen na 113 až 170 gramů (Mayo Clinic Staff, 2015). Bílkoviny obsažené v masu je dobré vyměnit za rostlinné bílkoviny ve fazolích nebo obecně v luštěninách. Z živočišných zdrojů bílkovin je vhodné mléko a mléčné výrobky, včetně jogurtů a sýrů, které jsou dobrým zdrojem vysoce kvalitních bioaktivních bílkovin a peptidů, a zároveň výrazně nezvyšují riziko hyperurikémie či dny. Pozitivní vliv na hladinu močové kyseliny v krvi mají hlavně mléčné výrobky s nízkým obsahem tuku (Ekpenyong a Neybuk, 2015). Havlík et al., (2010) uvádí, že dobrým zdrojem bílkoviny pro lidi trpící dnou mohou být náhražky masa, které jsou tvořeny hlavně rostlinnými bílkoviny (sójová, pšeničná bílkovina). Typ bílkovin používaných k výrobě těchto produktů určuje celkový obsah purinů.

Lidé trpící dnou vybírají potraviny, které konzumují, hlavně podle obsahu purinů (viz tabulka č. 1, 2 a 3). Největší podíl jejich stravy by měly tvořit potraviny s obsahem purinů nižší než 50 mg. Ze stravy bychom měli úplně vyloučit potraviny s obsahem nad 150 mg purinových látek a potraviny s obsahem mezi 50 až 150 mg bychom měli omezit (Chlup, 2009). Detailnější rozdělení potravin podle obsahu purinů (vysoký, středně vysoký a nízký obsah purinů) je uveden v tabulce číslo 5. Místo sladkostí a bílého pečiva se doporučuje jíst složité sacharidy, jako jsou celozrnné chleby, pečivo a ovoce a zelenina (Healthline Editorial Team, 2016). U pacientů s urolitiázou (močové kameny) se doporučuje vypít alespoň 2 litry tekutin denně.

Je potřeba se vyvarovat konzumace piva, alkoholu (mírná konzumace vína riziko nezvyšuje) a slazených nápojů, neboť pravidelné užívání může potencionálně zvýšit riziko dny (Marianayagam et al, 2014).

Jak alkohol, tak fruktóza rychle zvyšují hladinu urátu v séru. Zvýšená hladina kyseliny mléčné způsobená konzumací alkoholu inhibuje vylučování urátu ledvinami (Dalbeth et al., 2016) a metabolismus fruktózy spotřebovává ATP (adenosinmonofosfát) a vede k akumulaci AMP (adenosinmonofosfát), který je dále metabolizován na močovou kyselinu a zvýšený příjem fruktózy se tak přímo promítá do zvýšené syntézy močové kyseliny (Kochman a Stompór, 2016).

Konzumace stravy, která je bohatá na rostlinné polyfenoly pomáhá omezit vývoj hyperurikémie a dny. Tyto sloučeniny mají antihyperuricemický účinek (tj. snižují hladinu močové kyseliny v krvi) díky svému antioxidačnímu působení. Dlouhodobá spotřeba kávy také přispívá k nižšímu riziku hyperurikémie a dny (Ekpenyong a Neybuk, 2015). Podle Mayo Clinic existuje dostatek důkazů o tom, že pití čtyř až šesti šálků kávy může denně snížit riziko vzniku dny u mužů. Dále ovoce bohaté na antioxidanty jako jsou např. tmavě zbarvené plody jako ostružiny, borůvky, hrozny, maliny a zejména třešně, mohou pomoci udržet hladinu močové kyseliny v krvi pod kontrolou. Konzumace mírného množství vitamínu C je také spojena s nižšími hladinami močové kyseliny v krvi. Nicméně, velmi velké dávky vitamínu C mohou naopak její hodnoty zvýšit (Healthline Editorial Team, 2016). Towiwat a Li (2015) uvádí ve své studii, že účinky vitamínu C jsou sporné. Je potřeba na toto téma provést ještě další studie, abychom skutečně mohli tvrdit, že vitamin C při dně opravdu pomáhá.

Tabulka 5: Rozdělení potravin podle obsahu purinů (Boulanger a Charney, 2015)

Rozdělení	
Vysoce purinové potraviny	Plody moře, červené maso, sladké nápoje, alkohol, vnitřnosti, mozek, srdce, ledviny, játra, hovězí, vepřové, jehněčí, sleď, ančovičky, makrely, sardinky, tuňák, droždí, ovocné šťávy
Středně vysoké purinové potraviny	Skopové maso, slanina, losos, krocan, koroptev, pstruh, husa, treska, bažant
Nízko purinové potraviny	Fazole, čočka, voda, mléko s nízkým obsahem tuku nebo bez tuku, celozrnné pečivo, sladké brambory, ovoce, zelenina

Příklad stravy pro pacienty trpící dnou.

Snídaně:

- malá sklenice pomerančového džusu, káva a sklenice vody
- půl šálku obilovin s nízkotučným mlékem nebo jogurtem
- bílý toust s džemem a jednou čajovou lžičkou margarínu

Přesnídávka:

- šálek čerstvých jahod
- 1 kelímek (150 g) bílého jogurtu

Oběd:

- pečené brambory s jednou čajovou lžičkou margarínu
- míchaný salát s dresinkem bez tuku
- 1 šálek ovocného salátu a sklenice vody (Falck, 2017).

Odpolední svačina:

- 1 šálek čerstvých třešní
- voda (Mayo Clinic Staff, 2015)

Večeře:

- půl šálku kuřecích prsou bez kůže a půl šálku rýže
- půl šálku brokolice
- půl šálku nízkotučného mraženého jogurtu
- sklenice vody (Falck, 2017)

3.3.5.1 Srovnání urikogenního působení purinových bází

Ze čtyř purinových bází se uvádí, že adenin a hypoxanthin jsou více urikogenní než guanin a xantin. Kromě toho bylo prokázáno, že volný adenin je více urikogenní než jeho nukleosid nebo nukleotid. Změny v obsahu purinů a v uvolňování volných bází byly zaznamenány během různých způsobů tepelné úpravy, jako je vaření, smažení, pečení nebo grilování masa. Rozdíly v metabolických účincích jednotlivých purinů a modifikace množství a formy purinů způsobených zpracováním by naznačovaly, že urikogenní potenciál zpracovaných potravin by měl být založen na povaze a na množství jednotlivých bází purinů (Sarwer a Brule, 1991). Kaneko et al. (2014) ve své studii, také uvádí, že účinek purinů na sérovou koncentraci močové kyseliny se liší mezi jednotlivými bázemi. Hypoxantin, IMP, adenin, adenosin-5-monofosfát a guanosin-5-monofosfát zvyšují sérovou koncentraci močové kyseliny, jak u zdravých lidí, tak u lidí, kteří trpí hyperurikemií nebo dnou. Ukazuje se, že vliv

hypoxantinu na koncentraci močové kyseliny v séru je silnější než u jiných purinových bází. Potraviny, které obsahují nejen velké množství celkových purinů, ale také vysoký poměr hypoxantinu, lze proto považovat za největší dietní rizikový faktor pro rozvoj dny. Nutriční terapie dny by měla vzít tato fakta v úvahu. Sledovat nejen celkový obsah purinů, ale také složení a poměr jednotlivých bází.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie a činidla

- Demineralizovaná destilovaná voda
- Hydroxid sodný 0,1M (Lach-ner s.r.o., Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný 0,05M (Lach-ner s.r.o., Česká republika)
- Standardy v čistotě $\geq 99\%$: kyselina močová, adenin, guanin, hypoxantin, xantin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina mravenčí (Lach-ner s.r.o., Česká republika)
- Kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Acetonitril (Carl Roth, Německo)
- Methanol (Biosolve chemie SARL, Francie)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Přístroje

- ultrazvuková lázeň (Tesla, Československo)
- sušárna
- rotační vakuová odparka (Laborota 4000, Heidolph, Německo)
- centrifuga (EBA 12, Hettich, Německo)
- analytické váhy (AE 200, Mettler Toledo)

Pomůcky

- laboratorní sklo
- mikropipety
- injekční stříkačky
- stříkačkový filtr 0,45 μm (VWR International)
- HPLC systém
 - Kvartérní pumpa P680 (Dionex corp, USA), mobilní fáze A 0,05M KH_2PO_4 (pH 4,6), B acetonitril, lineární gradientová eluce (objem rozpouštědla A klesl ze 100 na 80 % a u rozpouštědla B rostl z 0 na 20 % v průběhu 18 minut), průtok mobilní fáze 0,8 ml/min
 - Manuální nástřikové zařízení Rheodyne (Rheodyne, USA), nástřikovaný objem 20 μl

- Analytická kolona Phaeonemenex typu Luna 5u C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), termostat kolony (teplota kolony 35 °C)
- UV/VIS detektor s diodovým polem (UVD340U, Dionex corp, USA) nastavené vlnové délky 250, 260 a 285 nm

4.3 Vzorky

Cvrček domácí (*Acheta domestica* L.) byl zakoupen z komerčního zdroje (Scorpion Export – Import s.r.o., Novosedly nad Nežárkou, Česká republika). Hmyz byl zabit zmrazením (-38 °C). Následně byly vzorky lyofilizovány a homogenizovány a uloženy v chladničce až do začátku analýzy.

4.4 Příprava roztoků k analýze

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 6,0845 g KH_2PO_4 s demineralizovou vodou do 1000ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Vznikl roztok o koncentraci 0,05 mol/l. Polovina tohoto roztoku byla převedena do zásobní lahve a nechána odplynit spolu s lahví s acetonitrilem na ultrazvukové lázni zhruba 40 minut.

Příprava standardů

Pro přípravu standardů byl nejdříve přichystán roztok NaOH o koncentraci 0,1 mol/l, smícháním 0,406 g NaOH s demineralizovanou vodou do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Následně bylo odváženo z každého standardu (močová kyselina, adenin, guanin, hypoxantin, xantin) 0,025 g do odměrné baňky o objemu 25 ml a rozpuštěno na čirý roztok v 0,1M NaOH. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněno po rysku roztokem pufru. Vznikl roztok o koncentraci 40 µg/ml. Tato koncentrace sloužila pro stanovení opakovatelnosti retenčních časů a opakovatelnosti nástřiku. Pro kalibraci byly připraveny roztoky o koncentracích 0, 10, 20, 60 a 100 µg/ml a pro stanovení LOD a LOQ o koncentracích 0,25; 0,5; 1,0 a 2 µg/ml.

Hydrolýza vzorku

Pro hydrolýzu vzorku bylo naváženo 40 mg homogenizovaného vzorku lyofilizovaného cvrčka do 25 ml varné baňky, do které bylo přidáno 3,3 ml kyseliny mravenčí a 6,7 ml kyseliny trifluoroctové (práce v digestoři) a poté byly baňky pořádně uzavřené pomocí skleněných zátek. Poté byly vloženy vzorky na 20 minut do sušárny při teplotě 120 °C. Po hydrolýze byly nechány

vzorky vychladnout a poté byly odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce při 40 °C. Následně byly vzorky kvantitativně převedeny do 15ml zkumavky pomocí 10 ml 0,05M KH_2PO_4 . Centrifuga byla nastavena na 4000 rpm a odstředování probíhalo po dobu 15 minut. Poté byly vzorky zfiltrány pomocí stříkačkového filtru 0,45 μm a analyzovány pomocí HPLC. Všechny vzorky byly vždy připraveny ve třech paralelních stanoveních.

Příprava spikovaných vzorků

Ze standardů bylo odváženo 25 mg kyseliny močové a 5 mg adeninu, guaninu, hypoxantinu a xantinu. Všechno bylo naváženo do jedné odměrné baňky o objemu 25 ml a rozpuštěno na čirý roztok v 0,1 M NaOH. Při 50% přídavku byl odpipetován směsný standard o objemu 6,25 ml do 25 ml a naředěn pufrém (0,05M KH_2PO_4), tím byl získán směsný standard, kde koncentrace kyseliny močové byla 250 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace adeninu, guaninu, xantinu a hypoxantinu byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Při 100% přídavku byl odpipetován směsný standard o objemu 6,25 ml do 25 ml a naředěn pufrém (0,05M KH_2PO_4), tím byl získán směsný standard, kde koncentrace kyseliny močové byla 250 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace adeninu, guaninu, xantinu a hypoxantinu byla 50 $\mu\text{g/ml}$. Při 150% přídavku byl odpipetován směsný standard o objemu 9,375 ml do 25 ml a naředěn pufrém (0,05M KH_2PO_4), tím byl získán směsný standard, kde koncentrace kyseliny močové byla 375 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace adeninu, guaninu, xantinu a hypoxantinu byla 75 $\mu\text{g/ml}$.

Vyhodnocení výsledků

Identifikace píků byla prováděna srovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů na základě UV spektra jednotlivých sloučenin. Integrace píků byla prováděna při vlnových délkách blízkých absorpčnímu maximu každého analytu (močová kyselina při 285 nm, guanin a hypoxantin při 250 nm, xantin a adenin při 260 nm). Pro kvantifikaci jednotlivých purinů byly použity kalibrační křivky příslušných standardů.

Mezdní hodnoty detekce (LOD) byly vypočteny jako koncentrace odpovídající trojnásobku šumu na pozadí. Výtěžky kvantifikovaných složek byly stanoveny pomocí standardů. Byly 3 standardy o 50 %, 100 % a 200 %, které byly extrahovány metodou, která je popsána výše a dále byly analyzovány pomocí HPLC.

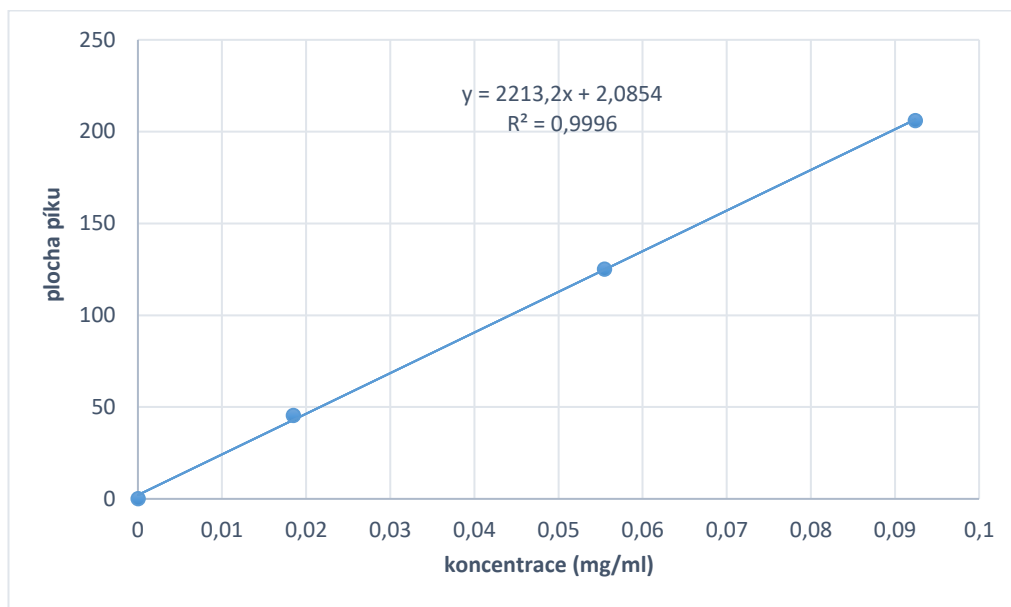
Statistické zpracování

Získané výsledky byly vyjádřeny jako průměry $\pm$ směrodatná odchylka (s). Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno pomocí statistického softwaru Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

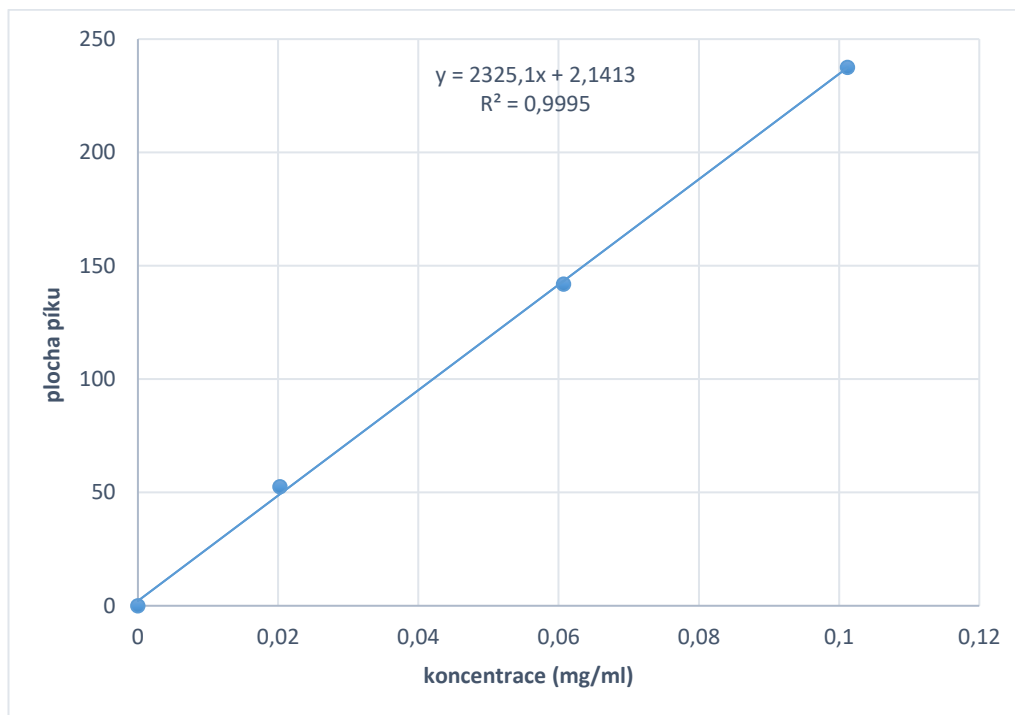
5 Výsledky

5.1 Validace metody

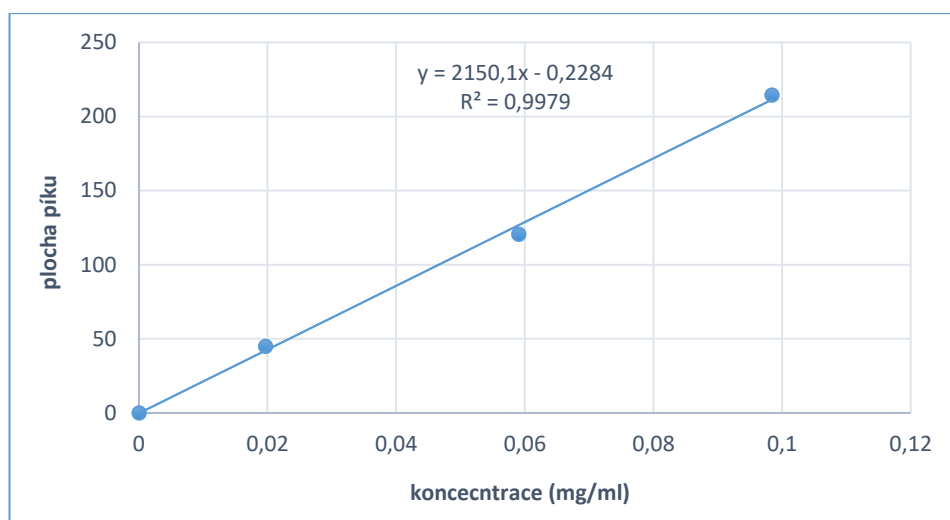
Na obrázcích č. 8 až 12 jsou zobrazeny kalibrační přímky standardů purinů a v tabulce č. 6 jsou shrnuty validační charakteristiky jednotlivých analytů.



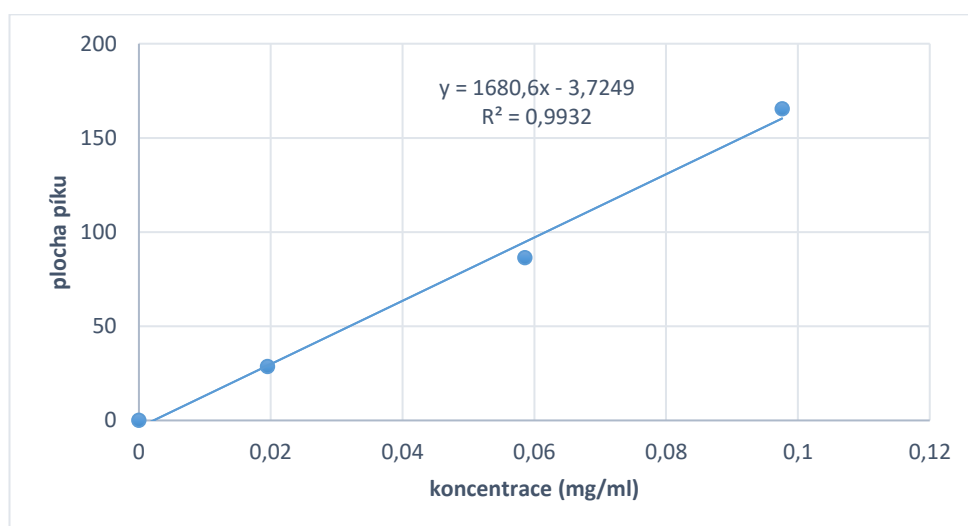
Obrázek 8: Kalibrační křivka močové kyseliny



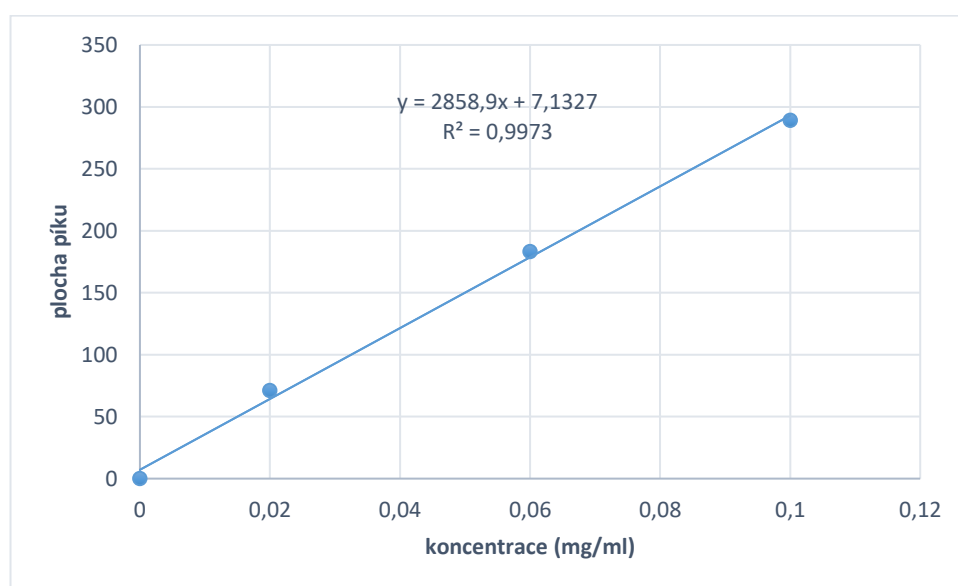
Obrázek 9: Kalibrační křivka guaninu



Obrázek 10: Kalibrační křivka hypoxantinu



Obrázek 11: Kalibrační křivka xantinu



Obrázek 12: Kalibrační křivka adeninu

Tabulka 6: Validační charakteristiky

Pík	Vlnová délka (nm)	Regresní rovnice	R ²	Retenční čas (min)	Lineární rozsah (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
UA	285	$y = 2213,2x + \frac{2}{2}$	0,9996	8,026	2 – 100	0,11	0,37
G	250	$y = 2325,1x + \frac{2}{2}$	0,9995	10,038	2 – 100	0,21	0,71
HX	250	$y = 2150,1x + 0,2$	0,9979	10,399	2 – 100	0,16	0,52
X	260	$y = 1680,6x - 4$	0,9932	11,867	2 – 100	0,11	0,37
A	260	$y = 2858,9x + \frac{7}{7}$	0,9973	12,435	2 - 100	0,26	0,85

V tabulce číslo 7 můžeme vidět opakovatelnost ze třech různých analýz během třech různých dnů.

Tabulka 7: Opakovatelnost

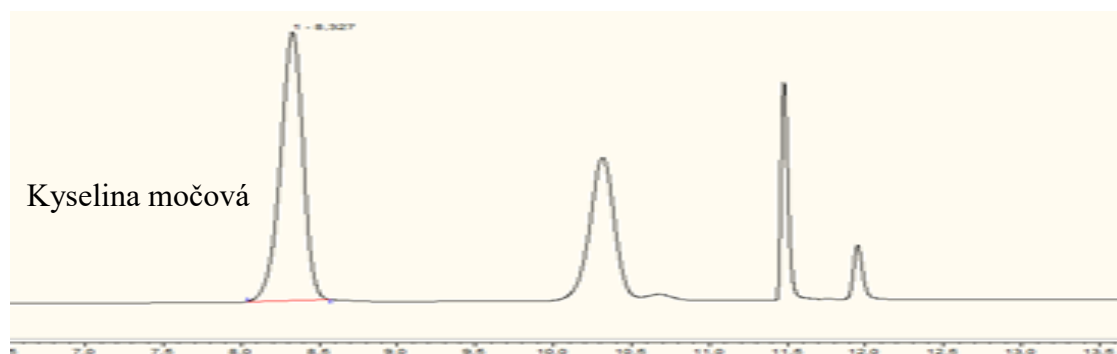
Opakovatelnost (RSD %)			
	Intra-day	Inter-day	Výtěžnost (%)
UA	4,42	13,02	89,85
G	5,92	4,39	104,38
HX	9,37	6,22	98,08
X	18,68	19,53	129,54
A	10,30	18,77	110,37

Metoda HPLC ukázala přijatelné výtěžnosti v rozmezí 89,85–129,54 %, limity detekce 0,11–0,26 µg/ml a relativní směrodatná odchylka intra-day opakovatelnosti byla nižší než 10,30 % pro všechny analyty s výjimkou xantinu (18,68 %).

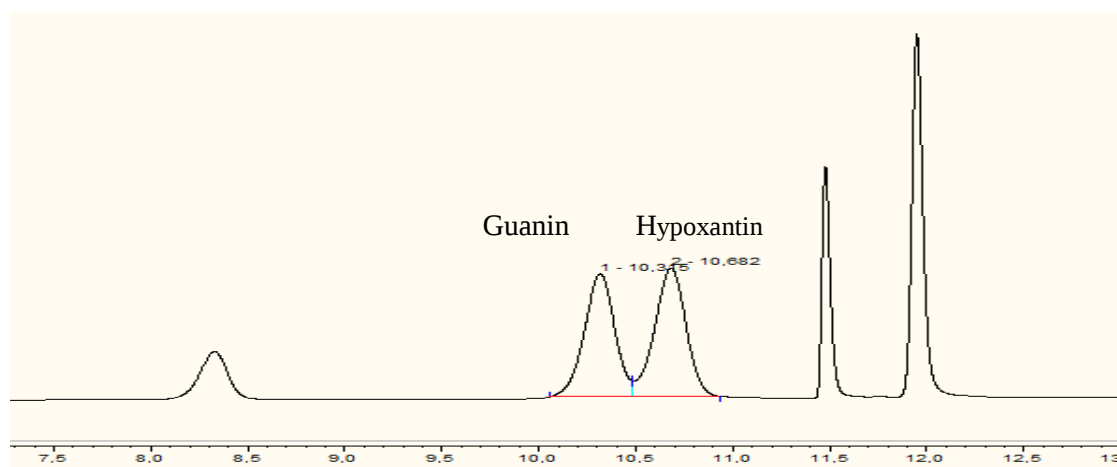
Tabulka 8: Obsah purinů - cvrček domácí

Purinové báze	Obsah (mg/100g vzorku)
UA	487
G	93
HX	101
X	80
A	73
Celkové puriny	834
A + HX	174

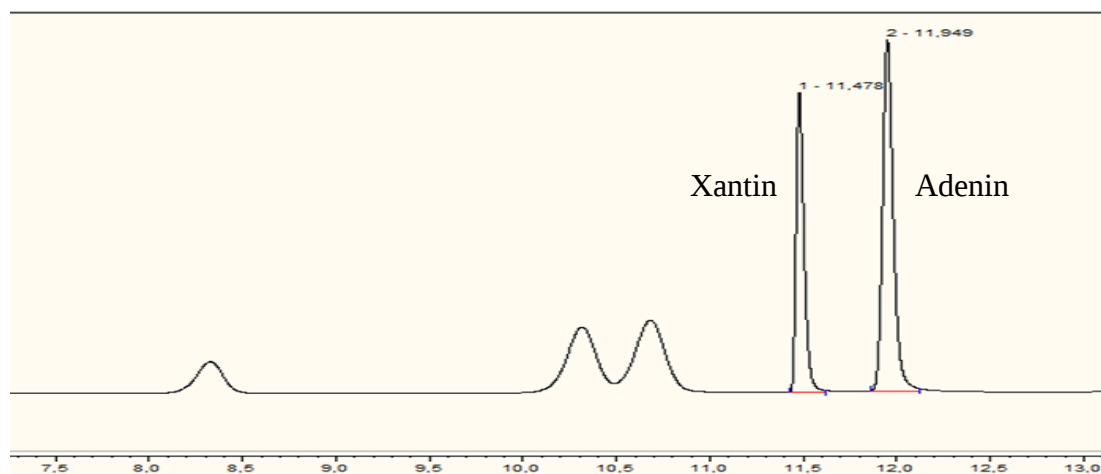
Na obrázcích č. 13 až 15 jsou zobrazeny chromatogramy standardů a na obrázcích č. 16 až 18 vidíme chromatogramy vzorku - cvrčka domácího.



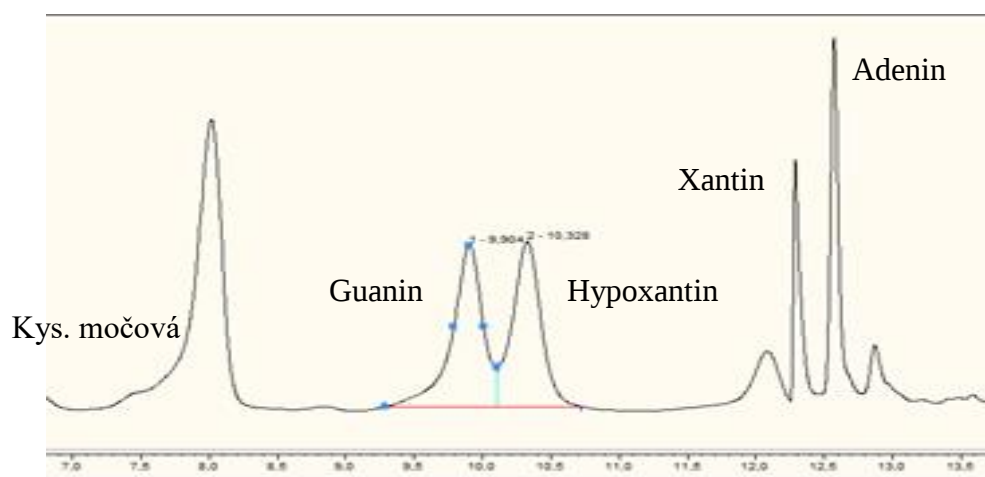
Obrázek 13: chromatogram standardu - UA (285 nm)



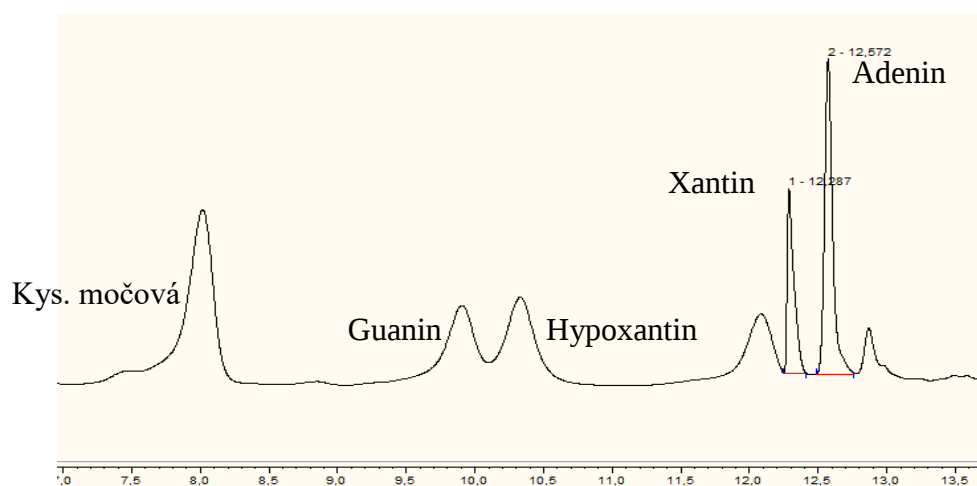
Obrázek 14: chromatogram standardu - G a HX (250 nm)



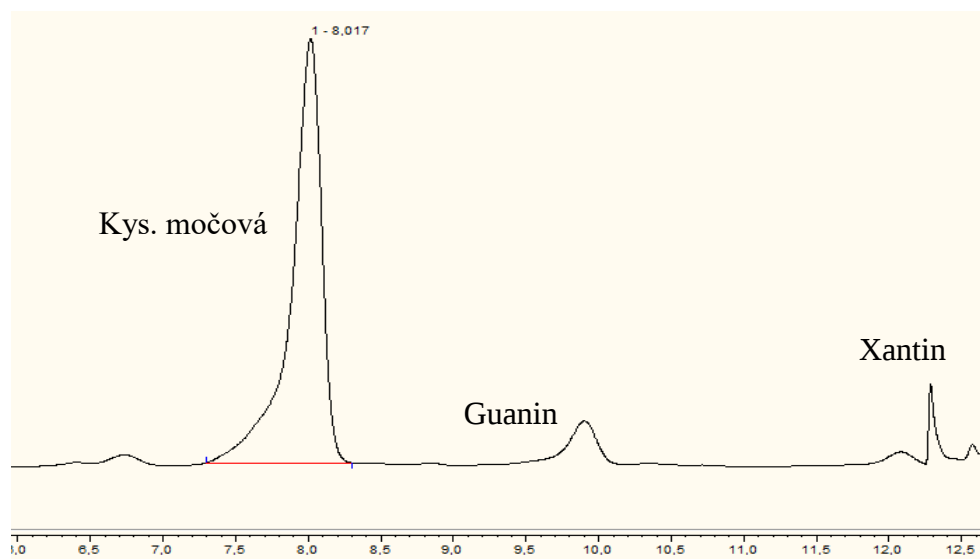
Obrázek 15: chromatogram standardu - X a A (265 nm)



Obrázek 16: chromatogram vzorku cvrčka domácího (250 nm)



Obrázek 17: chromatogram vzorku cvrčka domácího (260 nm)



Obrázek 18: chromatogram vzorku cvrčka domácího (285 nm)

6 Diskuze

Největší část této diplomové práce se zabývala validací HPLC metody pro stanovení obsahu purinů (adenin, guanin, hypoxantin, xantin a močová kyselina). Při srovnání naší validace s validací Havlíka et al. (2010) bylo pozorováno, že rozdíly byly patrné v retenčních časech, kdy největší rozdíl byl u adeninu, kde se hodnoty lišily o 1,858 min a xantinu, kde rozdíl činil 1,165 min a nejmenší rozdíl byl u guaninu o 0,587 min. Tyto rozdíly, v retenčních časech, mohly být zapříčiněny především, použitím různých typů eluce (gradientová vs. izokratická). Mez detekce získaná při validaci metody v rámci této práce byla o něco nižší (0,11 do 0,26 µg/ml) než v případě hodnot pro mez detekce sledovaných v práci. Havlík et al. (2010). Při porovnání opakovatelnosti metody (pod 10,30 % u A, G, HX a UA a 18,68 % u X) byly v případě této práce získány lepší výsledky opakovatelnosti (5,91 % u všech analytů) než ve studii Havlík et al. (2010) a ještě přesnější hodnoty (3,6 % u všech analytů) než byly získány ve studii autorů Rong et al. (2015). Když byla porovnána naše metoda s metodou Havlík et al. (2010) byl pozorován rozdíl v použití typu eluce. Typ kolony C18 byl stejný, lišila se však ve výrobci. Ve studii Rong et al. (2015) bylo pozorováno rozdílné použití detektoru, typu kolony, rozdílnou teplotu kolony (30 °C) a odlišnou mobilní fázi (mravenčan amonný).

Výtěžnost jednotlivých analytů se pohybovala v rozmezí od 89,85 % u močové kyseliny do 129,54 % u xantinu. Havlík et al. (2010) ve své studii uvedl hodnoty od 92,4 % u guaninu do 104,2 % u močové kyseliny, naše výtěžnost byla jasně vyšší kromě močové kyseliny. Při porovnání výtěžnosti se studií Rong et al. (2015), kde se autoři zabývali 4 bázemi (A, G, HX a X), jsou uvedeny hodnoty od 97,3 % u guaninu do 105,3 % u xantinu. Naše hodnoty výtěžnosti byly vyšší u všech bází, kromě báze hypoxantinu, kde činila tato hodnota pouze 98,08 %.

Při koncentracích ve kterých se pohybovala analýza purinových látek, tj. 2–100 µg/ml respektive 1 mg/g by se měla výtěžnost pohybovat mezi hodnotami 95–105 % (Codex Alimentarius, 2010).

Před porovnáváním jednotlivých hodnot purinových bází je nutné si ještě ujasnit, že močová kyselina není purinovou bází, ale vzniká až v metabolismu purinů. Proto bylo nutné u každé práce sledovat, kdo z autorů se zaměřil na množství purinů včetně kyseliny močové a kdo ne.

Pokud byly porovnávány hodnoty obsahu purinů ve vzorku cvrčka domácího v naší práci, se vzorky cvrčka stepního Bednářové et al. (2013) byl pozorován velký rozdíl v obsahu celkových purinů (UA, X, HX, A) mezi našim vzorkem cvrčka domácího (7,41 g/kg

lyofilizovaného vzorku) a vzorkem cvrčka stepního (31,41 g/kg sušiny). Cvrček stepní obsahuje 4x více purinů než cvrček domácí. Shodně však vychází, že nejvíce zastoupenou bází je močová kyselina a nejméně zastoupenou bází je xantin. Přičemž naše hodnoty purinů cvrčka domácího se pohybují mezi hodnotami purinů potměníka moučného, který obsahuje o necelé 2 mg více purinů, naopak potměník brazilský obsahuje o 1,5 mg méně. Adenin a hypoxantin jsou považovány za víc urikogenní než guanin a xantin (Sarwar a Brulé, 1991) a v našem vzorku byl hypoxantin druhou nejvíce zastoupenou bází (101 mg/100 g vzorku) a adenin naopak nejméně zastoupenou bází (73 mg/100 g vzorku). Rozdíly v hodnotách mezi cvrčkem stepním a cvrčkem domácím mohly být zapříčiněny tím, že u našeho vzorku byli využiti jen dospělci a to jak samci, tak samičky, zatímco ve studii Bednářová et al. (2013) byly využity larvy a nymfy.

Když byly porovnávány naše hodnoty obsahu purinů (A, G, HX a X) s obsahem purinů u mořských živočichů (ryby, ústřice, měkkýši, krevety) ve studii Qu et al., (2016), znovu bylo pozorováno, že obsah purinů (v průměru 254 mg/100 g potraviny) je významně nižší než u našeho vzorku cvrčka (347 mg/100 g sušeného vzorku). Pokud byly brány v úvahu hodnoty okouna japonského, jeho hodnoty purinů byly téměř 4x vyšší (1399 mg/100 g potraviny), stejně tak tomu je i u makrelovce japonského (1175 mg/100 g potraviny). Tyto vysoké hodnoty purinů se však vyskytovaly jen v kůži těchto ryb, když byly vzaty v úvahu hodnoty ve hřbetním mase, obsah purinů byl jen něco málo přes 104 mg/100 g potraviny oproti 347 mg/100 g vzorku (A, G, HX a X) ve cvrčkovi domácím. Shyi-Neng (1998) ve své studii uvedl, že obsah purinů (A, G, HX, X) v krevetě tygří činil 719 mg/100 g potraviny. Což byla ve srovnání s naším vzorkem dvakrát vyšší hodnota.

Naše hodnoty purinů se pohybovaly mezi hodnotami sarděle (321 mg/100 g potraviny) a sledě (378 mg/100 g potraviny) dle Lockyera a Stannera (2016). V jejich studii si můžeme všimnout vysokých hodnot purinů (A, G, HX a X) u vzorku brzlíku – bez uvedení druhu (1260 mg/100 g potraviny)

Při pohledu na obsah purinů v kuřecím mase bylo pozorováno, že hodnoty jsou nejednotné. Podle Havlíka et al. (2010) obsahovalo kuřecí stehno 4 báze purinů (A, G, HX, X) v množství 484,4 mg/100 g sušiny a kuřecí játra 1075,7 mg/100 g sušiny. Chlup (2009) dokonce uvedl jen hodnoty kolem 40 mg/100 g. Výsledky obsahu purinů (UA, A, HX, X) v kuřecím prsu podle Bednářové et al. (2013) byly 1074 mg/100 g sušiny. Rozdíly mezi vzorky Bednářové et al. (2013) a Havlíkem et al. (2010) mohly být zapříčiněny stanovením nestejných bází a sledováním obsahu purinů v rozdílných částech kuřete. Pokud byl porovnán náš vzorek s hodnotami purinů kuřecích prsou (Bednářová et al., 2013), byl obsah v kuřecím prsu o 1/3

vyšší. Lockyer a Stanner (2016) uvedl obsah v kuřecím masu 149 mg/100 g potravin, a kuřecí maso je tak zařazeno mezi potraviny se středním obsahem purinů, stejně tak tomu je u masa hovězího (90 mg/100 g potravin) a vepřového (145 mg/100 g potravin). Vzorek cvrčka obsahoval více purinů, než můžeme najít ve vaječném bílku (Bednářová et al., 2013).

Člověk trpící dnou by měl omezit konzumaci potravin s obsahem purinů nad 150 mg/100 g potravin. Základem jídelníčku by měly být nízkopurinové potraviny (0–50 mg/100 g potravin) doplněny o potraviny se středně vysokým obsahem purinů (50–150 mg/100 g potravin). Obsah purinů ve 100 g kuřecího masa se průměrně pohybuje v rozmezí 250–400 mg/100 g potravin, člověk trpící dnou by proto neměl zkonzumovat více jak 150 g kuřecího masa v závislosti na obsahu purinu v jednotlivých částech kuřecího masa. V případě cvrčků, kteří obsahují 347 mg purinů/100 g vzorku (bez UA) by jich mohl člověk trpící dnou zkonzumovat 43 g.

Zaměřením na hlavní urikogenní báze (HX a A), bylo pozorováno, že při konzumaci 100 g cvrčků by se do našeho organismu dostalo 174 mg purinů, při konzumaci této samé porce kuřecího masa by se do našeho organismu dostalo 350 mg těchto purinů.

Pokud sníme 100 g kuřecího masa, dostane se do našeho organismu 23 g bílkovin. Jelikož obsah bílkovin u jedlého hmyzu (56 g), je vyšší než u běžného masa (23 g) a stačí nám konzumace menší porce (Bednářová et al., 2013). To znamená, že zkonzumujeme necelých 70 mg purinů ve 40,7 g cvrčka.

Cvrčka bychom mohli zařadit mezi potraviny s vysokým obsahem purinů, kam patří například i kreveta, makrela, losos, pstruh, hovězí játra, brzlík. Po vyhodnocení našich výsledků, bylo zjištěno, že díky obsahu celkových purinů není cvrček vhodný ke konzumaci lidmi trpící dnou nebo jen v omezené míře. Ve velkém množství (nad 42 g/den). U konzumace jedlého hmyzu je však známo, že jejich porce jsou významně menší oproti běžným potravinám. Budou-li vzaty v úvahu jen urikogenní puriny (HX, A), množství bílkovin ve cvrčkovi a velikost porcí jedlého hmyzu, mohl by být dobrou alternativou k masu pro lidi, kteří trpí tímto onemocněním. Bude však nutné provést další studie na toto téma u více druhů jedlého hmyzu, aby mohlo být spolehlivě řečeno, zdali je jedlý hmyz vhodnou alternativou či nikoliv.

7 Závěr

Obsah purinů v potravinách je u lidí trpících dnou zásadní. Dna je porucha purinového metabolismu, která má za následek dlouhodobě zvýšenou hladinu močové kyseliny v séru. Dochází následně k tvorbě urátových krystalů, které se ukládají v kloubech.

Léčba onemocnění dnou je možná dvěma způsoby. Jedna varianta spočívá v užívání léků, které snižují hladinu kyseliny močové v séru. Pro druhou variantu je jako léčebná metoda zvolena nízko purinová dieta, kterou nemocný musí dodržovat. Nabízí se také kombinace obou výše zvolených cest léčby.

Při dodržování nízko purinové diety, by měl každý jeden nemocný člověk trpící dnou sledovat obsah purinů v potravinách, které konzumuje. V mé práci jsou rozděleny potraviny do několika skupin podle obsahu purinů na nízko purinové, středně vysoké purinové potraviny a vysoko purinové potraviny.

Vzhledem k výše uvedenému výčtu skupin potravin jsem se v práci zabývala alternativou, k nejvíce konzumovanému druhu masa u nás, kterým je kuřecí maso. Zvolila jsem netradiční druh potraviny, konkrétně cvrčky.

Pro stanovení jednotlivých purinových látek v hmyzu, po jeho hydrolýze, byla zavedena a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzním uspořádání s detektorem diodového pole. Metoda byla lineární v rozsahu koncentrace 2-100 $\mu\text{g/ml}$ a mez detekce (LOD) pro sledované analyty se pohybovala od 0,11 do 0,26 $\mu\text{g/ml}$. Opakovatelnost stanovení purinových látek ve vzorku hmyzu v rámci jednoho dne byla v rozmezí od 4,42 do 18,68 % a v rámci tří různých dnů od 4,39 do 19,53 %. Výťažnost purinových látek se pohybovala v rozmezí od 89,85 % do 129,54 %.

Z výsledků zkoumání pomocí analýzy HPLC nevyplynul jednoznačný závěr, zda je cvrček, jako alternativní potravina, opravdu vhodný ke konzumaci pro člověka trpícího dnou.

Při řešení tematiky konzumace hmyzu jsem narazila na nedostatek literárních informací pro mou práci, které by se zabývaly obsahem purinů v hmyzu. Do budoucna by bylo vhodné se tímto tématem zabývat více. Hmyz jako takový by mohl tvořit zásadní potravinu pro příjem bílkovin v celém světě.

8 Seznam použité literatury

Ban, E., Yoo, Y. S., Song, E. J. 2015. Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis. *Talanta*. 141. p. 15–20.

Bednářová, M., Borkovcová, M., Komprda, T. 2013. Purine derivate content and amino acid profile in larval stages of three edible insects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94. p. 71–76.

Betancourt, J., Gottlieb, S., Liquid Chromatography [online]. 16. února 2017 [cit. 2017-11-24]. Dostupné z
<https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography>

Blanco, A., Blanco, G. 2017. Chapter 18 – Purine and Pyrimidine Metabolism. *Medical Biochemistry*. p. 413–423.

Boulanger, A., Cherney, K., Gout-Friendly Eating: Nutrition Guidelines & Diet Restrictions [online]. 27. dubna 2015 [cit. 2017-11-8]. Dostupné z
<<https://www.healthline.com/health/gout/diet-restrictions#1>>

Brulé, D., Sarwar, G., Savoie, L. 1989. Effect of methods of cooking on free and total purine bases in meat and fish. *Canadian institute of Food science and technology*. p. 248–251.

Clariana, M., Gratacós-Cubarsi, M., Hortós, M., García-Regueiro, J. A., Castellari, M. 2010. Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1217. p. 4294–4299.

Codex Alimentarius. 2010. Codex alimentarius commission – Procedural manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 183.

Corp, N., Pendry, B. 2013. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. *Journal of Herbal Medicine*. 3. p. 157–170.

- Coskun, O. 2016. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul. p. 156–160.
- Dalbeth, N., Merriman, T. R., Stamp, L. K. 2016. Gout. Lancet. 388. p. 2039–2052.
- Dalkiran, B., Erden, P. E., Kilic, E. 2017. Amperometric biosensors based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-metal oxide nanoparticles-7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane composite for the determination of xanthine. Talanta. 167. p. 286–295.
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Cevik, E., Senel, M. 2017. Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosan – polypyrrole – gold nanoparticles hybrid bio – nanocomposite platform. Journal of Food and Drug Analysis. 25. p. 510–519.
- Desai, J., Steiger, S., Anders, H-J. 2017. Molecular Pathophysiology of Gout. Trends in Molecular Medicine. p. 756–768.
- Devi, R., Yadav, S., Nehra, R., Pundir, C. S. 2013. An amperometric hypoxanthine biosensor based on Au@FeNPs for determination of hypoxanthine in meat samples. International Journal of Biological Macromolecules. 62. p. 629–635.
- Di Pietro, M. C., Vannoni, D., Leoncini, R., Liso, G., Guerranti, R., Marinello, E. 2001. Determination of urinary methylated purine pattern by high – performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B. 751. p. 87–92.
- Durney, B. C., Crieffeld, C. L., Holland, L. A. 2015. Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014). Analytical and Bioanalytical Chemistry. p. 6923–6938.
- Ekpenyong, Ch. E., Neybuk, D. Roles of diets and dietary factors in the pathogenesis, management and prevention of abnormal serum uric acid levels. PharmaNutrition. 3. p. 29–45.
- Faeron, W., R. 2014. Chapter XX - purines and pyrimidines. An Introduction to Biochemistry (Second Edition). p. 344–355.

Falck, S., Gout and Diet: Nutritional Information and What to Avoid [online]. 11. února 2017 [cit. 2017-11-8]. Dostupné z <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/315732.php>>

Frank, J., What are purines? [online]. 26. února 2014 [cit. 2017-11-9]. Dostupné z <<https://www.arthritis-health.com/types/gout/what-are-purines>>

Gere, A., Székely, G., Kovács, S., Kókai, Z., Sipos, L. 2017. Readiness to adopt insects in Hungary: A case study. Food Quality and Preference. 59. p. 81–86.

Hafez, R. M., Abdel-Rahman, T. M., Naguib, R. M. 2017. Uric acid in plants and microorganisms: Biological applications and genetics – A review. 8. p. 475–486.

Havlik, J., Plachy, V., Fernandez, J., Rada, V. 2010. Dietary purines in vegetarian meat analogues. Journal of the Science of Food and Agriculture. 90. p. 2352–2357.

Healthline Editorial Team, Gout Treatment and Prevention [online]. 12. prosince 2016 [cit. 2017-11-8]. Dostupné z <<https://www.healthline.com/health/gout-treatments#overview1>>

Huang, W., Jiang, J.-Z., Chen, L., Zhang, B.-Q., Deng, S.-F., Sun, J. J. 2015. Density functional theory and surface enhanced Raman spectroscopy studies of tautomeric hypoxanthine and its adsorption behaviors in electrochemical processes. Electrochimica Acta. 164. p. 132–138.

Huge, B. J., Flaherty, R., Dada, O. O., Dovichi, N. J. 2014. Capillary Electrophoresis coupled with Automated Fraction Collection. Talanta. 130. p. 288–293.

Huis, A., Itterbeeck, J.V., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. 2013. Edible insects Future prospects for food and feed security. FAO Forestry Papers. 171. p. 187.

Chen, G., Chu, Q., Zhang, L., Ye, J. 2002. Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Analytica Chimica Acta. 457. p. 225–233.

Chitrakar, I., Kim-Holzappel, D. M., Zhou, W., French, J. B. 2017. Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *Journal of Structural Biology*. 197. p. 354–364.

Chlup, M. 2009. Jak se stravovat při onemocnění dnou. *Svět potravin*. 18–19 s.

Kaneko, K., Aoyagi, Y., Fukuuchi, T., Inazawa, K., Yamako, N. 2014. Total Purine and Purine Base Content of Common Foodstuffs for Facilitating Nutritional Therapy for Gout and Hyperuricemia. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 37. p. 709–721.

Katoch, P., Trier-Morch, S., Vyberg, M. 2014. Small intestinal tophus mimicking tumor. *Human pathology: Case Reports*. 1. p. 2–5.

Keller, R., A., Giddings, J., C., Chromatography [online]. 17. listopadu 2016 [cit. 2017-11-23]. Dostupné z <<https://www.britannica.com/science/chromatography>>

Kochman, P., Stompór, T. 2016. Gout, hyperuricemia and chronic kidney disease: New treatment possibilities. *Polish annals of medicine*. 23. p. 195–201.

Kouřimská, L., Adámková, A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*. 4. p. 22–26.

Kumari, A. 2018. Chapter 18 – Purine de novo Synthesis. *Sweet biochemistry*. p. 93–97.

Lawal, A. T., Adeloju, S. B. 2010. Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors of hypoxanthine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66. p. 270–275.

Liu, S., Perez-Ruiz, F., Miner, J. N. 2017. Patients with gout differ from healthy subjects in renal response to changes in serum uric acid. *Joint Bone Spine*. 84. p. 183–188.

Lockyer, S., Stanner, S. 2016. Diet and gout – what is the role of purines?. *Nutrition Bulletin*. 41. p. 155–166.

- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., Mollace, V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*. 213. p. 8–14.
- Mayo Clinic Staff, Gout diet: What's allowed, what's not [online]. 17. července 2015 [cit. 2017-11-8]. Dostupné z <<https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/gout-diet/art-20048524>>
- Marberg, A., Kranenburg, H., Korzilius H. 2017. The big bug: The legitimization of the edible insect sector in the Netherlands. *Food Policy*. 71. p. 111–123.
- Marianayagam, T., Koduri, G., Ellis, S. 2014. Crystal Arthropathies. *Medicine*. p. 208–212.
- Megido, R. C., Gierts, Ch., Blecker, Ch., Brostaux, Y., Haubruge, É. 2016. Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Quality and Preference*. 52. p. 237–243.
- Mlcek, J., Rop, O., Borkovcova, M., Bednarova, M. 2014. A Comprehensive Look at the Possibilities of Edible Insects as Food in Europe – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. p. 148–157.
- Nielsen, S., S. 2017. *Food analysis*. 557 s.
- Nowak, P. M., Woźniakiewicz, M., Gładysz, M., Janus, M., Kościelniak, P. 2017. Improving repeatability of capillary electrophoresis—a critical comparison of ten different capillary inner surfaces and three criteria of peak identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. p. 4383–4393.
- Nowak, V., Persijn, D., Rittenschober, D., Charrondiere, U. R. 2016. Review of food composition data for edible insects. *Food Chemistry*. 193. p. 39–46.
- Nyah, W. L. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular genetics and Metabolism*. 86. p. 25–33.

- Puma, G., Cuykx, M., Amato, E., Calaprice, Ch., Focant, J.F., Covaci, A. 2017. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food and Chemical Toxicology*. 100. p. 70–79.
- Qu, X., Sui, J., Mi, N., Lin, H. 2016. Determination of four different purines and their content change in seafood by high-performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97. p. 520–525.
- Rad, A. S., Aghaei, S. M., Aali, E., Peyravi, M. 2017. Study on the electronic structure of Cr- and Ni-doped fullerenes upon adsorption of adenine: A comprehensive DFT calculation. *Diamond & Related Materials*. 77. p. 116–121.
- Ragab, G., Elshahaly, M., Bardin, T. 2017. Gout: An old disease in new perspective – A review. *Journal of Advanced Research*. 8. p. 495–511.
- Ridi, R. E., Tallima, H. 2017. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *Journal of Advanced Research*. 8. p. 487–493.
- Richette, P., Bardin, T. 2010. Gout. *Lancet*. 375. p. 318–328.
- Robinson, P. C., Horsburgh, S. 2014. Gout: Joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities. *Maturitas*. 78. p. 245–251.
- Rong, S., Zou, L., Zhang, Y., Zhang, G., Li, X., Li, M., Yang, F., Li, Ch., He, Y., Guan, H., Guo, Y., Wang, D., Cui, X., Ye, H., Liu, F., Pan, H., Yang, Y. 2015. Determination of purine contents in different parts of pork and beef by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 170. p. 303–307.
- Rumpold, B. A., Schlüter, O. K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 57. p. 802–823.
- Sarwe, G., Brule, D. 1991. Assessment of the uricogenic potential of processed foods based on the nature and quantity of dietary purines. *Progress in food and nutrition science*. p. 151–181.

Shyi-Neng, L. 1998. Purine content in Grass Shrimp during Storage as Related to Freshness. *Journal of food science*. 63 (3) p. 442–444.

Siddiqui, M. R., Singh, R., Bhatnagar, A., Kumar, J., Chaudhary, M. 2017. Determination of residual solvents in docetaxel by headspace gas chromatography. *Arabian Journal of Chemistry*. 10. p. 2479–2484.

Sivera, F., Andrés, M., Quilis, N. 2017. Gout: Diagnosis and treatment. *Medicina Clinica*. 148. p. 271–276.

Smith, E. U. R, Díaz-Torné, C., Perez-Ruiz, F., March, L. M. 2010. Epidemiology of gout: An update. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 24. p. 811–827.

Somerville, R. L. 2013. Guanine. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. p. 372.

Spiegel, M. 2016. Chapter 11 – Safety of Foods Based on Insects. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*. p. 205–216.

Sun, M., Wang, F., Liu, W., Cai, W., Zhang, X. 2016. Novel application of gas chromatography in measurement of gas flow rate. *Flow Measurement and Instrumentation*. 50. p. 245–251.

Svobodová, R. 2016. Hyperurikemie a dnavá artropatie – diagnostika a léčba. *Interní medicína pro praxi*. 18. p. 137–141.

Švorc, L., Kalcher, K. 2014. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological sample using boron-doped diamond electrode. *Sensor and Actuators B: Chemical*. 194. p. 332–342.

Thet, K., Woo, N., Gas Chromatography [online]. 13. března 2015 [cit. 2017-11-23]. Dostupné z

https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography#Contributors

Wang, P., Ren, J. 2004. Separation of purine and pyrimidine bases by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin as an additive. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*. 34. p. 277–283.

Xie, X., Yang, K., Sun, D. 2008. Voltammetric determination of hypoxanthine based on the enhancement effect of mesoporous TiO_2 -modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 67. p. 261–264.

Zielińska, E., Baraniak, B., Karás, M., Rybczyńska, K., Jakubczyk, A. 2015. Selected of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*. 77. p. 460–466.

Žurek, M., Horák, P. 2007. Dnavá artritida a hyperurikemie. *Medicína pro praxi*. 1. p. 17–20.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: adenin	10
Obrázek 2: guanin	10
Obrázek 3: hypoxantin.....	11
Obrázek 4: xantin.....	11
Obrázek 5: močová kyselina.....	12
Obrázek 6: Syntéza purinového skeletu de novo	12
Obrázek 7: Pomocné cesty syntézy purinových nukleotidů	13
Obrázek 8: Kalibrační křivka močové kyseliny	35
Obrázek 9: Kalibrační křivka guaninu.....	35
Obrázek 10: Kalibrační křivka hypoxantinu.....	36
Obrázek 11: Kalibrační křivka xantinu.....	36
Obrázek 12: Kalibrační křivka adeninu	36
Obrázek 13: chromatogram standardu - UA (285 nm)	38
Obrázek 14: chromatogram standardu - G a HX (250 nm)	38
Obrázek 15: chromatogram standardu - X a A (265 nm)	38
Obrázek 16: chromatogram vzorku cvrčka domácího (250 nm)	39
Obrázek 17: chromatogram vzorku cvrčka domácího (260 nm)	39
Obrázek 18: chromatogram vzorku cvrčka domácího (285 nm)	39

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah purinů v potravinách (mg/100 g) dle Chlupa (2009).....	14
Tabulka 2: Obsah purinů ve vegetariánských „masech“ (mg/100 g) dle Havlík et al. (2010).....	15
Tabulka 3: Obsah purinů v potravinách (mg/100 g) dle Kaneko et al. (2014).....	15
Tabulka 4: Příklady chromatografických podmínek při stanovení purinů	18
Tabulka 5: Rozdělení potravin podle obsahu purinů (Boulanger a Charney, 2015)	28
Tabulka 6: Validační charakteristiky	37
Tabulka 7: Opakovatelnost	37
Tabulka 8: Obsah purinů - cvrček domácí.....	37