

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**ANALÝZA ENERGETICKÝCH POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ
POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce: Bc. Zuzana Riemlová
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněná v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....
Zuzana Riemlová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Vítězslavovi Maierovi, Ph.D. jakožto vedoucímu mé diplomové práce za odborné vedení, obětavou a ochotnou spolupráci, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval při konzultacích a při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá analýzou energetických potravinových doplňků kapilární elektroforézou. Práce je rozdělena do dvou částí.

Teoretická část blíže popisuje analytickou metodu, kapilární elektroforézu, použitou v experimentální části a shrnuje její využití v potravinářství. V práci jsou popsány možnosti analýzy aminokyselin, peptidů a proteinů, sacharidů, vitaminů a potravinových barviv. Dále jsou popsány některé látky obsažené v energetických potravinových doplňcích a jejich možnosti analýzy.

Cílem experimentální části bylo nalézt vhodné podmínky stanovení kofeinu, 1,3-dimethylamylaminu a 2-dimethylaminoethanolu v předložených potravinových doplňcích pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s DAD detekcí. Dalším cílem bylo nalézt vhodné podmínky pro separaci optických izomerů 1,3-dimethylamylamin s využitím vhodného chirálního selektoru pro nepřímou UV detekci a detekci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, kofein, 1,3-dimethylamylamin, 2-dimethylaminoethanol, energetické potravinové doplňky.

ABSTRACT

The thesis deals with analysis of energy food supplements by capillary electrophoresis. The thesis is divided into two parts.

The theoretical part describes analytical method, capillary electrophoresis, which is used in experimental selection and its use in the food industry. There are described possibilities of analysis of amino acids, proteins, peptides, carbohydrates, vitamins and food dyes. Further there are described some substances contained in energy food supplements and its possibilities of analysis.

The aim of experimental part was to find suitable conditions of the determination of caffeine, 1,3-dimethylamylamine and 2-dimethylaminoethanol by capillary electrophoresis coupled with DAD detection. The next aim was to find suitable conditions of the separation of optical isomers of 1,3-dimethylamylamine using a suitable chiral selector for the indirect UV detection and detection using tandem mass spectrometry.

Keywords: capillary electrophoresis, caffeine, 1,3-dimethylamylamine, 2-dimethylaminoethanol, energy nutritional supplements.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	10
2.1.1	Princip metody	10
2.1.1.1	Instrumentace	11
2.1.1.2	Jevy využívané v CE	12
2.1.1.3	Dávkování vzorku	12
2.1.1.4	Základní elektrolyt	13
2.1.1.5	Detektory v CE	14
2.1.1.6	Kvalitativní informace	16
2.1.1.7	Kvantitativní informace	16
2.2	FOODOMIKA	16
2.3	VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V POTRAVINÁŘSTVÍ	16
2.3.1	Analýza aminokyselina a heterocyklických aminů	17
2.3.2	Analýza peptidů a proteinů	18
2.3.3	Analýza sacharidů	19
2.3.4	Analýza vitamínů	19
2.3.5	Analýza polyfenolů	20
2.3.6	Analýza potravinových aditiv	20
2.4	ENERGETICKÉ POTRAVINOVÉ DOPLŇKY	22
2.4.1	Složení energetických nápojů	22
2.4.1.1	KOFEIN	22
2.4.1.2	GUARANA	23
2.4.1.3	TAURIN	24
2.4.1.4	1,3-DIMETHYLAMYLAMIN	25
2.4.1.5	2-DIMETHYLAMINOETHANOL	26
2.4.1.6	INOSITOL	28
2.4.1.7	GLUKURONOLAKTON	29
2.4.1.8	VITAMÍNY	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	31
3.2	CHEMIKÁLIE	31
3.3	PODMÍNKY MĚŘENÍ	31
3.3.1	Stanovení LOD	31
3.3.2	Chirální separace optických izomerů 1,3-DMAA	32
3.3.2.1	CE-UV	32
3.3.2.2	CE-MS/MS	32
3.4	PŘÍPRAVA STANDARDŮ A VZORKŮ	33
3.4.1	Stanovení LOD kofeinu	33
3.4.2	Stanovení LOD 1,3 -DMAA a 2-DMAE	33
3.4.3	Chirální separace 1,3-DMAA	34
4	VÝSLEKDY A DISKUZE	35

4.1	STANOVENÍ KOFEINU.....	35
4.2	STANOVENÍ 1,3-DMAA A 2-DMAE.....	37
4.3	CHIRÁLNÍ SEPARACE OPTICKÝCH IZOMERŮ 1,3-DMAA.....	38
4.3.1	CE-UV.....	38
4.3.2	CE-MS/MS.....	41
5	ZÁVĚR.....	45
6	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	46
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47

1 ÚVOD

Předložená diplomová práce je rozdělena na dvě části, teoretickou a experimentální. V teoretické části je shrnut princip kapilární elektroforézy (CE). Jedná se o instrumentální techniku, která se stále více dostává do popředí zájmu mezi ostatní analytické techniky, kterou objevil švédský chemik Arne Tiselius v roce 1930 během studia proteinů. Kapilární elektroforéza je rychle se rozvíjející analytická metoda se stále větším využitím a to díky krátkému analytickému času, ekonomickému využívání činidel a malému množství vzorku potřebného k analýze.

Je vysvětlen pojem foodomika, jedná se o disciplínu studující oblast potravin a výživy z hlediska kvality, bezpečnosti a autentičnosti potravin. Zabývá se stanovováním přítomnosti kontaminantů a alergenů v potravinách a posuzuje vliv zpracování, skladování a konzumace na lidské zdraví.

Z výše uvedeného se analýza potravin zaměřuje na aminokyseliny, které jsou důležité pro získávání informací o nutričních hodnotách, procesech zpracování, skladování, kontroly kvality a pravosti potravin. Důležitým atributem čerstvosti a kvality potravin je analýza biogenních aminů (1). Práce se dále zaměřuje na možnosti analýz peptidů, proteinů, sacharidů, vitaminů a potravinářských aditiv, potravinářských barviv, pomocí kapilární elektroforézy.

Energetické potravinové doplňky obsahují kofein a alespoň jednu další složku např. taurin, inositol a glukuronolakton. Další energeticky bohatým doplňkem stravy je guarana, což v překladu v rozličných domorodých dialektech znamená *popívaná rostlina* či *réva*. První zmínka o guaraně jako nápoji pochází z roku 1669, kdy si misionář v Amazonii, povšiml konzumace nápoje u domorodých indiánů, který měl močopudné a léčebné účinky, působil proti horečce, bolesti hlavy a křeči. První chemická studie guarany byla provedena roku 1826. Kofein je přírodní alkaloid vyskytující se v lístkách čajovníku, kávových zrnech, kolových oříškách, kakaovníku a guaraně. Poprvé byl izolován Friedliebem Ferdinandem Runge v roce 1820 (2).

V teoretické části je popsán 1,3-dimethylamylamin (1,3-DMAA), který se přirozeně vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích pravděpodobně v rostlinách rodu *Geranium* (*Pelargonium graveolens*). Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv FDA (Food and

Drug Administration) zakázal přidávat 1,3-DMAA pro své negativní účinky do potravinových doplňků.

Cílem experimentální části je nalézt vhodné podmínky pro stanovení kofeinu, 1,3-DMAA a 2-DMAE a separaci směsi 1,3-DMAA a 2-DMAE v předložených potravinových doplňcích. Dalším cílem je nalézt vhodné složení pracovního elektrolytu a optimalizovat podmínky pro separaci izomerů 1,3-DMAA s využitím vhodného chirálního selektoru, pro nepřímou UV detekci a detekci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektroforéza

2.1.1 Princip metody

Separace elektroforézou je založena na elektroforetické migraci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato separační metoda může být použita pro analýzu anorganických iontů, aminokyselin, sacharidů, peptidů, proteinů, nukleových kyselin, nukleotidů, katecholaminů, drog, vitamínů a mnoha dalších látek. Nenabitě či hydrofobní analyty lze separovat pomocí micelární elektrokinetické chromatografie.

Elektroforetická pohyblivost je pro daný iont a prostředí konstantou, jenž charakterizuje daný iont. Na nabitou částici působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly, působící vzájemně opačně, pohyblivá síla F_E a třecí síla F_F .

Separace probíhá v kapiláře, nejčastěji křemenné o vnitřním průměru 10 - 100 μm a délce 30-100 cm. Materiál, ze kterého je kapilára zhotovena, musí být chemicky a elektricky inertní, UV-Vis průhledný, pružný, robustný a relativně levný. Nejčastěji je pro snadnou manipulaci a dobrý odvod tepla, které se generuje průchodem proudu kapilárou, kapilára pokryta polyamidem. Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede elektrický proud.

Separace analytů probíhá vložení vysokého napětí (až 30 kV). Průchodem elektrického proudu kapilárou se tvoří teplo, nazývané Joulovo teplo. Joulovo teplo je účinně odváděno stěnami kapiláry, a proto může být použito vysoké napětí (3-5).

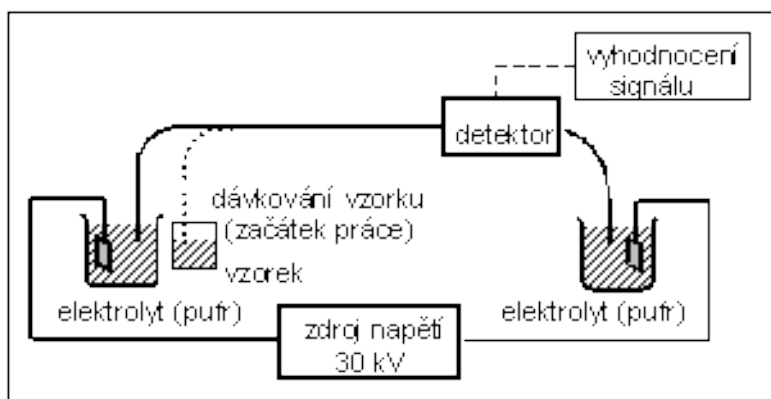
Je známo šest kapilárních elektromigračních technik, které mají stejnou instrumentaci, ale různý princip separace analytů (6):

- A) Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- B) Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- C) Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- D) Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- E) Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- F) Kapilární izotachoforéza (CITP)

2.1.1.1 Instrumentace

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá (obr. 1):

- z říditelného zdroje stejnosměrného vysokého napětí,
- ze dvou nádobek obsahující pracovní elektrolyt,
- ze dvou elektrod, nejčastěji platinových, ponořených do nádobek s pracovním elektrolytem, připojených ke zdroji vysokého napětí,
- ze separační kapiláry, která, je-li používána s určitými druhy detektorů, má v místě detekce opticky průhledné okénko
 - konce kapiláry jsou umístěny v nádobkách s pracovním elektrolytem,
 - kapilára je tímto pracovním elektrolytem naplněna,
- z vhodného dávkovacího systému,
- z termostátového systému schopného udržovat konstantní teplotu uvnitř kapiláry (výhodné z hlediska dobré opakovatelnosti separace),
- z detektoru schopného sledovat množství zkoumané látky procházející úsekem kapiláry v daném čase,
- ze zapisovače a vhodného integrátoru nebo počítače (7).



Obr. 1 Schéma aparatury pro kapilární elektroforézu (4)

2.1.1.2 *Jevy využívané v CE*

CE využívá dvou transportních jevů, elektroforetické migrace iontů, což způsobuje pohyb iontů v elektrickém poli k opačně nabitě elektrodě, a elektroosmotického toku (EOF) kapaliny kapilárou, v níž je elektrické pole vytvořeno vložением napětí mezi elektrody na koncích kapiláry.

EOF je důsledkem vlastností fázového rozhraní mezi kapalinou v kapiláře a vnitřní stěnou kapiláry. EOF má za následek pohyb roztoku kapilárou k detektoru, kam unáší i částice elektroforetický migrující opačným směrem a v případě nemodifikované vnitřní stěny kapiláry se pohybuje od anody ke katodě. EOF může urychlit např. vysoké pH, ale tím může dojít k eluci analytu před separací. EOF je silně závislý na pH, složení a koncentraci pracovního elektrolytu, dielektrické konstantě použitého rozpouštědla a viskozitě elektrolytu.

Podmínky, které způsobí změnu povrchu stěny kapiláry, často ovlivní i fyzikálně-chemické vlastnosti analytu. Úspěšné separace lze docílit optimalizováním podmínek EOF. Ten může být ovlivněn upravením koncentrace a iontovou silou pufru.

EOF se měří pomocí tzv. *EOF markerů*. Jedná se o neutrální látky rozpustné v prostředí pracovního elektrolytu, které migrují kapilárou stejnou rychlostí jako EOF. Marker by neměl reagovat s analytem ani s ostatními složkami pracovního elektrolytu. Měl by být snadno detekovatelný. Tyto podmínky splňují např. benzen, aceton nebo močovina (3) (8).

2.1.1.3 *Dávkování vzorku*

Roztok je dávkován do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. Dávkuje se 10 – 100 nl a zóna vzorku tvoří asi 1 – 2 % celkové délky kapiláry. Vzorek lze dávkovat několika způsoby:

1. *Hydrodynamické dávkování*

Je nejběžnější způsob dávkování. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku, která je pneumaticky uzavřena vhodným septem. Přívodem stlačeného vzduchu se přivede nad hladinu vzorku stlačený vzduch o tlaku několik set Pa po dobu několika sekund.

Jiný způsob je, že se výstupní nádobka pneumaticky uzavře a do této nádoby se přivede vakuum. Výhodou hydrodynamického dávkování je, že má vzorek dávkovaný do kapiláry stejné složení jako v nádobce.

2. Dávkování rozdílem hladin

Dávkování vzorku se dosáhne manuálním zvednutím nádoby s roztokem vzorku, tak aby byla o definovanou vzdálenost výše než výstupní nádobka. Vzorek se nasaje do kapiláry vlivem přetlaku, který se vytvoří nad hladinou vzorku.

3. Elektrokinetické dávkování

Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a elektrodou na kterou je přivedeno napětí několik jednotek kV po dobu několika sekund. Vlivem elektroosmózy se nasaje do vstupního konce kapiláry malé množství vzorku. Toto dávkování je méně často používáno.

Nevýhodou tohoto dávkování je, že složení vzorku vstupujícího do kapiláry má jiné složení než vzorek v nádobce. To je způsobeno elektroforetickými rychlostmi iontů, při kterých jsou zvýhodněny kationty a znevýhodněny anionty (3) (4) (6).

2.1.1.4 Základní elektrolyt

Základní elektrolyt se skládá z pufru, který hraje v CE důležitou roli. Měl by mít velmi nízkou absorpci při vlnových délkách, při kterých se provádí detekce analytu ve vzorku. Vhodný pracovní elektrolyt pro kapilární elektroforézu mají přiměřenou tlumivou kapacitu ve vybrané oblasti pH a nízkou elektrickou vodivost, aby minimalizoval procházející elektrický proud. Vodivé vlastnosti pufru umožňují migraci iontů analytu. Zvýšení koncentrace pracovního elektrolytu pro dané pH, snižuje EOF a rychlost rozpuštěné látky. Elektroosmóza je řízena hlavně zbytkovým nábojem na stěně kapiláry, ale elektroosmotický tok je také kontrolován uváženým výběrem pufru.

Rychlost migrace analytu, separace, účinnost kapiláry i tvar píku jsou citlivé na změnu charakteru pracovního elektrolytu. Pufrační kapacita musí mít dostatečný rozsah, tak aby se pH a vodivost neměnila po nadávkování vzorku (6) (7) (9).

2.1.1.5 Detektory v CE

1. UV/VIS spektrofotometrický detektor

CE ve spojení s UV detekcí je nejpoužívanější způsob analýzy velkého množství zneužívaných medikamentů v biologickém materiálu. Tento typ detektoru může být spojen s DAD a získávat souběžná spektra. Avšak malý vnitřní průměr kapiláry omezuje citlivost detekčního systému a proto mez detekce (LOD) pro UV-Vis absorpci není dost nízký pro kvantifikaci těchto medikamentů v biologickém vzorku. Pro zvýšení citlivosti je někdy třeba provést on-line nebo off-line prekoncentrování vzorku (10).

2. Fluorescenční detektor

Detektor využívající laserem indukovanou fluorescenci (LIF) je jeden z nejcitlivějších pro fluoreskující analyty. Nevýhodou je, že většinou vyžaduje derivatizaci vzorku (10).

3. Vodivostní detekce

Vodivostní detektor je zaměřený na měření elektrické vodivosti zón separovaných látek. Využívá se např. k detekci sacharidů, aminokyselin a anorganických iontů.

4. Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce je citlivá, selektivní a jednoduchá. Elektrody jsou zhotoveny z uhlíkatých vláken, zlata, mědi nebo platiny a jsou selektivní pro různé analyty (11).

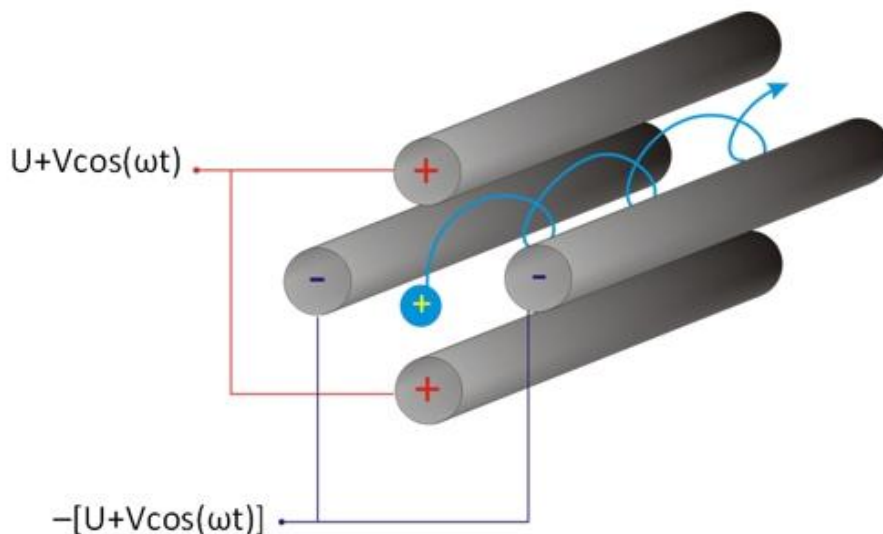
5. Hmotnostní spektrometr

Metoda poskytuje vynikající detekční citlivost a strukturální informace o analytech. Nevýhodou je vysoká cena a omezená komerční dostupnost CE-MS přístrojů. CE-MS se stala doplňující metodou pro HPLC-MS. Ionizace elektrosprejem (ESI) je nejpoužívanější propojení mezi CE a MS, protože usnadní přenos analytů z kapalně fáze CE do plynné fáze MS. Aby se zabránilo kontaminaci iontového zdroje a přerušení tvorby spreje během analýzy, používají se při přípravě nosného elektrolytu pouze těkavé soli typu mravenčanu nebo octanu amonného. V kombinaci CE-MS je dobré pracovat z hlediska pH v alkalické oblasti za podmínek stabilizované rychlosti EOF (6) (9) (10).

KVADRUPÓL

Jedná se o jeden z hlavních analyzátorů hmotností spektrometrie, který je sestaven ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu a délky 20 -30 cm, jak je ukázáno na obr. 2. Na dvě protilehlé tyče je vkládáno kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion přivedený do středu osy kvadrupólu začne oscilovat. Pro daný poměr U/V jsou oscilace stabilní jen pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem k detektoru. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Změnou hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V , jejich poměr zůstává konstantní, jsou přivedeny na detektor postupně všechny ionty. Tento hmotnostní analyzátor je hojně používán pro rutinní spojení se separačními metodami, díky jednoduché obslužnosti a nízké pořizovací ceně.

Trojitý kvadrupól (QqQ) je typický pro kvantitativní analýzu. Tři kvadrupóly jsou spojené za sebou, kdy střední slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, který způsobuje kolizní excitaci vybraných iontů prvním kvadrupólovým analyzátozem a jejich následnou fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou následně analyzovány pomocí posledního, třetího kvadrupólu (12) (13).



Obr. 2 Hmotnostní analyzátor – kvadrupól (14)

2.1.1.6 Kvalitativní informace

Kvalitativní informace odpovídá migračnímu času, a ten je dán elektroforetickou pohyblivostí analyzované látky.

2.1.1.7 Kvantitativní informace

Plocha píku udává množství a koncentraci analyzované látky. Kolísání rychlosti EOF, která je často pozorována v CE, ovlivňuje opakovatelnost ploch píku analyzovaných látek. Pro lepší opakovatelnost se místo plochy píku vyhodnocuje korigovaná plocha píku, což je plocha píku dělená migračním časem analytu (6) (15).

2.2 Foodomika

Foodomika je definována jako disciplína studující oblast potravin a výživy. Využívá moderních technologií k získání informací související s bioaktivitou, kvalitou, bezpečností a autenticitou potravin. Stanovuje přítomnost kontaminantů a alergenů v potravinách. Posuzuje účinky bio/technologických postupů využívaných při výrobě potravin, jejich změny v průběhu času. Dále zkoumá vliv konzumace potravy na lidské zdraví. Cílem foodomiky je výroba vysoce kvalitních a bezpečných potravin pro zlepšení lidského zdraví a pohodu (16-18).

I v případě foodomiky se CE jeví jako vhodná analytická metoda, umožňuje všestranné využití vzhledem k různým modům CE. Poskytuje rychlou a efektivní separaci za nízké spotřeby reagentů a vzorku. Nevýhodou je menší citlivost, kterou lze vylepšit spojením CE – MS (19).

2.3 Využití kapilární elektroforézy v potravinářství

Analýza potravin je stále aktuální téma, jež vyžaduje objevení nových analytických metod pro detekci stále více sofistikovanějších panšovacích procesů. Proto má své uplatnění kapilární elektroforéza, která patří mezi univerzální a robustní metody poskytující rychlou, efektivní a automatizovanou separaci s malou spotřebou rozpouštědla a činidla. Univerzálnost CE je ukázána nejen na rozmanitosti vzorků, které lze analyzovat (nápoje, ovoce, zelenina, maso, cereálie atd.), ale také při monitorování změn potravin v čase,

od výroby, přes transport, skladování až po spotřebu (oxidace, racemizace aminokyselin, chemické změny během tepelné úpravy, mikrobiální kontaminace atd.) (1).

Své uplatnění má i CE ve spojení s MS detekcí pro analýzu geneticky modifikovaných plodin a kontrolování bezpečnosti, kvality a autentičnosti potravin.

2.3.1 Analýza aminokyselina a heterocyklických aminů

Analýza aminokyselin je důležitá pro získávání informací o nutričních hodnotách, procesech zpracování, skladování a z důvodu monitorování kontroly kvality a pravosti potravin. Ve většině případů předchází analýze aminokyselin derivatizace vhodným derivatizačním činidlem. Použití MS detektoru umožňuje derivatizační krok vynechat (1).

Důležitým atributem čerstvosti a kvality potravin je analýza biogenních aminů. Jedná se o nízkomolekulární dusíkaté látky, vznikající enzymatickou dekarboxylací aminokyselin. Nadměrný příjem těchto dusíkatých sloučenin vyvolává u jedinců bolesti hlavy, průjem a zvracení.

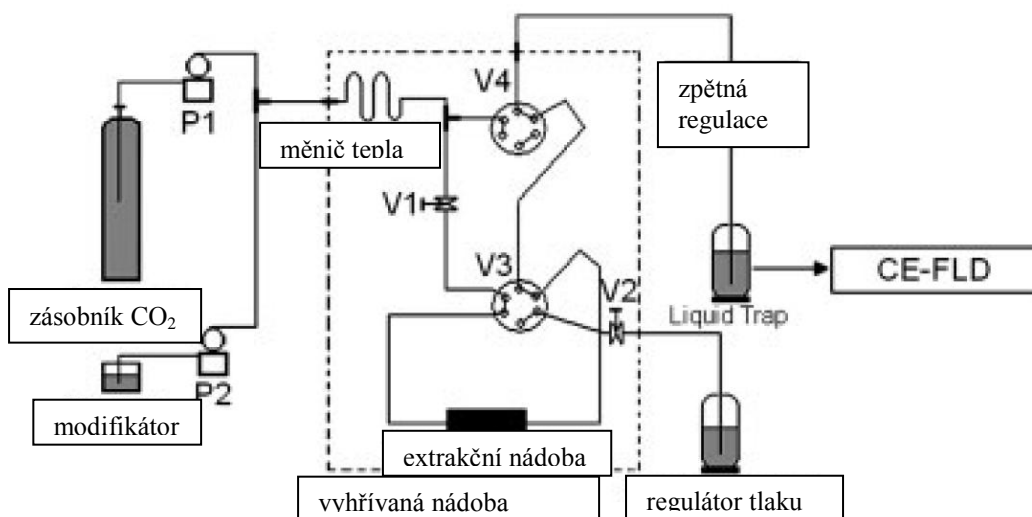
Baskan uvádí jako metodu pro stanovení biogenních aminokyselin histaminu, putrescinu (butan -1,4 - diamin) a kadaverinu (pentan -1,5 - diamin) micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií ve spojení s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (MEKC-LIF). Vzorek ryby i standardy byly derivatizovány. 1 ml roztoku obsahující standardy biogenních aminů, jejich deriváty a Na_2CO_3 o dané koncentraci byl upraven roztokem NaOH na pH 9. Směs byla ponechána 4 hodiny ve tmě při teplotě 40°C , před použitím byla směs 1000x zředěna destilovanou vodou. K 100 μl vzorku bylo přidáno 200 μl 19 mM roztoku směsi derivátu šesti biogenních aminů a 300 μl 0,3 M Na_2CO_3 . Směs byla ponechána 4 hodiny ve tmě při teplotě 40°C .

Separace probíhala v křemenné kapiláře o průměru 50 μm s celkovou délkou 63 cm a efektivní délkou 47 cm, na níž bylo vloženo napětí 25 kV. Kapilára byla termostatována na teplotu 25°C . Dávkování bylo provedeno tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Excitace byla provedena Ar laserem při 488 nm (20).

Heterocyklické aminy jsou další důležitá skupina sloučenin, jež vznikají z aminokyselin, kreatinu a cukru během vaření například ryb a masa. Nad 150°C koncentrace heterocyklických aminů rapidně vzrůstá. De Andres kombinoval superkritickou fluid-

ní extrakci (SFE) pro extrakci heterocyklických aminů z vařeného masa s kapilární elektroforézou s fluorimetrickou detekcí (CE-FLD).

SFE je účinná a spolehlivá technika, nese řadu výhod kvůli možnosti extrakce a koncentrování nestabilních sloučenin a minimalizuje ztrátu těchto sloučenin. Pro stanovení nepolárních heterocyklických aminů ze vzorku masa bylo s použitím SFE-CE-FLD dosaženo vysoké citlivosti, dobré opakovatelnosti extrakce i odezvy detektoru. Pro analýzu extrahovaných aminů, které byly rozpuštěny v roztoku ACN/ voda (1:1, v/v), byla použita pokrytá křemenná kapilára s efektivní délkou 41 cm, na kterou bylo vkládáno napětí 20 kV a temperována na teplotu 25°C. Použité bylo hydrodynamické dávkování o 50 mbar po dobu 5 s. Jako zdroj záření byla použita Xe-Hg výbojka, emisní záření bylo sbíráno v rozsahu od 495 nm do vyšších vlnových délek (21) (22).



Obr. 3 Schéma SFE pro extrakci heterocyklických aminů (21)

V1 a V2 ventily výběru tlaku, V3 a V4 ventily dávkování tlaku, P1 a P2 vysokotlaké pumpy

2.3.2 Analýza peptidů a proteinů

Analýza proteinů a peptidů je jedna z hlavních aplikací CE v potravinářství. Proteiny se při analýze CE adsorbují na vnitřní stěnu kapiláry, což má za následek snížení účinnosti separace a nižší opakovatelnost migračních časů. Použitím pokryté křemenné kapiláry a optimalizací složení pracovního elektrolytu je možné zlepšit separaci.

Peláez - Lorenzo ve své práci popisuje analýzu β -laktoglobulinu z dětské potravy obsahující několik mléčných produktů následovně: Nejprve byl odstraněn tuk přidávkem fos-

fátového pufru. β -laktoglobulinu byl extrahován přidavkem roztoku obsahující 25 mM mercaptoethanol, 25 mM guanidin hydrochlorid a 5 % 2,5 mM borátový pufr o pH 7,3

a 0,15 M roztok NaCl. Po protřepání a centrifugaci byl supernatant filtrován a analyzován CE-LIF (1) (23).

2.3.3 Analýza sacharidů

Sacharidy řadíme do skupiny heterogenních sloučenin, jež zahrnují monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Sacharidy mohou být součástí biomolekul, například glykoproteinů.

Při analýze sacharidů CE je nejčastějším problémem, režim detekce. Molekuly sacharidů obsahují nedostatek chromoforů, proto je nezbytná jejich předkolonová derivatizace, pro dosažení nízkého limitu detekce.

Analýza nederivatizovaných sacharidů (arabinóza, ribóza, xylóza, inositol, glukóza, fruktóza, galaktóza) byla provedena s použitím CE-ESI-MS metody, kde jako pracovní elektrolyt byl použit velmi alkalický pufr a pracovalo se v negativním módu MS detekce. Nebo je možné použít nepřímou UV-VIS detekci s použitím separačního pufru o pH větším než 12, kdy jsou sacharidy plně ionizovány, při vlnové délce 254 nm. Problém s nedostatkem chromoforů je často řešen derivatizací vhodným derivatizačním činidlem (např. 1-naftyl-3-methyl-5-pyrazolon) (24) (25).

Separace sacharidů CZE je možné s použitím silně alkalického pracovního elektrolytu (80 mM NaOH, 0.5 mM CTAB, 30 % MeOH), kdy se separují podle elektroforetické mobility a jsou detekovány jako negativní píky (22).

2.3.4 Analýza vitamínů

Vitamíny jsou organické látky nezbytné pro normální růst a funkci člověka. Některé si tělo neumí samo syntetizovat, musí být proto přijímány v potravě. Nedostatek způsobuje vážné nemoci.

Riboflavin (vitamín B2) se běžně vyskytuje v některých potravinách a nápojích, ale na světle snadno podléhá degradaci. Ze vzorku potravin lze určit například pomocí CZE

ve spojení s LIF detektorem (laserem indukovanou fluorescencí) nebo CE s fluorimetrickou detekcí s předcházející on-line superkritickou fluidní extrakcí. Důležité je provést přečištění vzorku superkritickým CO₂ (24).

Vitamíny skupiny B a vitamín C z farmaceutického přípravku byly separovány a kvantifikovány pomocí MEKC s UV detekcí za následujících podmínek: Vzorek i pufr byly filtrovány přes 0,22 µm filtr. Separační kapilára byla kondicionována 10 min 1 M NaOH před prvním použitím a poté před každou analýzou 3 min 0,1 M NaOH a 5 min puftrem. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky 50 mbar po dobu 3,7 s. Na kapiláru, která byla termostátována na 35 °C, bylo vkládáno pozitivní napětí 20 kV. Pro analýzu byl použit 20 mM boráto-fosfátový pufr s přídavkem 50 mM SDS o pH 9. Detektor měřil při vlnové délce 265 nm (26).

2.3.5 Analýza polyfenolů

Nejvíce studované polyfenoly jsou flavonoidy, sloučeniny, které jsou obsažené v množství potravin a nápojů. Flavonoidy jsou díky svým antioxidačním, protialergickým a protizánětlivým vlastnostem prospěšné pro lidské zdraví. Obsah flavonoidů v ovoci, zelenině a dalších rostlinách závisí na stupni zralosti, odrůdě, zpracování a skladování těchto potravin. Polyfenoly byly analyzovány pomocí CE-ESI-MS metodou za použití acetátu amonného jako pracovního elektrolytu a MS detekce v negativním módu (25).

2.3.6 Analýza potravinových aditiv

Potravinová aditiva jsou substance přidávané do jídla k uchování nebo zlepšení chuti, vůně a vzhledu. Některé aditiva jsou pro konzervaci potravin používána stovky let (ocet, sůl a další). S nástupem zpracování v 2. polovině 50. let 20. století se začali používat umělá aditiva jako barviva, sladidla a konzervanty (1).

Potravinová barviva jsou přírodní nebo syntetické sloučeniny. Syntetická barviva, povolená jako potravinová barviva, zahrnují substance, které řadíme mezi chinony, trifenylmethan, azosloučeniny a indigoidy. Například z alkoholických nápojů je můžeme extrahovat absorpcí na vlnu po okyselení nápoje například ledovou kyselinou octovou. Ex-

trakce pevnou fází se používá pro získání syntetických barviv z nápojů a pro jejich prekoncentraci (27).

Nejběžněji používaná barviva jsou například tartrazin, indigo, erythrosin, karmín nebo amarant. Syntetická barviva byla stanovena v nealkoholických nápojích a sladkostech pomocí MEKC, jak je popsáno v článku, za následujících podmínek: Separace probíhala v nepokryté křemenné kapiláře s efektivní délkou 57 cm a vnitřním průměrem 75 μm , na kterou bylo vkládáno napětí 25 kV. Separace probíhala v roztoku tvořeném 18 % acetonitrilem (ACN) a 82% 0,05 M deoxycholátem sodným v boráto-fosfátovém pufru o pH 7,8. Detekční vlnová délka byla nastavena na 214 nm (28).

Obdobně probíhala separace 11 syntetických barviv používaných v současnosti v Brazílii pomocí MEKC. Byl studován vliv elektrolytu obsahující 7,5 mM tetraboritan sodný o pH 10,1, 10 mM Brij 35 a 15 % acetonitril (v/v). Vzorek byl dávkován hydrodynamicky 50 mbar po dobu 2 s a monitorován simultánně při vlnových délkách 418, 484, 518 a 590 nm. Separace analytů probíhala za konstantního napětí +26 kV (29).

2.4 ENERGETICKÉ POTRAVINOVÉ DOPLŇKY

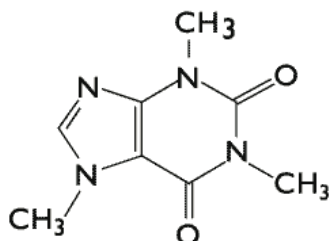
Jedním z komerčně snadno dostupných energetických potravin jsou energetické nápoje, definované jako nápoje obsahující kofein a alespoň jednu další složku, a to taurin (maximální možná koncentrace 4000 mg/l), inositol (limit 200 mg/l) a glukuronolakton (limit 2400 mg/l) (30).

Prodej energických nápojů roste v průběhu několika posledních let. Populární je především u teenagerů ve věku mezi 18 až 34 let a to díky schopnosti zvýšit pozornost, vytrvalost, kondici a udržet energii během zvýšené fyzické zátěže. Tento efekt způsobují kofein, guarana, taurin, cukr, umělá sladidla a jiná potravinová aditiva obsažená v energetických nápojích (31). Běžně se v energetických nápojích také vyskytují vitamíny rozpustné ve vodě B2, B3, B6 a C.

Kofein může být přidán k nealkoholickým nápojům v nejvyšším množství 250 mg/l. Do energetických nápojů může být přidán v nejvyšším přípustném množství 320 mg/l (32).

2.4.1 Složení energetických nápojů

2.4.1.1 KOFEIN



Obr. 4 Strukturní vzorec kofeinu

Systematický název je 1,3,7 – trimethylxanthin, derivát purinu, který je základní stavební jednotkou živočišné a rostlinné buňky. Předpokládá se, že akumulace purinových alkaloidů slouží jako ochrana mladých listů, květů a plodů před škůdci.

Jedná se o bílou krystalickou látku hořké chuti. Methylxanthiny jsou velmi stabilní látky. Alkylxanthiny jsou slabé báze a pro jejich separaci v CE se používá směs několika pufrů zásaditého pH, nejčastěji fostát a borát (33).

Kofein je přírodní alkaloid vyskytující se v lístcích čajovníku, kávových zrnech, kolových oříškách, kakaovníku a guaraně.

Obsah kofeinu:

- v kakaových bobech a semenech kávovníku pravého je 0,02 – 0,05 %,
- v kolových oříscích je 1,5 – 2,5 %,
- v listech čajovníku čínského je 2% v sušině,
- v guaranových oříscích je 2,5 – 7,5 %.

Kofein se řadí mezi látky určené k aromatizaci potravin. V malých denních dávkách, < 3 mg/kg, působí jako stimulant centrální nervové soustavy a močopudně. Je zjištěno, že má fatální následky po konzumaci dávky 150 – 200 mg/kg tělesné hmotnosti (32) (34) (35).

Podle článku (36) byla separace kofeinu v nápoji provedena pomocí MECC ve spojení s UV/Vis detekcí podle následujících experimentálních podmínek: Kapilára byla kondicionována 2 min 0,1 M roztokem NaOH, 1 min deionizovanou vodou a nakonec 2 min pufrem. Kapilára byla termostatována na 25 °C. Vzorek byl dávkován tlakem 138 mbar. Analyzovaným vzorkem byly nápoj z yerba mate, kávy, čaje, kakaá připravené rozpuštěním či luhováním v 100 ml 75 °C po dobu 5 min. Následně byly vzorky podle potřeby filtrovány a ředěny.

Na nepokrytou křemennou kapiláru o celkové délce 45 cm, a efektivní délce 40 cm bylo vloženo napětí 15 kV. Pracovní elektrolyt o pH 8,5 byl tvořen 50 mM dodecylsíránem sodným (SDS) a 90 mM borátem sodným. Detekční vlnová délka byla 200 nm. Limit detekce byl méně než 1 mg/l a mez kvantifikace byl 2,5 mg/l v pracovním rozsahu 2,5 – 300 mg/l (36).

2.4.1.2 GUARANA

Rostlina guarany je široce rozšířená v oblasti Amazonie a severovýchodní Brazílii. Semena jsou používána v medicíně, obsahují velké množství methylxanthinů, jako kofein, teofylin, teobromin a polyfenoly především třísloviny (taniny). Každý gram guarany obsahuje 40 – 80 mg kofeinu. Až 70 % produkce guarany je používána jako přísada do nealkoholických a energetických nápojů.

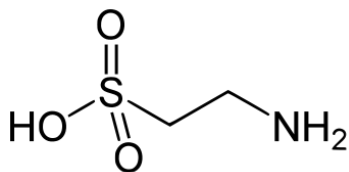
Extrakt z guarany se používá jako stimulant CNS, proti fyzickému a psychickému stresu, proti průjmu a jako močopudný prostředek. Dále tento extrakt vykazuje nízkou toxicitu, působí jako antioxidant a proti ztrátě paměti.

Polyfenoly mohou být analyzovány kapilární elektroforézou, ale analytické procesy jsou složité, doba analýzy je dlouhá a závisí na použití některých polyfenolech a standardech, které jsou drahé (37).



Obr. 5 Plody Guarany (2)

2.4.1.3 TAURIN



Obr. 6 Strukturní vzorec taurinu

2-aminoethansulfonová kyselina byla poprvé izolována němcem Fridrichem Tiedemanem z byčí žluče (taurus – z lat. býk). Je významnou složkou žluči. Taurin je u savců jedním z konečných produktů metabolismu aminokyseliny cysteinu.

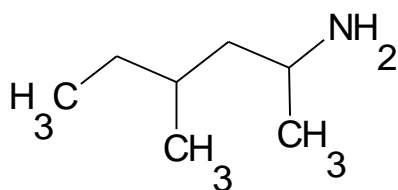
Ve vysoké koncentraci je přítomen v řasách, v tělech pavouků a členovců a ve stopovém množství je přítomen v bakteriální a rostlinné říši. Je jednou z nejhojnějších nízkomolekulárních organických složek v těle savců (70 kg hmotnosti člověka obsahuje až 70 g taurinu) (38) (39).

Taurin je organická slabá kyselina s disociační konstantou $pK_a = 4,96$. Jedná se o amfoterní sloučeninu snadno rozpustnou ve vodě. Je stabilní i během vaření, její teplota varu je větší než 300°C . Zůstává stabilní v kyselém i bazickém prostředí. Neobsahuje chromofor, takže je nutné ho pro UV a fluorescenční detekci derivatizovat. Pro CE analýzu je vhodné pouze předkolonové derivatizační činidlo, fluorescein, použitý v přítomnosti borátového pufru (40).

Analýza taurinu ve spojení CE-LIF byla provedena následovně: Pro separaci byla použita kolona s efektivní délkou 40 cm a vnitřním průměrem $75\ \mu\text{m}$, ve $20\ \text{mmol/l}$ Na_3PO_4 pufru o pH 11,8. Vkládáno bylo napětí 22 kV ($190\ \mu\text{A}$). Nadávkováno bylo 18 nl vzorku. Po každém měření byla kapilára promyta 1 min $0,5\ \text{mol/l}$ NaOH a ekvilibrována puftrem 1 min (41).

Taurin má fyziologický účinek, podílí se na ochraně jater a žlučníku a snižuje krevní tlak. Studie ukázaly, že vhodné množství taurinu, může chránit játra před volnými radikály, kdežto nadbytek může mít vliv škodlivý. Člověk má omezenou schopnost syntetizovat si taurin, proto je nutné jej z velké části dodat z potravy. Změna hladiny taurinu ve fyziologických tekutinách a tkáních úzce souvisí s množstvím chorob jako Alzheimerovou chorobou, kardiovaskulárním onemocněním a epilepsií. V těle se nachází ve vysoké koncentraci po narození a s věkem rychle klesá (38).

2.4.1.4 1,3-DIMETHYLAMYLAMIN



Obr. 7 Strukturální vzorec 1,3-DMAA

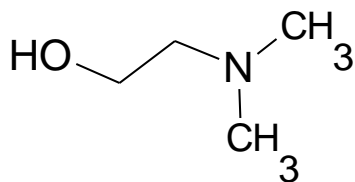
1,3-dimethylamylamin (1,3-DMAA) se v přírodě vyskytuje pravděpodobně v rostlinách rodu *Geranium* (*Pelargonium graveolens*) a jejich olejích. V roce 1940 byl patentován farmaceutickou společností jako nosní kapky pod značkou *Forthane*, které mohou být používány jako rekreační stimulanty.

Přirozený obsah 1,3-DMAA byl potvrzen několika publikovanými pracemi (42-44), ale také několik dalších prací toto tvrzení vyvrací (45-49). Práce, které uvádějí přirozený výskyt 1,3-DMAA v rostlinných materiálech a jeho extraktech uvádějí velmi nízký obsah 1,3-DMAA jak v samotném rostlinném materiálu tak jeho extraktu. Stanovený celkový obsah 1,3-DMAA v extraktu *Pelargonium Graveolens* se pohybuje v rozmezí 14-365 ng/g. Široké rozpětí obsahu 1,3-DMAA je dáno geografickou lokací a podmínkami, za kterých je rostlina pěstována.

Celkový obsah 1,3-DMAA v rostlinných extraktech je velice malý. Aby mohlo být 1,3-DMAA použito v potravním doplňku jako účinná složka, jejímž účinkem má být snižování váhy a podpora růstu svalové hmoty, je nutné použít poměrně velké množství extraktu. Farmakologický účinek 1,3-DMAA je pozorovatelný při užití 4 mg 1,3-DMAA, přičemž vážné zdravotní problémy nastávají při užití 100 – 200 mg 1,3-DMAA jednorázově (50).

1,3-DMMA je opticky aktivní sloučenina, která má dvě chirální centra a existují tedy 4 jednotlivé optické izomery. Je předpoklad, že pokud je obsah 1,3-DMMA přírodního původu, měl by být poměr jednotlivých optických izomerů různý od poměru 1:1:1:1. Technickou syntézou 1,3-DMMA vznikají jednotlivé izomery právě v poměru 1:1:1:1. Separací jednotlivých izomerů je možné stanovit poměr jednotlivých izomerů v reálných vzorcích (oleje, potravinové doplňky apod.) a zjistit tak, jestli je původ 1,3-DMAA v potravinových doplňcích přirozený, anebo je 1,3-DMAA uměle přidáván do potravinových doplňků jako syntetický. Přídavek syntetického 1,3-DMAA do potravinového doplňku je mnohonásobně ekonomicky výhodnější než přídavek extraktu rostlinného původu.

2.4.1.5 2-DIMETHYLAMINOETHANOL



Obr. 8 Strukturální vzorec 2-DMAE

2-dimethylaminoethanol (2-DMAE) je světle žlutá kapalina molekulovou hmotností 89 g/ mol a hustotou 886 mg/ ml. Ve vysokých koncentracích se nachází v ančovičkách

a sardinkách. Předpokládá se, že 2-DMAE methyduje v mozku za vzniku cholinu. Několik testů dokazuje, že má pozitivní vliv při léčbě výpadků paměti, příznaků Alzheimerovy choroby a může mít příznivý vliv při utlumení rušivého chování spojeného s poruchou pozornosti a hyperaktivitou. 2-DMAE působí jako antioxidant (51).

CHIRÁLNÍ SEPARACE

Molekuly, které nejsou identické se svým zrcadlovým obrazem a existují ve dvou enantiomerních formách, se označují jako chirální. Enantiomery mají v achirálním prostředí shodné fyzikálně – chemické vlastnosti. Liší se ve vlastnostech biologických, toxikologických a farmaceutických. Chirální molekula je molekula s nejméně jedním asymetrickým centrem, lokalizovaném na uhlíku, na kterém jsou navázány čtyři různé substituenty. Molekula nemá rovinu symetrie.

Pro úspěšnou separaci enantiomerů je nutné vytvořit v separačním prostředí vhodné chirální, stereoselektivní prostředí. Separační metody využívají pro separaci chirálních selektorů. V CE je chirální selektor přidáván do elektrolytu. Výhodou oproti HPLC je např. nižší spotřeba chirálního selektoru, rychlost separace a vysoká účinnost.

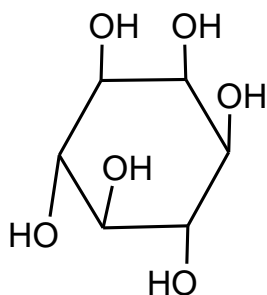
V CE rozlišujeme:

- přímou chirální separaci
- nepřímou chirální separaci

Přímá chirální separace je založena na tvorbě diastereomerů, které vznikají při separaci enantiomerů interagujícími s chirálním selektorem, který je součástí pracovního elektrolytu. S chirálním selektorem musí interagovat oba enantiomery. Separace probíhá v chirálním prostředí. Enantiomery jsou separovány na základě různých konstant stability vzniklých přechodných diastereoisomerních komplexů s chirálním selektorem. Jako chirální selektor se používá např. crown ethery, antibiotika, proteiny, polysacharidy, chirální tenzidy atd.

Nepřímé chirální separaci předchází derivatizace chirálním činidlem, které musí být čistým enantiomerem (52) (53).

2.4.1.6 INOSITOL



Obr. 9 Strukturální vzorec *myo*-inositolu

Inositol je triviální název pro cyklohexan s navázanými šesti hydroxyskupinami (též nazývané cyklohexitoly). Existuje osm stereoizomerů (*D*-(+)-*chiro*-, *L*-(-)-*chiro*-, *myo*-, *scyllo*-, *neo*-, *allo*-, *epi*-, *muko*-, *cis*-), lišící se stupněm fosforylace. Všechny tyto sloučeniny jsou si chemicky podobné, z fyziologického hlediska je velmi významný počet a poloha navázaných fosfátových skupin. Nejhojněji se vyskytuje *myo*-inositol, dříve známý jako vitamín B₈, který se jako volný vyskytuje v hroznovém víně, mléce, luštěninách a v nízké koncentraci je přítomen v masu. Mechanismus účinku *myo*-inositolu v lidském těle nebyl ještě zcela objasněn. Může být metabolizován na fosfatidylinositol, který tvoří malou, ale významnou součást buněčných membrán. *D*-*chiro*-inositol je další, přirozeně se vyskytující izomer, nejhojněji se vyskytuje v citrusových plodech, soji, medu a v některé zelenině. Podílí se na kontrole hladiny cukru v krvi.

Jelikož CE-UV vykazuje pro sumultánní stanovení *myo*-inositol a *D*-*chiro*-inositolem nízkou citlivost, byla pro stanovení těchto dvou látek v černé rýži použita CE s elektrochemikou detekcí (CE-ED), za následujících podmínek: pro analýzu byla použita pokrytá křemenná kapilára o celkové délce 65 cm a vnitřním průměru 25 μ m. Vzorek byl dávkován elektrokineticky 14 kV po dobu 6 s. Byl použit tří elektrodový systém, měděná desková elektroda jako pracovní elektroda, platina jako pomocná elektroda a nasycená kalomelová, jako referentní elektroda. Pracovní elektroda byla umístěna na konci separační kapiláry a detekce probíhala v nádobce obsahující základní elektrodu instrumentace CE. Před použitím, byl povrch pracovní elektrody leštěn brusným papírem a sonikován v deionizované vodě.

Přesně 1 g rýže byl extrahován 20 ml směsí etanol-voda (80:20, v/v) po dobu 30 min v ultrazvukové lázni. Roztok byl filtrován přes filtrační papír a poté přes 0,22 μ m filtr. 80 μ l filtrátu bylo zředěno na objem 1 ml 50 mmol borátem. Takto připravený roztok byl dáv-

kován přímo do CE-ED systému. Potenciál pracovní elektrody byl udržován při 0,65 V, pozadí proudu nebylo tolik vysoké a poměr signál/šum byl nejvyšší (53).

Ve vázané formě se vyskytuje běžně ve formě fosfolipidů. V některých potravinách se nachází jako hexafosfát, známý jako kyselina fytová (54-56).

Fostolipidy jsou nejčastěji separované pomocí MEKC. Jako aditivum se do pracovního elektrolytu při MEKC používají metanol, etanol nebo propan-1-ol. Přídavek alkoholů zvyšuje rozpustnost hydrofobních sloučenin ve vodné fázi a snižuje jejich retenční čas (57).

2.4.1.7 GLUKURONOLAKTON

Glukuronolaktony vznikají dehydratací glukuronové kyseliny. Bylo zjištěno, že D-glukurono-6,3-lakton se podílí na rychlejší tvorbě a pomalejším odbourávání svalového glykogenu. Využívá se jako výživa pro sportovce. Glukuronolakton vzniká v našem těle v játrech pro potřeby detoxikace. Pomáhá snižovat únavu, podporuje paměť a schopnost koncentrace (54).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil množství, při kterém se neobjevují negativní účinky na člověka a to na 1g/kg tělesné hmotnosti (58).

2.4.1.8 VITAMÍNY

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické látky, které člověk přijímá především potravou. Sám člověk dokáže syntetizovat např. niacin z tryptofanu. Vitamíny jsou pro člověka nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu, mají především funkci jako katalyzátory biochemických reakcí. Některé látky nejsou fyziologicky účinné, ale mohou sloužit jako prekurzory vitamínů, tzv. provitamíny, z nich si organismus sám dokáže vitamíny syntetizovat (54).

V. V. Khasanov a Yu. G. Slizhov pro stanovení kofeinu a vitamínu C v energetickém nápoji pracovali za následujících podmínek pro MEKC:

Vzorek byl odplyněn třepáním a pomocí ultrazvuku, následně centrifugován (10 000 otáček/ min). Před analýzou byl vzorek smíchán s pufrem v poměru od 1:1 až 1:9. Vzorek

byl dávkován hydrodynamicky, pro separaci byla použita polyamidová dutá kapilára s vnitřním průměrem 75 μm a efektivní délkou 48 cm. Kapilára byla termostatována, UV detektor měřil při vlnové délce 254 nm. Pracovní pufr obsahoval 10 mM tetraborát sodný a 40 mM dodecyl sulfát sodný (SDS) při pH 9. Vkládalo se napětí +20 kV (59).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Není – li uvedeno jinak, byly všechny experimenty prováděny s pomocí kapilární elektroforézy Agilent 7100 ve spojení s DAD detektorem (detektor diodového pole). Pro separaci optických izomerů 1,3-DMAA byl také použito spojení kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS/MS). Byla použita nepokrytá křemenná kapilára o celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm s vnitřním průměrem 50 μm (Polymicro Technologies, USA). Kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C. pH elektrolytů bylo upraveno na pH metru InoLAB WTW.

Záznamy analýz byly vyhodnoceny pomocí softwaru Agilent 3D ChemStation.

3.2 Chemikálie

Pro analýzu byly použity standardy kofeinu, 1,3-DMAA (racemická směs), 2-DMAE. Byly použity vzorky: potravinové doplňky Neurocore a Hyroxystim.

Dále byla použita kyselina fosforečná (85 %), kyselina boritá, imidazol, hydroxid sodný, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), kyselina octová, dodecyl síran sodný (SDS), 25 % roztok amoniaku ve vodě, methanol, sulfátovaný α -cyklodextrin a sulfátovaný β -cyklodextrin. Není-li uvedeno jinak byly všechny použité látky čistoty p.a.

3.3 Podmínky měření

3.3.1 Stanovení LOD

Na začátku každého dne byla kapilára promyta 10 minut 1 M NaOH, 10 minut deionizovanou vodou a následně 10 minut pracovním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára vždy promyta 3 minuty pracovním elektrolytem. Vzorek byl dávkován tlakem 100 mbar po dobu 10 s, rampa napětí 30 s.

Kofein:

Aplikované separační napětí bylo +15 kV

Detekční vlnová délka byla 200 nm

Pracovní elektrolyt: 50 mM borát sodný pH 9,5 s 100 mM přídavkem SDS

1,3-DMAA a 2-DMAE :

Aplikované separační napětí bylo +20 kV

Detekční vlnová délka byla 214 nm

Pracovní elektrolyt: 10 mM imidazol acetát pH 4,5 s přídavkem 10 % metanolu (v/v)

3.3.2 Chirální separace optických izomerů 1,3-DMAA

Pro separaci optických izomerů 1,3-DMAA byla využita kapilární elektroforéza s nepřímou UV-Vis detekcí (CE-UV) a kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS/MS), která umožňuje dosáhnout velmi vysoké citlivosti. Je možné identifikovat i stopová množství jednotlivých enantiomerů 1,3-DMAA.

3.3.2.1 CE-UV

Pro separace byla použita nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm , celkové délky 48,5 cm a efektivní délky 40 cm. Detekční vlnová délka byla nastavena na 214 nm. Dávkování vzorků bylo uskutečněno hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Před první analýzou byla kapilára promyta 20 min 1 M NaOH ve vodě, pak 20 minut deionizovanou vodou a 20 minut separačním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promyta vždy 5 min separačním pufrem. Separace probíhala při $U = + 15 \text{ kV}$.

Separací elektrolyt se skládal z 5 mM fosfát/TRIS pH 2.5 s přídavkem 10 mM benzyltrimethylammonium chloridu pro zajištění nepřímé UV detekce. Do takto připraveného separačního elektrolytu byla přidána směs chirálních selektorů 0,375 % (w/v) sulfatovaného α -cyklodextrinu a 0,05 % (w/v) sulfatovaného β -cyklodextrinu.

3.3.2.2 CE-MS/MS

Všechny analýzy byly prováděny na kapilární elektroforéze Agilent 7100 spojenou s tandemovým hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (trojitý kvadrupol, QqQ) s ionizací elektrosprejem. Pomocná sprejovací kapalina byla přiváděna s využitím isokratické

pumpy kapalinového chromatografu Agilent 1260. Pro separaci byla použita kapilára pokrytá lineárním polyakrylamidem o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 90 cm. Dávkování vzorků bylo uskutečněno hydrodynamicky tlakem 100 mbar po dobu 5 s. Před první analýzou byla kapilára promyta 20 min deionizovanou vodou a 20 minut separačním pufrem. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promyta vždy 5 min separačním pufrem. Separace probíhala při napětí $U = +25 \text{ kV}$.

Separací elektrolyt se skládal z 50 mM acetátu amonného pH 3.5 s přídavkem 0.2 % (w/v) sulfatovaného- β -CD.

Složení pomocné sprejovací kapaliny: methanol:voda:mravenčí kyselina (50:49,5:0,5, v/v/v). Průtok pomocné kapaliny byl nastaven na 4 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Podmínky ESI-MS/MS: sprejovací napětí $U_{\text{ESI}} = +3,5 \text{ kV}$, teplota sušícího plynu 100 $^{\circ}\text{C}$, průtok dusíku (sprejovacího plynu) byl nastaven na 10 l/min při tlaku 10 psi.

3.4 Příprava standardů a vzorků

3.4.1 Stanovení LOD kofeinu

- Standardní roztok kofeinu byl připraven rozpuštěním 1 mg standardu kofeinu v 1 ml metanolu a sonifikován 3 minuty v ultrazvukové lázni. Nižší koncentrace byly připraveny ředěním deionizovanou vodou na potřebnou koncentraci
- Vzorky Neurocore a Hydroxystim byly připraveny rozpuštěním 500 mg navážky v 9 ml deionizované vodě a 1 ml methanolu a následně byly extrahovány v ultrazvuku po dobu 10 minut. Vzorky byly po extrakci filtrovány mikrofilmem (průměr pórů 22 μm) ředěny 200x (Neurocore) a 1000x (Hydroxystim) neionizovanou vodou a analyzován CE/UV-Vis.

3.4.2 Stanovení LOD 1,3 -DMAA a 2-DMAE

- Standardní roztok 1,3-DMAA byl připraven rozpuštěním 1 mg standardu 1,3-DMAA v 1 ml vody. Nižší koncentrace byly připraveny ředěním na požadovanou koncentraci deionizovanou vodou.
- Standardní roztok 2 -DMAE byl připraven smícháním 56,5 μl standardu 2-DMAE s 4943,5 μl deionizované vody a následně 10 x zředěn neionizovanou vodou (vý-

sledná koncentrace 1mg/ml). Nižší koncentrace byly připraveny ředěním již 10x zředěného standardu deionizovanou vodou.

- Vzorke Neurocore a Hyroxystim byly připraveny rozpuštěním 500 mg navážky v 10 ml deionizované vodě a následně byly extrahovány v ultrazvuku po dobu 10 minut. Vzorke byly po extrakci filtrovány mikrofilmem (průměr pórů 22 μm) ředěn 2x (Neurocore) a 10x (Hydroxystim) deionizovanou vodou a analyzován CE/UV-Vis.

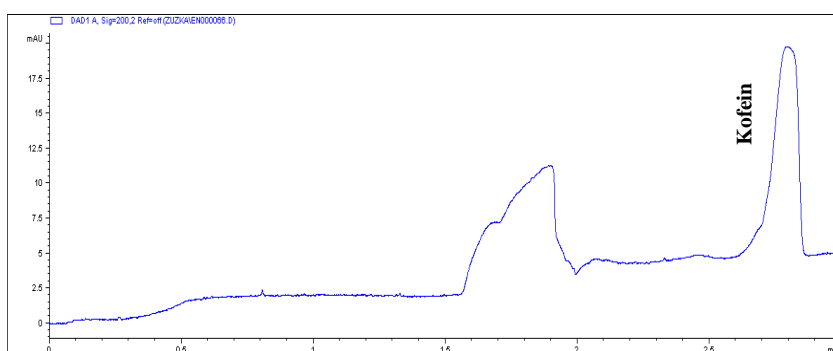
3.4.3 Chirální separace 1,3-DMAA

- Standardní roztoky 1,3-DMMA byly připraveny rozpuštěním 1 mg standardu 1,3-DMMA v 1 ml deionizované vody. Nižší koncentrace byly dále připravovány ředěním deionizovanou vodou na potřebnou koncentrační úroveň.
- 50 mg vzorku (Neurocore nebo Hydroxystim) bylo naváženo a rozpuštěno v 10 ml deionizované vody a extrahováno ultrazvukem po dobu 15 minut. Vzorek po extrakci byl filtrován mikrofiltrem (průměr pórů 22 μm) a v případě CE-UV analýzy přímo dávkován do kapiláry. V případě CE-MS/MS analýzy byl vzorek 100 x ředěn.

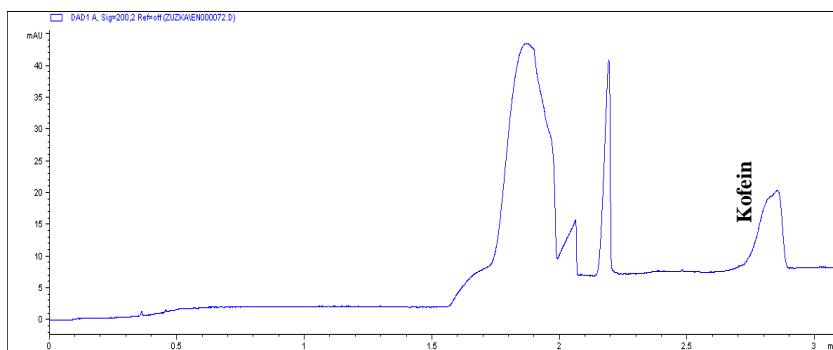
4 VÝSLEKDY A DISKUZE

4.1 Stanovení kofeinu

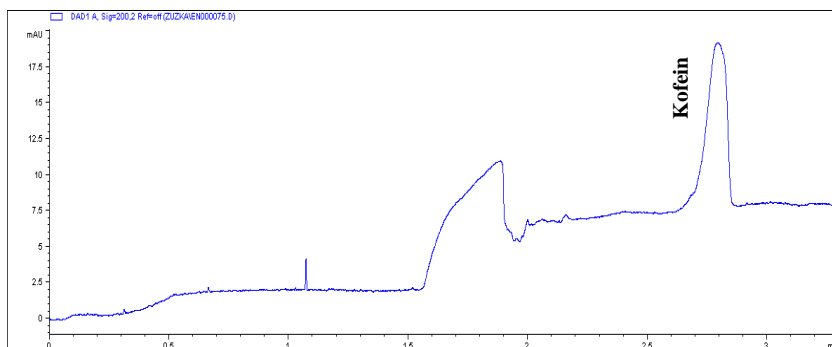
Pro sestavení kalibrační křivky byly použity koncentrace kofeinu 0,001; 0,002; 0,004; 0,008 a 0,01 mg/ml. Standard i vzorky byly měřeny při vlnové délce 200 nm. Byl použit pufr 50 mM borát sodný pH 9,5 s přidavkem 100 mM SDS. Z rovnice kalibrační křivky standardu kofeinu $y = 9455,6x + 0,909$ byla vypočítána mez detekce a koncentrace kofeinu v předložených potravních vzorcích Neurocoru a Hydroxystimu. Vzorek Neurocoru byl před analýzou zředěn 200 x, vzorek Hydroxystimu byl zředěn 1000 x, elektroferogramy jsou na obr. 11 a 12.



Obr. 10 Elektroferogram standardu kofeinu 50 mM borát sodný pH 9,5 + 100 mM SDS, $U = +15$ kV, injekce 100 mbar/10s, $\lambda = 200$ nm.



Obr. 11 Elektroferogram analýzy kofeinu v přípravku Neurocore (200x zředěný) 50 mM borát sodný pH 9,5 + 100 mM SDS, $U = +15$ kV, injekce 100 mbar/10s, $\lambda = 200$ nm.



Obr. 12 Elektroferogram analýzy kofeinu v přípravku Hydroxystim (1000x zředěný) 50 mM borát sodný pH 9,5 + 100 mM SDS, $U = +15$ kV, injekce 100 mbar/10s, $\lambda = 200$ nm.

Všechny standardy a vzorky byly analyzovány 3x. V tabulce jsou uvedené průměrné hodnoty.

Tab. 1: Průměrné hodnoty ploch, migračního času a EOF pro kalibrační řadu a vzorky.

c (mg/ml)	A	t_{mig} (min)	t_{EOF} (min)
0,001	11,667	2,773	1,852
0,002	19,367	2,782	1,863
0,004	38,233	2,783	1,864
0,008	74	2,779	1,871
0,01	97,667	2,804	1,895
vzorek Neurocore	67,3	2,811	1,868
vzorek Hydroxystim	64,2	2,772	1,872

Tab. 2: Standard kofeinu

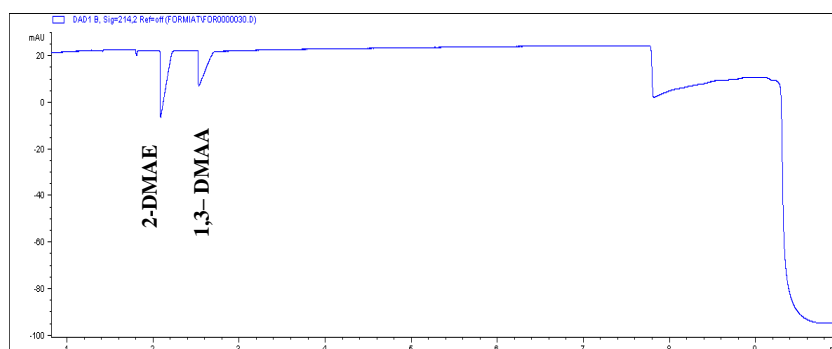
Kalibrační křivka	$y = 9455,6x + 0,909$
R^2	0,9975
LOD	0,08 $\mu\text{g/ml}$

Obsah kofeinu v potravním doplňku Neurocore výrobce deklaruje na 110 mg/ 4 g (1 dávka). Vypočítaná koncentrace kofeinu je 112 mg/ 1 dávku.

Obsah kofeinu v potravním doplňku Hydroxystim deklaruje výrobce na 100 mg/ 1 kapsle. Vypočítaná koncentrace kofeinu je 67 mg/ 500mg. Kapsle obsahuje 87 mg kofeinu.

4.2 Stanovení 1,3-DMAA a 2-DMAE

Pro sestavení kalibrační křivky byly použity koncentrace standardu 1,3-DMAA a 2-DMAE 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 a 0,1 mg/ml. Standardy byly měřeny při vlnové délce 214 nm. Separační purf byl 10 mM imidazol acetát pH 4,5 s 10 % metanolu (v/v). Z rovnice kalibrační křivky standardu 2-DMAE $y = 2366x + 0,218$ a 1,3-DMAA $y = 1615,3x + 0,2047$ byla vypočítána mez detekce.



Obr. 13 Elektroferogram analýzy standardu 1,3-DMAA a 2-DMAE při $c = 0,1$ mg/ml 10 mM imidazol acetát pH 4,5 + 10% MeOH (v/v), $U = +20$ kV, injekce 100 mbar/10s, $\lambda = 214$ nm.

Tab. 3: Průměrné hodnoty ploch, migračního času a EOF pro standardy 2-DMAE a 1,3-DMAA

c (mg/ml)	A1	$t_{\text{mig 1}}$ (min)	A2	$t_{\text{mig 2}}$ (min)	t_{EOF} (min)
0,005	11,275	1,97325	7,625	2,32725	6,291
0,01	22,65	1,9685	16,275	2,291	6,14575
0,02	45,94	1,9862	31,38	2,3224	6,5888
0,05	122,025	2,08425	84,175	2,52075	9,51975
0,1	234,76	1,9698	160,4	2,425	9,4692

Tab. 4: Standard 2-DMAE

Kalibrační křivka	$y = 2366x + 0,218$
R^2	0,9994
LOD	0,65 $\mu\text{g/ml}$

Tab. 5: Standard 1,3-DMAA

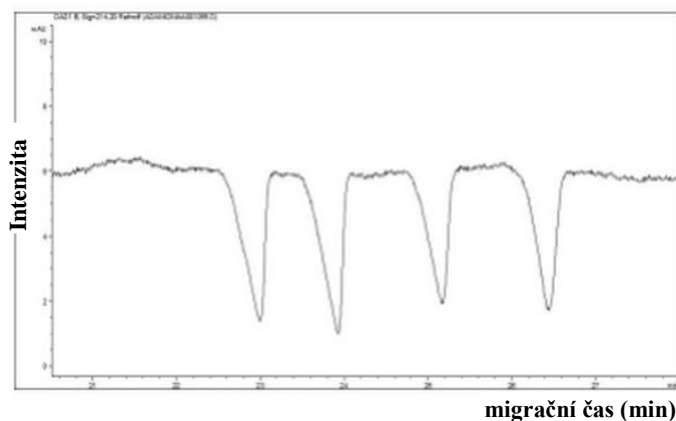
Kalibrační křivka	$y = 1615,3x + 0,2047$
R^2	0,9991
LOD	1,42 $\mu\text{g/ml}$

4.3 Chirální separace optických izomerů 1,3-DMAA

4.3.1 CE-UV

1,3-DMAA ve své struktuře neobsahuje žádné funkční skupiny, které by absorbovali UV záření. Z toho důvodu byla využita nepřímá UV detekce, kdy je do pracovního elektrolytu přidána látka, která absorbuje UV záření. V okamžiku, kdy prochází detektorem látka neabsorbující UV záření, projeví se její přítomnost v detektoru negativní odezvou (negativní pík). Optimalizací podmínek bylo nalezeno následující složení pracovního elektrolytu: 5 mM fosfát/TRIS pH 2.5 s přidavkem 10 mM benzyltrimethylammonium chloridu pro achirální separaci. Stejný elektrolyt, ale s přidavkem 0,375 % (w/v) sulfátového α -cyklodextrinu a 0,05 % sulfatovaného β -cyklodextrinu, byl pak využit pro separaci jednotlivých optických izomerů. Směs obou chirálních selektorů umožňuje separaci všech 4 optických izomerů 1,3-DMAA a zároveň umožňuje jejich individuální kvantifikaci.

Separací elektrolyt bez přidavků chirálních selektorů umožňuje stanovit celkový obsah všech izomerů 1,3-DMAA, elektrolyt s přidavkem chirálních selektorů umožňuje separaci a kvantifikaci každého enantiomeru zvlášť. Separaci standardů optických izomerů 1,3-DMAA za optimálních podmínek s pomocí CE-UV je na obr. 14.



Obr. 14 Separace enantiomerů standardu 1,3-DMAA ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$). 5 mM fosfát Tris pH 2,5 + 5 mM benzyltrimethylammonium chlorid + 0,375 % (w/v) sulfatovaného α -cyklodextrinu a 0,05% (w/v) sulfatovaného β -cyklodextrinu, $U = +15 \text{ kV}$, injekce 50 mbar/5s, $\lambda = 214 \text{ nm}$.

Metoda separace optických izomerů 1,3-DMAA byla částečně validována podle ICH guidelines (60). Validační data jsou obsažená v tabulce 6.

Tab 6: Validace stanovení optických izomerů 1,3-DMAA s pomocí CE-UV

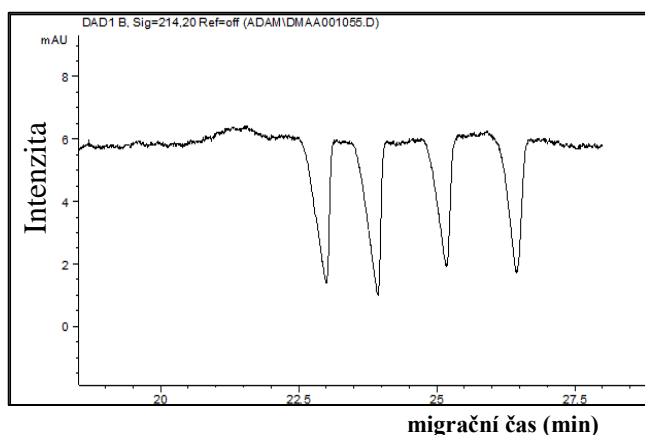
A) Pro achirální separaci

Kalibrační křivka	$Y = 920,55x + 0,83$
Linearita	2 – 250 $\mu\text{g/ml}$
R^2	0,999
LOD	1,88 $\mu\text{g/ml}$ (=16,4 nmol/l)
LOQ	3,74 $\mu\text{g/ml}$ (=54,6 nmol/l)
Výtěžnost	87 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	0,2 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	1,35 %

B) Pro separaci jednotlivých optických izomerů

Kalibrační křivky	(1) $Y = 342x + 2,6$ ($r^2 = 0,9931$) (2) $Y = 321x + 4,7$ ($r^2 = 0,9925$) (3) $Y = 332x + 8,2$ ($r^2 = 0,9942$) (4) $Y = 367x + 5,8$ ($r^2 = 0,9908$)
Linearita	5 – 500 $\mu\text{g/ml}$
LOD	(1) 7,8 $\mu\text{g/ml}$ (2) 8,3 $\mu\text{g/ml}$ (3) 8,2 $\mu\text{g/ml}$ (4) 7,9 $\mu\text{g/ml}$
LOQ	(1) 26,0 $\mu\text{g/ml}$ (2) 27,7 $\mu\text{g/ml}$ (3) 27,4 $\mu\text{g/ml}$ (4) 26,3 $\mu\text{g/ml}$
Výtěžnost	(1) 86,2 % (2) 88,1 % (3) 88,5 % (4) 84,9 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	(1) 0,43 % (2) 0,38 % (3) 0,32 % (4) 0,41 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	(1) 1,02 % (2) 2,13 % (3) 1,58 % (4) 1,33 %

Vyvinutá metoda separace 1,3-DMAA s využitím CE-UV byla aplikována k separaci optických izomerů 1,3-DMAA v dodaných vzorcích potravních.



Obr. 15 Elektroforegram separace enantiomerů 1,3-DMAA v přípravku Hydroxystim. 5 mM fosfát Tris pH 2,5 + 5 mM benzyltrimethylammonium chlorid + 0,375 % (w/v) sulfatovaného α -cyklodextrinu a 0,05% (w/v) sulfatovaného β -cyklodextrinu, $U = +15$ kV, injekce 50 mbar/5s, $\lambda = 214$ nm.

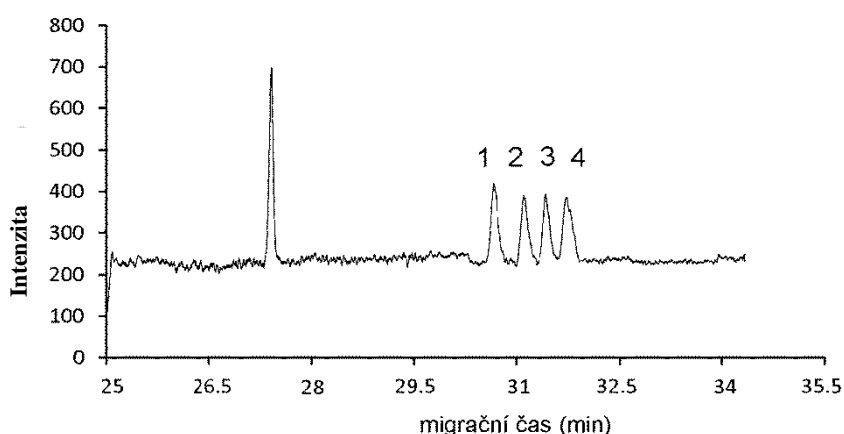
Z výsledků uvedených analýz (obr. 14 a 15) plyne, že není rozdíl mezi poměrem jednotlivých optických izomerů ve standardu 1,3-DMAA a v potravinovém doplňku Hydroxystim. Navíc celkový obsah 1,3-DMAA v jednotlivých potravinových doplňcích je relativně vysoký, takže lze usuzovat, že původ 1,3-DMAA v obou potravinových doplňcích je spíše syntetický. Identifikace jednotlivých optických izomerů byla provedena metodou standardního přídatku.

Analýzou přípravku Neurocore nebyla přítomnost 1,3-DMAA v koncentraci vyšší než 1,88 µg/ml zjištěna.

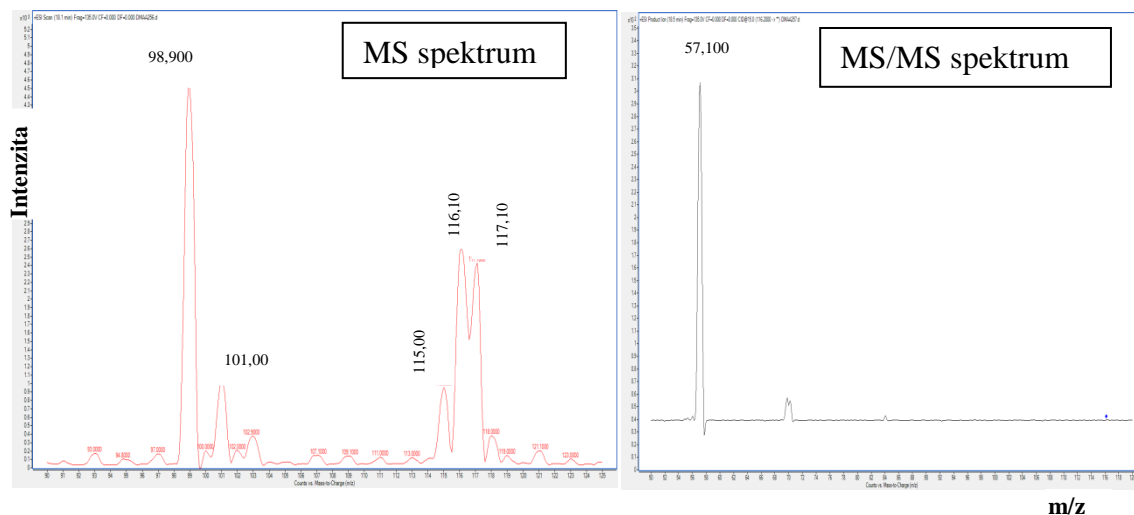
4.3.2 CE-MS/MS

CE-MS/MS je citlivější a spolehlivější metoda pro separaci a zároveň exaktní identifikaci jednotlivých separovaných analytů. CE-MS/MS metoda byla vyvinuta s cílem dosáhnout lepší citlivosti detekce pro 1,3-DMAA, v budoucnu i pro analýzu rostlinných extraktů. Tandemová hmotnostní spektrometrie zároveň umožňuje přesnou identifikaci jednotlivých izomerů 1,3-DMAA oproti předchozí metodě CE-UV.

S ohledem na nemožnost využití stejného pracovního elektrolytu jako v předchozím případě CE-UV analýz, bylo složení pracovního elektrolytu optimalizováno pro CE-MS/MS zvlášť. Nejvyšší odezvu pro jednotlivé enantiomery 1,3-DMAA poskytoval elektrolyt o složení 50 mM acetát amonný pH 3,5 s přídatkem 0,2 % (w/v) sulfátovaného β-cyklodextrinu. Rekonstruovaný elektroferogram separace enantiomerů 1,3-DMAA je uveden na obr. 16. MS spektrum je pak uvedeno na obr. 17.



Obr. 16: Rekonstruovaný elektroferogram separace enantiomerů 1,3-DMAA. 50 mM acetát amonný pH 3.5 + 0,2 % (w/v) sulfátovaného β-cyklodextrinu, U = +25 kV, dávkování 100 mbar/5s, koncentrace 1,3-DMAA 500 µg/L ve vodě. SIM [M+H]⁺ m/z = 116,2 ± 0,5, UESI = +3,5 kV, 10 L/min, 10 psi, T = 100 °C, SL – 50:49.5:0.5 MeOH:H₂O:HCOOH, 4 µL/min.



Obr. 17: MS (klizní energie 5 eV) a MS/MS spektrum (kolizní energie 15 eV) standardu 1,3-DMAA.

Vyvinutá metoda CE-MS/MS separace byla dále částečně validována podle ICH guidelines (60). Pro kvantifikaci enantiomerů 1,3-DMAA byl využit přechod 116,2 -> 57,1, a pro identifikaci byl využit přechod 116,2 -> 98,9.

Validační parametry pro achirální a chirální separaci jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab 7: Validace stanovení optických izomerů 1,3-DMAA s pomocí CE-MS/MS

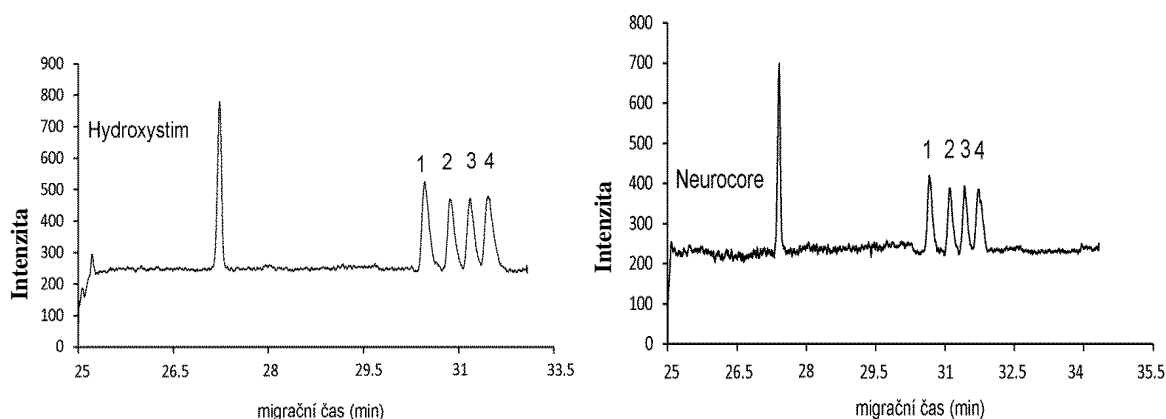
A) Pro achirální separaci

Kalibrační křivka	$Y = 4,9351x + 151,34$
Linearita	3 – 2000 $\mu\text{g/ml}$
R^2	0,9999
LOD	1 $\mu\text{g/ml}$ (= 8,7 nmol/l)
LOQ	3,3 $\mu\text{g/ml}$ (= 29 nmol/l)
Výtěžnost	94,7 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	1,56 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	2,12 %

B) Pro chirální separaci

Kalibrační křivky	(5) $Y = 260082x + 516,91$ ($r^2 = 0,9956$) (6) $Y = 183583x + 440,5$ ($r^2 = 0,9956$) (7) $Y = 162876x + 470,12$ ($r^2 = 0,9958$) (8) $Y = 228521x + 450,68$ ($r^2 = 0,9919$)
Linearita	5 – 1000 µg/l
LOD	(5) 4,9 µg/l (6) 5,3 µg/l (7) 5,4 µg/l (8) 5,2 µg/l
LOQ	(5) 16,3 µg/l (6) 17,6 µg/l (7) 18,0 µg/l (8) 17,3 µg/l
Výtěžnost	(5) 93,7 % (6) 92,3 % (7) 92,1 % (8) 92,9 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	(5) 2,16 % (6) 2,13 % (7) 2,11 % (8) 2,00 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	(5) 1,51 % (6) 5,24 % (7) 3,49 % (8) 1,54 %

Za stejných podmínek byly analyzovány i dodané vzorky potravinových doplňků Neurocore, Hydroxystim.



Obr. 18: Rekonstruovaný elektroferogram separace enantiomerů 1,3-DMAA v přípravku Hydroxystim a Neurocore. 50 mM acetát amonný pH 3.5 + 0,2 % (w/v) sulfatovaného β -cyklodextrinu, $U = +25$ kV, dávkování 100 mbar/5s. MRM 116,2 \rightarrow 57,1, $U_{ESI} = +3,5$ kV, 10 L/min, 10 psi, $T = 100$ °C, SL – 50:49.5:0.5 MeOH:H₂O:HCOOH, 4 µL/min.

Z uvedených elektroferogramů (obr. 16 a 18) plyne, že poměr jednotlivých enantiomerů je identický jako v případě analýzy syntetické směsi všech enantiomerů 1,3-DMAA (obr. 16). Lze tedy jednoznačně specifikovat, že je 1,3-DMAA do potravinových doplňků přidáván uměle.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo nalézt vhodné podmínky pro stanovení kofeinu, 1,3-DMAA a 2-DMAE a separaci směsi 1,3-DMAA a 2-DMAE v předložených potravinových doplňcích, Hydroxystim a Neurocore. Vhodné podmínky byly nalezeny a byly vypočítány limity detekce pro kofein (0,08 $\mu\text{g/ml}$), 1,3-DMAA (1,42 $\mu\text{g/ml}$) a 2-DMAE (0,65 $\mu\text{g/ml}$).

Byly vyvinuty dvě metody separace optických izomerů 1,3-DMAA. Obě metody byly částečně validovány a využity pro separaci a identifikaci jednotlivých izomerů 1,3-DMAA v potravinových doplňcích. V obou potravinových doplňcích Hydroxystim a Neurocore byl 1,3-DMAA identifikován a stanoven poměr izomerů 1,3-DMAA.

Pro potravinářský průmysl je stěžejní zjistit přítomnost celkového množství 1,3-DMAA. Proto je pro achirální separaci vhodnější zvolit následující pracovní podmínky: imidazol acetát pH 4,5 s přídavkem 10 MeOH (v/v), jenž poskytují nižší LOD pro 1,3-DMAA. Pro chirální separaci a zjištění poměru jednotlivých izomerů je vhodnější prostředí 5 mM fosfát/TRIS pH 2,5 s přídavkem chirálního selektoru sulfátového α -cyklodextrinu a β -cyklodextrinu se spojením CE-UV/Vis. Poměr optických izomerů 1,3-DMAA v potravinových doplňcích je identický s poměrem izomerů v synteticky vyráběném 1,3-DMAA. Lze tedy usuzovat, že výrobci potravinových doplňků přidávají 1,3-DMAA uměle. Analýza s pomocí CE je málo náročná na čas, spotřebu chemikálií včetně chirálního selektoru.

6 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1,3-DMAA	1,3 – dimethylamylamin
2-DMAE	2- dimethylaminoethanol
ACN	acetonitril
BGE	pracovní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
CTAB	cetyltrimethyl amonium bromid
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FLD	fluorimetrická detekce
LIF	laserem indukovaná disociace
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NaCl	chlorid sodný
Na₂CO₃	uhličitan sodný
NaOH	hydroxid sodný
SDS	dodecyl síran sodný
SFE	superkritická fluidní extrakce
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. *Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis.* **Cifuentes Alejandro.** 2006, Electrophoresis, stránky 283-303.
2. *Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon.* **Flávia Camila Schimpl, José Ferreira da Silva, José Francisco de Carvalho Gonçalves, Paulo Mazzafera.** 2013, Journal of Ethnopharmacology, stránky 14-31.
3. **Heiger, David.** *High performance capillary electrophoresis.* 2000.
4. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody.* 2003.
5. **Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman.** *Principles of instrumental analysis.* USA : Tomson Learning, 1998.
6. **Štulík, Karel a kolektiv.** *Analytické separační metody.* Praha : Karolinum, 2004.
7. **RNDr. Pavel Piskač, Ing. Marie Chalupová, Ing. Šárka Prokopcová.** Český lékopis 1997. [Online] 12. Květen 2014. [Citace: 8. duben 2013.] http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm.
8. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod.* **Kašička, Václav.** 1997, Chemické listy.
9. **Guzman, Norberto A.** *Capillary electrophoresis technology.* místo neznámé : Marcel Dekker, Inc., New Yourk, 1993.
10. *Capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse in biological specimen of forensic interest.* **C. Cruces-Blanco, A.M. García-Campaña.** 2001.
11. *Analysis of amphetamines in urine with liquid-liquid extraction by capillary electrophoresis with simultaneous electrochemical and electrochemiluminescence detection.* **Jinyng Sun, Xiaouy Xu, Chunyan Wang, Tianyan You.** 2008.
12. holcapek.upce.cz. [Online] [Citace: 3. 3 2015.] http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf.
13. **Laing, W. R.** *Analytical chemistry instrumentation.* Tennessee : Lewis Publishers,INC., 1985.

14. [Online] [Citace: 3. 3 2015.]
https://www.google.cz/search?q=trojit%C3%BD+kvadrupol&rlz=1C2DVCJ_enCZ407&biw=1034&bih=576&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=Dur1VK7PK435aPTCgvgH&sqi=2&ved=0CAcQ_AUoAg&dpr=1#tbm=isch&q=kvadrupol&imgdii=_&imgrc=IBMk9DqJX-BgjM%253A%3BULL9IuMKVrcZLM%3Bhttp%253A%2
15. **Zuzana, Riemlová.** *Analýza kationů kapilární elektroforézou.* Olomouc : autor neznámý, 2013.
16. *Novel Mass Spectrometry-Based Applications of the 'Omic' Sciences in Food Technology and Biotechnology.* **Picariello Gianluca, Mamone Gianfranco, Addeo Francesco, Ferranti Pasquale.** 2012, Food technology and biotechnology, stránky 286-305.
17. *Trends in Analytical Chemistry - Foodomics and food analysis in the post-genomics era.* **Cifuentes Alejandro.** 2013, ScienceDirect.
18. *Proteomics as a tool to understand the complexity of beer.* **Michelle L. Colgrave, Hareshwar Goswami, Crispin A. Howitt, Gregory J. Tanner.** 2012, Elsevier, stránky 1001-1012.
19. *Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: A review.* **Clára Ibáñez, Carolina Simó, Virginia García-Cañas, Alejandro Cifuentes.** 2013, Analytica Chimica Acta, stránky 1-13.
20. *Non-ionic micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence: A new method tested with biogenic amines in brined and dry-salted fish.* **Baskan S., Tezcan F., Köse S., Öztekin N., Erim F. B.** 2010, Electrophoresis, stránky 31, 2174–2179.
21. *Simultaneous determination of six non-polar heterocyclic amines in meat samples by supercritical fluid extraction–capillary electrophoresis under fluorimetric detection.* **Fernando De Andre, Mohammed Zougagh, Gregorio Castan, Angel Rios.** 2010, Electrophoresis, stránky 2165–2173.
22. *Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics.* **Maria Castro-Puyana, Virginia Gracia-Canas, Carolina Simo, Alejandro Cifuentes.** 2012, Electrophoresis, stránky 33, 147-167.

23. *A new sample preparation method compatible with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence for improving detection of low levels of B-lactoglobulin in infant food.* **Cristina Pelaez-Lorenzo, Jose Carlos Diez-Masa, Isabel Vasallo, Mercedes de Frutos.** 2009, *Analytica Chimica Acta*, stránky 649, 202–210.
24. *Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics.* **Miguel Herrero, Virginia Ggracia-Canas, Carolina Simo, Alejandro Cifuentes.** 2010, *Electrophoresis*, stránky 31, 205-228.
25. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry in food analysis.* **Carolina Simó, Coral Barbas, Alejandro Cifuentes.** 2005, *Electrophoresis*, stránky 26, 1306-1318.
26. *Micelar elektrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins.* **Domingo Blanco Gomis, Luis Laviana González, Dolores Gutiérrez Álvarez.** 1999, *Analytica chimica acta*, stránky 55-60.
27. *Electrophoretic Determination of Synthetic Dyes in alcoholic beverages.* **A. P. Patsovskii, N. V. Rudometova, Ya. S. Kamentsev.** 2004, *Journal of Analytical Chemistry*, stránky 150-154.
28. *Determination of Synthetic Colors in Soft Drinks and Confectioneries by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography.* **S.-S.CHOU, Y.-H.LIN,C.-C.CHENG,D. - F.HWANG.** 2002, *Food Chemistry and Toxicology*, stránky 1314-1318.
29. *Optimizing the separation of food dyes by capillary electrophoresis.* **Alessandra Vincenzi Jager, Fernando Gustavo Tonin, Marina Franco Maggi Tavares.** 2005, *JSS JOURNAL*, stránky 957-965.
30. **Suková.** [Online] 4. duben 2010. [Citace: 4. duben 2014.] <http://www.bezpecnostpotravin.cz/navrh-pravidel-pro-energeticke-napoje.aspx>.
31. *Determination of elements in energy drinks by ICP OES with minimal sample preparation.* **Anna Szymczycha-Madejam Maja Welna, Pawel Pohl.** 2013, *J. Baz. Chem. Soc.*, stránky 1606-1612.
32. **Jan Velíšek, Jana Hajšlová.** *Chemie potravin II.* Tábor : Osis, 2009.
33. *Rapid simultaneous determination of alkylxanthines by CZE and its application in analysis of pharmaceuticals and food sample.* **Fiona Regan, Yuliya Shakalisava.** 2004, *Science Direct*, stránky 103-110.

34. *Food analysis - samples preparation and chromatographic methods in determination of selected biogenic amines, methylxanthines and water-soluble vitamins.* **Plonka, Joanna.** 2012, Analytical Methods.
35. *Graphene platforms for the detection of caffeine in real samples.* **Weslie Yu Heng Khoo, Martin Pumera, Alessandra Bonanni.** 2013, Analytica Chimica Acta, stránky 92-97.
36. *Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylxanthines-containing beverages: discussion of the molecular species involved.* **Alicia B Pomilio, Silvia P Trajtemberg and Arturo A Vitale.** 2005, Jurnal of the Science of food and agriculture, stránky 622-628.
37. *Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of Paullinia cupana var. sorbilis (guaraná).* **Traudi Klein, Renata Longhini, Joao Carlos Palazzo de Mello.** 2012, Talanta, stránky 502-506.
38. *Physiological action of taurin.* **R.J.Huxtable.** 1992, Physiological reviews.
39. **Slíva I., Minárik J.** *Doplňky stravy.* Praha : Triton, 2009.
40. *Separation methods for taurine analysis in biological sample.* **Shifen Mou, Xiaojing Ding, Yongjian Liu.** 2002, Journal of Chromatography, stránky 251-267.
41. *Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food application.* **Angelo Zinellu, Salvatore Sotgia, Scanu Bastianina, Roberto Chessa, Leonardo Gaspa, Flavia Franconi, Luca Deiana, Ciriaco Carru.** 2009, Amino Acids, stránky 35-41.
42. **Z. Ping, Q. Jun, J. Qing, J. Guizhou.** 1996, Inst. Techn., str. 82.
43. **S. J. Li, M. Chen, C. Z. Li.,** 2007, Anal. Chem. Ins., str. 47.
44. **H. L. Fleming, P. L. Ranaivo, P. S. Simone.** 2012, Anal. Chem. Ins, str. 59.
45. **S. P. Vorce, J. M. Holler, B. M. Cawrse, J. Magluilo.** 2011, J. Analy. Toxicol, str. 183.
46. **A. Lisi, N. Hasick, R. Kazlauskas, C. Goebel.** 2011, Drug Test. Anal., str. 873.

47. **M. A. ElSohly, W. Gul, K. M. ElSohly, T. P. Murphy, A. Weerasooriya, A. G. Ghittiboyina, B. Avula, I. Khan, A. Eicher, L. D. Bowers.** 2012, *J. Anal. Toxicol.*, str. 457.
48. *1,3-Dimethylamylamine (DMAA) in supplements and geranium products: natural or synthetic?* **Y. Zhang, R. M. Wood, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong,** 2012, *Drug Test. Anal.*, str. 986.
49. *Could 1,3 dimethylamylamine (DMAA) in food supplements have a natural origin?* **C. Di Lorenzo, E. Moro, A. Dos Santos, F. Uberti, P. Restani,** 2013, *Drug Test. Anal.*, str. 116.
50. **B. J. Venhuis, D. de Kaste,** 2012, *Eur. J. Food Res Rev*, stránky 93-100.
51. [Online] [Citace: 3. 3 2015.] <http://wholehealthchicago.com/3378/dmae-dimethylaminoethanol/>.
52. [Online] [Citace: 3. 3 2015.] <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/aet2-1268581674.pdf>.
53. **Berthod, Alan.** *Chiral Recognition in Separation Methods, Mechanisms and Applications.* Berlin : Springer, 2010.
54. *Determination of myo-inositol and D-chiro-inositol in black rice bran by capillary electrophoresis with electrochemical detection.* **Lingyao Kong, Yun Wang, Yuhua Cao.** 2008, *Journal of food composition and analysis*, stránky 501-504.
55. **Jan Velíšek, Jana Hajšlová.** *Chemie potravin I.* Havlíčkův Brod : OSSIS, 2009.
56. **Arndt, PharmDr.Tomáš.** celostní medicína. [Online] 25. květen 2014. <http://www.celostnimedicina.cz/inositol.htm>.
57. *Optimization of pressurized liquid extraction of inositols from pine nuts (Pinus pinea L.).* **L. Ruiz-Aceituno, S. Rodríguez-Sánchez, J. Sanz, M.L. Sanz, L. Ramos.** 2014, *Food Chemistry*, stránky 450-456.
58. *Separation of fluorescent phosphatidyl inositol phosphates by CE.* **Simon M. Mwongela, Katherine Lee, Christopher E. Sims, Nancy L. Allbritton.** 2007, *Electrophoresis*, stránky 1235-1242.

59. *The use of taurine and D-glucurono- γ -lactone as constituents of* . **F. Aguilar, U.R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott a další.** 2009, The EFSA Journal, stránky 1-31.

60. *Energy drink analysis by capillary electrophoresis.* **V.V. Khasanov, Yu.G. Slizhov.** 2013, Journal of Analytical Chemistry, stránky 357-359.

61. [Online] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Side/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Strep2/Q2_R1_Guideline.pdf.

62. **Potapov, V. M.** *Strereochemie.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1986.

