

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Petra Vaňkátová

POST-KOLONOVÁ DERIVATIZACE V HPLC
PRO ANALÝZU AMINOKYSELIN

Post-column derivatization in HPLC for analysis of amino
acids

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.
Školitel – konzultant: RNDr. Anna Kubíčková, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2017.

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní doktorce Anně Kubíčkové, Ph.D. a panu profesorovi RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a vstřícnost při vypracovávání této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich podporu během celého studia.

Abstrakt

Proteogenní aminokyseliny jsou základní stavební jednotkou proteinů. Jejich analýza má význam v mnoha oborech, především v lékařství. Tato práce se zabývá jedním ze způsobů derivatizací aminokyselin za účelem zvýšení jejich absorpce v UV oblasti – postkolonovou derivatizací oxidem měďnatým. Je to rychlá, robustní a nenáročná metoda. Vzhledem k současnému trendu analýzy volných aminokyselin je tato práce zaměřena na prostředí HILIC separace.

Abstract

Proteinogenic amino acids are the basic structural building units of proteins. Their analysis is important in many fields, especially in medicine. This thesis deals with one of the methods of derivatization of amino acids in order to increase their absorption in the UV – the post-column derivatization using copper (II) oxide. It is quick, robust and easy-to-use method. Following the nowadays trend in the analysis of free amino acids, this thesis is focused on the HILIC mode separation environment.

Klíčová slova: aminokyseliny, oxid měďnatý, post-kolonová derivatizace, UV detekce, HPLC

Key words: amino acids, copper (II) oxide, post-column derivatization, UV detection, HPLC

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1. Úvod.....	8
1.1. Proteogenní aminokyseliny	8
1.1.1. Separace proteogenních aminokyselin	9
1.1.2. Detekce proteogenních aminokyselin.....	11
1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	12
1.2.1. Hydrofilní interakční chromatografie.....	12
1.3. Post-kolonová derivatizace	14
1.3.1. Oxid měďnatý.....	15
1.4. Výpočty	16
1.4.1. Mez detekce.....	16
1.5. Cíl práce	16
2. Experimentální část.....	17
2.1. Instrumentace	17
2.2. Použité chemikálie	17
2.3. Postup.....	18
2.3.1. UV spektra.....	18
2.3.2. HPLC analýza.....	18
2.3.3. Postkolonová derivatizace	19
3. Výsledky a diskuze	20
3.1. Volba stacionární fáze.....	20
3.2. UV spektra	22
3.3. Závislost signálu na pH.....	25
3.4. Vliv derivatizace na zvýšení citlivosti detekce	28
3.5. Vliv oxidu měďnatého na retenční čas a tvar píku	31
3.6. Aplikace post-kolonové derivatizace při separaci aminokyselin	34

3.6.1. Jednoduché aminokyseliny.....	34
3.6.2. Aromatické aminokyseliny.....	36
4. Závěr	38
Přílohy.....	45

Seznam zkratek a symbolů

[Ar] – elektronová konfigurace argonu

A – absorbance

A – plocha píku

ACQ – 6-*N*-aminochinoly-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát

AMK – aminokyselina

BEH – bridged-ethylene hydride

FMOOC – 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LOD – mez detekce

mg – miligram

min – minuta

mM – milimolární, (o koncentraci 10^{-3} mol·dm⁻³)

mmol – milimol

mol – mol

mV – milivolt

nm – nanometr

OPA – *o*-ftaldialdehyd

PITC – fenylisothiokyanát

RP – reverzní fáze

s – sekunda

S – signál detektoru

t_r – retenční čas

UV – ultrafialový

V·s – voltsekunda (jednotka plochy píku)

μL – mikrolitr

μmol – mikromol

λ – vlnová délka

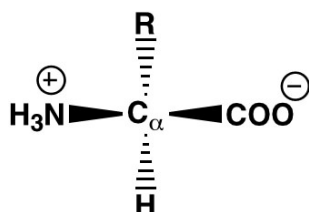
1. Úvod

1.1. Proteogenní aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny obsahující alespoň jednu karboxylovou a jednu aminovou skupinu. Důležitou skupinou aminokyselin jsou proteogenní aminokyseliny, které jsou základním stavebním prvkem proteinů.

Proteogenní aminokyseliny byly objevovány a izolovány postupně již od začátku 19. století, kdy byl jako první izolován asparagin [1], až do téměř poloviny dvacátého století [2,3]. Přesto zůstávají předmětem zájmu, protože jejich analýza má význam v mnoha oborech od botaniky, zemědělství a potravinářství až k medicíně, kde zvláště v posledních letech stoupá význam volných aminokyselin jako markerů vážných onemocnění [4-7].

Proteogenní aminokyseliny jsou definovány jako aminokyseliny, které kóduje alespoň jeden kodón [8]. Strukturně se jedná o aminokyseliny, které na jednom uhlíku nesou obě skupiny (karboxylovou i aminovou), vodík a postranní řetězec, viz obrázek 1. Tento uhlík je označován jako α uhlík a je zároveň chirálním centrem – výjimku tvoří glycin, který nese na α uhlíku dva vodíky, a tudíž nemůže být opticky aktivní. Ačkoli ostatní aminokyseliny mohou být v L nebo D formě, v proteinech se vyskytují výhradně jako L- α -aminokyseliny.



Obrázek 1 Schéma proteogenních L-aminokyselin, kde R je postranní řetězec (kromě glycinu, u kterého R je -H). Převzato z [9].

Obě skupiny navázané na α uhlíku se mohou nalézat v neutrálním stavu nebo nést náboj v závislosti na pH prostředí. Karboxylová skupina může disociovat a aminová skupina může být protonizována. Při neutrálním pH 7 se proteogenní aminokyseliny nalézají ve formě amfiontu (někdy též zwitterion). To znamená, že obě skupiny na α uhlíku jsou v ionizovaném stavu a molekula tak nese kladný i záporný náboj [10]. K výslednému náboji molekuly přispívají i další skupiny obsažené ve zbytku, např. další karboxylová, aminová nebo hydroxylová

skupina. Díky náboji jsou aminokyseliny dobře rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech a špatně rozpustné v nepolárních rozpouštědlech.

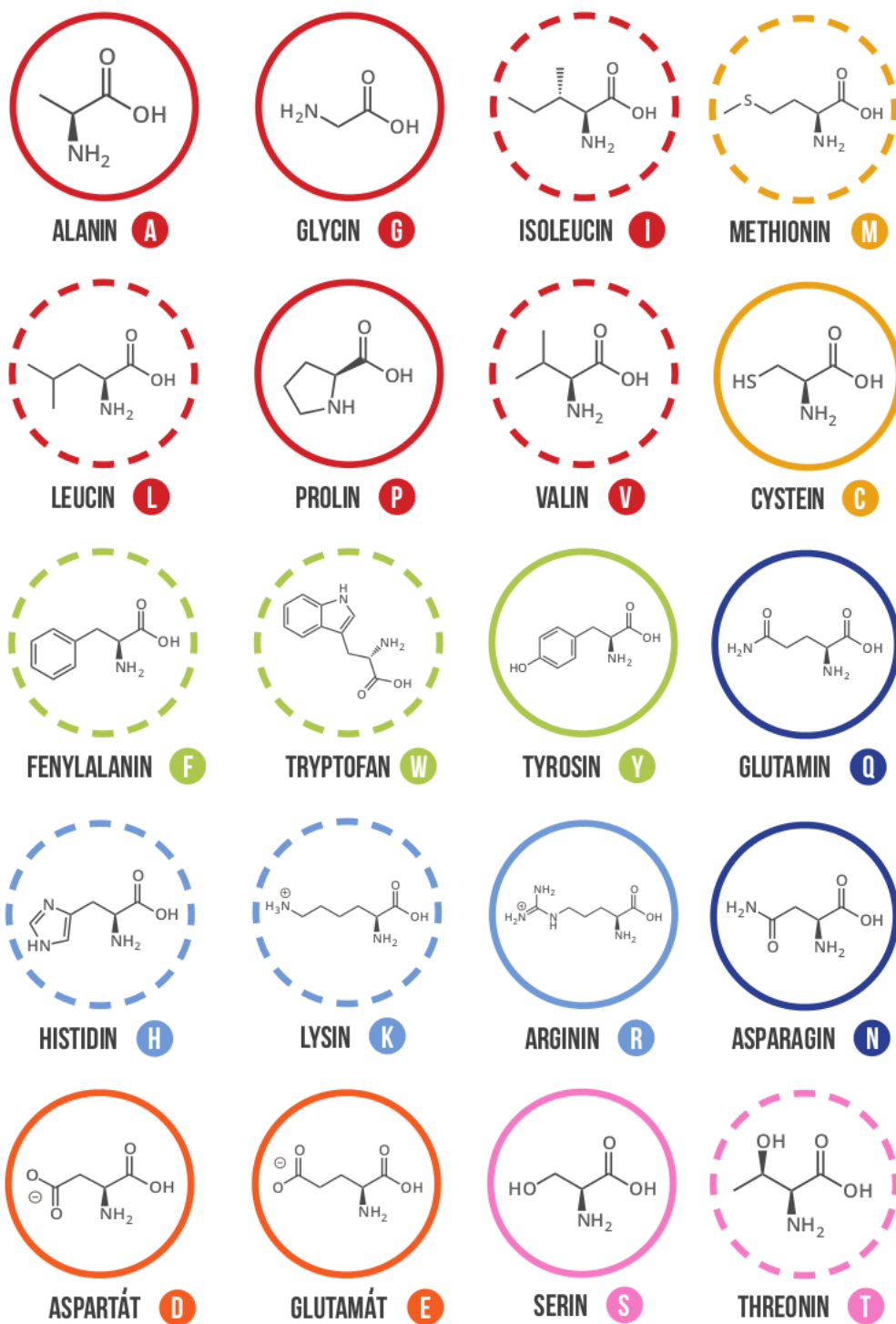
Jak už bylo řečeno, kromě glycinu nesou zbylé aminokyseliny na α -uhlíku unikátní zbytek, kterým se odlišují. Právě podle typu postranního řetězce lze rozlišit několik následujících podskupin aminokyselin, viz obrázek 2, str. 10:

- alifatické (glycin, alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin)
- aromatické (tryptofan, tyrosin¹, fenyloalanin)
- hydroxylové (serin, threonin)
- kyselé (kyselina asparagová a glutamová)
- bazické (lysin, arginin, histidin)
- amidy (asparagin, glutamin)
- aminokyseliny obsahující síru (cystein, methionin)

1.1.1. Separace proteogenních aminokyselin

Při značném rozsahu pH (přibližně 2,2-9,5) jsou proteogenní aminokyseliny ve formě zwitteriontu. Z toho vyplývá, že aminokyseliny jsou malé, velmi polární molekuly. To znesnadňuje jejich analýzu běžnou reverzní chromatografií, ale zároveň umožňuje použití elektroforetických metod [11-13], reverzní chromatografie s iontově párovými činidly [14-16] nebo kapalinové chromatografie v módu HILIC. O separaci volných aminokyselin v HILIC módu na kapalinovém chromatografu už od vývoje této metody vyšlo mnoho článků. Všechny se ale zabývají pouze částečnou separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií, kdy není třeba dokonalé separace [17-20], nebo úplnou separací pouze několika vybraných aminokyselin [21]. Přestože ještě nebylo dosaženo úplného rozdělení všech proteogenních aminokyselin, je zřejmé, že hydrofilní interakční chromatografie je často používaná metoda pro analýzu volných aminokyselin a bude jí i nadále [22].

¹ Některé aminokyseliny mohou patřit do dvou podskupin zároveň. Např. tyrosin je aromatická aminokyselina, která ale také obsahuje hydroxylovou skupinu.



Obrázek 2 Dělení proteogenních aminokyselin na alifatické (červeně), aromatické (zeleně), kyselé (oranžově), bazické (světle modře), hydroxylové (růžově), obsahující síru (žlutě) a amidové (tmavě modře). Převzato a upraveno z [23].

1.1.2. Detekce proteogenních aminokyselin

UV detektor je nejběžnějším detektorem používaným pro kapalinovou chromatografii. Hlavní výhodou je robustnost a poměrně nízká cena detektoru, nevýhodou je možnost detekovat pouze látky absorbující v UV oblasti, tzn. látky obsahující chromofor.

Aminokyseliny se značně liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a to včetně vlastností spektrálních. Většina aminokyselin absorbuje pouze slabě v UV oblasti kolem 200 nm díky karboxylové skupině a jejich detekce pomocí spektrofotometru není příliš citlivá. Výjimku tvoří aminokyseliny obsahující aromatický kruh, které dobře absorbují v rozmezí 260-280 nm, např. tryptofan. Tyto aminokyseliny mohou být poměrně dobře detekovány přímo při vlnové délce jejich absorpčního maxima [24,25].

Značnou nevýhodou detekce v UV je nízká selektivita. Při malých vlnových délkách absorbuje mnoho dalších látek, včetně některých rozpouštědel a pufrů. Tím se navíc zvyšuje pozadí měření a objevují se systémové píky. Důležitou vlastností pro měření v UV oblasti je absorpční hrana použitých chemikálií. Absorpční hrana (někdy též cut-off nebo mezní vlnová délka) je nejmenší vlnová délka detekce, při které lze danou látku v systému použít, aniž by ovlivnila výsledky měření a stanovuje se pro rozpouštědla i pufrů. Některé pufrů mají hodnotu UV absorpční hrany tak vysokou, že detekci v blízkosti 200 nm znemožňují úplně (např. pro citrátový pufr se udává cut-off 230 nm).

Aminokyseliny málo absorbující v UV oblasti je možné upravit navázáním chromoforu/fluoroforu při derivatizaci. Derivatizace může probíhat jako předkolonová i postkolonová. Nejpoužívanějšími činidly pro předkolonovou derivatizaci aminokyselin umožňujícími detekci pomocí UV/VIS absorpce nebo fluorescence jsou dansyl nebo dabsyl chlorid [26,27], o-ftalaldehyd (OPA) [28-30], fenylisothiokyanát (PITC) [31,32], 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid (FMOC) [33] a 6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát (ACQ) [34-36]. Při postkolonové derivatizaci se často užívá ninhydrin [37].

Další možností detekce je použití hmotnostního spektrometru jako detektoru. Hlavní výhodou tohoto způsobu detekce je možnost detekovat více

aminokyselin najednou a není tedy třeba dosáhnout úplné separace. Nevýhodou jsou značné pořizovací i provozní náklady a nepříliš velká robustnost. Většina současných publikací zabývajících se analýzou volných aminokyselin se vztahuje k částečné separaci s následnou hmotnostní detekcí.

1.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

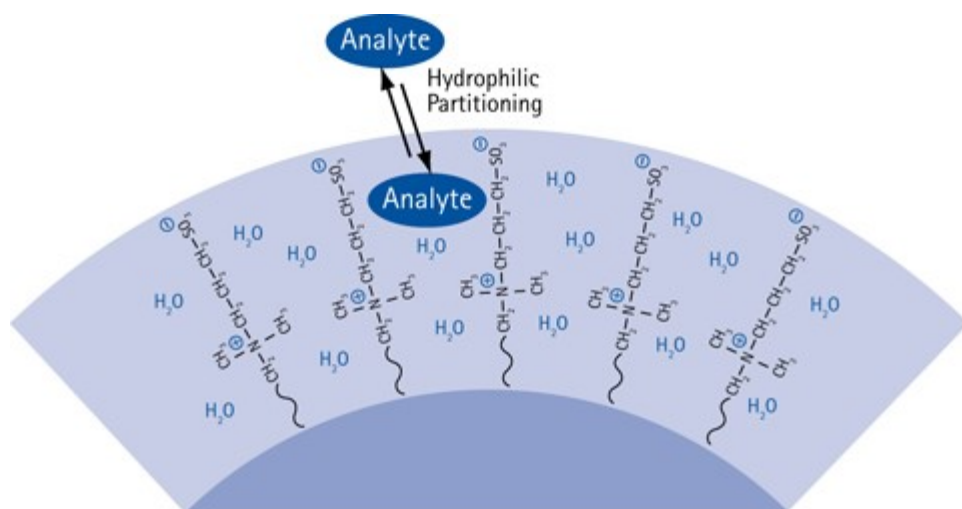
Vysokoučinná (někdy též vysokotlaká) kapalinová chromatografie je v současnosti jedna z nejčastěji užívaných separačních metod ať už za účelem stanovení, preparace nebo identifikace jednotlivých látek ve směsi. Jde o obdobu klasické sloupcové kapalinové chromatografie, od které se liší právě vyšším tlakem a tím i vyšší účinností a kratší dobou analýzy.

V HPLC se látky dělí na základě různé distribuce mezi stacionární a mobilní fází, případně mezi vrstvou kapaliny na stacionární fázi a mobilní fází. Podle typu použité mobilní a stacionární fáze tak můžeme rozlišit různé typy kapalinové chromatografie, např. normální, reverzní, iontově-výměnnou, HILIC, afinitní, chirální atd.

1.2.1. Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je separační metoda patřící do kapalinové chromatografie, která stojí na pomezí mezi normální, reverzní a iontově výměnnou chromatografií. Jedná se o poměrně novou metodu, která nalézá uplatnění především při analýze polárních látek, které se při běžné reverzní chromatografii separují nedostatečně nebo vůbec.

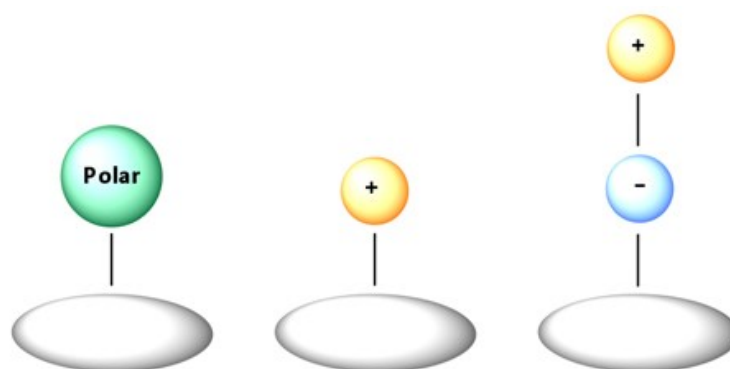
Základním principem HILIC separace je rozdělování analytu mezi převážně organickou mobilní fází a tenkou vrstvou vody částečně imobilizovanou na stacionární fázi [38], viz obrázek 3, str. 13. Podrobnými experimenty bylo dokázáno, že rozdělování není v HILIC módu otázkou konkrétní vlastnosti analytu nebo chromatografického systému, ale že se jedná o komplexní mechanismus složený z účinků mnoha jevů, např. tvorby vodíkových můstků, slabých elektrostatických interakcí, slabých hydrofobních interakcí atd. [39,40].



Obrázek 3 Princip rozdělování látek v HILIC separaci. Převzato z [41].

Aby bylo možné vytvoření vodného filmu na povrchu stacionární fáze, musí být stacionární fáze alespoň částečně polární. Původně byl pro tento účel používán především čistý silikagel, v současnosti je komerčně dostupných mnoho typů stacionárních fází, které lze rozdělit do tří základních kategorií [42], viz obrázek 4:

1. Neutrální – amid, diol, cyklodextrin
2. Nabité – aminopropyl, silikagel
3. Zwitteriontové – sulfobetain



Obrázek 4 Typy stacionárních fází pro HILIC. Zleva: polární (neutrální), nabité (kladně nebo záporně) a zwitteriontové (nabité kladně i záporně). Převzato a upraveno z [43].

Mobilní fáze musí být z velké části (50-95%) organická. Hlavním eluentem je v HILIC chromatografii vodná složka, jejíž obsah nesmí nikdy klesnout pod 3 %, aby nedošlo k zániku vodné vrstvy, a která musí být s organickou složkou

dokonale mísitelná. Je důležité, aby ani při vysokém obsahu organické složky nedocházelo k vysrážení použitých pufrů.

Vodná mobilní fáze je silnější eluent a při gradientové eluci je tedy na začátku mobilní fáze většinou organická a poté stoupá podíl vodné složky.

Velkou výhodou chromatografie v HILIC módu je dobrá kompatibilita s hmotnostním spektrometrem, protože mobilní fázi tvoří nejčastěji acetonitril ve vysoké koncentraci v kombinaci s těkavými pufrů. Nevýhodou je dlouhá doba potřebná k ustavení a stabilizaci vodného filmu. Především při použití gradientové eluce může úplná ekvilibrace kolony trvat desítky minut až hodiny.

1.3. Post-kolonová derivatizace

Při analýze látek, které samy o sobě nelze dostatečně dobře detekovat, je častým řešením derivatizace, ať už před-kolonová nebo post-kolonová. Oba způsoby lze dále použít buď jako „on-line“ (v běhu analýzy) nebo „off-line“ (mimo separační systém). Cílem derivatizace je vnesení chromoforu do struktury analytu a tím umožnění detekce.

Oproti před-kolonové derivatizaci se post-kolonová značně liší. Její hlavní výhodou je možnost použití v kombinaci s jakoukoliv už vyvinutou metodou separace, protože připojením reaktoru za kolonu nedochází ke změně separačního schéma. To je jeden z důvodů, proč je post-kolonová derivatizace často užívaná, hlavně ve spojení s kapalinovou chromatografií [44]. Především z důvodu časové náročnosti se ale používá výhradně ve formě „online“ [45]. Přímé zařazení reaktoru za kolonu ale do systému vnáší mimokolonový objem a prodlužuje cestu od kolony k detektoru, což může snižovat účinnost použité separační metody.

Pro post-kolonovou derivatizaci jsou důležité následující podmínky [42]:

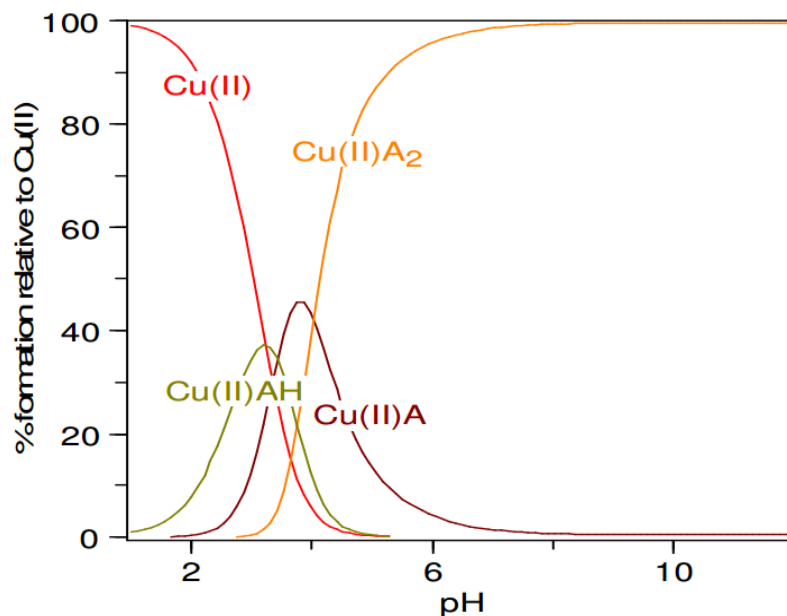
- Reakce musí probíhat rychle
- Reakce nemusí probíhat kvantitativně, ale výsledky musí být reprodukovatelné
- Produktem reakce nemusí být chemické individuum – reakce může být neselektivní
- Reakce musí probíhat v rozsahu podmínek použité separační techniky

Je výhodné používat post-kolonovou derivatizaci v systému kapalina-pevná látka, protože zde nedochází ke zředování analytu reakčním činidlem. V takovém případě může být tuhá látka nosič, na jehož povrchu je immobilizováno činidlo, nebo samotný reagent.

1.3.1. Oxid měďnatý

Oxid měďnatý je černá pevná látka za laboratorní teploty nerozpustná v čisté vodě. Kovová měď má elektronovou konfiguraci $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$. V oxidu měďnatém je kov oxidován na oxidační číslo +II a valenční d orbital není plně obsazen. Z toho vyplývá přechodný charakter měďnatého kationtu, který umožňuje tvorbu donor-akceptorové vazby např. s aminokyselinami jako ligandy. Právě přechodný charakter mědi a schopnost kationtů mědi tvořit komplexy s ligandy je i základem biologických funkcí mědi v organismech [46].

V roztoku v kontaktu s práškovým oxidem měďnatým vytvářejí aminokyseliny komplex s Cu^{2+} v poměru 1:1 i 2:1 v závislosti na pH, viz obrázek 5. Při nízkém pH převládají komplexy vzniklé v poměru 1:1, v zásaditém prostředí při $\text{pH} > 7$ naopak vznikají výhradně 2:1 [47,48]. Naopak schopnost aminokyselin působit jako ligand roste s pH, protože vznik komplexu probíhá výměnou za proton [48].



Obrázek 5 Zastoupení různých forem komplexů aminokyselin s měďnatým kationtem v závislosti na pH. Převzato z [48].

Komplexy měďnatých iontů s aminokyselinami silně absorbují v rozsahu 230-250 nm, proto je derivatizace oxidem měďnatým jeden ze způsobů, jak účinněji detekovat aminokyseliny pomocí UV detektoru. Dříve se tohoto způsobu využívalo jako před-kolonové derivatizace s roztokem síranu měďnatého a následnou separací měďnatých komplexů, případně přidáváním měďnatých iontů přímo do mobilní fáze [49,50]. Druhou variantou je post-kolonová derivatizace, například v online napojeném reaktoru s práškovým oxidem měďnatým [51,52].

1.4. Výpočty

1.4.1. Mez detekce

Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze použitou metodou změřit a s jistotou odlišit od šumu pozadí se nazývá mez detekce (LOD). Její hodnota se vypočítává pomocí rovnice přímky závislosti výšky píku analytu na koncentraci a obálky šumu pozadí, viz rovnice 1:

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (1)$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační přímky pro výšku píku na koncentraci.

1.5. Cíl práce

Cílem této práce je prozkoumat vlastnosti post-kolonové derivatizace oxidem měďnatým použité pro zlepšení detekce proteogenních aminokyselin v podmínkách hydrofilní interakční chromatografie s následnou UV detekcí.

2. Experimentální část

2.1. Instrumentace

Všechna UV spektra byla naměřena na spektrofotometru Agilent 8453 s křemennou 10,00 mm kyvetou od firmy Fisher Scientific. Chromatografické experimenty byly provedeny s HPLC gradientním čerpadlem BETA 10, UV-VIS detektorem LCD 2084.2 a degasserem DG 3014 od firmy ECOM a dynamickou míchací komůrkou od firmy KNAUER. Použité kolony byly: XBridge[®] BEH Amide 3,5 μm , 2,1x150 mm od firmy Waters s ochrannou předkolumnou XBridge[®] BEH Amide 3,5 μm VanGuard[®] Cartridge 2,1x5 mm při průtoku 0,5 mL/min, Luna NH₂ 250x2 mm 5 μm s ochrannou předkolumnou SecurityGuard[™] Cartridge NH₂ 4x2,0 mm od firmy Phenomenex při průtoku 0,5 mL/min a SeQuant[™] ZIC[®] HILIC 150x4,6 mm 3,5 μm od firmy Merck při průtoku 0,7 mL/min. Jako reaktor pro plnění oxidem měďnatým byla použita prázdná SecurityGuard[™] Cartridge 4x2,0 mm uzavřená do ochranné předkolumny SecurityGuard[™] Guard Cartridge Kit, obojí od firmy Phenomenex. Všechna měření byla provedena při laboratorní teplotě.

2.2. Použité chemikálie

Aminokyseliny glycin, L-serin, L-leucin, L-isoleucin, L-tryptofan, L-arginin, L-methionin, L-asparagin, L-fenylalanin, L-histidin, L-alanin, L-prolin, L-valin, L-tyrosin a L-asparagová kyselina byly zakoupeny jako sada L-Amino acids od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis). Pro přípravu pufrů byly použity octan sodný p.a. od firmy Merck (Darmstadt), hydrogenfosforečnan sodný p.a., dihydrogenfosforečnan sodný p.a., kyselina octová (99%) a kyselina boritá p.a. od firmy PENTA (Praha), hydroxid sodný p.a., kyselina mravenčí (98%) od firmy Lach-Ner (Neratovice) a dekahydrát tetraboritanu sodného (borax) p.a. od firmy Lachema (Brno). Pro přípravu vzorků a pufrů byla použita deionizovaná voda přečištěná systémem Milli-Q Water Purification System. Jako organická složka mobilní fáze byl použit acetonitril Gradient Grade od Fischer Chemical. Derivatizační činidlo byl oxid měďnatý CuO ACS p.a. od firmy Merck (Darmstadt).

2.3. Postup

2.3.1. UV spektra

Vzorky pro měření UV spekter byly připraveny jako 2 mmol/L roztoky (kromě tryptofanu, který byl připraven v koncentraci 0,2 mmol/L a methioninu, který byl připraven v koncentraci 1 mmol/L). Rozpouštědlem pro přípravu vzorků byl acetonitril s 10mM octanem sodným o pH 4 v poměru 50:50. Pro výběr optimální vlnové délky pro detekci komplexů a porovnání absorbance čistých aminokyselin s komplexy s oxidem měďnatým byla změřena UV spektra čistých L-aminokyselin v rozsahu vlnových délek 200-300 nm. Poté byl do roztoků přidán v nadbytku práškový oxid měďnatý a byly nechány reagovat po dobu 10 minut. Roztoky byly přefiltrovány a byla změřena spektra vzniklých komplexů. Jako blank bylo použito rozpouštědlo použité pro přípravu vzorků.

2.3.2. HPLC analýza

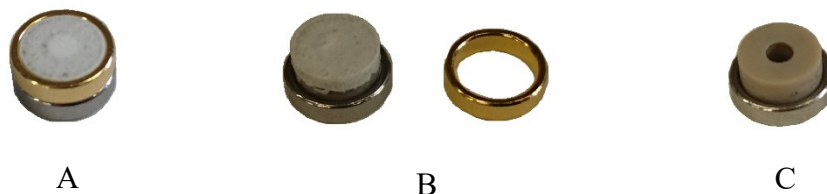
Pro měření závislosti signálu na pH pufru byly aminokyseliny připraveny jako 0,5 mmol/L roztoky v 70% acetonitrilu (kromě tryptofanu, který byl připraven v koncentraci 0,1 mmol/L a argininu, který byl připraven v 50% acetonitrilu v koncentraci 3 mmol/L). Závislost signálu na pH jsem měřila při isokratické eluci při průtoku 0,5 mL/min s mobilní fází acetonitril:10mM pufr (70:30, v/v) postupně s pufrů o pH 3-10. Použité pufrů byly mravenčan sodný (pH 3), octan sodný (pH 4 a 5), citronan sodný (pH 6), dihydrogenfosforečnan sodný (pH 7), hydrogenfosforečnan sodný (pH 8) a boritan sodný (pH 9 a 10). Při každé změně pufru byla kolona promyta acetonitrilem s čistou deionizovanou vodou v poměru 30:70.

Kalibrační závislost ploch i výšek píků jednotlivých aminokyselin s derivatizací i bez jsem měřila za stejných podmínek, ale pouze s octanovým pufrů o pH 4. Čisté aminokyseliny byly detekovány při 210 nm a komplexy vzniklé derivatizací oxidem měďnatým při 230 nm.

Všechna měření jsem provedla v tripletu. Plochy a výšky píků byly odečítány softwarem Clarity (verze 2.6.6) od DataApexu.

2.3.3. Postkolonová derivatizace

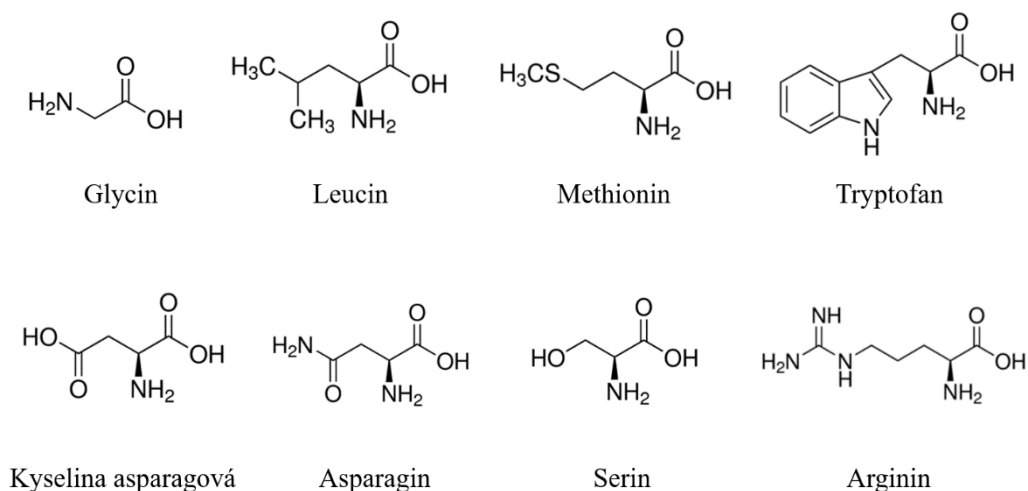
Nejdříve byla cartridge do ochranné předkolonky otevřena a vyčištěna od původní náplně. Poté byla ručně naplněna práškovým oxidem měďnatým a opět uzavřena. Všechny experimenty byly prováděny s náplní 20 mg práškového oxidu měďnatého.



Obrázek 6 Cartridge použitá pro plnění oxidem měďnatým: A – celá, tak jak byla zakoupena, B – s odstraněným horním prstencem, C – s odstraněnou membránou. Pod membránou se nachází otvor dříve naplněný stacionární fází.

3. Výsledky a diskuze

Protože se jednotlivé proteogenní aminokyseliny zásadně liší svými vlastnostmi, experimenty byly prováděny s osmi zvolenými aminokyselinami zastupujícími každou podskupinu proteogenních aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou: glycin, leucin (alifatické), serin (hydroxylové), tryptofan (aromatické), methionin (obsahující síru), asparagin (amidy), arginin (báze) a kyselina asparagová (kyseliny), pro strukturní vzorce viz obrázek 7.



Obrázek 7 Vybrané proteogenní aminokyseliny. Převzato a upraveno z [53].

3.1. Volba stacionární fáze

Nejprve bylo třeba porovnat jednotlivé typy stacionárních fází používaných v HILIC módu z hlediska vhodnosti pro další experimenty s aminokyselinami. K dispozici byly kolony s aminopropylovou, amidovou a sulfobetainovou stacionární fází zastupující každý typ stacionární fáze pro HILIC separace, viz úvod, str. 13.

Cílem této komparace bylo vybrat kolonu, na které lze všechny vybrané aminokyseliny bez problémů analyzovat, tzn. eluují v čase pod 20 minut a píky nejsou výrazně rozmyté ani deformované. Pro srovnání jsem na každé koloně nadávkovala postupně osm vybraných aminokyselin. Měření jsem prováděla isokraticky s mobilní fází acetonitril:10 mM octanový pufr o pH 4,0 (80:20, v/v). Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 1, str. 21.

Tabulka 1 Srovnání kolon při izokratické eluci osmi vybraných aminokyselin. Měřeno v poměru 80:20 ACN:10mM sodno-octanový pufr pH 4,0. Použité kolony jsou Xbridge® BEH Amide 150x2,1 mm 1,5 μm, Luna –NH₂ 250x2 mm 5μm a ZIC® HILIC 150x4,6 mm 3,5 μm (sulfobetain).

AMK	<i>t_r</i> (min)		
	<i>sulfobetain</i>	<i>aminopropyl</i>	<i>amid</i>
Glycin	17,3	8,8	3,8
Leucin	5,3	3,7	1,9
Serin	18,4	10,1	4,4
Tryptofan	5,3	3,8	1,7
Arginin	-	1,6	9,9*
Kyselina asparagová	-	-	3,2
Asparagin	18,5	9,3	4,6
Methionin	6,3	4,3	2,1

*retenční čas argininu na amidové koloně je při mobilní fázi acetonitril:10 mM pufr (70:30, v/v)

Z měření vyplývá, že zwitteriontová kolona ZIC®-HILIC je při daných podmínkách nevhodná, protože dochází k silnému zadržování velmi polárních aminokyselin, tj. argininu a kyseliny asparagové. Další experimenty potvrdily, že k eluci zmíněných aminokyselin dochází až při navýšení vodné složky mobilní fáze na 80 % a v takových podmínkách se nejedná o separaci v módu HILIC, navíc jsou píky silně nesymetrické a rozmyté. Vzhledem ke zwitteriontové povaze stacionární fáze zřejmě dochází k elektrostatické interakci s nabitými aminokyselinami (celkový náboj při pH 4 je -1 u aspartátu a +1 u argininu). Tato stacionární fáze je pro další měření v daných podmínkách nevhodná k analýze bazických a kyselých proteogenních aminokyselin.

Obdobný problém nastal i u aminopropylové stacionární fáze u kolony Luna –NH₂. Tato kolona už byla použita pro částečnou separaci všech proteogenních aminokyselin ve spojení s hmotnostní detekcí [54], ale při zásaditém pH. Při pH 4 byla u této kolony z hlediska přílišné retence problematická kyselina asparagová, u které ani snížení podílu organické složky na 30 % nepomohlo a stále se trvale zadržovala na koloně. Domnívám se, že

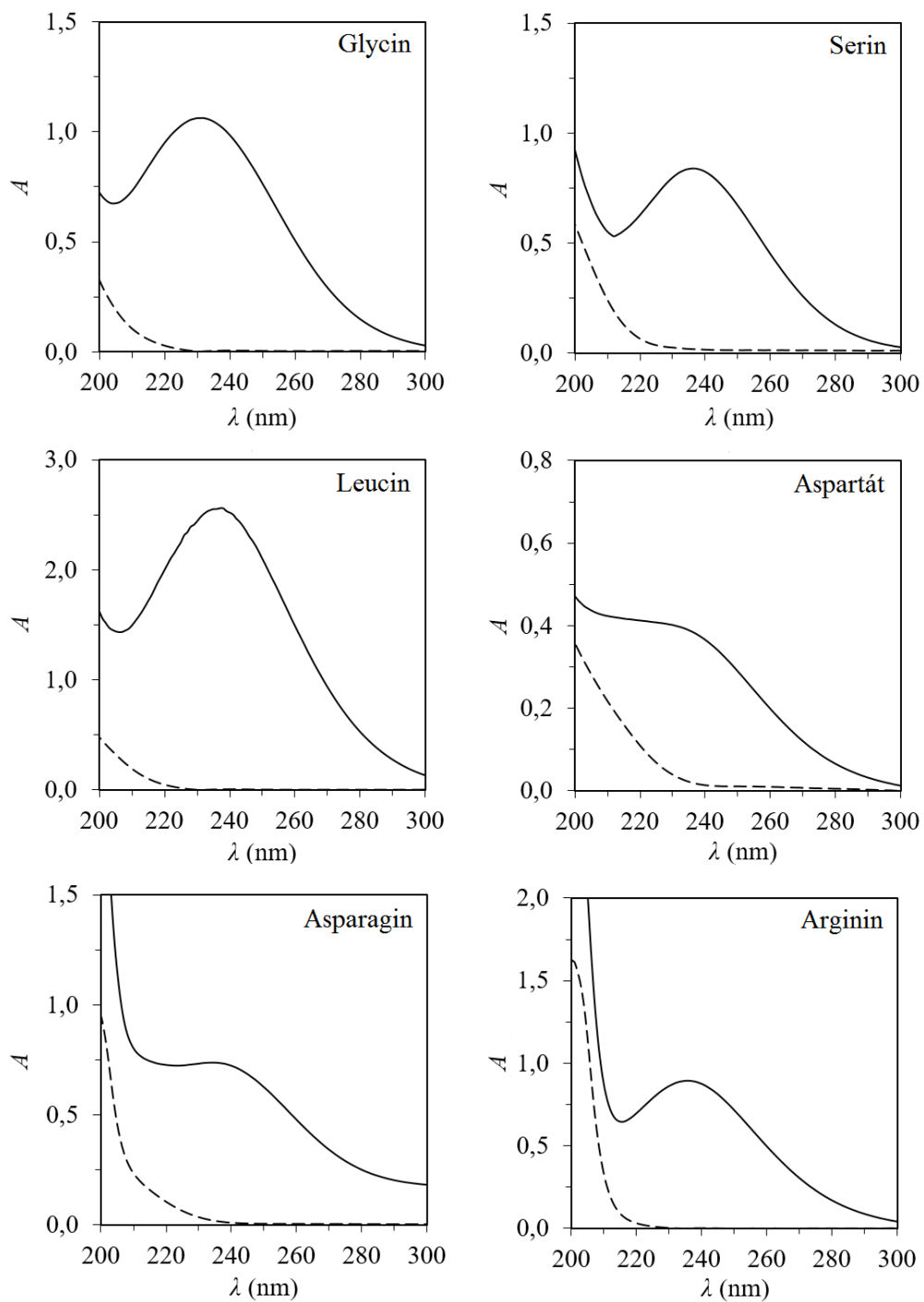
vzhledem k celkovému náboji -1 kyseliny asparagové a protonaci aminové skupiny stacionární fáze v prostředí o pH 4 zde také dochází k silné elektrostatické interakci. Ostatní aminokyseliny eluovaly bez problémů. Z toho vyplývá, že tato kolona je za daných podmínek vhodná pro experimenty s vybranými aminokyselinami s výjimkou kyseliny asparagové.

Poslední testovanou kolonou byla amidová stacionární fáze v koloně Xbridge[®] – BEH amide. Stejný typ stacionární fáze byl použit při úspěšné separaci 18 proteogenních aminokyselin na základní linii na UHPLC při pH 3,2 [21]. Amidová stacionární fáze jako jediná z testovaných je sice silně polární, ale nese žádný náboj. Jak už bylo řečeno, aminokyseliny se od sebe velmi liší a ty, které kromě zwitteriontu aminové a karboxylové skupiny nesou další náboj mohou tvořit silné elektrostatické interakce se stacionárními fázemi, které také nesou náboj. Tím dochází k silnému zadržování analytů, podobně jako u iontově-výměnné chromatografie. U amidové kolony k tomuto jevu nedochází, ale přesto je dostatečně polární, aby umožnila vznik vodného filmu.

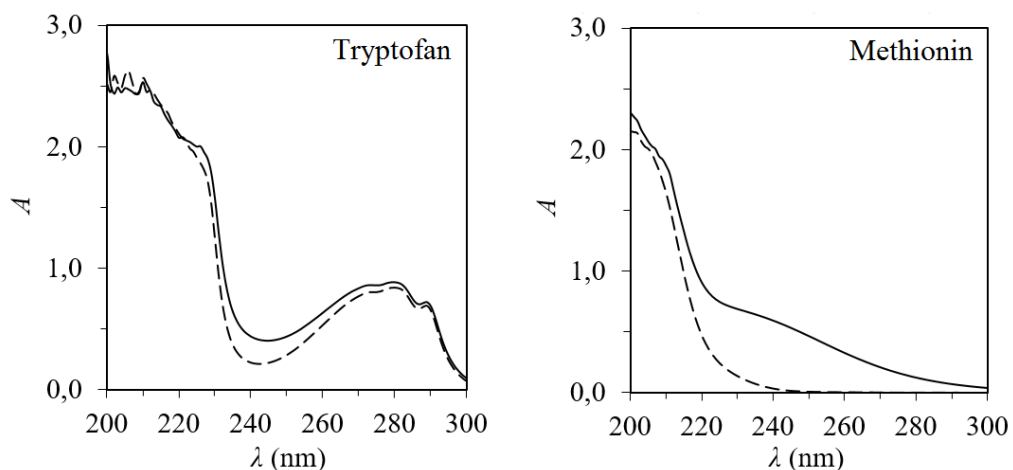
Na této koloně eluovaly aminokyseliny v souladu s požadavky na další experimenty s výjimkou argininu, u kterého bylo třeba zvýšit podíl vodné složky mobilní fáze na 30 %, aby se jeho retenční čas snížil pod 20 minut. Kolonu Xbridge[®] BEH Amide 150x2,1 mm 1,5 μm jsem se rozhodla použít pro další experimenty a jako mobilní fázi jsem zvolila acetonitril:10mM octan sodný pH 4,0 (70:30, v/v).

3.2. UV spektra

Pro ověření, že reakcí aminokyselin s oxidem měďnatým v kyselém prostředí dochází ke vzniku komplexů byla změřena spektra roztoků čistých aminokyselin a poté spektra komplexů vzniklých reakcí s oxidem měďnatým. Zároveň byla tato spektra použita pro výběr optimální vlnové délky pro další experimenty. Spektra čistých aminokyselin a jejich komplexů jsou pro přehlednost rozdělena na dvě skupiny. První skupinou jsou ty, které čisté při 210 nm absorbují slabě, tj. glycin, leucin, serin, asparagin, aspartát a arginin (obrázek 8, str. 23). Druhá skupina jsou aminokyseliny, které samy o sobě výrazně absorbují při 210 i 230 nm, tj. methionin a tryptofan (obrázek 9, str. 24).



Obrázek 8 Srovnání UV spekter čistých aminokyselin (---) a jejich komplexů s měďnatými kationty (—). Roztoky aminokyselin byly připraveny v koncentraci $3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v rozpouštědle acetonitril:10Mm octanový pufr o pH 4 (50:50, v/v).



Obrázek 9 Srovnání UV spekter čistých aminokyselin (---) a jejich komplexů s měďnatými kationty (—). Roztoky aminokyselin byly připraveny v koncentraci $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro tryptofan a $1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro methionin v rozpouštědle acetonitril:10mM pufr o pH 4 (50:50, v/v).

U glycinu, leucinu, serinu, asparaginu, kyseliny asparagové a argininu je na první pohled zřejmé, že derivatizace oxidem měďnatým proběhla a vzniklé komplexy silně absorbují v oblasti 230-240 nm.

U zbývajících dvou aminokyselin, především u tryptofanu už výsledek není tak očividný. Jak je patrné, nejenže se čistý tryptofan vyznačuje silnou absorpcí při 210 nm, ale má i důležité absorpční maximum při 280 nm, které se běžně používá pro stanovení čistoty a obsahu bílkovin. Derivatizací se absorbance v oblasti kolem 230 nm zvýšila, ale relativně jen velmi málo ve srovnání s čistou aminokyselinou – tryptofan s oxidem měďnatým sice tvoří komplexy, ale zvýšení signálu je oproti ostatním aminokyselinám nejmenší. Přesto je jeho signál ze všech aminokyselin nejsilnější při 210 i 230 nm.

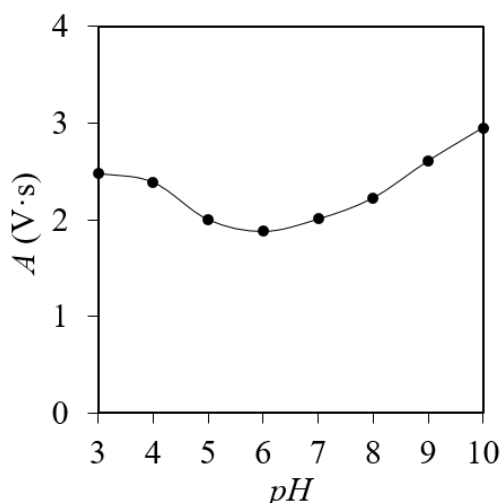
Methionin sám o sobě neabsorbuje při 210 nm tak silně jako tryptofan. Opět je vidět zvýšení absorpce kolem 230-240 nm, přesto je ze spektra patrné, že ani u něj nebude mít derivatizace oxidem měďnatým tak významný vliv na zvýšení signálu jako u prvních šesti aminokyselin.

Ze spekter aminokyselin a jejich komplexů je zřejmé, že optimální vlnová délka pro detekci vznikajících komplexů se pohybuje kolem 230 nm. Pro leucinu, serin a arginin je absorpční maximum při 236 nebo 237 nm. Naproti tomu u

methioninu, kyseliny asparagové a tryptofanu absorbance klesá při vlnové délce větší než 230 nm. Glycin poskytuje největší signál právě při 230 nm. Vzhledem k tomu, že poslední asparagin má při 230 a 236 nm přibližně stejnou absorbanci, byla pro další experimenty vybrána vlnová délka detekce 230 nm, která se pro detekci komplexů již používala dříve [51].

3.3. Závislost signálu na pH

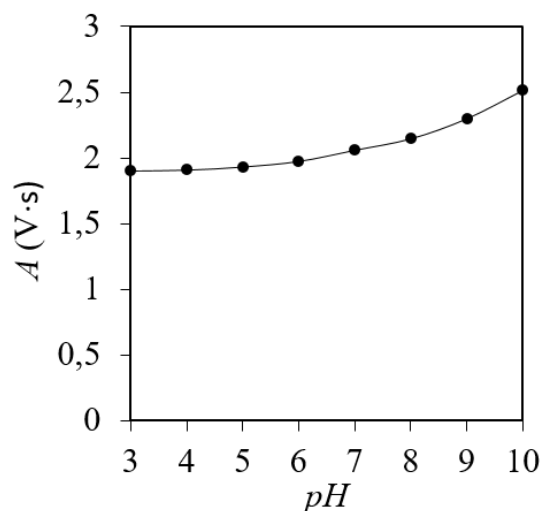
Při zvolené vlnové délce 230 nm a s mobilní fází acetonitril:10mM pufr (70:30, v/v) byl dále zkoušen vliv pH na signál aminokyselin s postkolonovou derivatizací. Opět jsou pro přehlednost výsledky rozděleny podle trendu závislosti na pH na tryptofan, jehož závislost signálu na pH se zcela liší od ostatních aminokyselin (viz obrázek 10), aminokyseliny s optimálním pH 4, a aminokyseliny s optimálním pH 5. Signál je vyjádřen jako plocha píku s jednotkou voltsekunda.



Obrázek 10 Závislost signálu tryptofanu s post-kolonovou derivatizací oxidem měďnatým na pH mobilní fáze. UV detekce při 230 nm.

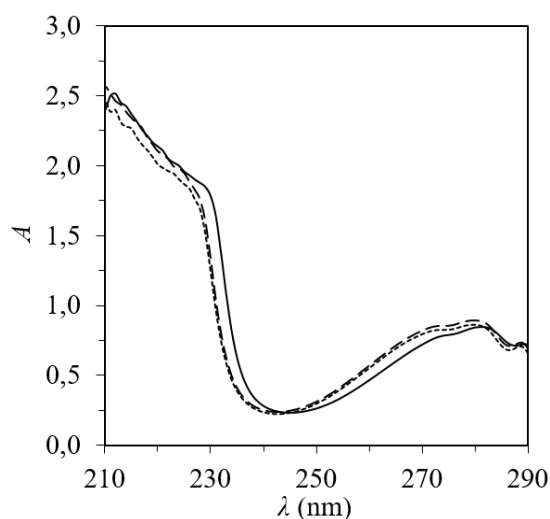
Zvláštností tryptofanu je průběh závislosti velikosti píku na pH pufru. Maximální odezva je při pH 10, nejzásaditějším z vyzkoušených pH. Tvorba komplexů aminokyselin s měďnatými kationty probíhá výměnou za proton, a to by mohlo být příčinou zvýšení odezvy v zásaditém prostředí. Nicméně to by se projevilo i u ostatních aminokyselin, u kterých je derivatizace účinnější. Pro ujištění, že je tento jev způsoben samotným tryptofanem, a ne vznikajícími

komplexy, byla proměřena závislost signálu čistého tryptofanu na pH při 230 nm, viz obrázek 11.



Obrázek 11 Závislost signálu čistého tryptofanu na pH mobilní fáze. UV detekce při 230 nm.

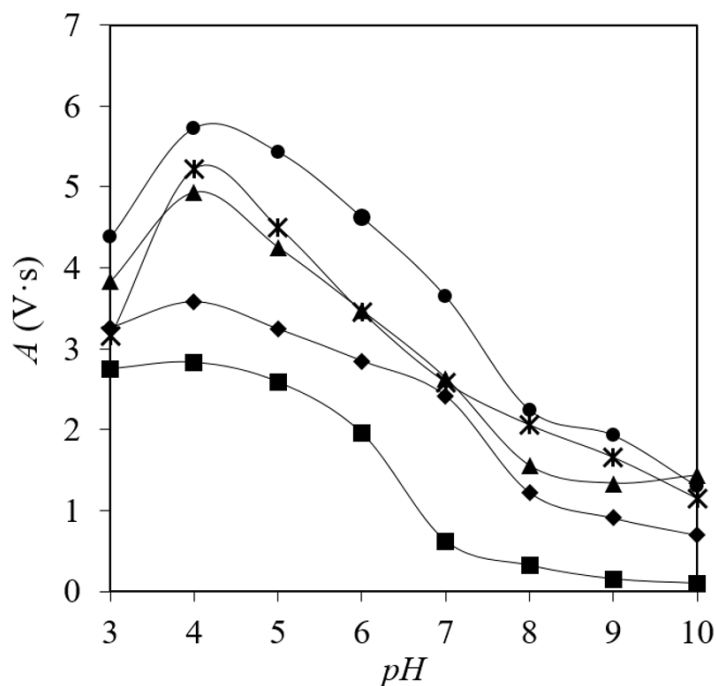
Z grafu vyplývá, že v zásaditém prostředí se zvyšuje absorbance i čistého tryptofanu při 230 nm. V dostupné literatuře byl nalezen článek o změnách spekter aminokyselin v závislosti na pH, ze kterého vyplývá, že spektrum tryptofanu se v zásaditém prostředí posouvá směrem k vyšším vlnovým délkám [55]. Pro kontrolu bylo proměřeno spektrum čistého tryptofanu v pH 4, 7 a 10, viz obrázek 12.



Obrázek 12 Vliv pH rozpouštědla na UV spektrum čistého tryptofanu. Měřeno při pH 4 (···), pH 7 (- - -) a pH 10 (—).

Ze spekter je jasné, že unikátní průběh závislosti signálu na pH při zásaditých pH je u tryptofanu dán samotnou čistou aminokyselinou a nemá nic společného s derivatizací oxidem měďnatým.

Závislost signálu na pH vykazuje u většiny ostatních aminokyselin obdobný průběh – maximum je při kyselém pH, nejčastěji pH 4, viz obrázek 13:

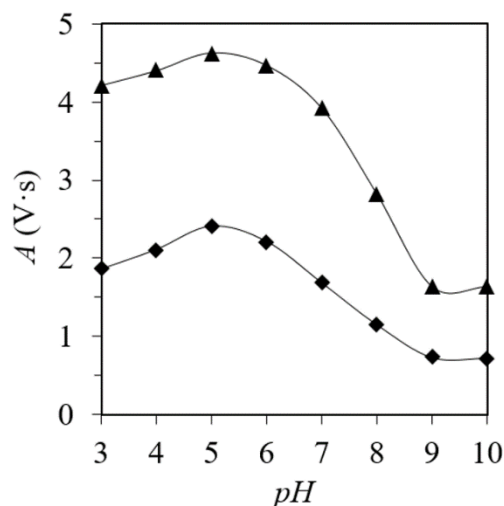


Obrázek 13 Závislost signálu aminokyselin s postkolonovou derivatizací na pH mobilní fáze. V grafu je vynesena závislost pro glycine (◆), leucin (▲), serin (●), asparagin (✕) a arginin (■). UV detekce při 230 nm.

Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, trend zvyšování signálu v kyselém prostředí je dán vznikem komplexů 1:1, kdy každá molekula aminokyseliny tvoří komplex s jedním měďnatým kationtem. Při zvýšení pH se zvyšuje preference vzniku komplexů v poměru 1:2 a v důsledku toho se absorbance snižuje. Výjimkou jsou tryptofan, methionin a kyselina asparagová, viz obrázek 14, str. 28.

U methioninu a kyseliny asparagové je trend závislosti na pH obdobný jako u zmíněných aminokyselin, pouze mají optimum při pH 5. U tryptofanu je trend zcela atypický a optimum je při pH 10. Signál tryptofanu je ale přesto při všech testovaných pH řádově vyšší než signál ostatních aminokyselin. Proto není nezbytné při výběru optimálního pH pro detekci všech aminokyselin brát

optimální pH detekce tryptofanu v potaz. U kyseliny asparagové a methioninu, u kterých je pro detekci optimální pH 5 má změna pH mnohem větší vliv na celkový signál, viz obrázek 14. Přestože úbytek signálu při přechodu z pH 5 na pH 4 není především u kyseliny asparagové zanedbatelný, rozhodla jsem se v rámci kompromisu dále pracovat s pH 4, které je optimální pro pět z osmi analyzovaných aminokyselin.

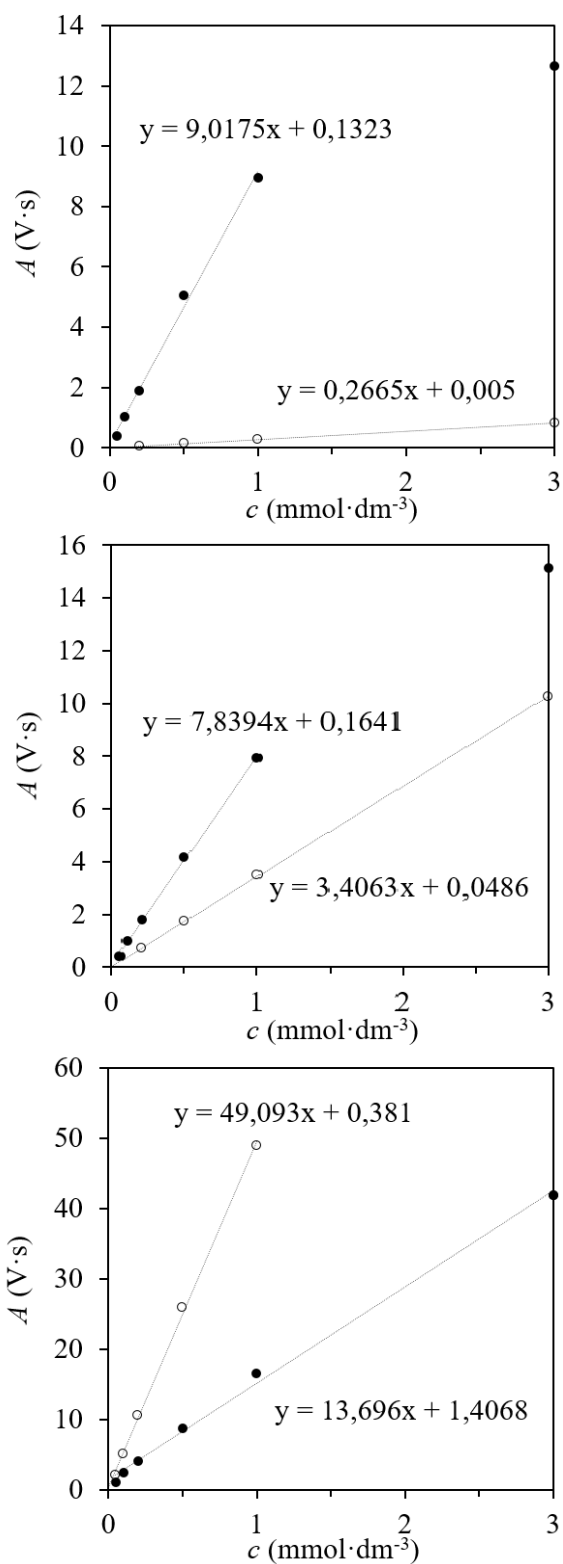


Obrázek 14 Závislost signálu aminokyselin s postkolonovou derivatizací na pH mobilní fáze. V grafu je vynesena závislost pro aspartát (♦) a methionin (▲). UV detekce při 230 nm.

3.4. Vliv derivatizace na zvýšení citlivosti detekce

Pro srovnání účinnosti detekce bez derivatizace, resp. s derivatizací oxidem měďnatým byla proměřena kalibrační závislosti všech osmi aminokyselin bez zapojení reaktoru při 210 nm, resp. se zapojením reaktoru při 230 nm a vynesena do grafu. Vlnová délka 210 nm pro čisté aminokyseliny byla zvolena, protože je to nejmenší použitelná vlnová délka vzhledem k absorpční hraně použitého pufru, tj. 210 nm pro 10mM octan sodný [56].

Vzhledem k většímu množství a podobnosti získaných dat je v následující kapitole diskutován pouze serin, u kterého došlo k největšímu zvýšení citlivosti, methionin, u kterého bylo zvýšení citlivosti nejmenší a tryptofan, u kterého jako jediného došlo ke snížení citlivosti, viz obrázek 15, str. 29. Pro výsledky zbylých aminokyselin viz obrázek 21 a 22, str. 45-46. Pro souhrnné údaje všech aminokyselin, viz tabulka 2, str. 30.



Obrázek 15 Vliv derivatizace oxidem měďnatým na signál aminokyselin serinu (nahore), methioninu (uprostřed) a tryptofanu (dole). V grafech je zobrazena kalibrační závislost bez derivatizace s detekcí při 210 nm (○) a s derivatizací s detekcí při 230 nm (●).

Tabulka 2 Srovnání směrnice kalibrační závislosti plochy piku na koncentraci bez derivatizace při 210 nm a s derivatizací při 230 nm.

AMK	bez derivatizace	s derivatizací	zvýšení citlivosti
	$k (V \cdot s \cdot dm^3 \cdot mmol^{-1})$	$k (V \cdot s \cdot dm^3 \cdot mmol^{-1})$	
glycin	0,2784	5,836	20,96
leucin	0,3416	8,969	26,25
serin	0,2665	9,018	33,84
arginin	0,2797	5,133	18,35
asparagin	0,8507	9,736	11,44
aspartát	0,5409	4,181	7,729
tryptofan	49,09	13,70	0,3178
methionin	3,406	7,839	2,301

U serinu se použitím post-kolonové derivatizace zvýšila citlivost téměř 34krát, tedy řádově. U methioninu se citlivost zvýšila podstatně méně, nicméně hlavním problémem detekce při vlnové délce 210 nm je množství interferujících látek. V této oblasti spektra absorbují např. všechny pufry na bázi organických kyselin i základní rozpouštědlo pro HILIC – acetonitril. Přestože ve srovnání s kalibrační přímkou čistého methioninu došlo sice jen k malému zvýšení citlivosti, má užití oxidu měďnatého i u methioninu význam. Použití derivatizace umožňuje detekci při 230 nm namísto 210 nm a tím se snižuje možnost interferencí a šum na základní linii, což má za následek další snížení hodnot meze detekce a kvantifikace. U tryptofanu se citlivost snížila, ale jedná se pouze o důsledek posunutí vlnové délky detekce do oblasti, kde tryptofan daleko méně absorbuje, viz obrázek 9, str. 24. Rozdíl mezi absorbancí při 210 a 230 nm je tak velký, že ani nárůst signálu vlivem derivatizace ho nepokryje.

Ze zobrazených grafů vyplývá, že derivatizace oxidem měďnatým poskytuje signál lineárně úměrný koncentraci analytu, ale pouze v určitém koncentračním rozsahu. U koncentrovaných vzorků ($3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) je u všech aminokyselin s výjimkou tryptofanu na první pohled patrné, že odezva není v souladu s přímkou závislosti, ale že je výrazně menší. Při vysokých koncentracích aminokyselin tedy nejspíše může dojít k lokálnímu „nasyčení“ povrchu práškového oxidu měďnatého a část analytu je vymyta dříve než stačí reagovat.

Tento problém by mohl být odstraněn použitím většího množství oxidu měďnatého, nicméně to s sebou nese nevýhody, které budou diskutovány dále.

U tryptofanu je kalibrační závislost při nejvyšší měřené koncentraci nejméně zakřivena, protože u této aminokyseliny má derivatizace oxidem měďnatým malý vliv na výslednou absorbanci, jak už bylo diskutováno dříve.

Postkolonová on-line derivatizace oxidem měďnatým řádově zlepšila odezvu šesti z osmi aminokyselin ve srovnání s detekcí čistých látek. Pomocí naměřených kalibračních přímk pro výšky píků a obálky šumu na základní linii byla vypočítána mez detekce pro všech osm aminokyselin s a bez derivatizace. Pro souhrnné výsledky viz tabulka 3:

Tabulka 3 Mez detekce (LOD) pro vybrané aminokyseliny. Hodnoty šumu na základní linii použité pro výpočet byly 0,6932 mV pro 210 nm bez derivatizace a 0,3606 mV pro 230 nm s derivatizací. Směrnice kalibrační přímk pro výšky píků je značena m.

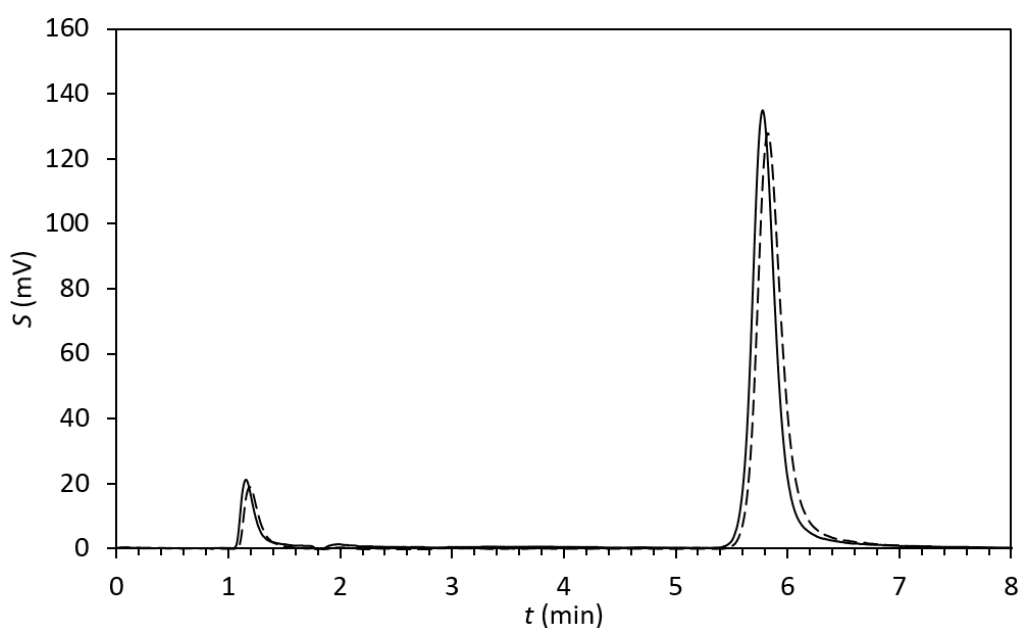
AMK	bez derivatizace		s derivatizací	
	m (mV·dm ³ ·mmol ⁻¹)	LOD (μmol·dm ⁻³)	m (mV·dm ³ ·mmol ⁻¹)	LOD (μmol·dm ⁻³)
glycin	16,56	125,6	284,8	3,798
leucin	24,94	83,39	636,1	1,701
serin	18,62	111,7	364,2	2,970
arginin	7,524	276,4	95,58	11,32
asparagin	49,6	41,95	375,5	2,881
aspartát	38,49	54,04	345,3	3,133
tryptofan	4480	0,4642	1036	1,044
methionin	313,8	6,628	507,6	2,131

3.5. Vliv oxidu měďnatého na retenční čas a tvar píku

V průběhu analýz jsem zjistila, že tvar píku aminokyselin se se zapojenou kolonkou s oxidem měďnatým zhoršuje – píky se rozšiřují a chvostují. Pro objasnění, jakým způsobem přidaná součástka ovlivňuje práci systému jsem se rozhodla provést srovnávací měření. Pro tyto experimenty jsem zvolila tryptofan, který měl pro tento účel vhodné vlastnosti:

- je nejvíce absorbující aminokyselinou v UV oblasti
- s oxidem měďnatým reaguje nejméně z proteogenních aminokyselin
- lze ho dobře detekovat při 280 nm (vznikající komplexy detekci v této vlnové délce neovlivňují)

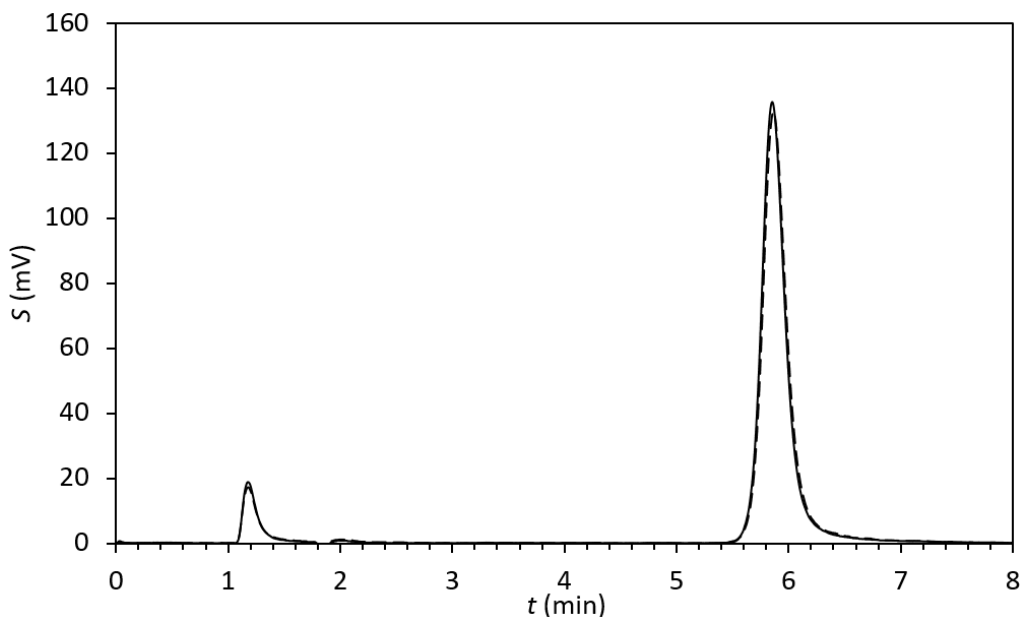
První domněnka byla, že rozšiřování píku může být způsobeno zapojením kolonky, která nejenže vnáší do systému mimokolonový objem, ale vnáší ho navíc za kolonu. Tím způsobuje prodloužení cesty z kolony k detektoru a rozmytí zóny analytu podélnou difuzí. Pro objasnění vlivu kolonky bylo provedeno stejné měření se zapojenou prázdnou kolonkou a bez zapojené kolonky, viz obrázek 16.



Obrázek 16 Srovnání vlivu zapojení kolonky na oxid měďnatý za kolonu na tvar píku tryptofanu. Zobrazen je chromatogram bez zapojené kolonky (—) a se zapojenou prázdnou kolonkou (- - -). Měřeno při isokratické eluci s mobilní fází acetonitril: 10 mM pufr pH 4 (85:15, v/v).

Jak je patrné z obrázku, zapojení prázdné kolonky, má určitý vliv na tvar píku, ale ne tak zásadní, jaký byl pozorován. Deformaci píku tedy může způsobovat buď nerovnoměrné ruční plnění kolonky nebo samotný oxid měďnatý. Pro vyloučení první možnosti byl experiment zopakován s originální náplní do ochranné předkolonky plněnou výrobcem kolony a poté pro srovnání

s kolonkou, která byla ručně naplněna stejnou stacionární fází. Způsob plnění neměl na výsledek žádný vliv, viz obrázek 17, str. 33.

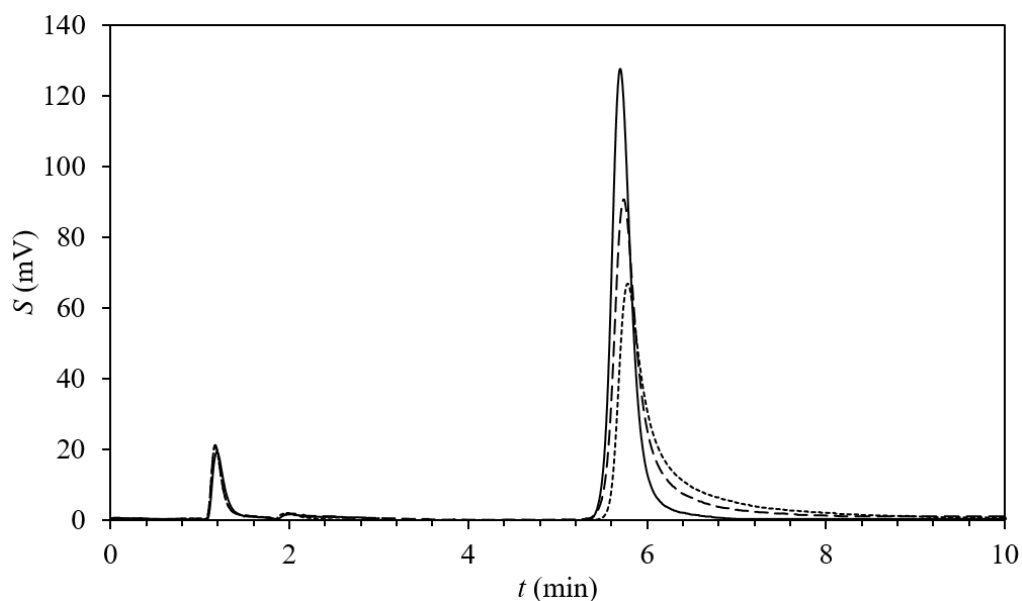


Obrázek 17 Srovnání vlivu plnění kolonky na tvar píku tryptofanu. Zobrazen je chromatogram se zakoupenou náplní (—) a ručně plněnou kolonkou (- - -). Měřeno při isokratické eluci s mobilní fází acetonitril:10 mM pufr pH 4 (85:15, v/v).

Je zřejmé, že chvostování píků nezpůsobuje ani přidání mimokolonový objem ani nerovnoměrné ruční plnění zapojené kolonky. Poslední možností je vliv oxidu měďnatého. Pro potvrzení byl porovnán vliv kolonky plně a z poloviny naplněné, pro výsledky viz obrázek 18, str. 34.

Domnívám se, že chvostování píku je důsledek přítomnosti oxidu měďnatého, který zde funguje nejen jako derivatizační činidlo, ale také jako obdoba stacionární fáze, na které dochází k retenci aminokyselin, resp. komplexů aminokyselin.

Z výsledků experimentů je jasné, že oxid měďnatý způsobuje chvostování píků. Tím zhoršuje uplatnění této metody detekce pro separační analýzu, kdy je třeba rozdělit analyty na základní linii, což je vzhledem ke zvětšení šířky píku mnohem obtížnější. Při použití menšího množství oxidu měďnatého je sice deformace píku menší, ale zároveň se tím snižuje signál analytů, protože se snižuje i dostupnost oxidu měďnatého pro tvorbu komplexů.



Obrázek 18 Vliv množství použitého oxidu měďnatého na tvar píku tryptofanu. Srovnání vlivu plnění kolonky na tvar píku tryptofanu. Zobrazen je chromatogram naměřen s prázdnou kolonkou (—), s 10 mg CuO (- - -) a s 20 mg CuO (···). Měřeno při isokratické eluci s mobilní fází acetonitril:10 mM pufr pH 4 (85:15, v/v).

3.6. Aplikace post-kolonové derivatizace při separaci aminokyselin

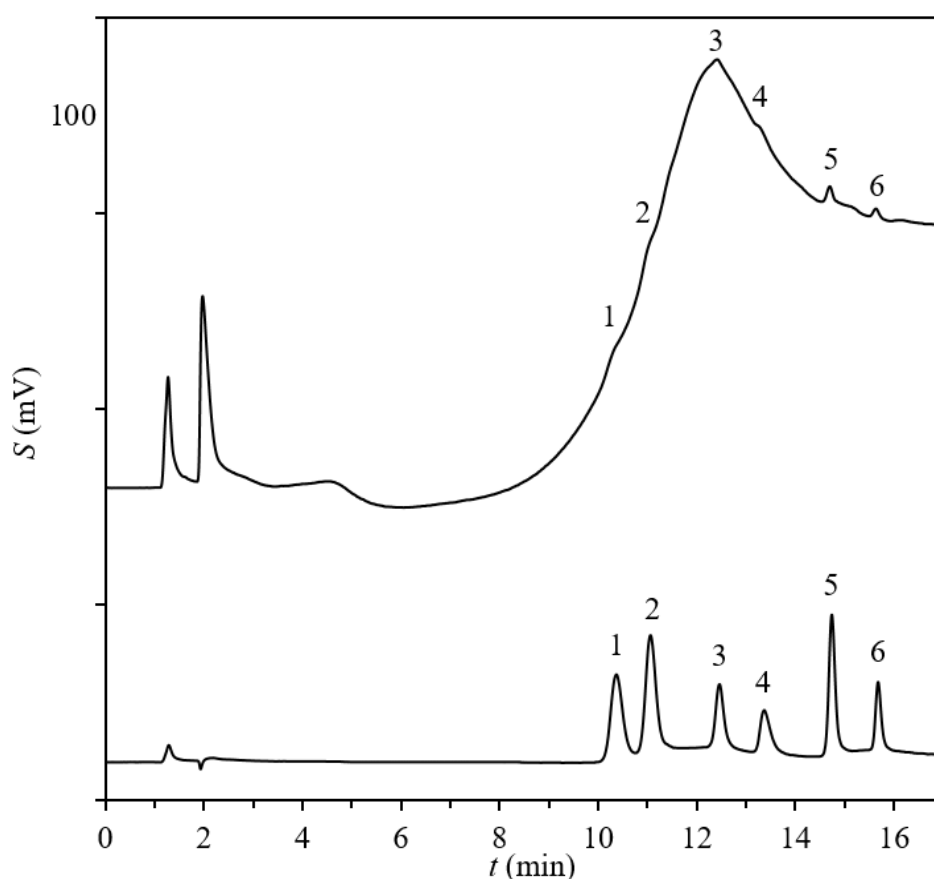
3.6.1. Jednoduché aminokyseliny

Pro ilustraci účinnosti derivatizace oxidem měďnatým byly separovány jednoduché proteogenní aminokyseliny glycin, leucin, isoleucin, alanin, valin a prolin. Separace byla provedena gradientovou elucí na koloně Luna -NH₂, která byla jednou z porovnávaných stacionárních fází pro analýzu aminokyselin, viz str. 21. Jedná se v současnosti o nejpoužívanější typ stacionární fáze pro HILIC chromatografii.

Aminokyseliny byly analyzovány nejprve pouze s detekcí čistých aminokyselin při 210 nm a poté s post-kolonovou derivatizací oxidem měďnatým a detekcí při vlnové délce 230 nm. Pro dosažení separace na základní linii byla použita gradientová eluce, viz tabulka 4, str. 35. Pro chromatogramy viz obrázek 19, str. 35.

Tabulka 4 Program gradientové eluce pro separaci jednoduchých aminokyselin. Složka mobilní fáze A je 100% acetonitril, složka B je 10mM octan sodný pH 4.

čas (min)	podíl složky A (%)	podíl složky B (%)
0	90	10
2	90	10
16	55	45



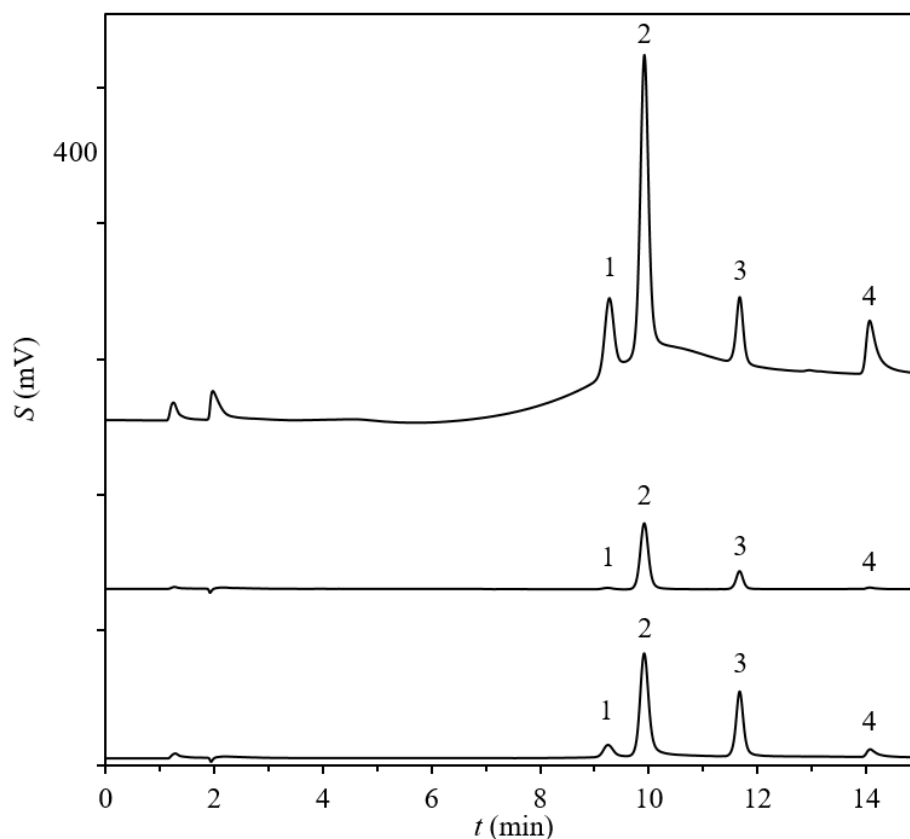
Obrázek 19 Srovnání chromatogramu jednoduchých proteogenních aminokyselin bez derivatizace s detekcí při 210 nm (nahore) a s post-kolonovou derivatizací oxidem měďnatým s detekcí při 230 nm (dole). Separované aminokyseliny jsou leucin (1), izoleucin (2), valin (3), prolin (4), alanin (5) a glycin (6). Koncentrace aminokyselin byla $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Jak je patrné z chromatogramů, použití post-kolonové derivatizace značně zlepšilo detekci jednoduchých aminokyselin. Posunem vlnové délky detekce z 210 na 230 nm se snížily prudké výkyvy pozadí, tedy drift základní linie, způsobené použitým gradientem. Derivatizací oxidem měďnatým a zvýšením

vlnové délky detekce se nejenže snížil šum pozadí, ale značně se stabilizovala základní linie a tím i zlepšilo odečítání píků.

3.6.2. Aromatické aminokyseliny

Již v úvodu bylo zmíněno, že aromatické aminokyseliny je možné detekovat při vlnové délce jejich maxima, viz str. 11. Tyto aminokyseliny samy o sobě absorbují i při 230 nm a vliv oxidu měďnatého na jejich signál je tak mnohem menší, než např. u alifatických aminokyselin. Pro ukázkou byla provedena analýza směsi aromatických aminokyselin, tj. fenylalaninu, tyrosinu, histidinu a tryptofanu nejdříve bez derivatizace s detekcí při 210 a 280 nm a poté s derivatizací oxidem měďnatým s detekcí při 230 nm. Pro separaci byla použita gradientová eluce, viz tabulka 5, str. 37. Pro chromatogramy viz obrázek 20.



Obrázek 20 Srovnání chromatogramu aromatických proteogenních aminokyselin bez derivatizace s detekcí při 210 nm (nahore) a 280 nm (uprostřed) a s post-kolonovou derivatizací oxidem měďnatým s detekcí při 230 nm (dole). Separované aminokyseliny jsou fenylalanin (1), tryptofan (2), tyrosin (3) a histidin (4). Koncentrace aminokyselin byla $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Z chromatogramu vyplývá, že aromatické aminokyseliny samy o sobě velmi silně absorbují při 210 nm a jejich detekce při této vlnové délce se jeví jako nejlepší. Nicméně základní linie je opět silně nerovná vlivem použitého gradientu. Při 280 nm tento problém se základní linií nepozorujeme, ale píky fenylalaninu a histidinu jsou nepoměrně menší oproti píkům tryptofanu a tyrosinu, protože při této vlnové délce málo absorbují. Při 230 nm je rovná základní linie a lze snadno odečíst všechny čtyři píky. Přestože je odezva aromatických aminokyselin větší při 210 nm, lze je bez problému detekovat i při 230 nm.

Tabulka 5 Program gradientu pro separaci aromatických aminokyselin. Složka mobilní fáze A je 100% acetonitril, složka B je 10mM octan sodný pH 4.

čas (min)	podíl složky A (%)	podíl složky B (%)
0	90	10
15	52,5	47,5

4. Závěr

V této práci se podařilo prostudovat postkolonovou derivatizaci vybraných aminokyselin zastupujících všechny typy proteogenních aminokyselin. Zjistila jsem, že pro derivatizaci je vhodné pH 4 a při tomto pH jsem porovnála citlivost této metody s detekcí čistých aminokyselin. U všech aminokyselin s výjimkou tryptofanu se derivatizací zvýšila citlivost (u pěti z osmi řádově) a snížila mez detekce. Ověřila jsem, že post-kolonovou derivatizaci oxidem měďnatým lze provádět v podmínkách HILIC separace, která je v současnosti pro analýzu volných aminokyselin bez předchozí derivatizace zásadní.

Seznam zdrojů a použité literatury

- [1] Vauquelin L.N.; Robiquet P.J.; The discovery of a new plant principle in *Asparagus sativus*. *Annales de Chimie*. **57**, 88–93 (1806)
- [2] Braconnot, H.M.: Sur la conversion de matieres animals en nouvelles substances par le moyen de l'acide sulfurique. *Annales de Chimie et de Physique* **13**, 113-125 (1820)
- [3] McCoy, R. H.; Meyer, C. E.; Rose, W. C.: Feeding Experiments with Mixtures of Highly Purified Amino Acids. VIII. Isolation and Identification of a New Essential Amino Acid. *Journal of Biological Chemistry* **112**, 282-302 (1935)
- [4] Kaspar, H. et al.: Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 445-452 (2009)
- [5] Ubhi, B.K. et al.: Targeted metabolomics identifies perturbations in amino acid metabolism that sub-classify patients with COPD. *Molecular Biosystems* **8**, 3125–33 (2012)
- [6] Shimada, H.; Noie, T.; Ohashi, M.; Oba, K.; Takahashi, Y.: Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the task force of the Japanese gastric cancer association. *Gastric Cancer* **17**, 26–33 (2014)
- [7] Xuan, J. et al.: Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. *Journal of Proteome Research* **10**, 5433–43 (2011)
- [8] Devlin, T.M.: *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 7th ed. John Wiley & Sons, New Jersey 2011
- [9] http://www.biochem.umd.edu/biochem/kahn/teach_res/amino_acids/ (27.3.2017)
- [10] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997
- [11] Soga, T.; Heiger, D.N.: Amino Acids Analysis by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 1236-1241 (2000)

[12] Martin-Girardeau, A.; Renou-Gonnord, M.-F.: Optimization of a capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry method for the quantitation of the 20 natural amino acids in childrens blood. *Journal of Chromatography B* **742**, 163–171 (2000)

[13] Mayboroda, O.A. et al.: Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis – mass spektrometry. *Journal of Chromatography A* **1159**, 149–153 (2007)

[14] Petritis, K.N. et al.: Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent. *Journal of Chromatography A* **833**, 147–155 (1999)

[15] Chaimbault, P. et al.: Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spektrometry. *Journal of Chromatography A* **855**, 191–202 (1999)

[16] Troise, A.D. et al.: Simultaneous quantification of amino acids and Amadori products in foods through ion pairing liquid chromatography - high-resolution mass spektrometry. *Amino Acids* **47**, 111-124 (2015)

[17] Gao, J. et al.: Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1449**, 78-88 (2016)

[18] Domingues, D.S.; Crevelin, E.J.; De Moraes, L.A.B.; Hallak, J.E.C.; De Souza Crippa, J.A.; Queiroz, M.E.C.: Simultaneous determination of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **38:5**, 780-787 (2015)

[19] Prinsen, H.C.M.T., Schiebergen-Bronkhorst, B.G.M., Roeleveld, M.W. et al.: Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **39:5**, 651-660 (2016)

[20] Langrock, T. et al.: Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids* **30**, 291-297 (2006)

[21] Socia, A.; Foley, J.P.: Direct determination of amino acids by hydrophilic interaction liquid chromatography with charged aerosol detection. *Journal of Chromatography A* **1446**, 41-49 (2016)

[22] Periat, A. et al.: Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Separation Science* **38**, 357-367 (2015)

[23] <http://www.compoundchem.com/2014/09/16/aminoacids/> (4.4.2017)

[24] Beaven, G.H.; Holiday, E.R.: Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. *Advances in Protein Chemistry* **7**, 319-386 (1952)

[25] Edelhofer, H.: Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **6**:7, 1948-1954 (1967)

[26] Minocha, R.; Long, S.: Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *Journal of Chromatography A* **1035**, 63-73 (2004)

[27] Krause, I. et al.: Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. *Journal of Chromatography A* **715**, 67-79 (1995)

[28] Wu, G.: Determination of proline by reversed-phase high-performance liquid chromatography with automated pre-column *o*-phthalaldehyde derivatization. *Journal of Chromatography*, **641**, 168-175 (1993)

[29] Korös, Á. et al.: Simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1203**, 146-152 (2008)

[30] Z. Dai et al.: Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column *o*-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **964**, 116-127 (2014)

- [31] Sarwar, G.; Betting, H.G.: Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *Journal of Chromatography* **615**, 1-22 (1993)
- [32] Gonzalez-Castro, M.J. et al.: Determination of Amino Acids in Green Beans by Derivatization with Phenylisothiocyanate and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatographic Science* **35**, 181-185 (1997)
- [33] Jámboř, A.; Molnár-Perl, I.: Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride - Literature overview and further study. *Journal of Chromatography A* **1216**, 3064–3077 (2009)
- [34] Cohen, S.A.; Michaud, D.P.: Synthesis of Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-*N*-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acid via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical biochemistry* **211**, 279-287 (1993)
- [35] Reverter, M. et al.: Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-*N*-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **696**, 1 –8 (1997)
- [36] Bosch, L. et al.: Application of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B* **831**, 176–183 (2006)
- [37] Spackman, D.H.; Stein, W.H.; Moore, S.: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* **30**:7, 1190-1206 (1958)
- [38] Alpert, A.J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* **499**, 177–196 (1990)
- [39] Buzsewski, B.; Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry* **402**, 231–247 (2012)

- [40] Gama, M.R. et al.: Hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **37**, 48-60 (2012)
- [41] www.merckmillipore.com (10.4.2017)
- [42] Nováková, L.; Douša, M. a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vydání, Europrint, Praha 2013
- [43] <http://www.chromacademy.com/chromatography-HILIC-Stationary-Phases.html> (27.3.2017)
- [44] Krull, I.S. et al.: Solid-phase derivatization reactions for biomedical liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **659**, 19-50 (1994)
- [45] Krull, I.S. et al.: General strategies and selection of derivatization reactions for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **659**, 1-17 (1994)
- [46] Malmstrom, B.G.; Leckner, J.: The chemical biology of copper. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 286-292 (1998)
- [47] Kunimoto, M. et al.: Theoretical Study on the Formation Mechanism of Amino Acid- Cu(II) Complexes on an Enantio-Sensing Device Interface. *The Journal of Physical Chemistry C* **120**, 15722-15728 (2016)
- [48] Lahsasni, S.A. et al.: Mixed-Ligand Complex Formation of Cu(II) with 1,2-Diphenylethylenediamine as Primary Ligand and Amino Acids as Secondary Ligands. *International Journal of Electrochemical Science* **7**, 7699-7711 (2012)
- [49] Levin, S.; Grushka, E.: Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation of Amino Acids with Aqueous Mobile Phases Containing Copper Ions. *Analytical Chemistry* **57**:9, 1830-1835 (1985)
- [50] Polanuer, B.M.; Ivanov, S.V.: High-performance liquid chromatography of amino acids in copper(II) complex form: application to valine fermentation samples. *Journal of Chromatography A* **722**:1-2, 311-315 (1996)
- [51] Kubičková, A. et al.: UV-VIS detection of amino acids in liquid chromatography: Online post-column solid-state derivatization with Cu(II) ions. *Journal of Separation Science* **34**, 3131-3135 (2011)

[52] UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. Postkolonová derivatizace tuhým derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC. Česká republika. Patentový spis CZ 305127 B6

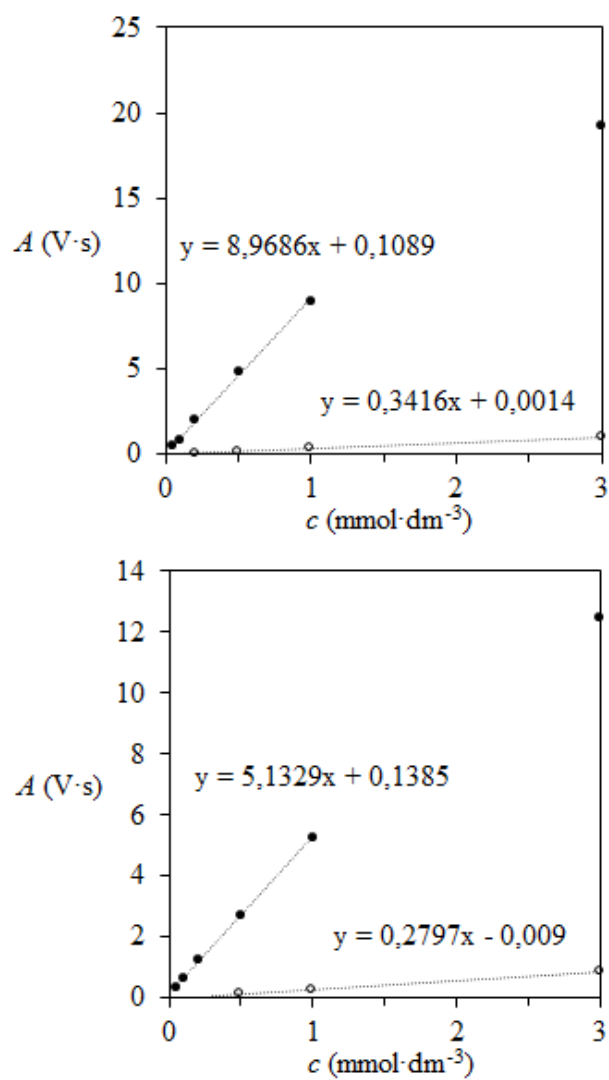
[53] www.sigmaaldrich.com/catalog/ (20.3.2017)

[54] Krumpochova, P. et al.: Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **114**, 398-407 (2015)

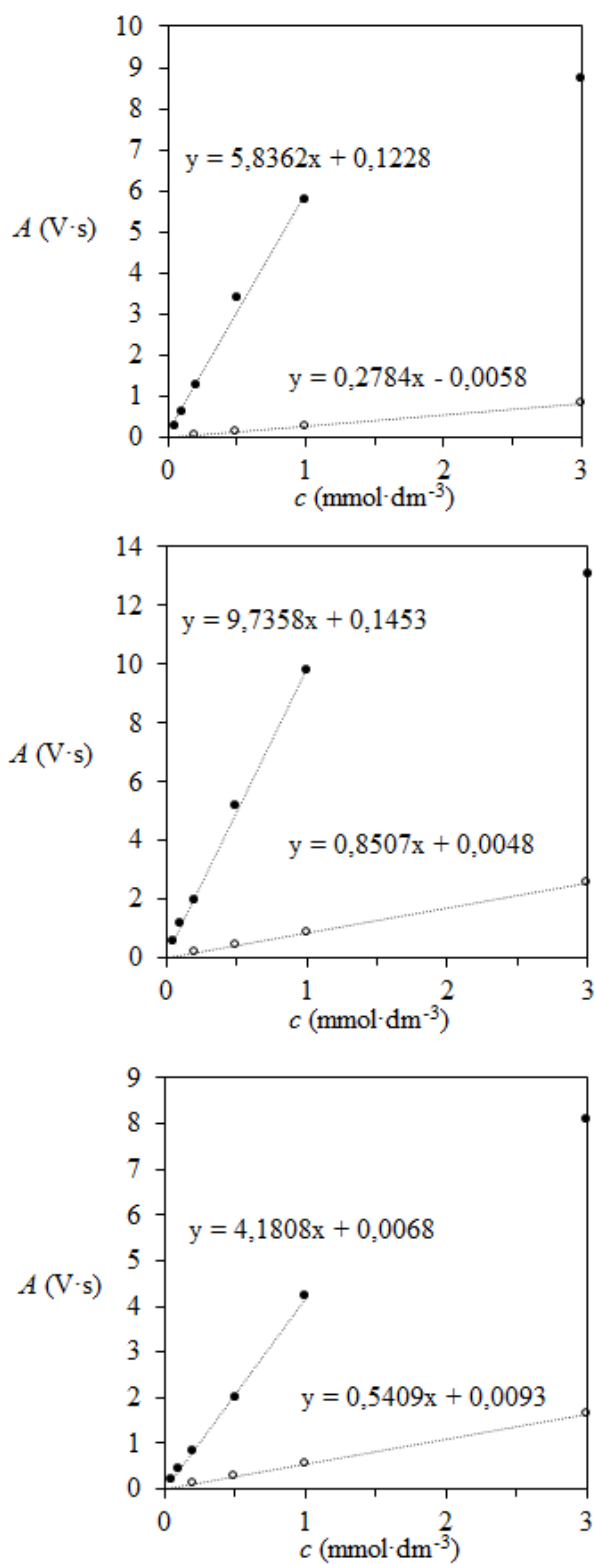
[55] Saidel, L.J.; Goldfarb, A.R.; Waldman, S.: The absorption spectra of amino acids in the region two hundred to two hundred and thirty nanometers. *Journal of Biological Chemistry* **197**, 285-291 (1952)

[56] Snyder, L.R.: *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed, John Wiley & Sons, New Jersey 2010

Přílohy



Obrázek 21 Vliv derivatizace oxidem měďnatým na signál aminokyselin leucinu (nahore) a argininu (dole). V grafech je zobrazena kalibrační závislost bez derivatizace s detekcí při 210 nm (○) a s derivatizací s detekcí při 230 nm (●).



Obrázek 22 Vliv derivatizace oxidem měďnatým na signál aminokyselin glycinu (nahore), asparaginu (uprostřed) a aspartátu (dole). V grafech je zobrazena kalibrační závislost bez derivatizace s detekcí při 210 nm (○) a s derivatizací s detekcí při 230 nm (●)