

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Analytické chemie

**Postkolonová derivatizace v kapilární kapalinové
chromatografii**

**Postcolumn derivatization in capillary liquid
chromatography**

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Prohlášení o důvěrnosti dat

Všechna experimentální data uvedená v této bakalářské práci jsou důvěrná a neveřejná, neboť budou předmětem patentu u Úřadu průmyslového vlastnictví České republiky.

Confidentiality statement

All experimental data summarized in this Bachelor Thesis are nonpublic, Charles University in Prague restricted and being patented at the Industrial Property Office in the Czech Republic.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....
podpis

Poděkování

Úvodem bych rád poděkoval svému školiteli panu Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za jeho ochotu vést mě při vypracovávání této práce a za jeho cenné rady. Dále bych rád poděkoval Mgr. Anně Hamplové za celkové uvedení do projektu a Bc. Martinu Francovi za přípravu kolony.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována projektem GAUK 78808 Grantové Agentury Univerzity Karlovy v Praze a výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Předmětová hesla: analytická chemie, separační metody, biochemie

Klíčová slova: kapilární kapalinová chromatografie, aminokyseliny, derivatizace, oxid měďnatý

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	6
1. Úvod	7
1.1 Kapalinová rozdělovací chromatografie.....	7
1.2 Mikrokolonová kapalinová chromatografie	9
1.3 Derivatizace v kapalinové chromatografii.....	10
1.4 Aminokyseliny	10
1.5 Cíl práce.....	12
2. Experimentální část	13
2.1 Použité chemikálie.....	13
2.2 Použité přístroje.....	13
2.3 Experimentální podmínky	13
2.4 Postup práce.....	14
2.4.1 Kvalitativní analýza.....	14
2.4.2 Optimalizace separace	14
2.4.3 Sestrojení kalibračních závislostí	14
3. Výsledky a diskuze	15
3.1 Kvalitativní analýza.....	15
3.2 Optimalizace separace	17
3.3 Sestrojení kalibračních závislostí	21
4. Závěr	29
Literatura	30

Seznam zkratek a symbolů

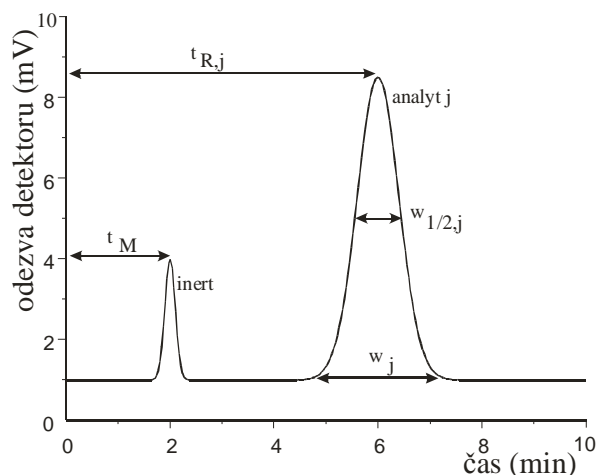
t_R	retenční čas
t_M	mrtvý retenční čas
w	šířka píku při základně
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
h	výška píku
A	plocha píku
n	počet teoretických pater
$R_{1,2}$	rozlišení píků 1 a 2
R	postranní řetězec aminokyseliny
R^2	determinační koeficient
k	retenční faktor
ml	mililitr, jednotka objemu
μ l	mikrolitr, jednotka objemu
nl	nanolitr, jednotka objemu
pmol	pikomol, jednotka látkového množství
mol/l	mol/litr, jednotka látkové koncentrace
mmol/l	milimol/litr, jednotka látkové koncentrace
mm	milimetr, jednotka délky
mV	milivolt, jednotka napětí
min	minuta, jednotka času
i.d.	vnitřní průměr
MPa	megapascal, jednotka tlaku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
°C	stupeň Celsia, jednotka teploty
PTFE	polytetrafluorethylen
C18	oktadecyl
\bar{X}	průměrná hodnota
SD	směrodatná odchylka
RSD	relativní směrodatná odchylka
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
CH ₃ CN	acetonitril
CH ₃ OH	methanol
Val	valin
Leu	leucin
Phe	fenylalanin
OPA	o-ftalaldehyd
Dansyl-Cl	1,1-N,N'-dimethylaminonaftalen-5-sulfonyl chlorid
DMS-Cl	4-(5,6-dimethoxy-2-ftalimidinyl)-2-methoxyfenylsulfonyl chlorid

1. Úvod

1.1 Kapalinová rozdělovací chromatografie

Kapalinová rozdělovací chromatografie je instrumentální, analytická a separační metoda. Je založena na kontinuální distribuci látek mezi dvě kapalně fáze: mobilní (pohyblivou) fází a stacionární (nepohyblivou) fází. Nejrozšířenější aplikací kapalinové rozdělovací chromatografie je systém složený z polární mobilní fáze (např. směs acetonitril : voda) a nepolární stacionární fáze (např. chemicky navázané oktadecylové zbytky tvořící na částicích silikagelu film kapaliny). Tento systém se nazývá chromatografie s obrácenými fázemi, jelikož je z historického hlediska mladší než dnes již méně používaný systém s nepolární mobilní fází a polární stacionární fází [1].

K separaci látek kapalinovou rozdělovací chromatografií s obrácenými fázemi dochází díky různé afinitě látek ke stacionární fázi. Látky méně polární ochotněji vstupují do stacionární fáze, jsou v ní zadržovány a díky tomu prostorově separovány a na výstupu z kolony časově opožděny za látkami polárnějšími. Obsahuje-li vzorek analyty, které se liší svou polaritou, lze tyto analyty od sebe navzájem oddělit tak, že každý vytvoří v proudu mobilní fáze svou vlastní zónu [1, 2]. Přítomnost analytu v eluátu kontinuálně monitorujeme pomocí vhodného detektoru, například spektrofotometrického, který zaznamenává změnu absorbance v kapalině eluující z kolony. Konečným výstupem analýzy je pak chromatogram, neboli grafický záznam odezvy detektoru na čase analýzy. Čas, který uplyne od nadávkování analytu do jeho průchodu detektorem, se nazývá retenční čas (t_R). Retenční čas látky, která se nezadržuje na stacionární fázi, se nazývá mrtvý retenční čas (t_M). Jednotlivé zóny analytů jsou na chromatogramu reprezentovány píky, jak ukazuje obrázek 1 [1].



Obr. 1 Ukázka chromatogramu s popsanými charakteristikami [1].

Pík charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně [1] a jeho šířka při základně (w) odráží šířku zóny analytu při průchodu detektorem. Další důležité charakteristiky píku jsou výška píku (h), šířka píku v polovině jeho výšky ($w_{1/2}$) a plocha píku (A). Šířka zóny analytu, neboli jeho rozmytí v koloně, je ovlivňována kinetickými faktory separace: vřívou difúzí, podélnou molekulární difúzí a odporem proti přenosu hmoty v mobilní a stacionární fázi [1, 2]. Mírou účinnosti kolony, neboli jak moc kolona rozmývá daný analyt, je počet teoretických pater kolony (n) pro daný analyt [1]. Teoretické patro je pomyslný úsek kolony, na kterém dochází k ustavení distribuční rovnováhy analytu mezi stacionární a mobilní fázi, čím větší je počet teoretických pater, tím větší je účinnost kolony a tím méně je rozmytá zóna analytu [2]. Míru separace dvou analytů charakterizuje rozlišení píků ($R_{1,2}$) těchto analytů na chromatogramu.

$$n = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,1} - t_{R,2})}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

Hledáme-li pro známé analyty vhodné separační podmínky na dané koloně při konstantním průtoku mobilní fáze, pak hledáme takové složení mobilní fáze, při jehož použití se všechny složky vzorku oddělí s nejvyšší účinností a dostatečným rozlišením během co možná nejkratšího času analýzy.

Kapalinová chromatografie je metoda vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Kvalitativní informaci získáváme porovnáním retenčních faktorů (k) neznámých analytů s retenčními faktory standardních látek naměřenými za stejných experimentálních podmínek.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

Kvantitativní informaci o analytu získáme z plochy píku za použití vhodné kvantitativní metody například metody kalibrační křivky, metody vnitřního standardu, či metody standardního přídatku [1].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je současné pojetí kapalinové chromatografie a je takto nazývána, jelikož oproti klasické chromatografii je zde dosaženo vysoké účinnosti kolony, řádově desítky tisíc teoretických pater, zejména díky použití kulových částic nosiče stacionární fáze o malém průměru (běžně 5 μm a méně) a použitím vysokotlakých čerpadel mobilní fáze (desítky MPa) [2].

1.2 Mikrokolonová kapalinová chromatografie

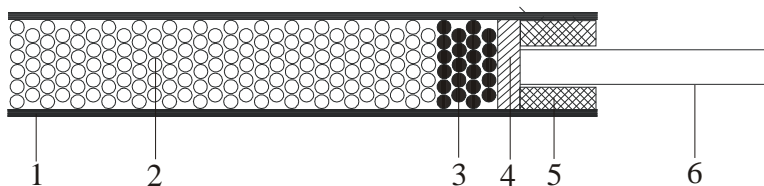
Mikrokolonová kapalinová chromatografie je miniaturizovanou formou vysokoučinné kapalinové chromatografie. Zmenšením průměru chromatografické kolony dochází k menší spotřebě chemikálií, tudíž klesá produkce odpadů a jako mobilní a stacionární fáze lze použít i cenově nákladnější kapaliny či sorbenty [2, 3]. Další výhodou mikrokolonové chromatografie je možnost dosáhnout vyšších účinností než u konvenčních chromatografů a to pravděpodobně díky potlačení rušivých vlivů frikčního tepla při aplikaci vysokých tlaků v důsledku lepšího převodu tepla z mikrokolon a také díky možnosti konstruovat dlouhé kolony. Nízký průtok mobilní fáze je výhodný pro následné použití hmotnostního spektrometru jako detektoru, stejně jako snížený poměr koncentrace analytu ve vzorku ku koncentraci analytu v maximu píku, který vede k možnosti analyzovat vzorky s nižší minimální detegovatelnou hmotností než u konvenčních chromatografů [3]. Miniaturizace je trendem dnešní doby a instrumentální vývoj je tak daleko, že dnes jsou dostupné už i plně automatizované mikrokolonové chromatografy. Typy kolon v HPLC a jejich parametry shrnuje tabulka 1.

Tab. 1 Typické parametry kolon v analytické HPLC [2].

Typ kolony	Vnitřní průměr	Průtok mobilní fáze
Náplňové (konvenční)	3-4,5 mm	1 ml/min
Semimikronáplňové	2,5 mm	0,2-0,4 ml/min
Mikronáplňové	0,8-1 mm	20-60 $\mu\text{l}/\text{min}$
Kapilární náplňové	0,15-0,5 mm	1-15 $\mu\text{l}/\text{min}$
Otevřené kapiláry	10 μm	cca 1 $\mu\text{l}/\text{min}$

Kapilární náplňové kolony jsou nejčastěji křemenné a jsou potaženy vrstvičkou polyimidu pro zvýšení jejich mechanické odolnosti a ohebnosti, naplněny mohou být všemi druhy stacionárních fází použitelných v kapalinové chromatografii o vhodné velikosti částic [2].

Na obrázku 2 je schematicky znázorněna separační kapilára použitá v této práci, její podrobný popis je součástí kapitoly 2.3.



Obr. 2 Ilustrační obrázek kapilární náplňové kolony s ložem CuO [1].

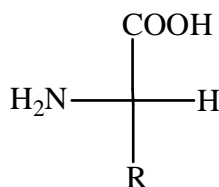
1 – separační kapilára, 2 – stacionární fáze, 3 – oxid měďnatý,
4 – frit, 5 – lepidlo, 6 – vlepená kapilára

1.3 Derivatizace v kapalinové chromatografii

Derivatizace je cílená fyzikální nebo chemická změna analytu provedená například za účelem zlepšení detekce analytu, zvýšení možnosti chromatografické separace, či zvýšení stability analytu. Derivatizační reakce by měla být rychlá, kvantitativní a s minimem vedlejších produktů, aby nedocházelo k výraznému navýšení chyby analýzy. Derivatizaci můžeme provést před samotnou analýzou, nebo v jejím průběhu metodou prekolonové, či postkolonové derivatizace [2].

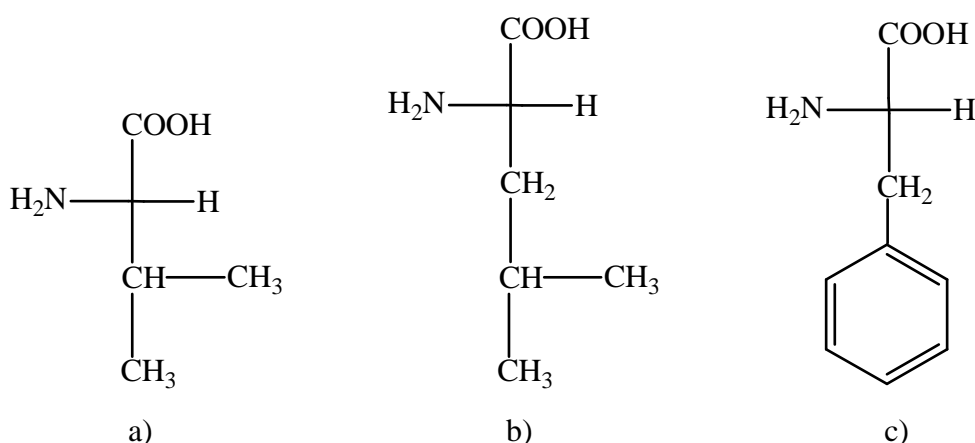
1.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny tvoří početnou skupinu organických látek, jejichž hlavním společným rysem je přítomnost karboxylové a aminové skupiny na jednom uhlíku. Tento uhlík se nazývá α -uhlík a vyjma aminokyseliny glycinu je chirální. Každá aminokyselina tak může zaujímat dvě zrcadlově odlišné prostorové konfigurace označované D a L. Obecně lze strukturu aminokyseliny znázornit tak, jak je nakresleno na obrázku 3, kde R zastupuje postraní řetězec aminokyseliny, ve kterém se aminokyseliny liší.



Obr. 3 Obecná struktura L-aminokyseliny ve Fischerově projekci.

Skupina aminokyselin čítá niekoľik set látok, ovšem zvláštní pozornost je třeba věnovat 20-ti z nich, které tvoří takzvané proteinogenní aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou základními stavebními kameny proteinů, jsou výhradně konfigurace L a jejich pořadí udává primární strukturu proteinů. Proteiny jsou makromolekuly plnící řadu životně důležitých funkcí a jejich primární struktura je jedním ze zásadních faktorů ovlivňujících jejich správnou činnost. Stanovení sekvence aminokyselin je základním krokem při poznávání funkce nebo dysfunkce daného proteinu. Mnoho onemocnění má příčinu ve špatné činnosti enzymů způsobené vlivem chyby v primární struktuře proteinu, například srpkovitá anémie [4]. Zvýšený výskyt aminokyselin v tělních tekutinách pak může indikovat možné onemocnění organismu např. primární či sekundární aminoacidurii [5]. Na obrázku 4 jsou znázorněny strukturální vzorce aminokyselin použitých v této bakalářské práci, které byly vybrány, jelikož se liší svou polaritou a jsou dostupné v požadované čistotě a množství.



Obr. 4 Strukturální vzorce L-aminokyselin použitých v této práci.
 a) valin, b) leucin, c) fenylalanin

V dnešní době se aminokyseliny analyzují pomocí automatických analyzátorů pracujících na principu iontově výměnné vysokoúčinné chromatografie s postkolonovou derivatizací aminokyselin ninhydrinem [6]. Velmi citlivé jsou metody založené na fluorescenčním značení aminokyselin například pomocí OPA [7], DMS-Cl [8], Dansyl-Cl [9] a 9-fluorenylmethyl chloroformátu [10]. Detekci spektrofotometrickým detektorem umožňují derivatizace s fenylthiohydantoinem [11], benzyliothiokyanátem a fenylisothiokyanátem [12].

Postkolonová derivatizace aminokyselin s CuO využívá schopnosti aminokyselin vytvářet komplexy s měďnatými ionty. Vzniklý komplex absorbuje elektromagnetické záření o vlnové délce 230 nm charge-transfer přechodem z ligandů na centrální atom Cu, což umožní detekci spektrofotometrickým detektorem jinak pro tento detektor „neviditelných“ aminokyselin [13]. Výhodou této derivatizace oproti výše uvedeným je její technická nenáročnost. Oxid měďnatý je cenově dostupná, stabilní látka a není třeba jej jakkoli dále upravovat. Derivatizační reakce probíhá on-line a za běžné laboratorní teploty. Jeho skupenství je pevné, což umožňuje jeho snadnou integraci do kapilární náplňové kolony a nebo jeho použití jako náplně v předkolonce použité za kolonou v konvenční chromatografii. Nadbytek oxidu měďnatého je vůči analytům tak veliký, že i jeho malé množství nám vystačí na mnoho analýz. Tento způsob detekce aminokyselin v kapalinové chromatografii doposud nebyl studován, blízko mu je ale například metoda využívající katalytických schopností komplexu polyaminů s Cu^{2+} na reakci luminol- H_2O_2 jako nástroje pro chemiluminescenční detekci polyaminů [14].

1.5 Cíl práce

Cílem této práce bylo najít vhodnou mobilní fázi pro separaci aminokyselin valinu, leucinu a fenylalaninu ve směsném vzorku a následné sestrojení kalibračních závislostí a určení limitů detekce a limitů stanovitelnosti těchto aminokyselin za použití metody mikrokolonové kapalinové chromatografie v reverzním módu s postkolonovou derivatizací oxidem měďnatým a spektrofotometrickou detekcí.

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

V této práci byly použity chemikálie: methanol (99,9%, gradient grade pro chromatografii Lichrosolv(R)), acetonitril (99,9%, gradient grade pro chromatografii LiChrosolv(R)), L-valin (99,9%, for Biochemistry) a L-leucin (99,9%, for Biochemistry) všechny zakoupeny od firmy Merck. Dále pak chemikálie: methanol (99,9%, for High performance liquid chromatography) a DL-phenylalanine (cell culture tested) zakoupené od firmy Sigma –Aldrich. L-phenylalanine od společnosti Reanal a oxid měďnatý (p.a.) zakoupený od firmy Šenk.

2.2 Použité přístroje

Experimentální část práce byla provedena na mikropalinovém chromatografu, který se skládal z lineárního čerpadla mobilní fáze Pump MHPP20 od firmy Laboratorní přístroje Praha, dávkovacího ventilu Valco C14W od firmy Vici AG o objemu 60nl, separační kolony (viz kapitola 2.3) a spektrofotometrického detektoru Spectra 100 od firmy Thermo separation products. Pro přípravu mobilní fáze byla používána ultrazvuková lázeň Elmasonic S15H zakoupená od firmy P-Lab. Chromatogramy byly zaznamenávány pomocí PC stanice s operačním systémem Windows XP a softwarem Clarity verze 2.3.0.174

2.3 Experimentální podmínky

Měření bylo provedeno na křemenné kapilární koloně (320 μm i.d.), která byla naplněna stacionární fází Nucleosil C18 o velikosti částic 5 μm . Za stacionární fází následovalo 1 mm dlouhé lože oxidu měďnatého ukončené fritou ze skelné vaty a ukotvené vlepenou kapilárou (75 μm i.d.). Délka separační části kolony byla 168 mm. Návrh separační kolony je znázorněn na obrázku 2. Spektrofotometrická detekce při vlnové délce 230 nm byla realizována detektorem (viz kapitola 2.2) a detekční kapilárou (220 μm i.d.), která byla spojena s vlepenou kapilárou z kolony PTFE trubičkou.. Průtok mobilní fáze byl 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, její tlak nebyl měřen. Okolní teplota se pohybovala v rozmezí 22 – 24 $^{\circ}\text{C}$.

2.4 Postup práce

2.4.1 Kvalitativní analýza

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky aminokyselin o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l a objemu 15 ml a to rozpuštěním vypočítaného a naváženého množství dané aminokyseliny v 15 ml vody. Měřené vzorky o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l byly připraveny naředěním 100 μ l těchto zásobních roztoků vodou na objem 1 ml v mikrozkuhavce. Obdobným postupem byl připraven vzorek thiomočoviny. Poté byly naměřeny chromatogramy jednotlivých aminokyselin a thiomočoviny, pro každý vzorek byla provedena tři měření za použití 5% methanolu jako mobilní fáze (příprava mobilní fáze viz kap 2.4.2).

2.4.2 Optimalizace separace

Nejprve byl připraven směsný vzorek aminokyselin a to ze zásobních roztoků jednotlivých aminokyselin o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l, které již byly v laboratoři připraveny. Směsný vzorek o objemu 1 ml a koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l každé aminokyseliny byl připraven tak, že v mikrozkuhavce bylo smícháno 100 μ l z každého zásobního roztoku aminokyseliny a doplněno 700 μ l vody. Poté byl tento vzorek proměřen na chromatografu za použití mobilních fází obsahujících 1, 3, 5, 7, 10, a 15 % objemových acetonitrilu, nebo methanolu. Pro každou mobilní fázi byla provedena tři měření a byl naměřen mrtvý čas kolony. Mobilní fáze byly připravovány v objemu 10 ml do plastových lahviček pomocí skleněných pipet a skleněných odměrných válců. Připravená mobilní fáze byla před použitím 15 minut ultrazvukována v režimu degas, aby byla zbavena rozpuštěných plynů.

2.4.3 Sestrojení kalibračních závislostí

Nejprve byl připraven směsný zásobní roztok všech tří aminokyselin o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l a objemu 15 ml a to rozpuštěním vypočítaného a naváženého množství daných aminokyselin v 15 ml vody. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena řaděním řada kalibračních roztoků o koncentracích $1,0 \cdot 10^{-4}$, $2,0 \cdot 10^{-4}$, $4,0 \cdot 10^{-4}$, $6,0 \cdot 10^{-4}$, $8,0 \cdot 10^{-4}$, $1,0 \cdot 10^{-3}$, $2,0 \cdot 10^{-3}$, $4,0 \cdot 10^{-3}$, $6,0 \cdot 10^{-3}$, $8,0 \cdot 10^{-3}$, $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l aminokyselin a celkovém objemu 1 ml v jednotlivých mikrozkuhavkách. Pro každý kalibrační roztok byla provedena tři měření za použití 5% methanolu jako mobilní fáze (příprava mobilní fáze viz kapitola 2.4.2).

3. Výsledky a diskuze

3.1 Kvalitativní analýza

V této části práce byly měřeny standardní roztoky aminokyselin a thiomocoviny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l pro zjištění jejich retenčních vlastností v daném systému. Měřením retenčních časů aminokyselin bylo zjištěno jejich pořadí, v jakém by eluovaly z kolony při použití směšného vzorku. Retenční čas tak byl klíčovou měřenou veličinou a pro každý analyt byl zpracován statisticky. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 2 až 5.

Tab. 2 Hodnoty retenčního času (t_M) průměrného retenčního času ($\overline{t_M}$) směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) naměřené pro thiomocovinu.

měření	t_M (min)	$\overline{t_M}$ (min)	SD (min)	RSD (%)
1	3,817			
2	3,840	3,842	0,027	0,7
3	3,870			

Tab. 3 Hodnoty retenčního času (t_R) průměrného retenčního času ($\overline{t_R}$) směrodatné odchylky (SD), relativní směrodatné odchylky (RSD) a retenčního faktoru (k) naměřené pro valin.

měření	t_R (min)	$\overline{t_R}$ (min)	SD (min)	RSD (%)	k
1	3,980				
2	4,033	4,025	0,042	1,0	0,048
3	4,063				

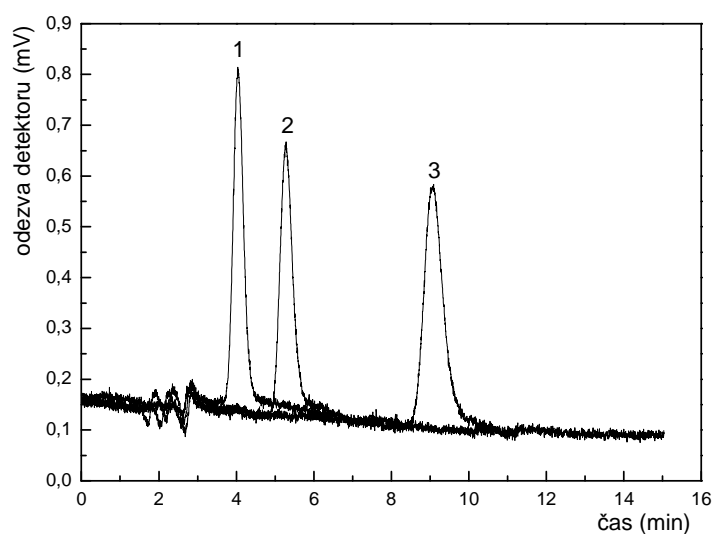
Tab. 4 Hodnoty retenčního času (t_R) průměrného retenčního času ($\overline{t_R}$) směrodatné odchylky (SD), relativní směrodatné odchylky (RSD) a retenčního faktoru (k) naměřené pro leucin.

měření	t_R (min)	$\overline{t_R}$ (min)	SD (min)	RSD (%)	k
1	5,253				
2	5,223	5,251	0,027	0,5	0,367
3	5,277				

Tab. 5 Hodnoty retenčního času (t_R) průměrného retenčního času ($\overline{t_R}$) směrodatné odchylky (SD), relativní směrodatné odchylky (RSD) a retenčního faktoru (k) naměřené pro fenylalanin.

měření	t_R (min)	$\overline{t_R}$ (min)	SD (min)	RSD (%)	k
1	9,083				
2	9,013	9,040	0,038	0,4	1,353
3	9,023				

Z hodnot retenčních časů jednotlivých aminokyselin, uvedených v tabulkách 2 až 5, vyplývá jejich eluční pořadí. Aminokyseliny, v souladu s předpoklady vycházejícími z teorie popsané v úvodu (viz kapitola. 1.1), eluují v pořadí podle své polarity, která je dána jejich strukturou (viz Obr. 4). Valin, aminokyselina s nejkratším postranním řetězcem, eluuje jako první a téměř s mrtvým časem kolony, poté následuje leucin s postranním řetězcem o jeden uhlík delším a nakonec fenylalanin obsahující velmi nepolární postranní řetězec. Zpoždění fenylalaninu za valinem a leucinem je tak významné, že další krok hledání optimální mobilní fáze pro separaci těchto aminokyselin bude zejména záležitostí separace valinu a leucinu. Na obrázku 5 jsou uvedeny chromatogramy všech tří aminokyselin, čímž tento obrázek ukazuje separaci v hypotetickém složeném vzorku.



Obr. 5 Složený chromatogram analýzy jednotlivých aminokyselin.
1 - valin, 2 - leucin, 3 - fenylalanin

3.2 Optimalizace separace

V této části práce byl analyzován směsný vzorek všech tří aminokyselin v různých mobilních fázích. Nejdůležitějšími veličinami sledovanými v této části práce byly retenční časy všech analytů, počty teoretických pater pro každý analyt a rozlišení píků na chromatogramech (uváděno je rozlišení píku od píku předchozího) v každé mobilní fázi. Koncentrace methanolu a acetonitrilu v mobilních fázích byly zvoleny 1-15 % objemových, jelikož 15% methanol je používán pro obdobnou separaci na kolonové HPLC. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulkách 6 a 7.

Tab. 6 Hodnoty retenčních časů (t_R), počtů teoretických pater (n) a rozlišení píků ($R_{1,2}$) naměřené při použití mobilních fází o různých koncentracích methanolu.

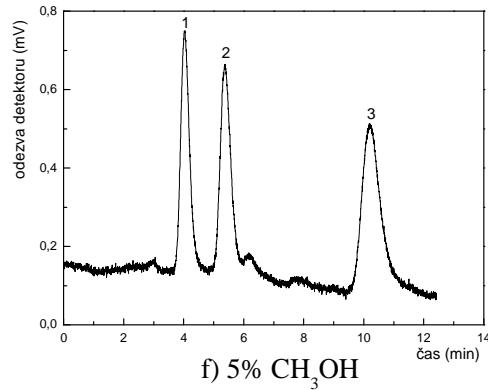
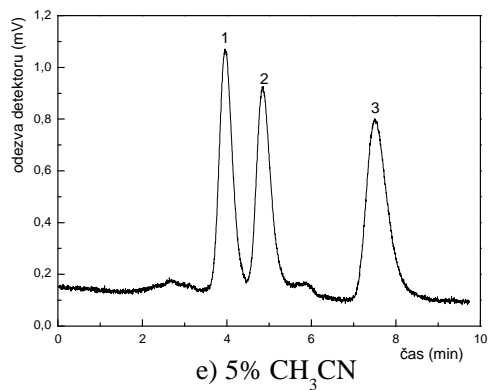
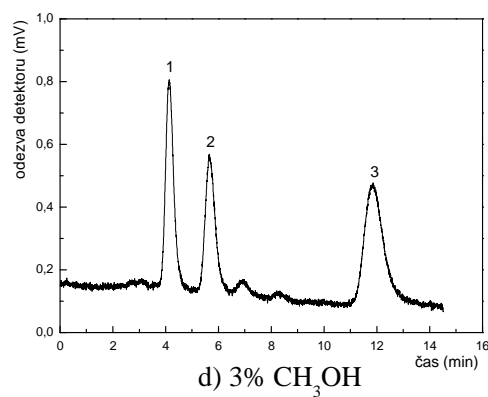
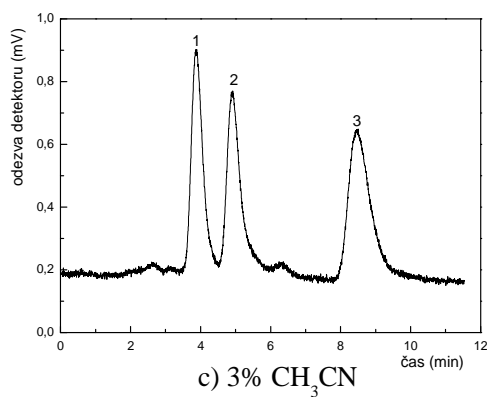
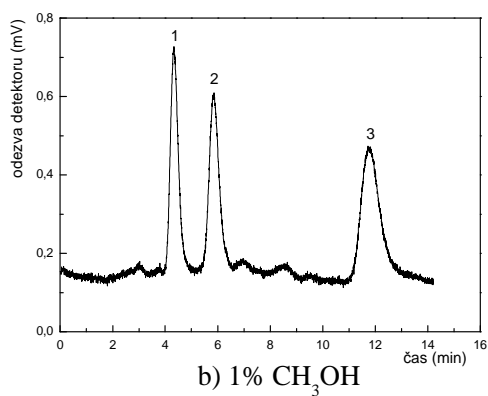
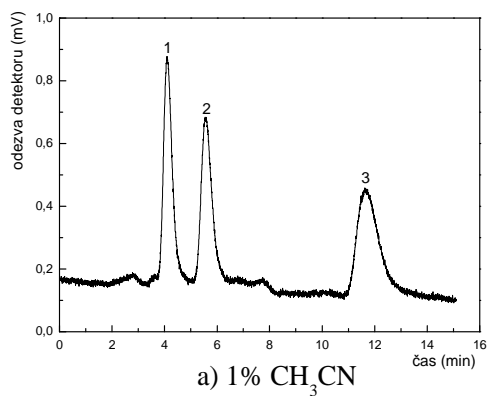
% CH ₃ OH v mobilní fázi	t_R (min)	aminokyselina	závěr	n	$R_{1,2}$
1	4,330	Val	separovány	1000	-
	5,860	Leu		1100	2,5
	11,723	Phe		1300	5,8
3	4,133	Val	separovány	900	-
	5,643	Leu		1100	2,4
	11,863	Phe		1300	6,3
5	4,020	Val	separovány	900	-
	5,373	Leu		1100	2,3
	10,197	Phe		1300	5,5
7	4,040	Val	separovány	800	-
	5,323	Leu		800	2,0
	9,480	Phe		1000	4,3
10	4,153	Val	separovány	800	-
	5,213	Leu		800	1,6
	8,150	Phe		900	3,3
15	3,863	Val	separovány	800	-
	4,687	Leu		800	1,4
	6,750	Phe		1100	2,9

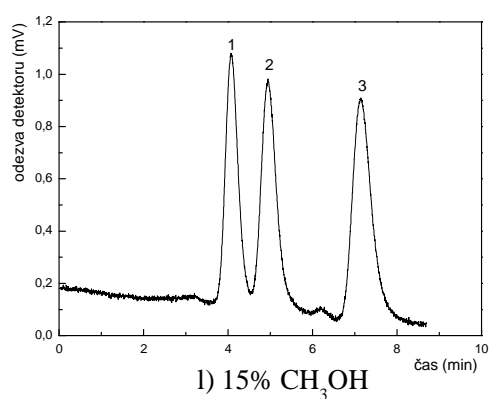
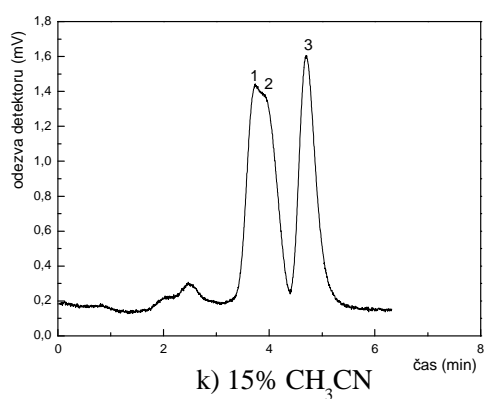
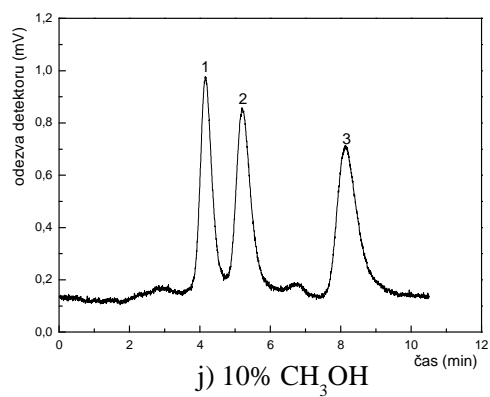
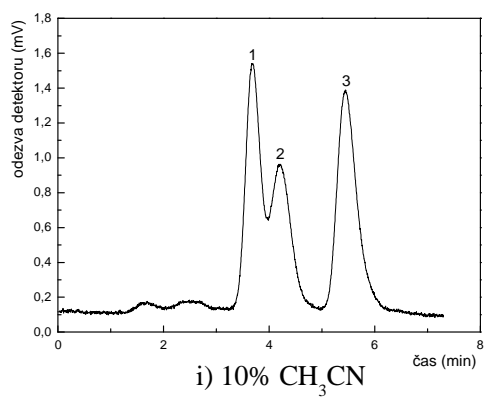
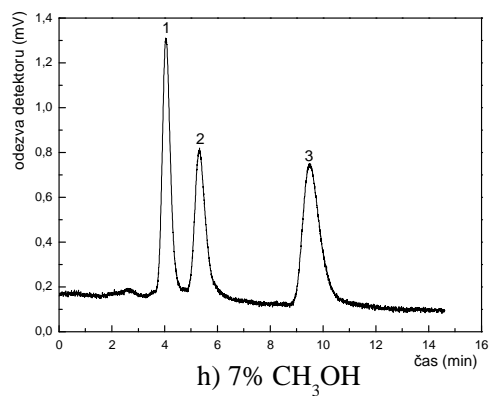
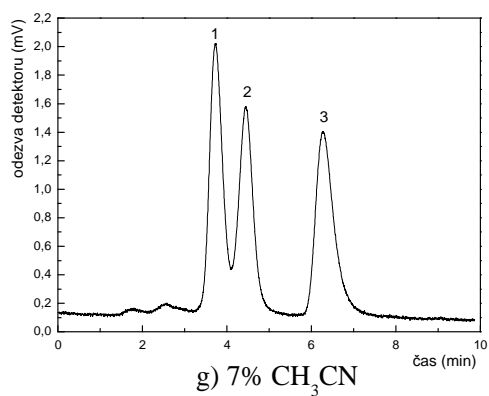
Z tabulky 6 vyplývá obecný trend separace, že se zvyšující se koncentrací methanolu se zkracují retenční časy zadržovaných analytů. Aminokyseliny se separovaly ve všech mobilních fázích, ovšem s rostoucí eluční silou mobilní fáze klesalo rozlišení píků valinu a leucinu. V mobilní fázi o koncentraci 7 % objemových methanolu jejich rozlišení kleslo na hodnotu 2 a jejich píky již nebyly odděleny až k základní linii. Jako nejvhodnější mobilní fáze se tedy jevil 5% methanol, při jehož použití se dosáhlo dostatečného rozlišení a vysokého počtu teoretických pater.

Tab. 7 Hodnoty retenčních časů (t_R), počtů teoretických pater (n) a rozlišení píků ($R_{1,2}$) naměřené při použití mobilních fází o různých koncentracích acetonitrilu.

% CH ₃ CN v mobilní fázi	t_R (min)	aminokyselina	závěr	n	$R_{1,2}$
1	4,100	Val	separovány	800	-
	5,550	Leu		900	2,1
	11,630	Phe		1000	5,4
3	3,887	Val	separovány	700	-
	4,920	Leu		900	1,6
	8,457	Phe		1000	4,1
5	3,953	Val	separovány	700	-
	4,857	Leu		1000	1,5
	7,500	Phe		1100	3,5
7	3,727	Val	neseparovány	700	-
	4,443	Leu		800	1,2
	6,273	Phe		1000	2,6
10	3,693	Val	neseparovány	700	-
	4,207	Leu		500	0,8
	5,443	Phe		1000	1,7
15	3,733	Val	neseparovány	1200	-
	3,823	Leu		600	0,2
	4,693	Phe		1100	1,5

Z tabulky 7 rovněž vyplývá, že se zvyšující se eluční silou mobilní fáze klesají retenční časy zadržovaných analytů a klesá rozlišení jednotlivých píků. Z porovnání hodnot z obou tabulek je patrné, že mobilní fáze obsahující acetonitril mají větší eluční sílu než mobilní fáze připravené z methanolu. Již při použití 1% acetonitrilu bylo rozlišení valinu a leucinu na hranici hodnoty 2 a při použití 3% acetonitrilu nebyly již jejich píky odděleny až k základní linii. Jedinou možností by tedy bylo použití 1% acetonitrilu jako mobilní fáze. Porovnáme-li ovšem separaci v 1% acetonitrilu se separací v 5% methanolu je patrné, že při použití 1% acetonitrilu byla analýza delší, rozlišení píků bylo menší a rovněž počty teoretických pater pro jednotlivé aminokyseliny byly nižší. Jako optimální mobilní fáze pro separaci valinu, leucinu a fenylalaninu na dané koloně byl tedy zvolen 5% methanol. Tento závěr potvrzuje i obrázek 6, na kterém jsou znázorněny vybrané chromatogramy pro separaci v každé mobilní fázi.





Obr. 6 a - l Ukázky chromatogramů naměřených v jednotlivých mobilních fázích.
1 - valin, 2 - leucin, 3 - fenylalanin

3.3 Sestrojení kalibračních závislostí

V této části práce byly měřeny směsné vzorky aminokyselin v rozsahu koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l do $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l za použití 5% methanolu jako mobilní fáze. Nejdůležitějšími veličinami sledovanými v této části práce byly výšky a plochy píků jednotlivých aminokyselin pro sestavení jejich kalibračních závislostí. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulkách 8 až 10 a obrázcích 7 až 9.

Tab. 8 Hodnoty retenčního času (t_R) výšky píku (h), plochy píku (A), průměrné plochy píku (\bar{A}) směrodatné odchytky (SD) a relativní směrodatné odchytky (RSD) naměřené pro valin o různých koncentracích (c).

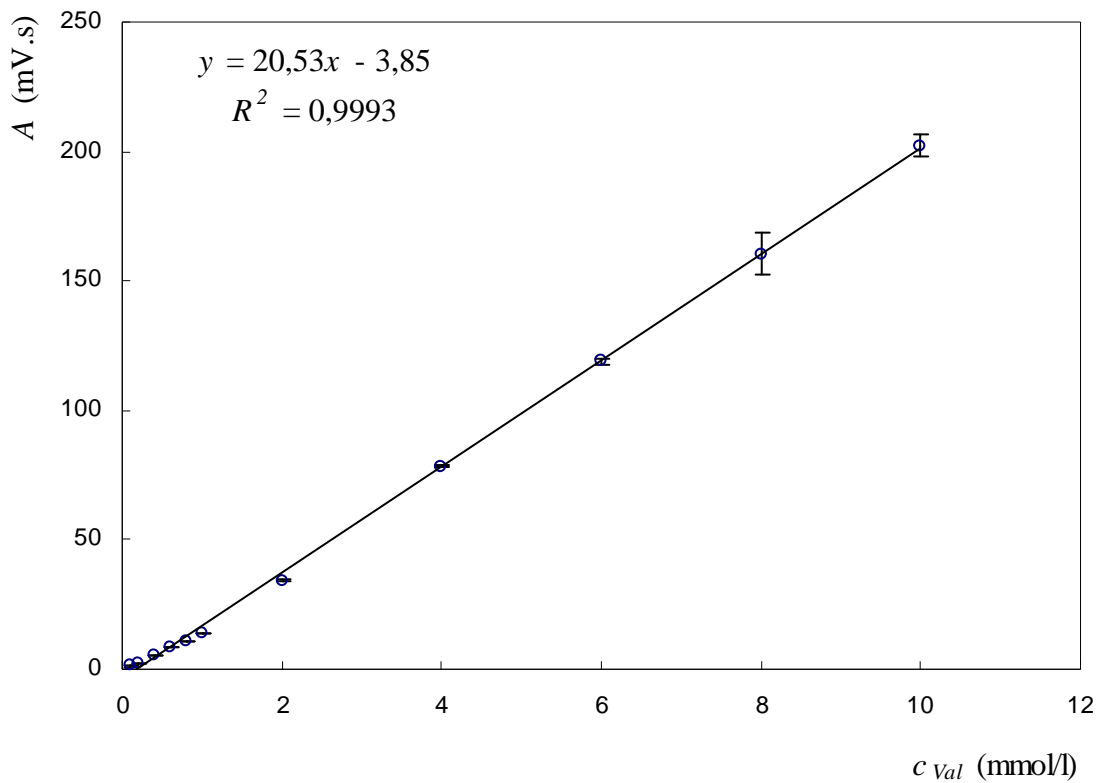
c (mol/l)	měření	t_R (min)	h (mV)	A (mV.s)	\bar{A} (mV.s)	SD (mV.s)	RSD (%)
$1,0 \cdot 10^{-4}$	1	4,10	0,07	1,19	1,18	0,04	3,7
	2	4,15	0,07	1,13			
	3	4,17	0,07	1,22			
$2,0 \cdot 10^{-4}$	1	4,14	0,14	2,61	2,56	0,05	1,8
	2	4,19	0,14	2,55			
	3	4,09	0,13	2,52			
$4,0 \cdot 10^{-4}$	1	4,21	0,28	5,80	5,70	0,09	1,6
	2	4,17	0,26	5,66			
	3	4,17	0,28	5,62			
$6,0 \cdot 10^{-4}$	1	3,91	0,43	8,31	8,43	0,18	2,2
	2	3,94	0,42	8,33			
	3	4,09	0,43	8,64			
$8,0 \cdot 10^{-4}$	1	4,02	0,55	10,78	10,81	0,14	1,3
	2	4,06	0,52	10,69			
	3	4,05	0,55	10,97			
$1,0 \cdot 10^{-3}$	1	3,91	0,69	13,73	13,96	0,28	2,0
	2	3,89	0,71	13,87			
	3	3,98	0,74	14,27			
$2,0 \cdot 10^{-3}$	1	3,98	1,80	34,15	34,23	0,27	0,8
	2	4,05	1,76	34,01			
	3	4,11	1,77	34,54			
$4,0 \cdot 10^{-3}$	1	4,06	4,26	78,64	78,52	0,10	0,1
	2	4,04	4,23	78,46			
	3	4,06	4,20	78,46			
$6,0 \cdot 10^{-3}$	1	3,94	6,40	118,65	119,01	1,32	1,1
	2	4,00	6,30	117,91			
	3	3,93	6,61	120,47			
$8,0 \cdot 10^{-3}$	1	3,91	8,38	159,94	160,58	8,35	5,2
	2	3,94	8,04	152,57			
	3	3,91	8,80	169,23			
$1,0 \cdot 10^{-2}$	1	3,91	10,70	206,08	202,34	4,45	2,2
	2	3,88	10,63	203,51			
	3	3,98	10,40	197,42			

Tab. 9 Hodnoty retenčního času (t_R), výšky píku (h), plochy píku (A), průměrné plochy píku (\bar{A}), směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) naměřené pro leucin o různých koncentracích (c).

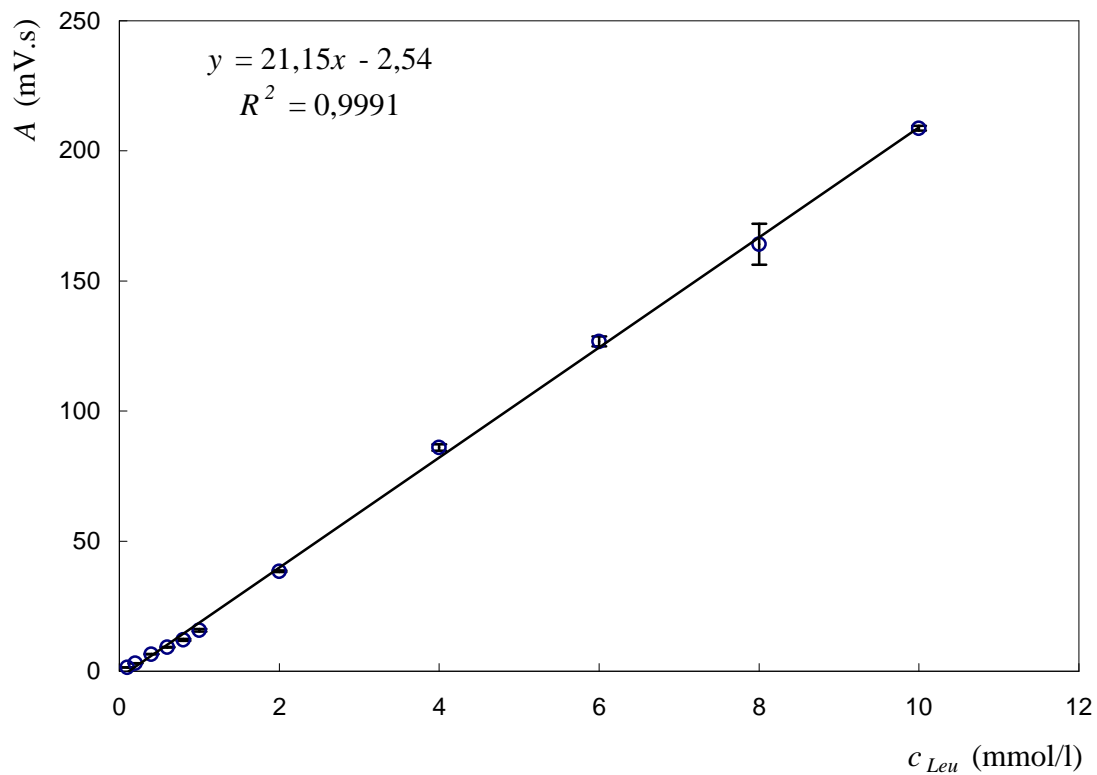
c (mol/l)	měření	t_R (min)	h (mV)	A (mV.s)	\bar{A} (mV.s)	SD (mV.s)	RSD (%)
$1,0 \cdot 10^{-4}$	1	5,41	0,07	1,51	1,51	0,02	1,3
	2	5,50	0,07	1,54			
	3	5,46	0,07	1,50			
$2,0 \cdot 10^{-4}$	1	5,44	0,14	3,05	3,07	0,03	0,8
	2	5,45	0,14	3,05			
	3	5,42	0,14	3,10			
$4,0 \cdot 10^{-4}$	1	5,48	0,27	6,54	6,56	0,02	0,3
	2	5,47	0,26	6,57			
	3	5,42	0,27	6,58			
$6,0 \cdot 10^{-4}$	1	5,12	0,40	9,17	9,22	0,10	1,1
	2	5,13	0,41	9,33			
	3	5,35	0,39	9,15			
$8,0 \cdot 10^{-4}$	1	5,25	0,51	11,79	12,03	0,37	3,1
	2	5,30	0,49	11,83			
	3	5,31	0,52	12,46			
$1,0 \cdot 10^{-3}$	1	5,13	0,64	15,44	15,77	0,47	3,0
	2	5,10	0,69	16,31			
	3	5,18	0,69	15,57			
$2,0 \cdot 10^{-3}$	1	5,19	1,71	38,49	38,40	0,29	0,8
	2	5,29	1,67	38,64			
	3	5,37	1,65	38,07			
$4,0 \cdot 10^{-3}$	1	5,29	3,89	85,44	86,03	1,24	1,4
	2	5,28	3,88	85,20			
	3	5,32	3,93	87,45			
$6,0 \cdot 10^{-3}$	1	5,16	5,68	125,77	126,78	1,90	1,5
	2	5,24	5,67	125,60			
	3	5,13	5,90	128,97			
$8,0 \cdot 10^{-3}$	1	5,01	7,36	162,76	164,15	7,88	4,8
	2	5,05	7,06	157,05			
	3	5,04	7,72	172,63			
$1,0 \cdot 10^{-2}$	1	5,05	9,23	208,80	208,72	0,96	0,5
	2	4,99	9,27	207,72			
	3	5,11	9,33	209,65			

Tab. 10 Hodnoty retenčního času (t_R), výšky píku (h), plochy píku (A), průměrné plochy píku (\bar{A}), směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) naměřené pro fenylalanin o různých koncentracích (c).

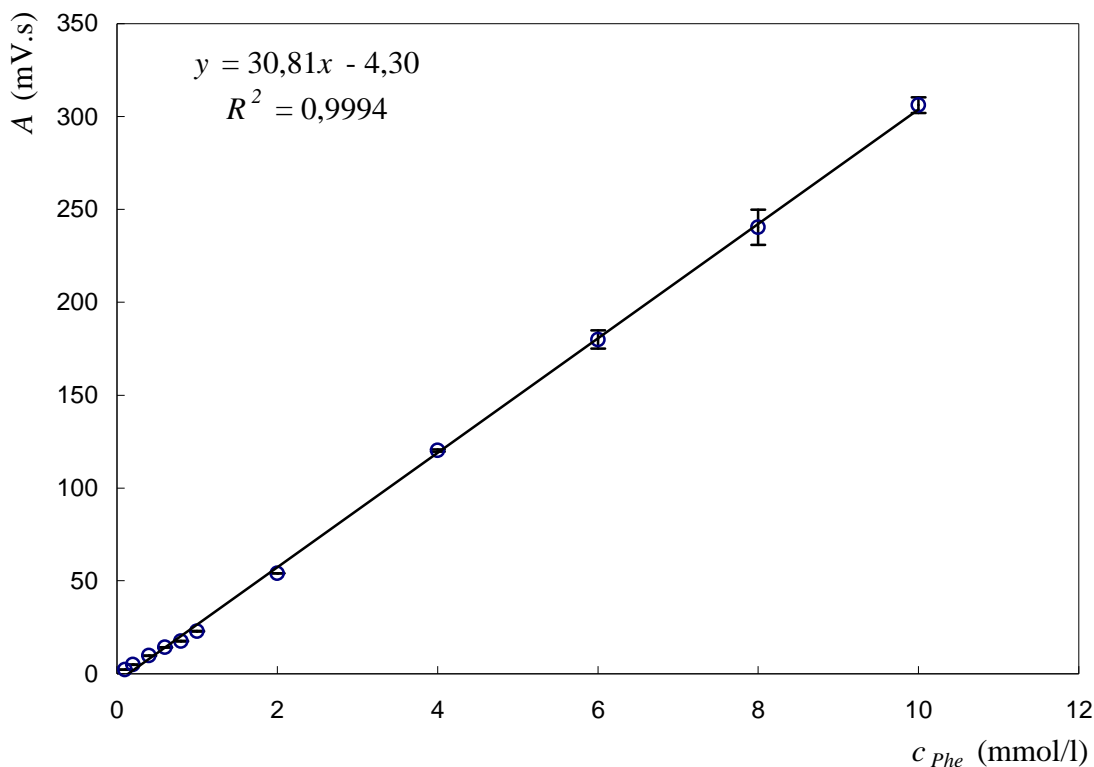
c (mol/l)	měření	t_R (min)	h (mV)	A (mV.s)	\bar{A} (mV.s)	SD (mV.s)	RSD (%)
$1,0 \cdot 10^{-4}$	1	9,93	0,07	2,23	2,22	0,03	1,2
	2	10,07	0,07	2,23			
	3	10,04	0,07	2,19			
$2,0 \cdot 10^{-4}$	1	9,90	0,14	4,98	4,95	0,13	2,6
	2	10,00	0,14	4,81			
	3	10,01	0,14	5,06			
$4,0 \cdot 10^{-4}$	1	9,95	0,27	9,81	9,78	0,12	1,3
	2	10,00	0,25	9,65			
	3	9,99	0,26	9,89			
$6,0 \cdot 10^{-4}$	1	9,45	0,40	14,26	14,27	0,04	0,3
	2	9,52	0,40	14,32			
	3	9,86	0,39	14,23			
$8,0 \cdot 10^{-4}$	1	9,69	0,51	17,68	17,62	0,16	0,9
	2	9,73	0,48	17,44			
	3	9,77	0,51	17,74			
$1,0 \cdot 10^{-3}$	1	9,45	0,63	22,85	22,96	0,12	0,5
	2	9,32	0,66	22,95			
	3	9,41	0,66	23,09			
$2,0 \cdot 10^{-3}$	1	9,43	1,64	54,02	54,01	0,06	0,1
	2	9,64	1,57	54,07			
	3	9,75	1,54	53,95			
$4,0 \cdot 10^{-3}$	1	9,55	3,67	120,42	120,24	0,61	0,5
	2	9,55	3,59	119,56			
	3	9,69	3,57	120,74			
$6,0 \cdot 10^{-3}$	1	9,43	5,37	182,78	179,89	4,92	2,7
	2	9,52	5,26	174,21			
	3	9,32	5,51	182,68			
$8,0 \cdot 10^{-3}$	1	8,93	7,37	239,84	240,41	9,44	3,9
	2	8,94	7,06	231,27			
	3	8,99	7,62	250,12			
$1,0 \cdot 10^{-2}$	1	9,03	9,10	303,09	306,11	4,26	1,4
	2	8,91	9,45	310,99			
	3	9,03	9,13	304,27			



Obr. 7 Závislost plochy píku valinu na koncentraci.



Obr. 8 Závislost plochy píku leucinu na koncentraci.



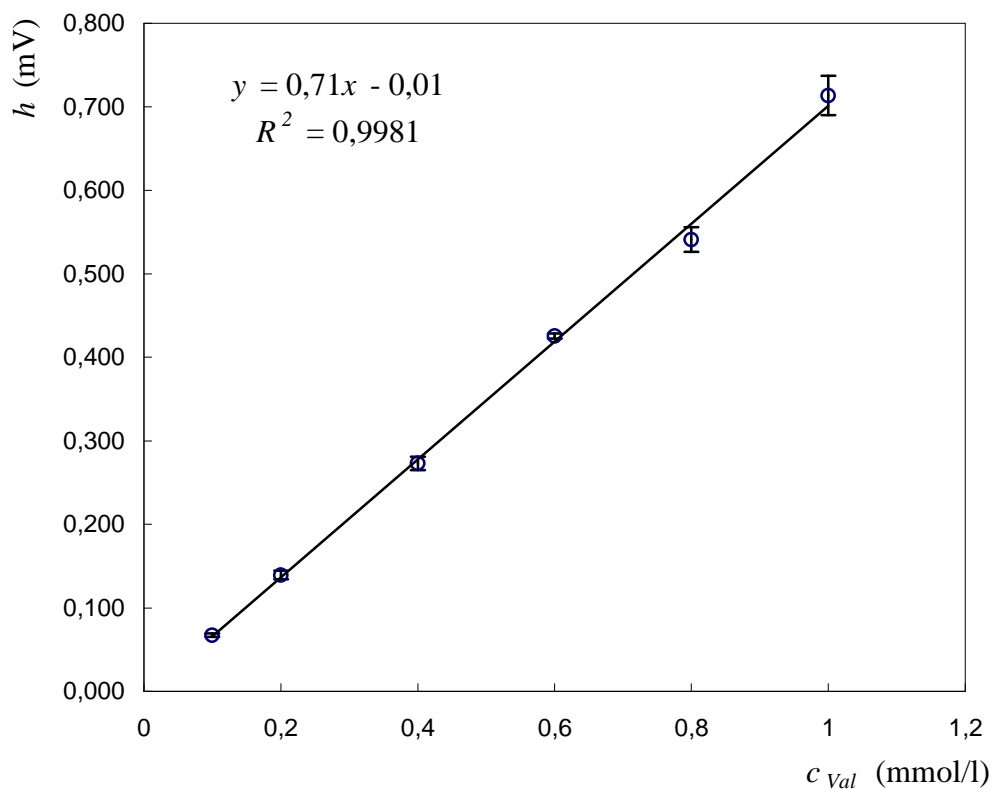
Obr. 9 Závislost plochy píku fenylalaninu na koncentraci.

Z tabulek 8 až 10 a obrázků 7 až 9 vyplývá lineární závislost ploch píků aminokyselin na jejich koncentraci ve zvoleném kalibračním rozsahu. Plochy píků valinu a leucinu nabývají podobných hodnot a i směrnice jejich kalibračních závislostí jsou srovnatelné. Fenylalanin má větší plochy píků a i jeho kalibrační závislost roste s větší směrnici, jelikož obsahuje v postranním řetězci benzenové jádro, které zvyšuje absorbanci samotného fenylalaninu při 230 nm. Determinační koeficienty mají u všech tří závislostí hodnotu větší než 0,9990, což svědčí o dobré lineární závislosti v daném koncentračním rozsahu. Vyšší hodnoty SD a RSD u měření vzorku o koncentraci $8 \cdot 10^{-3}$ mol/l indikují možné komplikace s opakovatelností metody.

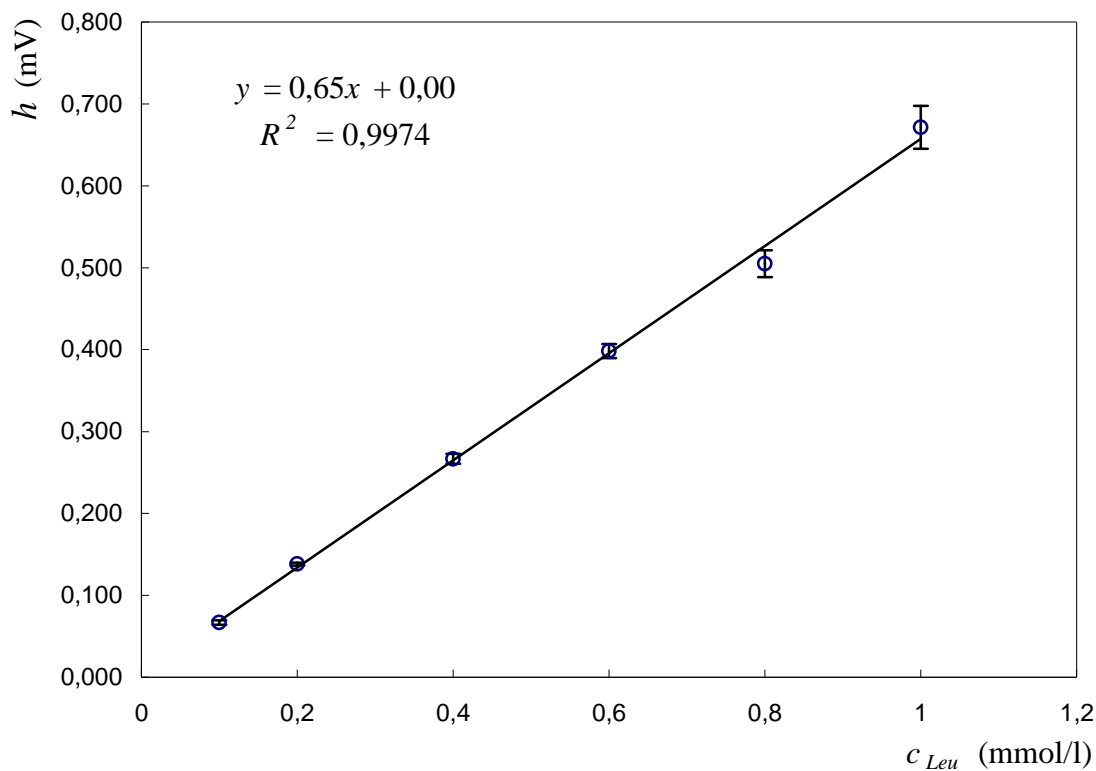
Údaje potřebné pro určení limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ) pro všechny aminokyseliny jsou shrnuty v tabulce 11 a v obrázcích 10 až 12. Limitu detekce odpovídá koncentrace analytu, při které jeho pík má výšku 3krát větší, než je výška šumu detektoru (velikost rozptylu základní linie) a limitu stanovitelnosti odpovídá koncentrace analytu, při které jeho pík má výšku 10krát větší, než je výška šumu detektoru. Výška šumu detektoru byla 0,020 mV. V tabulce 12 jsou uvedeny výsledné hodnoty LOD a LOQ vypočtené z rovnice lineární regrese závislosti výšky píku na koncentraci pro jednotlivé aminokyseliny (viz Obr. 10 až 12).

Tab. 11 Hodnoty průměrné výšky píku (\bar{h}) směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) potřebné pro sestavení závislosti výšky píku na koncentraci (c) pro jednotlivé aminokyseliny.

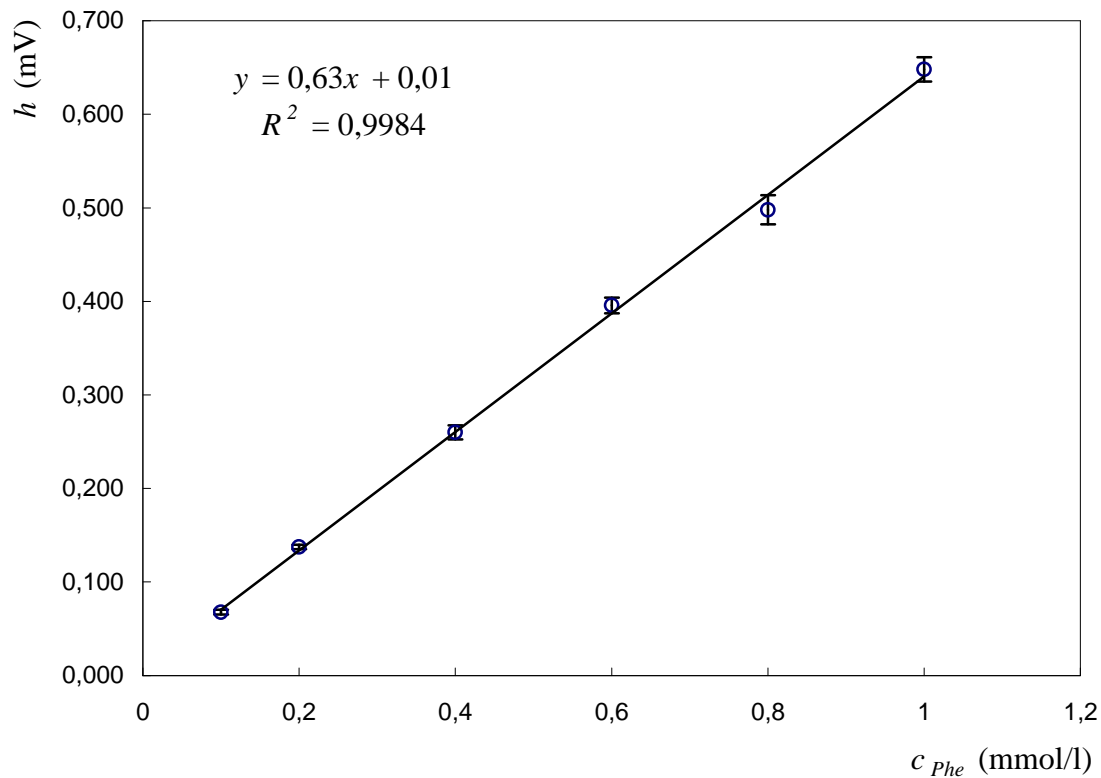
c (mol/l)	valin			leucin			fenylalanin		
	\bar{h} (mV)	SD (mV)	RSD (%)	\bar{h} (mV)	SD (mV)	RSD (%)	\bar{h} (mV)	SD (mV)	RSD (%)
$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,07	0,00	3,1	0,07	0,00	3,9	0,07	0,00	3,9
$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,14	0,01	3,7	0,14	0,00	1,3	0,14	0,00	1,7
$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,27	0,01	3,0	0,27	0,01	2,3	0,26	0,01	2,9
$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,43	0,00	0,7	0,40	0,01	2,1	0,40	0,01	2,1
$8,0 \cdot 10^{-4}$	0,54	0,01	2,7	0,51	0,02	3,3	0,50	0,02	3,2
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,71	0,02	3,3	0,67	0,03	3,9	0,65	0,01	2,0



Obr. 10 Závislost výšky píku valinu na koncentraci.



Obr. 11 Závislost výšky píku leucinu na koncentraci.



Obr. 12 Závislost výšky píku fenylalaninu na koncentraci.

Tab. 12 Hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ) vypočtené z rovnice lineární regrese závislosti výšky píku na koncentraci pro jednotlivé aminokyseliny při výšce šumu detektoru 0,020 mV.

aminokyselina	LOD (mol/l)	LOQ (mol/l)
valin	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$
leucin	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
fenylalanin	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$

Hodnoty LOD a LOQ (viz Tab. 12) jsou pro všechny aminokyseliny srovnatelné. Při nadávkovaném objemu 60 nl vzorku je detekční limit 5,4 pmol pro valin a leucin a 4,8 pmol pro fenylalanin. Ačkoli fenylalanin má větší plochy píků, jejich výšky jsou srovnatelné s výškami píků valinu a leucinu, jelikož fenylalanin se více zdržuje na stacionární fázi a je tak více ovlivňován faktory kinetiky separace, díky čemuž jsou jeho píky širší. Směrnice závislosti výšek píků aminokyselin na jejich koncentracích jsou pak srovnatelné.

4. Závěr

Podářilo se mi splnit cíle bakalářské práce, byla nalezena optimální mobilní fáze pro separaci valinu, leucinu a fenylalaninu a následně byly sestrojeny jejich kalibrační závislosti ve směšném vzorku. Kalibrační závislosti jsou v daném koncentračním rozsahu lineární a metoda postkolonové derivatizace aminokyselin pomocí oxidu měďnatého je výhledově použitelná pro kvantitativní stanovení aminokyselin. Ačkoli tato nová metoda zatím nedosahuje limitu detekce a limitu stanovitelnosti super-citlivých metod využívajících fluorescenční značení aminokyselin, její jednoduchost a technická nenáročnost jí dávají velikou šanci na uplatnění v cílových oblastech výzkumu a vývoje a na možné komerční využití. Metoda je potenciálně použitelná pro široké spektrum analytů a její možnosti ještě nebyly zdaleka vyčerpány. Podrobnější vypracování kalibračních závislostí pro další analyty a další sloučeniny mědi, jejich vzájemné porovnání a konfrontace s metodami již publikovanými bude předmětem dalšího výzkumu.

Literatura

- [1] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/> 24.3.2009, 12.21
- [2] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004
- [3] Krejčí, M.: *Mikrokolonová a kapilární kapalinová chromatografie*. Praha, SNTL 1990
- [4] Kolektiv autorů: *Biochemie Základní kurz*. 3. vyd. Praha, Karolinum 2005
- [5] Novák, F.: *Úvod do klinické biochemie*. Praha, Karolinum 2002
- [6] <http://www.instruments.ingos.cz/> 23.3.2009, 12.51
- [7] Lindroth, P.; Mopper, K.: *Anal. Chem.* **51**, 1667 (1979)
- [8] Tsuruta, Y.; Inoue H.: *Anal. Biochem.* **265**, 15 (1998)
- [9] Bayer, E.; Grom, E.; Kaltenegger, B.; Uhmann, R.: *Anal. Chem.* **48**, 1106 (1976)
- [10] Einarsson, S.; Josefsson, B.; Lagerkvist, S.: *J. Chromatogr.* **282**, 609 (1983)
- [11] Lottspeich, F.: *J. Chromatogr.* **326**, 321 (1985)
- [12] Woo, K.-L.; Ahan, Y.-K.: *J. Chromatogr.* **740**, 41 (1996)
- [13] Coufal, P.: Ústní sdělení. Praha 17.10.2008
- [14] Wu, Q.; Su, Y.; Yang, L.; Li, J.; Ma, J.; Wang, Ch.; Li, Z.: *Microchim. Acta* **159**, 319 (2007)