

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Marie Chytrová

**Optimalizace podmínek derivatizace vybraných aminokyselin
pomocí FMOC-Cl**

Optimization of derivatization conditions of selected amino acids
with FMOC-Cl

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková

Praha, 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM00221620857 a grantu GA AV IAAX 00100903.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze dne

.....

podpis

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a trpělivost, s níž se mi věnovala a za pomoc při zpracování výsledků této bakalářské práce. Dále děkuji kolektivu v laboratoři za vytvoření přátelského pracovního prostředí a své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

ABSTRAKT

Chirální HPLC metoda (mobilní fáze methanol/0,5% triethylamoniumoctanový pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), teikoplaninová chirální stacionární fáze, fluorescenční detekce - λ_{ex} 254 nm, λ_{em} 314 nm) byla použita pro sledování výtěžnosti derivatizační reakce pro D/L-alanin, D/L-valin, D/L-leucin a D/L-soleucin. Pro derivatizaci byl použit 9-fluorenylmethylchlormravenčan (FMOC-Cl). Byl sledován vliv pH 0,2 M vodného roztoku NaHCO₃ (8,0 – 9,5) a teploty derivatizace (22, 40 a 60 °C) na výtěžnost derivatizace, která byla sledována velikostí plochy píku D-enantiomeru jednotlivých aminokyselin. Bylo zjištěno, že optimální hodnota pH je 8,5 a teplota 40 °C. Vypracovaná metoda byla aplikována na reálný vzorek, výživový doplněk BCAA Extreme Pure obsahující L-soleucin, L-leucin a L-valin. Bylo zjištěno, že preparát neobsahuje žádný balastní D-enantiomer

Klíčová slova: chirální HPLC, teikoplanin, aminokyseliny, derivatizace, 9-fluorenylmethylchlormravenčan (FMOC-Cl).

ABSTRACT

Chiral HPLC method (mobile phase methanol/0.5% triethylammonium acetate buffer, pH 6.0 40/60 (v/v), teicoplanin based chiral stationary phase, fluorescence detection - λ_{ex} 254 nm, λ_{em} 314 nm) was used for studying a recovery of derivatization procedure for D/L-alanin, D/L-valin, D/L-leucin and D/L-isoleucin. 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was used as a derivatization agent. The influence of derivatization temperature (22, 40 and 60 °C) and pH value of 0.2 M NaHCO₃ (8.5 – 9.5) on derivatization recovery was monitored in terms of D-enantiomer peak areas for the individual amino acid. The optimal derivatization conditions were found to be pH 8.5 and temperature 40 °C. The developed method was applied to analysis of the real sample, food supplement BCCA Extreme Pure, containing L-isoleucin, L-leucin and L-valin. The sample was D-enantiomers free.

Key words: chiral HPLC, teicoplanin, amino acids, derivatization, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl).

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	
2.1 Enantiomery.....	9
2.2 Chirální separace v HPLC	10
2.3 Makrocyclická antibiotika	11
2.4 Aminokyseliny.....	13
2.5 Derivatizace	14
2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
3.1 Chemikálie.....	18
3.2 Přístroje a pomůcky	19
3.3 Mobilní fáze a podmínky měření.....	19
3.4 Příprava vzorků a činidel	20
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	
4.1 Porovnání separace aminokyselin v nativním stavu a derivatizované formě	22
4.2 Derivatizace	24
4.3 Porovnání standardů derivatizovaných aminokyselin s derivatizovanými aminokyselinami	25
4.4 Optimalizace průběhu derivatizace použitím hydrogenuhličitanu sodného o různé hodnotě pH.....	26
4.5 Vliv teploty na průběh derivatizace	28
4.6 Analýza reálného vzorku	29
5. ZÁVĚR.....	32
POUŽITÁ LITERATURA	33

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

α	selektivita
A	plocha píku
ACN	acetonitril
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
D/L-Ala	D/L-alanin
D/L-Ile	D/L-isoleucin
D/L-Leu	D/L-leucin
D/L-Val	D/L-valin
FMOC-Cl	9-fluorenylmethylchlormravenčan
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
h_n	šum základní linie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
k	retenční faktor
L	délka kolony
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
λ	vlnová délka
m	směrnice kalibrační křivky
MeOH	methanol
n	účinnost
ot/min	počet otáček za 1 minutu
R	rozlišení
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
TEAA pufr	triethylamoniumoctanový pufr
t_M	mrtvý čas kolony
t_R	retenční čas
v/v	objem/objem (objemový poměr složek mobilní fáze)
w	šířka píku při základně
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky

1. ÚVOD

V současné době je věnována velká pozornost sledování stereoselektivního chování přírodních i uměle připravených sloučenin, jejichž enantiomery mohou mít odlišné biologické i fyziologické vlastnosti. Významná část přírodních látek vykazuje chiralitu a vyskytují se ve formě enantiomerů, případně diastereoizomerů. Plní nejen funkci základních stavebních jednotek živých organismů, ale jsou i důležitým prekurzorem pro syntézu řady léčiv a v poslední době se staly i populárními výživovými doplňky užívanými zejména sportovci. Velmi důležitými chirálními složkami potravin jsou aminokyseliny s nutričně využitelnými L-enantiomery. Vlivem nevhodného zpracování potravin může docházet k racemizaci jednotlivých složek. Ke změně poměru enantiomerů dochází také při nesprávném skladování, např. v důsledku bakteriální kontaminace, či přidavkem syntetické příměsi. Např. D-aminokyseliny by neměly být přítomné v nekvašených, nijak nezpracovaných potravinách. Proto mohou sloužit jako významný ukazatel podmínek zpracování a kvality potravin. Z toho vyplývá, že určování enantiomerního zastoupení v potravinách a nápojích má velkou vypovídající hodnotu a je důležitou součástí potravinářské analýzy.¹

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi vhodné metody používané k enantioseparacím aminokyselin. Absence chromoforů v molekulách některých aminokyselin vede k nízké citlivosti detekce v UV oblasti, proto je nutné aminokyseliny derivatizovat vhodným činidlem a tím zvýšit citlivost detekce použité metody.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci RP-HPLC metody pro enantioseparaci D,L-alaninu, D,L-isoleucinu, D,L-leucinu a D,L-valinu v derivatizované formě s důrazem na enantioseparaci D-isomerů za využití chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu. Derivatizace je realizována fluorescenčním derivatizačním činidlem 9-fluorenylmethylchlormravenčanem (FMOC-Cl) a je sledován vliv různé hodnoty pH hydrogenuhličitanu sodného, který slouží jako rozpouštědlo pro studované aminokyseliny a teploty derivatizace na její výtěžnost.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enantiomery

Isomery jsou sloučeniny se stejným molekulovým vzorcem, ale různým strukturním vzorcem nebo rozdílným prostorovým uspořádáním.²

Prostorové uspořádání molekul se nazývá stereoizomerie. Dvě molekuly, které jsou zrcadlovým obrazem jedna druhé, nazýváme enantiomery. Stereoisomery, které nejsou enantiomery, nazýváme diastereoizomery. Diastereoizomery mohou být chirální i achirální.³ Chiralita je odvozena od řeckého *chiros* – ruka a je zpravidla zapříčiněna přítomností tzv. stereogenního centra, kterým je nejčastěji atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty, ale mohou to být i jiné atomy, např. křemík, síra, dusík či fosfor.^{2,4}

Enantiomery rozlišujeme v názvu sloučeniny afixem (+) nebo (-), vztahujícím se ke směru stáčení roviny polarizovaného světla definované vlnové délky, nejčastěji při čáře sodíku. Enantiomery se strukturně vzájemně liší absolutní konfigurací. Ve spojení s názvem sloučeniny používáme symboliku *R* a *S* uváděnou před názvem sloučeniny a známou jako konvence *R/S*. Pokud molekula obsahuje více než jedno centrum chiralit, aplikuje se tento postup na každé centrum chiralit a konfigurace molekuly se vyjadřuje souborem *R* a *S* afixů. Afixy *D* a *L*, vyjadřující absolutní konfiguraci, používáme u cukrů, aminokyselin a peptidů.

Každou látku, bez ohledu na její skupenství, obsahující ekvimolární množství enantiomerních molekul, nazýváme racemát.³ Tato směs je opticky neaktivní, neboť se optické otáčivosti jednotlivých enantiomerů navzájem vyruší.²

Chiralita je základní vlastnost přírody. Proteiny, enzymy a uhlohydráty jsou chirální. Např. proteiny jsou tvořeny L-aminokyselinami, uhlohydráty jsou tvořeny přírodními cukry s D-isomerií atd. Živé organismy představují chirální prostředí, které je schopno rozlišit jednotlivé enantiomery. Ačkoliv enantiomery vykazují stejné fyzikální vlastnosti, jako je molekulová hmotnost, teplota tání, teplota varu, *pKa* aj. a liší se pouze směrem stáčení roviny polarizovaného světla, mohou mít zcela rozdílné biologické účinky, vzhledem k vysokým stereospecifickým interakcím s receptorovým povrchem. Např. u racemátu thalidomidu, který byl v 60. letech podáván těhotným ženám proti ranní nevolnosti, se prokázalo, že *R*-enantiomer má sice požadované účinky, ale jeho *S*-

-analog je silně teratogenní. Navíc, jestliže je podán pouze *R*-thalidomid, dochází k racemizaci *in vivo* a vzniká opačný enantiomer. Bohužel stále je mnoho chirálních léčiv produkováno jako racemát nejen z důvodů obtížné nebo finančně nákladné enantioseparace, ale také z důvodů, že farmakologické a toxikologické studie byly provedeny pouze pro racemát, nebo z důvodů nestability enantiomerů a jejich opětovné racemizaci.^{5,6}

2.2 Chirální separace v HPLC

Separace enantiomerů je označována jako chirální separace. Od objevu prvních optických isomerů L. Pasteurem, má význam chiralita s ohledem na biologickou aktivitou nezanedbatelný význam. Fyziologické prostředí uvnitř živého organismu je chirální a biologická aktivita enantiomerních forem molekul se může dramaticky lišit. S výjimkou glycinu má všech 20 α -aminokyselin chirální atom uhlíku, sousedící s karboxylovou skupinou. Toto chirální centrum umožňuje existenci dvojice enantiomerů. Některé z geneticky zakódovaných aminokyselin tvoří stavební kameny bílkovin, což jsou nejdůležitější složky všech živých systémů. Mnohobuněčné organismy jsou obvykle založeny na L-aminokyselinách. Je dobře známo, že L-formy a D-formy peptidů se mohou výrazně lišit s ohledem na stabilitu a biologickou aktivitou.⁷

Příprava enantiomerně čistých substituovaných analogů aminokyselin je náročný úkol, který vyžaduje přesné analytické metody, s nimiž je možno zjistit enantiomerní profil při syntézách.⁷

V současné době je hledání nových, efektivních a dostupných chirálních selektorů předmětem mnoha výzkumů. Byly vyvinuty různé separační metody, včetně plynové chromatografie, kapilární elektroforézy, micelární elektrokinetické chromatografie, superkritické fluidní chromatografie a vyskoúčinné kapalinové chromatografie, které mohou být použity jako separační techniky pro analýzu chirálních látek.⁸

Chirální HPLC separaci lze uskutečnit dvěma způsoby, a to buď přímým, či nepřímým způsobem. Přímá metoda spočívá v zavedení vhodné opticky aktivní látky, tzv. chirálního selektoru do separačního prostředí. Při interakci chirálního selektoru s enantiomery vznikají přechodné diastereoizomerní komplexy o různých konstantách stability. Pokud jsou tyto konstanty dostatečně odlišné, může docházet k rozdílnému

zadržování jednoho z dvojice enantiomerů na koloně a tím i k jejich vzájemnému rozdělení. Chirální selektor může být chemicky vázaný na pevném inertním nosiči, se kterým tvoří tzv. chirální stacionární fázi, nebo může být přidán jako aditivum do mobilní fáze. Obě zmíněné metody mají své výhody i nevýhody. Např. k výhodám přidavku chirálního selektoru do mobilní fáze patří možnost širokého výběru chirálního selektoru a jeho snadná výměna a možnost využití nechirální stacionární fáze, která je oproti chirální stacionární fázi levnější. Nevýhodou je velká spotřeba drahého chirálního selektoru a v některých případech i snížení citlivosti detekce.^{8,9}

V metodě nepřímé se používá nechirální stacionární fáze a vlastní separaci předchází derivatizační reakce mezi racemickým analytem a opticky čistým činidlem. Nevýhodou nepřímé metody je, že vzniká stabilní diastereoizomerní pár a tento způsob je nevýhodný např. pro izolaci jednotlivých enantiomerů.¹⁰

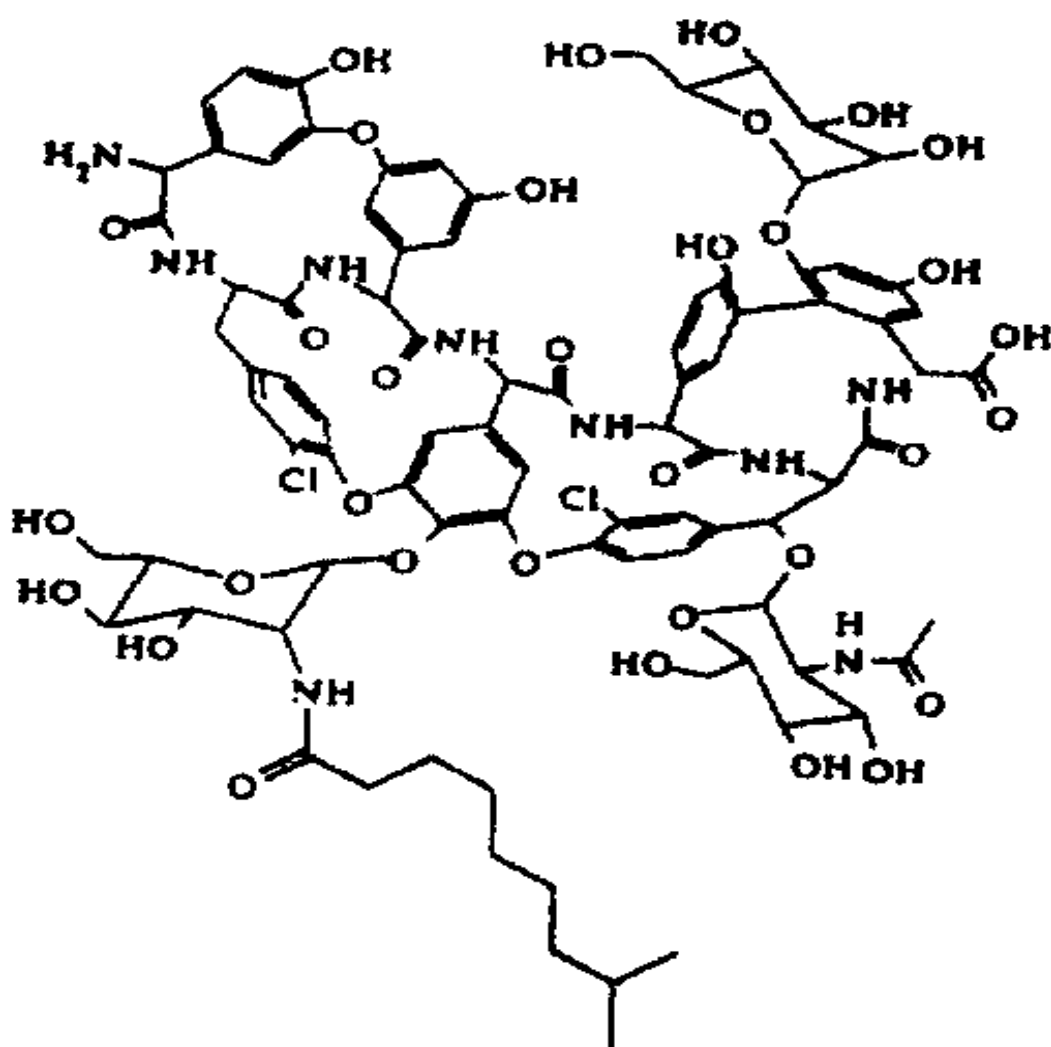
2.3 Makrocyclická antibiotika

Hledání účinných chirálních selektorů, které jsou schopny separovat širokou škálu enantiomerních sloučenin, je stále otevřený proces. Makrocyclická antibiotika se ukázala jako mimořádně užitečná třída chirálních selektorů, používaných pro biologické a farmakologické enantioseparace v HPLC, tenkovrstvé chromatografii a elektroforéze. K nejvýznamnější skupině makrocyclických antibiotik patří glykopeptidy. Do skupiny glykopeptidů patří avoparcin, teikoplanin, ristocetin A a vankomycin, které jsou v HPLC nejčastěji využívány ve formě chirálních stacionárních fází, tedy chirální selektor navázaný na nosiči. S úspěchem byly využity i pro enantioseparaci nativních a derivatizovaných forem aminokyselin.¹¹

Makrocyclická antibiotika mají molekulovou hmotnost větší než 600, ale menší než 2000 a mají mnoho funkčních skupin a podle prostředí mohou vykazovat kyselý, bazický, nebo neutrální charakter. Interakční mechanismus zahrnuje hydrofobní, dipól-dipól nebo π - π interakce, vodíkové vazby a sterické repulze. Kromě hydrofobních částí mají tyto molekuly i hydrofilní a ionizovatelné skupiny, což jim zaručuje dobrou rozpustnost ve vodných roztocích. Jsou aktivní proti anaerobním i aerobním grampozitivním patogenním bakteriím. Svou specifickou vazbou na karboxylový konec D-alanyl-D-alaninu, přítomného v bakteriální buněčné stěně, zamezují polymerizaci

peptidoglykanu a tím vyvolávají inhibici syntézy buněčné stěny bakterií.^{11,12,13} Jelikož v této práci byla používána chirální stacionární fáze s navázaným teikoplaninem, bude následující odstavec zaměřen na něj.

Teikoplanin, jehož struktura je znázorněna na obr. 1, je fermentačním produktem bakterie *Actinoplanes teichomyceticus*. V molekule teikoplaninu je sedm aromatických jader, čtyři z nich jsou fenolické zbytky a další dva kruhy jsou substituované chlorem.¹¹ Teikoplanin je jediný mezi glykopeptidy, který má hydrofobní acylový postranní řetězec spojený s 2-amino-2-deoxy- β -glukopyranosylovou skupinou. Tento hydrofobní acylový postranní řetězec je zodpovědný za agregační schopnosti teikoplaninu.¹²



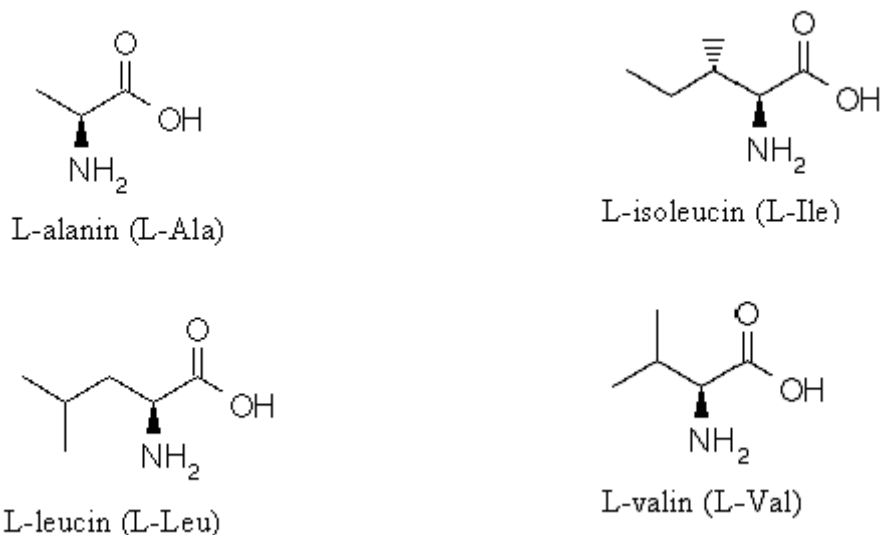
Obr. 1 Strukturální vzorec teikoplaninu.¹⁴

2.4 Aminokyseliny

Fyziologické prostředí uvnitř živého organismu je chirální a biologické aktivity enantiomerních forem molekul se mohou dramaticky lišit. Jak již bylo uvedeno, s výjimkou glycinu, mají všechny α -aminokyseliny chirální atom uhlíku sousedící s karboxylovou a aminovou skupinou. Toto chirální centrum umožňuje existenci dvojice enantiomerů.⁷ Vedle základních funkčních skupin (karboxylové a aminové) má každá aminokyselina charakteristický postranní alifatický nebo aromatický zbytek, jímž se jednotlivé aminokyseliny liší a který rozhoduje o interakcích a funkcích peptidů a proteinů z nich složených.

Některé geneticky zakódované aminokyseliny tvoří stavební kameny bílkovin. Mnohobuněčné organismy jsou obvykle založeny na L-aminokyselinách.⁷ Příčinou této homochiralitě může být skutečnost, že L-aminokyseliny jsou stabilnější, než D-formy.¹ Racemizace opticky aktivních aminokyselin v metabolicky stabilních bílkovinách živých systémů se může uskutečnit jak ve zředěných kyselinách a bázích, tak i při neutrálním pH. Příprava enantiomerně čistých substituovaných analogů aminokyselin je náročný úkol, který vyžaduje přesné analytické metody, s nimiž je možno zjistit případné nedostatky asymetrických syntéz. Je dobře známo, že L- a D-formy peptidů se mohou výrazně lišit s ohledem na stabilitu a biologickou aktivitou.⁷

L-enantiomery aminokyselin a hlavně aminokyselin s rozvětveným postraním hydrofobním řetězcem jsou součástí mnoha potravinových doplňků. Např. L-valin, L-leucin a L-isoleucin jsou hojně užívané lidmi s nadměrnou fyzickou zátěží (např. sportovci).¹ Tyto aminokyseliny bývají označovány jako BCAA (z anglického brached chain amino acids – kyseliny s rozvětveným řetězcem) a patří do skupiny esenciálních aminokyselin. Jsou katabolizovány hlavně ve svalech, oxidace je provázána uvolňováním energie, při syntéze jiných aminokyselin slouží jako dárci dusíku, regulují syntézu a degradaci bílkovin.¹⁶ Také pomáhají snižovat únavu v důsledku zvyšování hladiny serotoninu. Proto je nesmírně důležité kontrolovat enantiomerní čistotu těchto výrobků, aby nedocházelo k výživovým ztrátám z důvodu vzniku nemetabolisovatelných a biologicky nevyužitelných D-forem těchto aminokyselin.¹ Na obr. 2 jsou uvedeny strukturní vzorce L-enantiomerů studovaných aminokyselin.



Obr. 2 Strukturní vzorce a názvy studovaných aminokyselin.

2.5 Derivatizace

Derivatizační techniky jsou používané v hmotnostní spektroskopii, jaderné magnetické rezonanci, UV-VIS a fluorescenční spektroskopii roztoků, v elektrochemických a radiochemických metodách, v separačních metodách atd.¹⁷

Derivatizací se mění fyzikálně-chemické vlastnosti analytů. Hlavní důvody pro převedení analytů na deriváty jsou zlepšení detekovatelnosti, zlepšení chromatografických vlastností (např. změna polariry), zlepšení stability analytů, umožnění chirální separace, změna matrice pro lepší separaci. V HPLC je hlavním důvodem pro derivatizace zvýšení citlivosti detekce. Do molekuly analytu se zavádí chromofor (pro UV detekci) nebo fluorofor (pro fluorescenční detekci).^{18, 19}

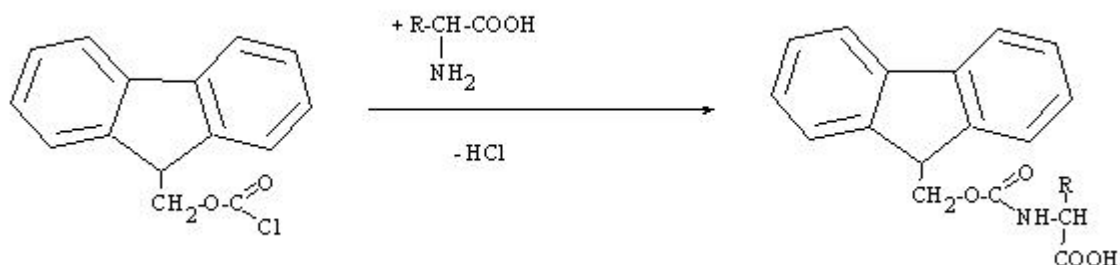
Derivatizační reakce můžeme dělit podle různých kritérií: v závislosti na experimentálním uspořádání je dělíme na derivatizace před kolonou a za kolonou. V závislosti na použité technice máme derivatizace pro kapalinovou a plynovou chromatografii, případně dělení podle typu reaktivní skupiny derivatizačního činidla. Mezi funkční skupiny analytů, na kterých probíhá nejčastěji derivatizace, patří aminoskupiny a karboxylové či hydroxylové skupiny.¹⁹

Hlavní nevýhodou derivatizace je zavedení operace navíc, která zvyšuje komplexnost analýzy, její chybu i celkovou dobu trvání. Proto je důležitá automatizace

derivatizačního kroku minimalizující tyto nevýhody. Derivatizační reakce by měla být rychlá, kvantitativní a s minimem vedlejších produktů.^{18,19}

Protože aminokyseliny nemají ve své struktuře konjugované dvojné vazby, je jejich UV detekce i při nízkých vlnových délkách obtížná a málo citlivá. Vzhledem k tomu, že aminokyseliny jsou snadno derivatizovatelné pomocí mnoha derivatizačních činidel za vzniku produktů absorbujících v UV oblasti či poskytující fluorescenci, jsou předkolonové derivatizační techniky často používanými metodami při stanovení aminokyselin. Mezi používaná derivatizační činidla patří např. o-ftalaldehyd (OPA), 9-fluorenylmethylchlormravenčan (FMOC-Cl), OPA/FMOC-Cl nebo 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB).²⁰ Literatura uvádí desítky dalších derivatizačních činidel, s ohledem na zaměření této bakalářské práce bude dále uvedeno pouze používané derivatizační činidlo FMOC-Cl (obr. 3).

Činidlo 9-fluorenylmethylchlormravenčan (FMOC-Cl) reaguje s primárními a sekundárními aminy za vzniku velmi stabilních derivátů vykazujících fluorescenci. Je používán pro derivatizaci a analýzu různých typů aminů, včetně biogenních aminů a polyaminů, alifatických aminů s krátkým řetězcem či neurotransmiterů. Díky zavedení chromoforu do struktury studovaných látek dochází ke zvýšení citlivosti detekce FMOC-derivátů oproti původním nederivatizovaným látkám o více než 3 řády. I tato derivatizace má své nevýhody. Jednou z nich je, že mnoho endogenních komponent v biologických matricích je reaktivních vůči derivatizačnímu činidlu. Proto je často nezbytné vzorek před analýzou přechistit. Další nevýhodou je přítomnost 9-fluorenylmethoxykarboxylové kyseliny (FMOC-OH) v produktech derivatizace, vznikající hydrolýzou nezreagovaného FMOC-Cl.²¹



Obr. 3 Schéma reakce FMOC-Cl s aminokyselinou.

2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je jednou z nejpoužívanějších separačních technik v analytické chemii, jelikož umožňuje analyzovat i velmi složité směsi látek o nízkých koncentracích.²²

Separace sloučenin na základě rozdílného rozdělení mezi dvě navzájem nemísitelné kapalně fáze je základem rozdělovací chromatografie. Separační systém se skládá z chemicky vázané stacionární fáze a nemísitelné mobilní fáze. Chromatografické separace jsou založeny na rozdílném rovnovážném rozdělení vzorku mezi tyto dvě fáze. Pro detekci je nejčastěji využíván UV/VIS spektrofotometrický detektor, který v některých případech poskytuje malou citlivost detekce. K podstatně citlivějším patří fluorimetrická detekce nebo hmotnostní, popřípadě tandemová hmotnostní detekce.¹⁷

K základním retenčním charakteristikám sloužícím k popisu průběhu separace patří retenční faktor, rozlišení, separační faktor, výškový ekvivalent teoretického patra, mez stanovitelnosti a mez detekce.

Retenční faktor k vyjadřuje míru zadržení a tedy zpoždování analytu v koloně. Je dán vztahem:

$$k = (t_R - t_M) / t_M, \quad (1)$$

kde t_R je retenční (tedy celkový) čas, který analyt stráví v separační koloně a t_M je mrtvý čas kolony, tedy celkový čas složky vzorku, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí, jako mobilní fáze.

Rozlišení $R_{1,2}$ udává míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Pokud je $R_{1,2} \geq 1,5$, jsou píky rozděleny až na základní linii. Rozlišení je dáno vztahem:

$$R_{1,2} = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2), \quad (2)$$

kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy dříve a později elujícího analytu a w_1 a w_2 jsou příslušné šířky píků při základně.

Pro porovnání kolon různých délek slouží výškový ekvivalent teoretického patra H , který udává separační účinnost kolony:

$$H = L / n, \quad (3)$$

kde L udává délku kolony a n počet teoretických pater, který získáme výpočtem ze vztahu

$$n = 5,545 \cdot (t_R / w_{1/2})^2, \quad (4)$$

kde $w_{1/2}$ značí šířku píku v polovině jeho výšky.

Mez stanovitelnosti LOQ a mez detekce LOD udávají hodnotu koncentrace, kterou jsme za daných experimentálních podmínek schopni s určitou spolehlivostí stanovit, respektive detekovat. Jdou dány vztahy:

$$LOQ = 10 \cdot h_n / m \quad (5)$$

$$LOD = 3 \cdot h_n / m, \quad (6)$$

h_n vyjadřuje šum základní linie a m směrnici kalibrační křivky.

Kritériem pro separační schopnosti chromatografického systému je selektivita, která je pro látky 1 a 2 definovaná podle vztahu:

$$\alpha_{1/2} = k_2 / k_1, \quad (7)$$

kde k_1 a k_2 jsou retenční faktory dříve a později eluujícího analytu. Systém je tím selektivnější, čím je hodnota $\alpha_{1/2}$ vyšší. Pokud je $\alpha_{1/2} = 1$, analyty se vzájemně neseparují.^{17,18,22}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- acetonitril R CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- triethylamin, čistota $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- methanol CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenuhličitan sodný, NaHCO_3 , čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- octová kyselina 99,8%, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- deionizovaná voda filtrovaná Milli-Q filtrovacím systémem (Millipore, Miliford, MA, USA)
- BCAA Extreme Pure (Aminostar s.r.o., Loukov u Mnichova Hradiště, ČR)
- 9-fluorenylmethylchloromravenčan (FMOC-Cl), čistota $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- standardy:
 - D/L-alanin (D/L-Ala), čistota $\geq 99\%$,
 - D/L-leucin (D/L-Leu), čistota $\geq 99\%$
 - D-iso-leucin (D-Ile), čistota $\geq 99\%$; L-iso-leucin (L-Ile), čistota $\geq 99\%$
 - D/L-valin (D/L-Val), čistota $\geq 99\%$
 - FMOC-D-alanin (FMOC-D-Ala-OH), čistota $\geq 99\%$, FMOC-L-alanin (FMOC-L-Ala-OH), čistota $\geq 99\%$
 - FMOC-D-leucin (FMOC-D-Leu-OH), čistota $\geq 99\%$, FMOC-L-leucin (FMOC-L-Leu-OH), čistota $\geq 99\%$
 - FMOC-D-valin (FMOC-D-Val-OH), čistota $\geq 99\%$, FMOC-L-valin (FMOC-L-Val-OH), čistota $\geq 99\%$

Veškeré standardy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2 Přístroje a pomůcky

- kapalinový chromatograf, jehož součástí byla vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor FL 2000 (Spectra System, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l a ke sběru dat program Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)
- kovová separační kolona Chirobiotic T (ASTEC – Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm I. D. naplněná teikoplaninem vázaným na silikagelový nosič o velikosti zrnění 5 μ m
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, USA)
- skleněná stříkačka Hamilton (Reno, Nevada, USA) o objemu 10 μ l
- pH-metr model 4330 (Jenway, UK)
- ultrazvuk Ultrasonic LC30H (Elma, Německo)
- mikrocentrifuga (Denver Instrument, USA)
- bloková lázeň Grant model QBD2 (Cambridge Instruments, UK),
- program Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA)
- nylonový membránový filtr 0,45 μ m (Whatman International Ltd, Maidstone, UK)

3.3 Mobilní fáze a podmínky měření

Mobilní fáze pro separaci nativních aminokyselin byla složena z MeOH a deionizované vody v různých objemových poměrech.

Pro chirální separaci derivatizovaných FMOC-aminokyselin byla použita mobilní fáze složená z MeOH v kombinaci s 0,5% vodným roztokem triethylamoniumoctanového pufru (TEAA) o pH 6,0 v poměru MeOH/TEAA pufr 40/60 (v/v).

Příprava 0,5% TEAA pufru byla provedena odměřením 5 ml triethylaminu a přidáním tohoto množství do cca 800 ml deionizované vody. Přídavkem ledové kyseliny octové bylo upraveno pH na hodnotu 6,0. Vzniklý roztok byl doplněn na celkový objem 1 litr.

UV detekce nativních aminokyselin byla měřena při 205 nm.

Fluorescenční detekce derivatizovaných analytů byla měřena při 254 nm pro excitaci a 314 nm pro emisi záření.

Průtoková rychlost mobilní fáze byla pro nativní formy aminokyselin 0,5 ml/min, pro derivatizované aminokyseliny 0,7 ml/min. Separace probíhaly během celého experimentu za laboratorní teploty 22 ± 2 °C.

3.4 Příprava vzorků a činidel

Studované aminokyseliny alanin, leucin a valin byly dostupné ve formě racemátů, pro analýzu D/L-isoleucinu byly smíchány jeho D- a L-enantiomery v poměru 1:1.

Pro analýzu derivatizovaných standardů FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Val byly smíchány jejich FMOC-D- a FMOC-L-enantiomery v poměru 1:1. Standard FMOC-D/L-Ile nebyl k dispozici.

Standardní zásobní roztoky pro separaci nederivatizovaných aminokyselin byly připraveny navážením 1 mg vzorku (racemátu) a jeho rozpuštěním v 1 ml solventu tvořeného směsí MeOH/H₂O v objemovém poměru 50/50 (v/v).

Pro separaci derivatizovaných aminokyselin byly zásobní roztoky připraveny navážením 1 mg racemátu aminokyseliny a rozpuštěním v 1 ml 0,2 M NaHCO₃ o různém pH. Pro zkrácení doby rozpouštění byly vzorky ponechány po dobu 5 minut v ultrazvuku. Zásobní roztoky byly dále ředěny pomocí 0,2 M NaHCO₃ na požadované koncentrace.

Zásobní roztok NaHCO₃ o koncentraci 0,2 M byl připraven rozpuštěním 4,20 g v přibližně 200 ml deionizované vody. Pomocí 1 M NaOH byla nastavena požadovaná hodnota pH a poté byl roztok doplněn na konečný objem 250 ml.

Zásobní roztok 1 M NaOH byl připraven rozpuštěním 4,0 g vzorku ve 100 ml deionizované vody.

Pro přípravu zásobního roztoku derivatizačního činidla byl 1 mg FMOC-Cl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu. Dalším ředěním pomocí acetonitrilu bylo dosaženo požadované koncentrace.

Derivatizace aminokyselin byla provedena pomocí derivatizačního činidla FMOC-Cl. Bylo smícháno 500 µl racemátu aminokyseliny o koncentraci 2 µg/ml s 500 µl FMOC-Cl o koncentraci 20 µg/ml. Směs byla intenzivně protřepávána po dobu

2 minut, centrifugována při 500 ot/min po dobu pěti minut a pro analýzu byla použita vrchní část vzorku.

Zásobní roztoky byly skladovány v temnu při teplotě 5 °C. Před analýzou byly ponechány 30 minut stát při laboratorní teplotě pro jejich temperaci.

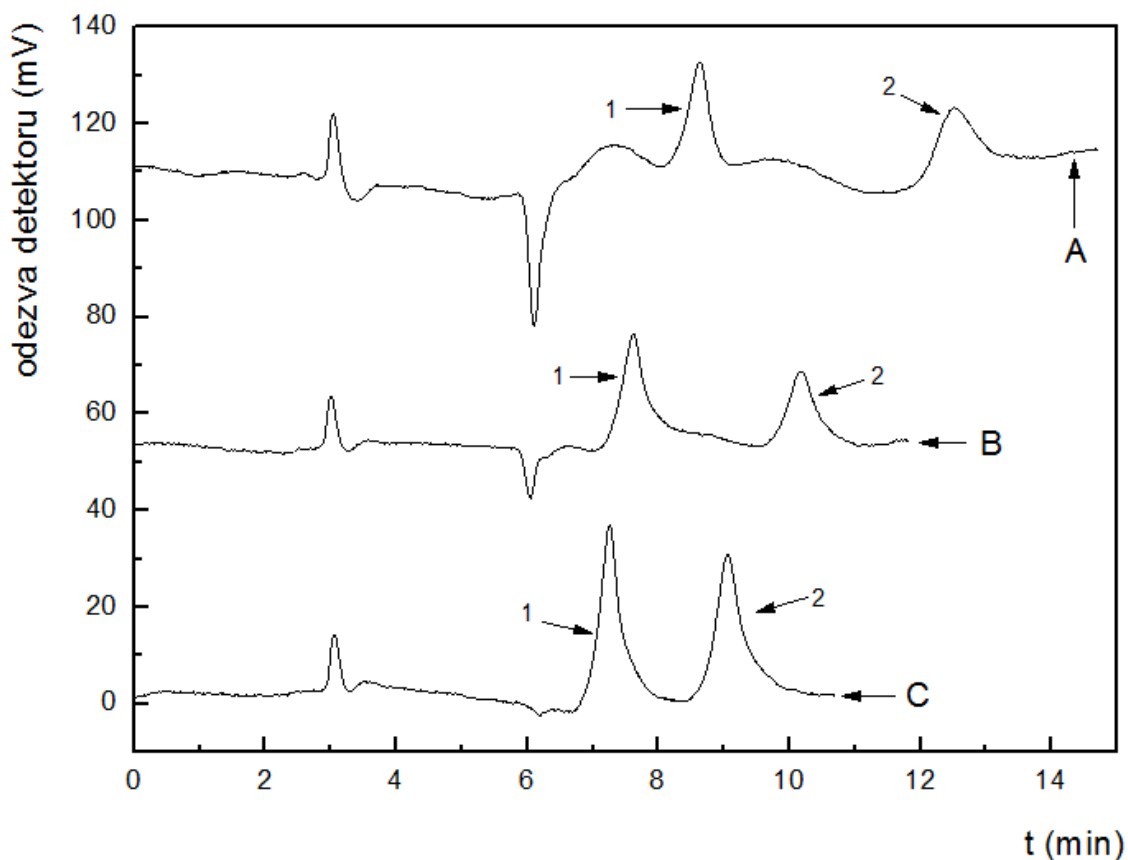
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Porovnání separace aminokyselin v nativním stavu a derivatizované formě

Tato bakalářská práce navazuje na výsledky diplomové práce Mgr. Pavla Repka, který vyvíjel a následně optimalizoval enantiomerní HPLC metodu s UV a fluorimetrickou detekcí pro chirální separaci racemických směsí alaninu, valinu, leucinu a isoleucinu v nativních a derivatizovaných formách s použitím různých stacionárních fází na bázi teikoplaninu a teikoplanin aglykonu v různých mobilních fázích. Z hlediska derivatizace byl sledován vliv objemového poměru D/L-aminokyselina/derivatizační činidlo na výtěžnost derivatizační reakce. Závěrem práce byla volba objemového poměru 1/1 D/L-aminokyselina/derivatizační činidlo s desetinásobně vyšší koncentrací derivatizačního činidla pro derivatizaci racemátů aminokyselin. Separace nativních i derivatizovaných enantiomerů aminokyselin byla nejúčinnější na koloně Chrobiotic T.²³

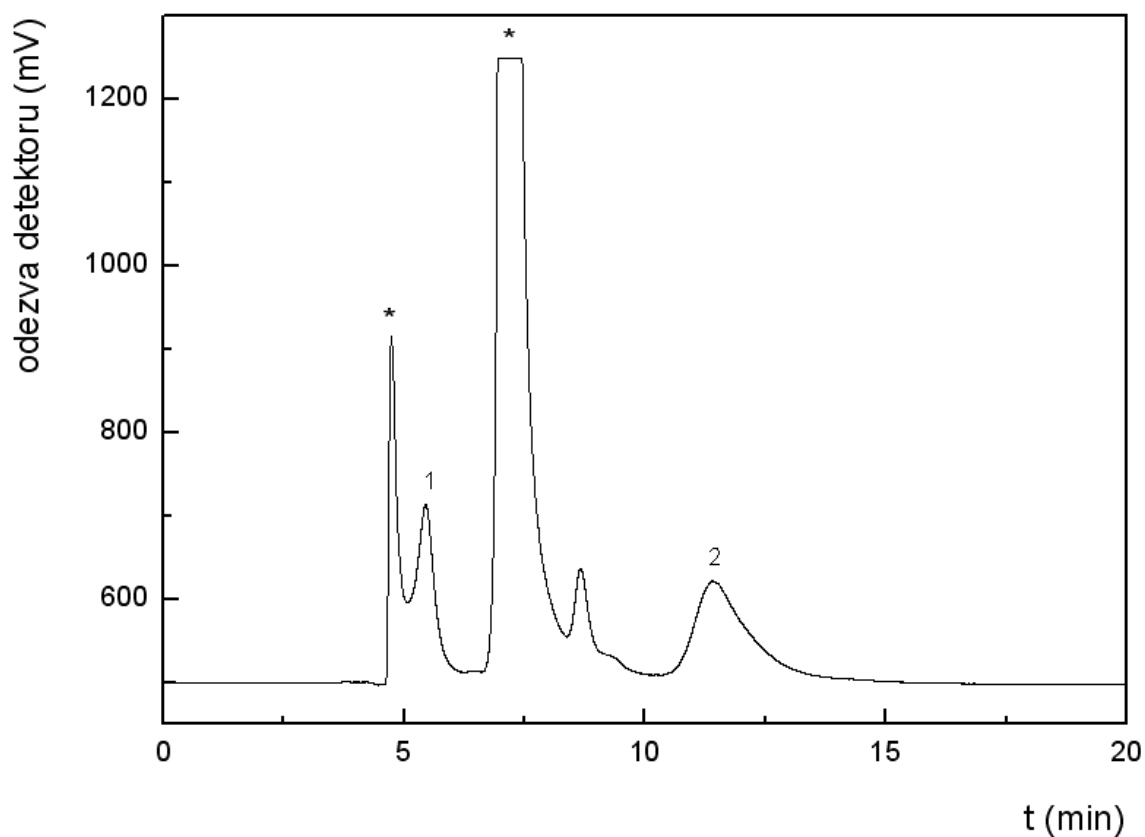
Na začátku této práce byla otestována chirální kolona Chirobiotic T pro separaci nativních i FMOC-derivatizovaných aminokyselin za podmínek nalezených v práci P. Repka.²³ Pro porovnání průběhu enantioseparace D/L-aminokyselin v nativní a derivatizované formě bylo provedeno porovnávací měření s D/L-alaninem. Výsledky separace nativní a derivatizované aminokyseliny jsou uvedeny na obr. 4 a 5.

Na základě již publikovaných výsledků byla pro analýzu nativní formy D/L-alaninu zvolena mobilní fáze MeOH/H₂O s obsahem organického modifikátoru 50, 60 a 70 objemových procent. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Pro měření byla zvolena UV detekce při 205 nm. Ze získaných chromatografických dat vyplývá, že s rostoucím objemovým zastoupením organického modifikátoru v mobilní fázi docházelo k nárůstu retenčního času, a tím prodloužení doby analýzy. Toto chování odpovídá tzv. HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) módu a v tomto typu separačního systému se především uplatňují dipólové interakce a vodíková vazba. Nárůst retenčních charakteristik při zvyšování objemového zastoupení MeOH v mobilní fázi dokumentuje obr. 4.



Obr. 4 Enantioseparace nativního D/L-Ala v mobilních fázích MeOH/H₂O **A**) 70/30 (v/v) **B**) 60/40 (v/v) **C**) 50/50 (v/v), D/L Ala o koncentraci 1 mg/ml v MeOH/H₂O 50/50 (v/v), kolona Chirobiotic T, UV detekce při 205 nm, průtoková rychlost 0,5 ml/min, označení: 1: L-Ala, 2: D-Ala.

Enantiomery FMOC-D/L-Ala byly separovány v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), která byla v práci P. Repka nalezena jako optimální. Derivatizace D/L-Ala probíhala v objemovém poměru racemát/derivatizační činidlo 1:1 s desetinásobně vyšší koncentrací derivatizačního činidla při laboratorní teplotě 22 ± 2 °C a D/L-Ala byl rozpuštěn v 0,2 M NaHCO₃ o pH = 9,0. Příslušný chromatogram je uveden na obr. 5.



Obr. 5 Průběh separace Fmoc-D/L-Ala, koncentrace D/L-Ala 1 $\mu\text{g/ml}$ v 0,2 M NaHCO_3 o $\text{pH} = 9,0$, kolona Chirobiotic T, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, průtoková rychlost 0,7 ml/min, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, $\text{pH} 6,0$ 40/60 (v/v), označení: 1: L-Ala, 2: D-Ala, *: derivatizační činidlo.

Při porovnání obr. 4 s obr. 5 je patrné, že derivatizace aminokyseliny umožnila dobře detekovat i koncentrace o několik řádů nižší, než byla původní koncentrace nederivatizované aminokyseliny. Tento nárůst detekce dokládají i LOQ a LOD pro derivatizované aminokyseliny, jejichž limity se pohybují řádově v jednotkách ng/ml .²³

4.2 Derivatizace

Hlavní náplní této práce bylo blíže prozkoumat podmínky derivatizace s cílem dosáhnout co nejlepšího výtěžku derivatizace. Jak již bylo uvedeno výše, práce navazuje na výsledky P. Repka, ve kterých bylo zjištěno že za použití derivatizačního

čínidla 9-fluorenylmethylchloromravenčanu (FMOC-Cl) je výhodné při derivatizaci studovaných aminokyselin postupovat tak, že aminokyseliny by měly být rozpouštěny v 0,2 M NaHCO₃ (testované pH bylo 9), objemový poměr D/L-aminokyselina/FMOC-Cl by měl být 1:1, kdy koncentrace derivatizačního činidla je oproti koncentraci aminokyseliny desetkrát vyšší.²³ Takto připravená směs byla intenzivně protřepávána po dobu 2 minut. Protože filtrace směsi na odstranění případných nečistot, které by mohly narušit reprodukovatelnost separace, se projevila jako nevhodná, vzhledem k ulpívání podstatné části vzorku na filtračním médiu, bylo vhodné použít centrifugaci při 500 ot/min po dobu pěti minut a poté svrchní část vzorku odebrat k analýze.

Analýza derivatizovaných aminokyselin probíhala v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr 40/60 (v/v) při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Protože deriváty vykazují fluorescenci, mohla být k analýze derivatizovaných aminokyselin použita fluorescenční detekce při 254 nm pro excitaci a 314 nm pro emisi záření.²³

Pro zvolené aminokyseliny D/L-alanin, D/L-isoleucin, D/L-leucin a D/L-valin bylo v této práci hledáno vhodné pH roztoku NaHCO₃, ve kterém byly standardy aminokyselin rozpouštěny a vhodná teplota derivatizace aminokyselin pro optimalizaci derivatizačního postupu.

4.3 Porovnání standardů derivatizovaných aminokyselin s derivatizovanými aminokyselinami

Pro porovnání výtěžnosti derivatizace FMOC-Cl derivatizačním činidlem byly zakoupeny standardy FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Val. Ty byly nejprve rozpouštěny v ACN, zředěny na požadovanou koncentraci (1 µg/ml racemátu nativní aminokyseliny) a byly separovány za stejných podmínek jako laboratorně připravené FMOC-D/L-aminokyseliny a byly sledovány plochy píku D-enantiomerů. Acetonitril se však projevil jako nevhodné rozpouštědlo, vzhledem k velkému množství vznikajících vedlejších produktů při derivatizaci, které následně rušily enantioseparaci. Proto byl pro rozpouštění standardů FMOC-D/L-aminokyselin acetonitril nahrazen 0,2 M NaHCO₃ o pH 9.

Analýza standardů derivatizovaných aminokyselin probíhala v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr 40/60 (v/v) při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Byla použita

fluorescenční detekce při 254 nm pro excitaci a 314 nm pro emisi záření. Při stejných podmínkách proběhla i analýza derivatizovaných aminokyselin. V tab. 1 jsou porovnány plochy píků standardů FMOC-D-aminokyselin s derivatizovanými FMOC-D-aminokyselinami. Z tabulky 1 je patrné, že plochy odpovídající standardům jsou vyšší než plochy laboratorně derivatizovaných aminokyselin, takže výtěžnost derivatizace byla menší než 100 %.

Tabulka 1. Porovnání hodnot ploch píků (A) FMOC-D-enantiomerů aminokyselin pro zakoupené FMOC-derivatizované standardy a zderivatizované FMOC-D/L-aminokyseliny. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, teplota = 22 °C, pH = 9,0, koncentrace racemátů aminokyselin 1 µg/ml, $n = 3$.

	FMOC-D-aminokyselina		
	Ala	Leu	Val
	A	A	A
	mV's	mV's	mV's
Standard	16567	6607	11299
Deriv. vzorek	8915	4912	6351

4.4 Optimalizace průběhu derivatizace použitím hydrogenuhličitanu sodného o různé hodnotě pH

Jak už bylo uvedeno výše, standardy aminokyselin byly rozpouštěny v 0,2 M roztoku NaHCO₃ a tímto roztokem byly i dále ředěny. Cílem této práce bylo najít vhodnou hodnotu pH roztoku NaHCO₃, při které bude následná derivatizace vzorku probíhat s co nejvyšší účinností. Byly sledovány hodnoty pH roztoku NaHCO₃ v rozmezí 8,0 – 9,5 po velikosti kroku 0,5. Hodnoty pH nižší než 8,0 nebyly používány z důvodu špatné rozpustnosti standardů nativních aminokyselin. Vzhledem k pracovní oblasti kolony nebyly používány ani hodnoty pH vyšší než 9,5.

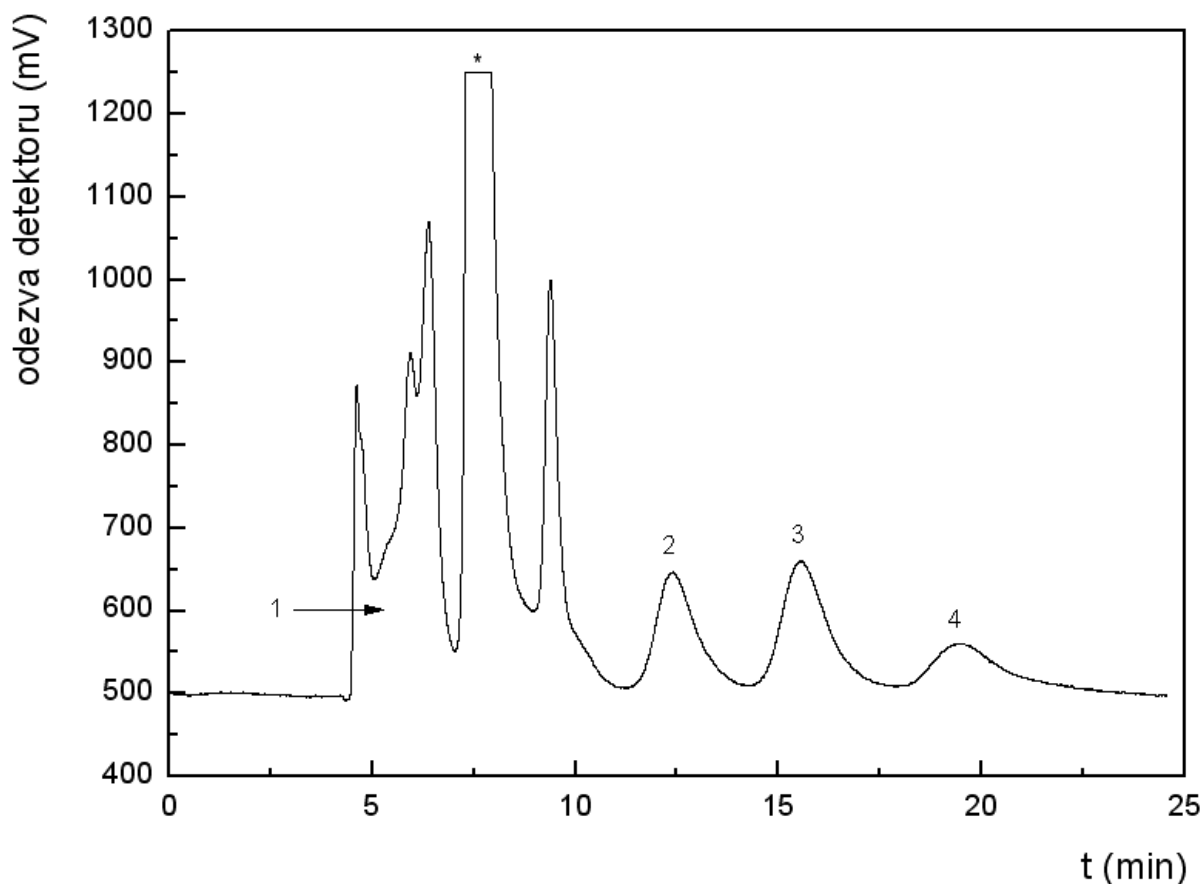
Při jednotlivých hodnotách pH byl sledován vliv hodnoty pH na výtěžnost derivatizace FMOC-derivatizovaných racemátů aminokyselin. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 2. Ze získaných údajů je patrné, že výtěžnost derivatizace, která byla pro jednotlivé aminokyseliny vyjádřena pomocí ploch píků D-enantiomerů, se změnou pH z 8,0 na 8,5 vzrůstá a s dalším zvyšováním pH opět klesá. Proto bylo pH 8,5 zvoleno jako nejvhodnější a bylo použito pro další měření.

V racemické směsi FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Val dochází k separaci D-enantiomerů na základní linii při všech testovaných hodnotách pH NaHCO₃ s výjimkou pH 9,5, kdy dochází ke koeluci FMOC-D-Val s derivatizačním činidlem. Průběh enantioseparace směsi FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Val je zachycen na obr. 6. FMOC-D/L-isoleucin nebyl na přípravu směsi použit, protože při zvolených podmínkách separace nedocházelo k rozdělení FMOC-D-isoleucinu a FMOC-D-alaninu až na základní linii.

Ze získaných výsledků je patrné, že při použití NaHCO₃ o pH 8,5 bylo dosahováno nejvyšších výtěžků derivatizace pro všechny D-enantiomery, naopak při pH 9,5 bylo dosaženo nejnižší výtěžnosti.

Tabulka 2. Vliv pH 0,2 M roztoku NaHCO₃ používaného k rozpouštění a následnému ředění standardů nativních aminokyselin v derivatizační reakci na hodnoty plochy píků (A) D-enantiomerů aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, teplota = 22 °C, koncentrace racemátů aminokyselin 1 µg/ml, *n* = 3.

	FMOC-D/L-aminokyselina			
	Ala	Ile	Leu	Val
	A	A	A	A
pH	mV's	mV's	mV's	mV's
8,0	6579	4892	5193	5674
8,5	11911	8922	6582	8510
9,0	8915	5116	4912	6351
9,5	5005	5005	3798	1550



Obr. 6: Enantioseparace racemické směsi FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Val, koncentrace jednotlivých racemátů 1 $\mu\text{g/ml}$ ve směsi v 0,2 M NaHCO_3 o $\text{pH} = 8,5$, kolona Chirobiotic T, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, průtoková rychlost 0,7 ml/min, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, $\text{pH} 6,0$ 40/60 (v/v), označení: 1: FMOC-L-Ala, FMOC-L-Leu, FMOC-L-Val, 2: FMOC-D-Val, 3: FMOC-D-Ala, 4: FMOC-D-Leu, *: derivatizační činidlo.

4.5 Vliv teploty na průběh derivatizace

Pro posouzení, zda má teplota při derivatizaci vliv na výtěžnost derivatizace, bylo postupováno následovně: Standardní roztoky byly postupně zahřívány v blokové lázni na teploty 22, 40 a 60 $^{\circ}\text{C}$ a při těchto teplotách probíhala derivatizace. Aby nedocházelo k úniku nebo naopak k dodávání tepla do studovaného systému během derivatizace, bylo třeba zkumavky se vzorky izolovat od vnějšího prostředí. K tomu posloužil

polystyrénový kvádr o rozměrech 5 x 5 x 5 cm, který byl rozříznut na dvě nestejně velké části. Uvnitř větší poloviny bylo vytvořeno místo na mikroskopickou, menší polovina posloužila jako vrchní víko. V takto připraveném boxu byly vzorky po celou dobu derivatizace, poté byly ponechány při laboratorní teplotě 20 minut temperovat. Nakonec byla provedena centrifugace pro případné odstranění nečistot a vrchní část vzorku byla použita při analýze.

Vliv teploty reakční směsi na účinnost derivatizace je uveden v tab. 3. Ze získaných údajů je patrné, že derivatizace neprobíhala výrazně ve prospěch konkrétní teploty, ale ani se naměřené hodnoty pro jednotlivé teploty od sebe výrazně nelišily. Pro další měření byla jako kompromis zvolena teplota 40 °C.

Tabulka 3. Vliv teploty roztoků D/L-aminokyselin a FMOC-derivatizačního činidla v derivatizační reakci na hodnoty plochy píků (A) D-enantiomerů aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, 0,2 M NaHCO₃ o pH = 8,5, D/L-aminokyselina o koncentraci 1 µg/ml, *n* = 3.

	FMOC-D/L-aminokyselina			
	Ala	Ile	Leu	Val
	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
°C	mV's	mV's	mV's	mV's
22	11911	8922	6582	8510
40	14770	9993	5984	9872
60	16542	8191	4986	10563

4.6 Analýza reálného vzorku

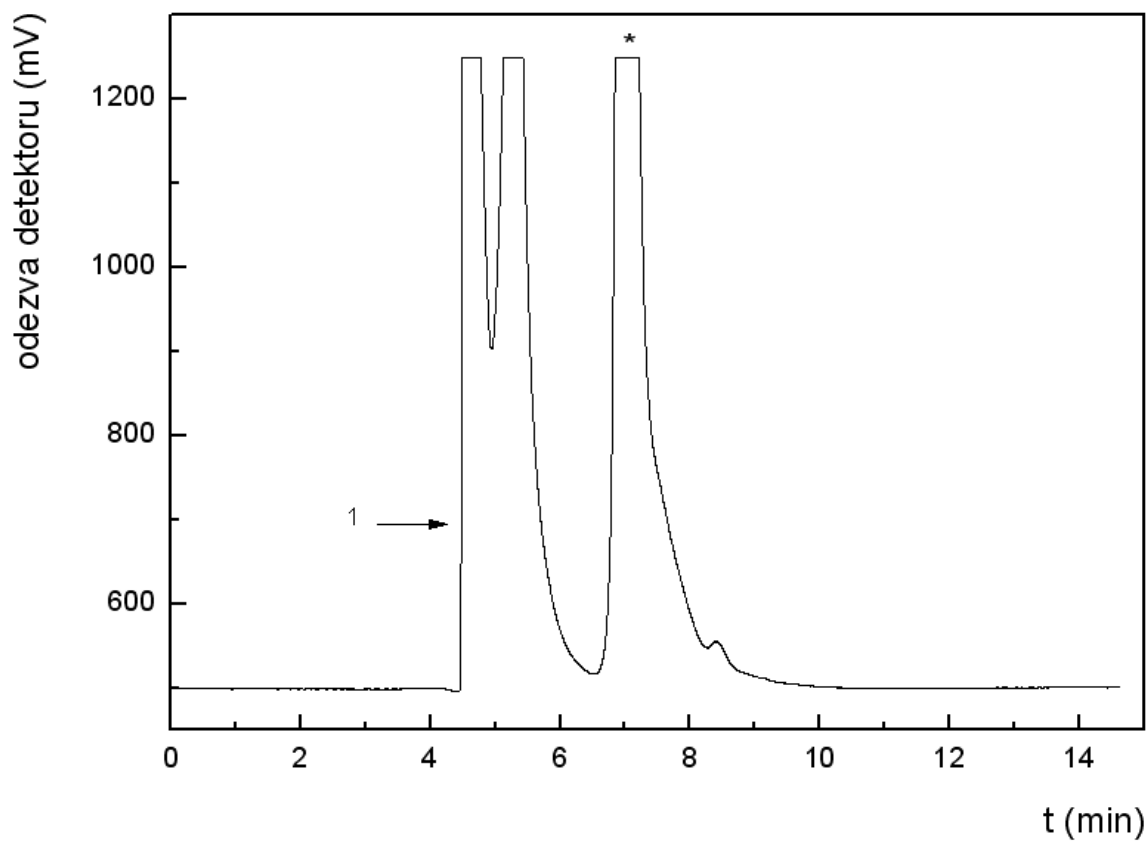
Jako reálný vzorek byl použit přípravek BCAA Extreme Pure od společnosti Aminostar[®] s.r.o., jehož složení je uvedeno v tab. 4. Tento přípravek je určen pro aktivní sportovce a jeho úkolem je zvýšení svalové syntézy proteinů, snížení katabolických procesů ve svalech a tím ochrana svalové hmoty.²⁴

Tabulka 4. Složení přípravku BCAA Extime Pure od společnosti Aminostar: L-leucin, L-isoleucin, L-valin, želatinová kapsle (želatina, barviva: oxid titaničitý, oxidy a hydroxidy železa), látky protispěkové: stearát hořečnatý a oxid křemičitý.²⁴

<u>Aminokyselina</u>	<u>mg/1 kapsle</u>	<u>g/100 g</u>
L-Leu	333	52,2
L-Ile	83	13
L-Val	83	13

Optimalizovaná metoda derivatizace a enantioselektivní HPLC byla použita pro zjištění, zda výše uvedený přípravek skutečně neobsahuje i D-analogy zmíněných aminokyselin.

Vzorek ve formě kapslí byl zbaven vnějšího želatinového obalu a vnitřní sypek obsah byl za stálého míchání a následné sonifikace rozpuštěn ve 100 ml 0,2 M roztoku NaHCO₃ o pH 8,5. Protože kapsle neobsahovala jen samotné aminokyseliny, ale i další pomocné látky, zejména pak oxidy, vznikl bíle zakalený roztok, který bylo potřeba před další úpravou zfiltrovat. Roztok byl přefiltrován přes nylonový membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm. Z roztoku bylo odebráno 120 μl, ke kterým byl přidán 0,2 M NaHCO₃ na doplnění do objemu 1 ml. Takto vzniklý roztok byl dále ředěn až na konečnou koncentraci 2 μg/ml L-Ile a L-Val. V blokové lázni byl roztok zahřát na 40 °C a derivatizován pomocí FMOC-Cl, též zahřátým na 40 °C. Derivatizovaný vzorek byl centrifugován a vrchní část byla použita k analýze, jejíž výsledek je uveden na obr. 7, ze kterého je zřejmé, že chromatogram neobsahoval žádný pík příslušející D-enantiomerům.



Obr. 7 Enantioseparace směsi Fmoc-L-Ile, Fmoc-L-Leu, Fmoc-L-Val o koncentracích 1 $\mu\text{g/ml}$ pro L-Ile, L-Val a koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$ pro L-Leu. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, průtoková rychlost 0,7 ml/min, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), pH NaHCO_3 8,5, teplota derivatizace 40 $^\circ\text{C}$, označení: 1: L-Ile, Leu, Val, 2: D-Ile, *: derivatizační činidlo.

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla aplikace již vyvinuté enantioselektivní HPLC metody pro sledování enantioseparace aminokyselin alaninu, isoleucinu, leucinu a valinu s důrazem na D-formy v derivatizované podobě, realizované fluorescenčním derivatizačním činidlem 9-fluorenylmethylchlormravenčanem (FMOC-Cl) za využití chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu. Byl studován vliv hodnot pH 0,2 M NaHCO₃, používaného při rozpouštění studovaných racemátů aminokyselin i reálného vzorku, a vliv teploty roztoků studovaných látek a derivatizačního činidla na výtěžnost derivatizace, která byla sledována velikostí plochy píku D-enantiomeru jednotlivých aminokyselin.

Na koloně Chirobiotic byly nejprve provedeny separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin, kdy bylo k rozpuštění a následnému ředění standardů aminokyselin použito 0,2 M vodného roztoku NaHCO₃ při pH v rozmezí 8,0 – 9,5. Nejvyšší výtěžnosti derivatizace vyjádřené plochou píků příslušející D-enantiomerům, bylo dosaženo při pH 8,5.

Pro optimalizaci metody při různé teplotě byly použity zahřáté zásobní roztoky aminokyselin a derivatizačního činidla. Jako zkoumané teploty byly zvoleny teploty 22, 40 a 60 °C. Výtěžnost derivatizace neprobíhala výrazně ve prospěch konkrétní teploty, Jako kompromis pro další měření byla zvolena teplota 40 °C.

Analýza reálného vzorku – výživového doplňku BCAA Extreme Pure od společnosti Aminostar® s.r.o. obsahující L-isoleucin, L-leucin a L-valin neprokázala přítomnost D-enantiomerů studovaných aminokyselin.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Strkalová, S.; Kalíková, K.; Tesařová, E.: Výskyt a význam enantiomerů v potravinách. *Chem. Listy* 102, 480-486 (2008).
2. Smith, S.W.: Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicol. Sci.* 110, 4-30 (2009).
3. Červinka, O.: Chiralita a pojmy s ní související. *Chem. Listy* 93, 294-305 (1999).
4. Loukotová, L.; Rambousková, M.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based chiral stationary phases as effective tools for enantioselective HPLC separation of structurally different disubstituted binaphthyls. *Chirality* 20, 900-909 (2008).
5. Nerkar, A.G.; Lade, K.S.; Gadhave, N.A.; Sawant, S.D.: Chiral switches: A review. *J. Pharm. Res.* 4, 1300-1303 (2011).
6. Kasprzyk-Hordern, B.: Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4466-4503 (2010).
7. Ilisz I., Berkecz R., Péter A.: Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 1-15 (2008)
8. Ye, J.; Wu, J.; Liu, W.: Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 28, 1148-1163 (2009).
9. Armstrong, D.W.: Optical isomer separation by liquid chromatography. *Anal. Chem.* 59, 84A-88A, 90A-91A (1987).
10. Nuggehally, R.S.: Evaluation of experimental strategies for the development of chiral chromatographic methods based on diastereomer formation. *Biomed. Chromatogr.* 18, 207-233 (2004).
11. Ilisz I., Berkecz R., Péter A.: HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review. *J. Sep. Sci.* 29, 1305-1321 (2006).
12. Ward, T. J., Farris III., A.B.: Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: A review. *J. Chromatogr. A* 906, 73-89 (2001).

13. Somma, S.; Gastaldo, L.; Corti, A.: Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26, 917-923 (1984).
14. Desiderio C.; Fanali S.: Chiral analysis by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selector. *J. Chromatogr. A* 807, 37-56 (1993).
15. Sajdok, J.; Kozak, A.; Zídková, J.; Kotrba, P.; Pilin, A.; Káš, J.: Modifikace proteinů v průběhu stárnutí organismů. *Chem. Listy* 95, 98-101 (2001).
16. Chiarla, C.; Giovannini, I.; Boldrini, G.; Castagneto, M.: The branched-chain amino acids, *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 43, 189 (1997); anglický abstrakt; ID 16501446.
17. Lawrence, J.F.; Frei, R.W.: *Journal of Chromatography Library – Volume 7: Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company, 1976.
18. Štulík K.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, E.; Ševčík, J.: *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 2004.
19. Deyl, Z.; Mikšík, I.; Tagliaro, F.; Tesařová, E.: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences* (Deyl, Z.; ed.), kap. 4., Elsevier, Amsterdam, 1998.
20. Zhou, W.; Zhang, X.-Y.; Duan, G.-L.: Liquid-chromatography quantitative analysis of 20 amino acids after derivatization with Fmoc-Cl and its application to different origin *Radix isatidis*, *J. Chin. Chem. Soc.* 58, 509-515 (2011).
21. Molnár-Perl, I.: *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography - - Methods and Protocols* (Molnár-Perl, I.; ed.), kap. 2., Elsevier, Amsterdam 2005.
22. Pacáková V.; Štulík K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, 1. vydání, Praha Univerzita Karlova, Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
23. Repko, P.: *Využití chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu a teikoplanin aglykonu pro enantioseparaci Fmoc-derivatizovaných aminokyselin*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2011.
24. <http://www.aminostar.cz/bcaa-extreme-pure-xxl>.