

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

STANOVENÍ ENANTIOMERŮ AMINOKYSELIN METODOU HPLC

Bakalářská práce
studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2010

Regina Michalčková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Evy Tesařové, Csc. a všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma 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

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Evě Tesařové, Csc. za čas, který mi věnovala během odborných konzultací, za poskytnutí literatury, důležitých informací, rad a připomínek.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za velkou trpělivost a podporu během studia.

Abstakt

Bakalářská práce se zabývá stanovením enantiomerů aminokyselin, v praktické části konkrétně alaninu, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie za využití chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu.

Rešeršní část je zaměřena na shrnutí základní problematiky chiralit a chirálních aminokyselin v potravinách, na charakteristiku vysokoúčinné kapalinové chromatografie, jako jedné z nejvhodnějších metod k enantioseparaci aminokyselin, a popis metod derivatizace, jež se využívají ke zvýšení citlivosti stanovení enantiomerů aminokyselin.

Experimentální část se pak zabývá separací jednotlivých enantiomerních forem alaninu, volbou vhodného separačního systému pro tuto separaci a stanovením D- a L- alaninu v ovocném džusu.

Abstract

This Bachelor's thesis deals with determination of amino acids enantiomers, namely alanine in the experimental part, by high performance liquid chromatography using chiral stationary phases based on teicoplanin.

The theoretical part is focused on summarizing the fundamental issue of chirality and chiral amino acids in foods, the characteristics of high-performance liquid chromatography, as one of the most appropriate methods to enantioseparation amino acids, and description of the methods of derivatization, which are used in determination of enantiomers of amino acids.

The experimental part deals with the separation of alanine enantiomers, with the choice of the best separation system for the separation and determination of D- and L- alanine in fruit juice.

Obsah

Obsah	5
Seznam zkratk	7
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1. Chiralita a enantiomery.....	9
2.2. Rozdílné vlastnosti enantiomerů.....	10
2.3. Chiralita aminokyselin.....	10
2.4. Chiralita aminokyselin v potravinách	11
2.5. Chirální separace v HPLC	11
2.6. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	12
2.6.1. Mobilní fáze.....	13
2.6.2. Stacionární fáze.....	13
2.6.2.1. CSP na bázi polysacharidů	14
2.6.2.2. CSP na bázi cyklodextrinů.....	14
2.6.2.3. CSP na bázi makrocyclických antibiotik.....	14
2.6.2.3.1. Teikoplaninové CSP	15
2.7. Derivatizace	16
2.7.1. Předkolonová derivatizace.....	17
2.7.2. Postkolonová derivatizace	17
2.7.3. Derivatizace alaninu respektive aminokyselin	18
2.8. Chirální separace alaninu pomocí HPLC.....	19
3. Experimentální část.....	22
3.1. Přístroje a pomůcky	22
3.2. Použité chemikálie.....	23
3.3. Roztoky vzorků.....	23
3.4. Podmínky měření a mobilní fáze	25
3.5. Použité vztahy.....	26
4. Výsledky a diskuse	27
4.1. Volba separačního systému	27
4.2. Kalibrace	32
4.3. Stanovení D- a L- alaninu v ovocném džusu.....	35
4.4. Derivatizace enantiomerů alaninu pomocí DBS-Cl.....	37

5. Závěr	39
6. Použitá literatura	40

Seznam zkratek

AMK	Aminokyseliny
ALA	Alanin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním módu
MS	Hmotnostní spektrometrie
CSP	Chirální stacionární fáze
GC	Plynová chromatografie
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
MECC	Micelární elektrokinetická chromatografie
CEC	Kapilární elektrochromatografie
MA	Makrocyclická antibiotika
TAG	Teikoplanin aglykon
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Oblast viditelného světla
BITC	Butylisothiokyanát
BZITC	Benzylisothiokyanát
DNS-Cl	Dansyl chlorid
DBS-Cl	Dabsyl chlorid
Fmoc	Fluorenylmethoxykarbonyl
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
DNB	Dinitrobenzyl chlorid
<i>t</i> -BOC	<i>N</i> -terc-butyloxykarbonyl
BOC-L-cys	<i>N</i> -tert-butyloxycarbonyl-L-cystein
NBD-F	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
IBLC	<i>N</i> -isobutyryl-L-cystein
NALC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein

1. Úvod

Chirální vlastnosti aminokyselin obecně jsou nejen velmi zajímavé, ale také důležité, neboť většina aminokyselin je na Zemi přítomna ve formě D- a L- enantiomerů, jež se odlišují nejen svou strukturou, ale i rozdílnými vlastnostmi projevujícími se v mnoha ohledech, jako je například chuť a vůně. Mezi ty závažnější pak můžeme zařadit například odlišné fyziologické a biologické vlastnosti.

Vzhledem k tomu, že je četnost výskytu aminokyselin na Zemi celkem vysoká, patří jejich enantiomery k nejlépe prozkoumané skupině chirálních sloučenin a metody, které jednotlivé enantiomery určují, jsou dnes již velmi dobře zvládnuté a stále se zdokonalují.

Problematika separace jednotlivých forem aminokyselin se objevuje například v potravinářství, kde je možné díky znalostem chirálních vlastností upravovat různé vlastnosti jednotlivých produktů, ale také zjišťovat, jak jsou jednotlivé potraviny kvalitní, nebo naopak nekvalitní, neboť při zpracování produktů může docházet k racemizaci aminokyselin přítomných v peptidech a proteinech. Tento proces může probíhat rozdílnou rychlostí, která závisí právě na vnějších podmínkách. Mezi důležité aminokyseliny, užívající se k účelu stanovení kvality potravinových výrobků, patří i alanin, jehož enantioseparací jsem se rozhodla ve své bakalářské práci věnovat.

Cílem této bakalářské práce je tedy shrnutí základní problematiky chiralit, problematiky chirálních aminokyselin v potravinách, základní charakteristika vysokoúčinné kapalinové chromatografie, jako jedné z nejvhodnějších metod k dělení jednotlivých enantiomerů a v experimentální části pak separace jednotlivých enantiomerních forem alaninu, jež nám ve vzorcích ovocného džusu, u nichž budeme zjišťovat jejich přítomnost, zároveň může pomoci určit jejich kvalitu.

2. Teoretická část

2.1. Chiralita a enantiomery

Chiralita ^{1,2} je pojem, který popisuje schopnost molekul tvořit enantiomery. Tyto látky, jež nemají střed, osu, ani rovinu souměrnosti, jsou jedním z základních fenoménů organické chemie. Většina přírodních látek je chirálních a vyskytuje se ve formě enantiomerů či racemátů.

Enantiomery popisujeme jako prostorové izomery mající stejnou chemickou strukturu, jež jsou ve vzájemném vztahu vzoru a jeho zrcadlového obrazu. ³ Jejich dalšími charakteristickými rysy mohou být stejné fyzikální a chemické vlastnosti v achirálním prostředí. Naopak mezi vlastnosti kterými se odlišují můžeme zařadit jejich schopnost tvořit odlišné krystaly a stáčet rovinu polarizovaného světla o určitý úhel. Enantiomery stáčejí rovinu polarizovatelného světla o stejný úhel, avšak v opačném směru. ⁴ Tuto schopnost, typickou pro enantiomery, nazýváme optickou aktivitou. ⁵ Ta je způsobena vlivem makroskopického vzorku, nikoliv pouze jedné molekuly. Naopak v chirálním prostředí jsou enantiomery dobře rozlišitelné. ⁶

Racemát je směs dvou enantiomerů o stejné koncentraci. ⁷ Tato směs nejeví žádnou optickou aktivitu, neboť jednotlivé enantiomery mají stejně velkou, ale opačnou hodnotu optické otáčivosti, která se vzájemným působením obou enantiomerů vyruší. S pojmem racemát také souvisí pojem racemizace, což je proces, při kterém se z výchozích čistých enantiomerů stává racemát. Právě tomuto procesu se snažíme v mnoha oblastech předejít, neboť jednotlivé enantiomery mohou mít rozdílné vlastnosti.

2.2. Rozdílné vlastnosti enantiomerů

Přestože bychom enantiomery na první pohled popsali jako velmi podobné látky, z hlediska molekulového rozpoznávání se zásadně liší, a proto se liší i jejich vlastnosti. Rozdíly mezi enantiomery se mohou projevit v rozdílné chuti či vůni těchto látek (například monoterpen S-(+)karvon voní jako kmín, zatímco R-(+)karvon voní po mátě⁸⁾ nebo daleko závažnějšími vlastnostmi, jako je rozdílná fyziologická či obecně biologická aktivita. Například jeden enantiomer může být antiarytmikem (R-sotalol), druhý β -blokátorem (S-sotalol). Jeden může být účinným léčivem a druhý může být jedovatý či teratogenní stejně jako nechvalně známý thalidomid, léčivo podávané ve formě racemické směsi v 50. a na počátku 60. let pro zmírnění příznaků ranních nevolností během těhotenství, kdy R-thalidomid měl sedativní účinky, avšak S-thalidomid byl teratogenní. Navíc při jeho podání docházelo *in vivo* k racemizaci za vzniku S-thalidomidu, teratogenní formy.⁹

2.3. Chiralita aminokyselin

Aminokyseliny jsou látky, jež jsou obsažené ve všech živých organismech, neboť jsou základními stavebními kameny pro proteiny. Z dvaceti aminokyselin, používaných k jejich syntéze, se devatenáct vyskytuje ve formě enantiomerů. Jedinou výjimkou je glycin. L- formy těchto aminokyselin jsou používány k syntéze proteinů a najdeme je ve všech živých bytostech na Zemi. V průběhu stárnutí se L-formy (L-enantiomery) aminokyselin postupně přeměňují v D-enantiomery a pokud organismus zemře, proces racemizace pokračuje. Toho se využívá například při datování stáří biologických materiálů.¹⁰ Protože jsou aminokyseliny velmi zastoupenou skupinou a jejich stanovení není příliš náročné, patří jejich enantiomery mezi nejlépe prozkoumanou skupinu chirálních látek.

2.4. Chiralita aminokyselin v potravinách¹¹

Jak jsem již zmínila, enantiomery aminokyselin se často liší chutí či vůní¹² a mohou být použity jako vhodné ukazatele kvality nebo podmínek zpracování potravin, neboť všechny aminokyseliny přítomné v peptidech i proteinech racemizují, avšak různou rychlostí. Rychlost racemizace je ovlivňována právě vnějšími faktory.¹³

Přítomnost určitého množství D- aminokyselin je přirozená například u kvašených produktů, neboť i všechny mikroorganismy účastníci se procesu kvašení ve své buněčné stěně některé z D-aminokyselin obsahují. Naopak u kvalitních nekvašených produktů či nijak nezpracovaných potravin by se objevit neměly. Mezi skupinu nekvašených produktů můžeme zařadit i ovocné džusy, kterými se budu v této práci zabývat. Protože ovoce D- aminokyseliny neobsahuje, neměly by se objevit ani v ovocných džusech⁸, avšak v mnoha na trhu dostupných džusech bylo významné množství D- alaninu nalezeno.¹⁴ To hovoří o nižší kvalitě ovoce použitého na výrobu džusu, a také o bakteriální kontaminaci produktu.

2.5. Chirální separace v HPLC

Z důvodu rozdílných vlastností jednotlivých enantiomerů, je důležité umět tyto jednotlivé enantiomery velmi dobře odlišit. S tím souvisejí i požadavky, aby metody pro dělení enantiomerů byly vysoce selektivní a separace účinné. Proto se využívají zejména vysokoúčinné separační techniky, jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Abychom oddělili jednotlivé enantiomery v HPLC, můžeme využít dva separační postupy. Prvním z nich je přímé dělení enantiomerů², kdy jsou enantiomery oddělovány ve stereoselektivním separačním prostředí HPLC. Chirální rozdělení je zde možné uskutečnit použitím chirální stacionární fáze (CSP), která je obecně nejčastěji používaná, či chirální mobilní fáze. Protože ve své práci budu používat separaci přímou, tedy chirální HPLC, bude na ni zaměřen i následující text. Druhou možností je nepřímé dělení enantiomerů¹⁵ za využití derivatizace, při níž se vytvářejí diastereomery ještě před vlastní separací. Ta je pak prováděna v běžném, nechirálním HPLC systému.

2.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC¹⁶, dříve též nazývaná vysokotlakou kapalinovou chromatografií, byla vyvinuta jako efektivní a velmi účinná metoda pro stanovení enantiomerů.¹⁷ Mezi další chromatografické metody sloužící k tomuto účelu patří: plynová chromatografie (GC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a superkritická fluidní chromatografie (SFC). Mimo chromatografické metody se pro separaci enantiomerů osvědčily také metody kapilární elektroforézy, a to kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC).

I přes velké množství vhodných chromatografických metod i metod kapilární elektroforézy, je HPLC v mnoha aplikačních oblastech nejužívanější, a to pro analytické i preparativní účely.

Principiálně je metoda HPLC založena na rozdělení sloučeniny mezi dvě fáze, stacionární a mobilní. Stacionární fázi tvoří malé částice jednotného tvaru a jednotné velikosti homogenně vyplňující kolonu. Mobilní fází je kapalina proudící v koloně mezi jednotlivými částicemi. Výsledkem je dynamický stav soustavy, při kterém se jednotlivé komponenty pohybují různou rychlostí přes stacionární fázi, neboť každá částice má různou distribuční rovnováhu v závislosti na velikosti molekuly a rozpustnosti ve fázích, díky čemuž jsou navzájem odděleny.

Kolony pro HPLC bývají plněny velmi malými částicemi, protože velikost částic má značný vliv na separaci, a to proto, že čím menší je velikost částic, tím lze dosáhnout účinnější separace. Protože s klesající velikostí částic dochází k znesnadnění průtoku mobilní fáze kolonou (malé částice kladou značný odpor) je také nutné udat systému vyšší tlak. Toho docílíme pomocí vysokotlaké bezpulzní pumpy, velmi důležité součásti HPLC aparatury. Tato pumpa dodává mobilní fázi velmi vysoký tlak a konstantní průtok, aby mohla projít přes kolonu.

Systémy HPLC můžeme rozdělit na normální a reversní. Při normálním uspořádání je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Naopak při reversním uspořádání (RP HPLC) (reverse phase HPLC) je naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. RP HPLC je již řadu let používána mnohem častěji než normální HPLC.

Mezi výhody HPLC patří vysoká účinnost metody, dobrá opakovatelnost, robustnost (míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení) a možnost analyzovat velké množství strukturně odlišných látek, mezi které patří látky

vysokomolekulární, polární i nepolární, málo těkavé či tepelně nestabilní. V neposlední řadě patří mezi výhody HPLC oproti GC možnost ovlivnit separaci změnou složení mobilní fáze.

2.6.1. Mobilní fáze

Mobilní fází v RP HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Díky tomu má HPLC vysokou flexibilitu i rozsah použití. Mobilní fáze je volena dle fáze stacionární, neboť manipulace s mobilními fázemi jsou prakticky neomezené (jediným omezením je mísitelnost rozpouštědel, respektive rozpustnost složek mobilní fáze) a je jednodušší změnit složení mobilní fáze než použít jinou stacionární fázi.

Dalším požadavkem na mobilní fáze v HPLC je to, aby v ní byl stanovovaný analyt rozpustný, přičemž pro mnoho analytů jsou díky vysoké užívanosti metody mobilní i stacionární fáze již dobře známé.

2.6.2. Stacionární fáze

Vysoké selektivity HPLC se dosahuje díky stacionárním fázím, přičemž hledání účinnějších a univerzálních chirálních stacionárních fází (CSP) pro HPLC je stále aktuálním tématem pro mnoho vědců, zabývajících se právě separacemi enantiomerů. Nejužitečnější a nejčastěji používané CSP¹⁶ jsou schopné oddělit mnoho chirálních sloučenin a zároveň poskytují dobrou účinnost a dlouhodobou stabilitu. Patří sem například CSP na bázi makrocyclických glykopeptidů, známé také jako makrocyclická antibiotika, nebo například polysacharidové, proteinové či cyklodextrinové CSP.¹⁸

Vliv na separaci má kromě již zmíněných fyzikálních vlastností stacionární fáze, jako je tvar a velikost, především charakter chemicky vázané složky.

2.6.2.1. CSP na bázi polysacharidů

Stacionární fáze na bázi polysacharidů ¹⁹ můžeme rozdělit na dvě varianty, a to na variantu, kdy chirální selektor nosič pokrývá (coated CSP) (nevýhodou těchto CSP je jejich nízká stabilita), nebo na variantu, kdy je chirální selektor na nosič vázán (immobilized CSP).

Tyto CSP využívají převážně různé deriváty celulosy či amylasy, ²⁰ přičemž stabilnější konformace celulosy je méně ovlivňována substitucí než flexibilnější struktura amylasy.

CSP na bázi polysacharidů vyráběné v současnosti jsou dostatečně stabilní a lze je používat jak v normálním, tak v reverzním uspořádání.

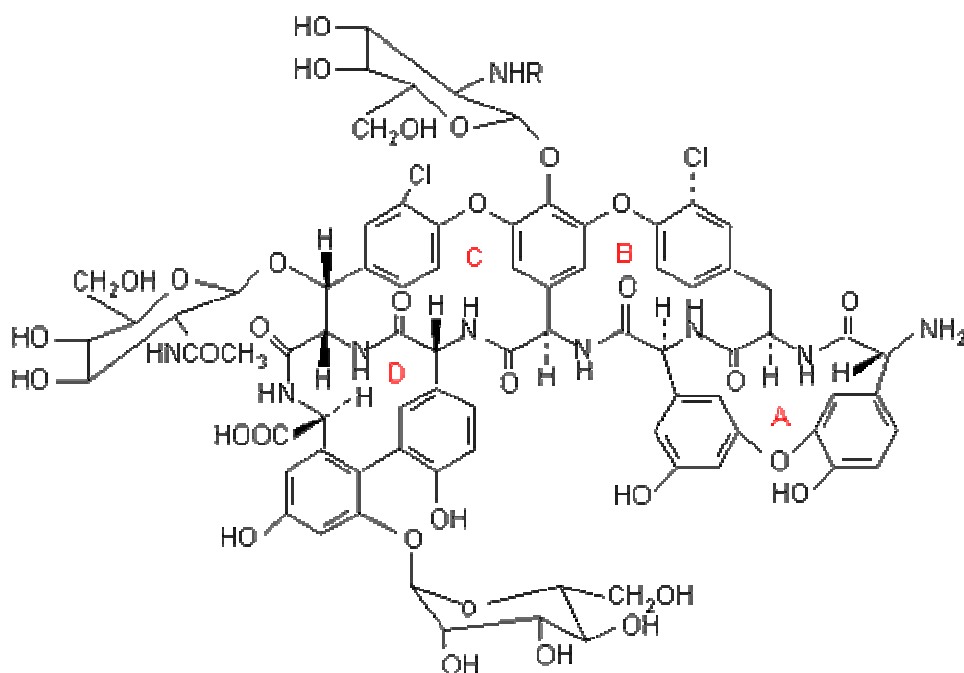
2.6.2.2. CSP na bázi cyklodextrinů

Stacionární fáze tvořené cyklodextriny a jejich deriváty, které se skládají z cyklických oligosacharidů o různém počtu glukopyranosových jednotek, můžeme zařadit mezi nejnámější chirální selektory. ²¹ Tyto CSP jsou schopné dělit strukturně velmi rozmanité enantiomerní páry a můžeme je použít v mnoha mobilních fázích bez nebezpečí, že během procesu dojde ke ztrátě separační účinnosti.

2.6.2.3. CSP na bázi makrocyclických antibiotik

Mezi selektory řadící se do této skupiny patří glykopeptidy. Například teikoplanin, který bude použit v mé práci, vankomycin, ristocentin A a avoparcin. ²² Tyto glykopeptidy nacházející uplatnění v celé řadě chirálních separací, mají mnoho chirálních center a funkčních skupin, jež jim umožňují mnoho různých interakcí potřebných pro chirální dělení. Zajímavé je, že CSP s různými makrocyclickými antibiotiky (MA) se chovají komplementárně. Pokud tedy dojde při použití určité mobilní fáze pouze k částečné enantioseparaci analytu za použití jednoho druhu MA, pak při zachování použité mobilní fáze se velmi často docílí úplné enantioseparace s jiným MA, respektive CSP. ¹⁸

2.6.2.3.1. Teikoplaninové CSP



Obrázek 1: Struktura teikoplaninu

Teikoplanin (Obrázek 1: Struktura teikoplaninu) je směsí několika izomerů, kterou tvoří pět hlavních komponent, označovaných jako teikoplanin A2-1 až A2-5 a čtyři menší komponenty, značené jako teikoplanin RS-1 až RS-4. Molekula teikoplaninu má 20 chirálních center a velmi složitou strukturu, díky které má teikoplanin možnost, stejně jako již zmíněná ostatní MA, využívat opravdu velmi mnoho různých interakcí potřebných pro chirální dělení. Teikoplaninová CSP je považována za velmi účinnou chirální stacionární fázi a může být použita v normálním i reverzním režimu systému HPLC. Navíc lze použít polárně organickou mobilní fázi. Teikoplanin má velmi vysokou selektivitu pro řadu molekul, mezi něž můžeme zařadit například nederivatizované α -, β -, γ -aminokyseliny, cyklické aminokyseliny, N-derivatizované aminokyseliny, kyselé látky, fenoly, malé peptidy, neutrální aromatické analyty a cyklické, aromatické a alifatické aminy. Protože se ukázal být velmi vhodným chirálním selektorem právě pro enantioseparace aminokyselin, použili jsme jej i v této práci.

Aby došlo k co nejlepší separaci enantiomerů, existují speciální požadavky na mobilní fázi, jež se společně s teikoplaninem používají. Bylo zjištěno, že mezi nejvhodnější

mobilní fáze patří jednoduše methanol, či methanol s vodou, které jsou ve spojení s teikoplaninovými CSP vysoce účinné a efektivní.²³

Teikoplaninové CSP můžeme dle pokrytí chirálním selektorem a charakteru chemických vazeb teikoplaninu na silikagelový nosič rozdělit na klasické CHIROBIOTIC T CSP a CHIROBIOTIC T₂ CSP, přičemž CHIROBIOTIC T₂ CSP se vyznačují právě větším pokrytím chirálního selektoru teikoplaninem. V této práci budeme pracovat s oběma teikoplaninovými CSP.

Při modifikaci teikoplaninu za odštěpení cukerných částí molekuly dochází ke vzniku teikoplaninu aglykonu TAG, který vázaný na silikagelovém nosiči, je též považován za velmi dobrou stacionární fázi.

2.7. Derivatizace

Derivatizace může být použita nejen pro vytváření enantiomerů před vlastní separací, ale i jako metoda, která snižuje detekční limit a umožňuje tak detekovat látky, jež jednoduše detekovatelné nejsou.¹⁸ Tento přístup zařazujeme mezi metody nepřímé, pokud se při tomto procesu vytváří i kovalentní diastereomer (chirální látka, jež není přímo enantiomer, tedy zrcadlový obraz vzoru¹). Když k tvorbě diastereomeru nedochází, je proces považován za metodu přímou a derivatizace slouží pouze pro zcitlivění detekce.

Nejen aminokyseliny, zkoumané v této práci, ale i jiné látky mohou být těžko detekovatelné, poněvadž ve své molekule neobsahují ani chromofor pro detekci v ultrafialové (UV) a viditelné oblasti (VIS) spektra, ani fluofofor pro fluorimetrickou detekci²⁴. Proto se tyto skupiny zavádějí do molekuly právě pomocí derivatizace.

Derivatizace může probíhat několika způsoby, a to buď před kolonou (pre-column), za kolonou (post-column), a nebo i na koloně.

2.7.1. Předkolonová derivatizace

Předkolonovou derivatizaci můžeme rozdělit na dvě části dle toho, je-li derivatizační reaktor stabilní součástí chromatografu. Pokud tak tomu je, označujeme derivatizační proces jako on-line.²⁵ Jako off-line označujeme proces, kdy derivatizační reaktor není součástí chromatografu, přičemž nejprve probíhá derivatizační reakce mimo systém a teprve její produkt je aplikován na kolonu.²⁶

Předkolonová derivatizace využívá dostatečně stabilní derivát a ideálně musí probíhat dostatečně rychle, kvantitativně, selektivně, bez vedlejších produktů a za mírných reakčních podmínek. Předkolonová derivatizace je více využívána než-li postkolonová, a to především díky snadnější automatizaci procesu.

2.7.2. Postkolonová derivatizace

Postkolonovou derivatizaci můžeme stejně jako předchozí - předkolonovou derivatizaci rozdělit na off-line a on-line. Protože off-line metoda se u tohoto procesu téměř nevyužívá, považujeme postkolonovou derivatizaci obecně jako on-line.

Pro tuto metodu je typické, že na rozdíl od předkolonové derivatizace nemusí poskytovat jednoznačně chemické individuum, ani probíhat kvantitativně. Je neselektivní, avšak může probíhat za extrémních podmínek, jmenovitě především pH a teplotě. Nejdůležitější při postkolonové derivatizaci je především reprodukovatelnost chemické reakce.²⁷

U postkolonové derivatizace můžeme rozlišit celkem 3 reakční principy dle toho, v kolika krocích celý proces probíhá, a to jednostupňovou derivatizaci, dvoustupňovou derivatizaci a jednostupňovou derivatizaci s tvorbou derivatizačního činidla *in situ* (derivatizační činidlo se tvoří přímo uvnitř reaktoru smísením dvou různých činidel).

2.7.3. Derivatizace alaninu respektive aminokyselin

Derivatizace je v této práci zvažována z důvodu zvýšení citlivosti detekce a umožnění detekce separovaných enantiomerů alaninu vůbec. Protože alanin patří mezi aminokyseliny, které se vyznačují přítomností dvou reaktivních skupin, jmenovitě aminoskupiny a karboxylové skupiny, tvořících 2 ze 3 funkčních skupin, na nichž derivatizace probíhá nejčastěji, můžeme jej zderivatizovat buď derivatizační reakcí přítomné aminoskupiny, nebo karboxylové skupiny. K tomuto účelu může být využito mnoho derivatizačních činidel, mezi něž můžeme zařadit například isokyanáty, isothiokyanáty (například butylisothiokyanát (BITC) a benzylisothiokyanát (BZITC), tj. činidla reagující kvantitativně s 22 standardními aminokyselinami.²⁸), 5-N,N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonyl chlorid, nebo-li dansyl chlorid (DNS-Cl) a další dansyl-deriváty, 4-(dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl chlorid, nebo-li dabsyl chlorid (DBS-Cl)²⁹, fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc)^{30,31}, *o*-ftalaldehyd (OPA)^{32,33} spolu s chirálními thioly pro chirální derivatizaci jak aminokyselin na aminoskupině, tak aminů. Mnoho návodů na použití výše uvedených derivatizačních činidel za využití HPLC shrnuje článek zabývající se kvantifikací aminokyselin a aminů ve stejné matrici.³⁴

Pro derivatizaci aminokyselin na karboxylové skupině se využívá například amidace aminy.

Při předkolumnové derivatizaci se jako nejvhodnější derivatizační činidlo ukázal být *o*-ftalaldehyd, přičemž zderivatizované vzorky se při použití tohoto činidla poté analyzují pomocí RP HPLC v UV-VIS oblasti³⁵, dále dansyl chlorid³⁶ a dinitrobenzylchlorid (DNB), přičemž N-deriváty vzniklé působením tohoto činidla lze vhodně separovat metodou HPLC s CYCLOBOND I 2000 RN či SN – jako stacionární fází v normálním módu.

V této práci nebude derivatizace sledována pro zlepšení enantioseparace, ale jen pro vylepšení detekčních možností aminokyselin. K tomu použijeme derivatizace předkolumnové pomocí derivatizačního činidla DBS-Cl.

2.8. Chirální separace alaninu pomocí HPLC

Enantiomery alaninu mohou být separovány jednotlivě, či ve skupině s ostatními aminokyselinami. Protože pro separaci alaninu nebývají určeny specifické požadavky, jsou postupy, jež se k separaci využívají povětšinou obecné pro všechny aminokyseliny.

Přístup k separaci přirozených L- a D- aminokyselin volíme podle toho, zda-li jsou aminokyseliny již zderivatizované využitím nejrůznějších derivatizačních činidel, či nikoliv.²³ Pokud tomu tak je a L- či D- aminokyseliny byly zderivatizované za vzniku derivátu blokujícího aminoskupinu, můžeme k separaci použít kombinaci nejrůznějších mobilních a stacionárních fází. Mezi vhodné stacionární fáze můžeme zařadit například teikoplaninovou nebo ristocetinovou v reverzním módu. Obě tyto chirální stacionární fáze v reverzním módu lze využít pro separaci derivátů enantiomerů aminokyselin za použití DNS-Cl.

Pro nederivatizované aminokyseliny se jako nejlepší reverzní separační systém jeví teikoplaninová CSP s methanolem a vodou (pufr není třeba) jako mobilní fáze. Tento systém bude použit i v této práci.

Na konec této kapitoly bych ráda uvedla několik praktických příkladů využití separace enantiomerů alaninu pomocí HPLC, neboť jejich separace byla v letech předchozích prováděna v mnoha oborech vědy a techniky.

V principu můžeme metody, které enantioseparaci aminokyselin využívají rozdělit podle způsobu derivatizace či separace, nebo například podle účelnosti. Separace aminokyselin se uplatňuje převážně ve dvou odvětvích. Prvním z nich jsou průzkumy zabývající se pochopením různých biologických procesů. Druhé uplatnění, rozvíjející se v posledních letech, našla separace alaninu v potravinářství, přičemž právě toto uplatnění je klíčové pro mou práci.

Poněvadž se separace D- a L- alaninu i jiných D- a L- aminokyselin pomocí HPLC stala velmi důležitou pro porozumění fungování a distribuce jednotlivých enantiomerních forem v tělech savců, mezi které se řadíme i my, začala se tato enantioselektivní metoda (společně s ostatními citlivými enantioselektivními metodami) velmi rozvíjet.

Pokrok a vývoj chirální separace a selektivní detekce savčích D-aminokyselin v metodách, jako jsou GC/MS, HPLC/fluorescence, HPLC/MS-MS můžeme najít v různých publikacích.³⁷

Obecně se separace a detekce enantiomerů alaninu a aminokyselin v HPLC provádí v reverzním módu po předchozí derivatizaci, jež je prováděna za využití derivatizačních činidel umožňujících nebo zlepšujících detekci zavedením fluoroforu do molekuly aminokyseliny (pro fluorescenční detekci). Derivatizačním činidlem používaným k této derivatizaci bývá nejčastěji OPA.^{37,38,39} Mezi další běžně užívaná derivatizační činidla pak můžeme zařadit DNS-Cl, FMOC, N-*tert*-butyloxycarbonyl-L-cystein (BOC-L-cys), či 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F).⁴⁰

Mezi výzkumy využívající separace aminokyselin a alaninu v tkáních savců můžeme zařadit například stanovení jejich D-formy v mozku mutovaných myší, postrádajících enzymovou činnost oxidáz. Při tomto stanovení byl využit reverzní systém HPLC a předkolumnová derivatizace s derivatizačními činidly jako jsou OPA a BOC-L-cys. Proces byl proveden na ODS koloně udržované při 35°C, za použití dvou mobilních fází, a to mobilní fáze A obsahující acetonitril a 0.1 M pufr octanu sodného (pH 6.0) v poměru 9/91 (v/v) a mobilní fáze B obsahující tytéž složky v poměru 16/84 (v/v).⁴¹

Velké zastoupení má i dvoudimenzionální HPLC, jež zajistí selektivnější separaci. Tento systém se využívá například při stanovení malých množství D-aminokyselin a D-alaninu v tkáních savců v průběhu stárnutí (derivatizace je docílena opět za použití OPA a BOC-L-cys⁴²) či při stanovení D- a L-alaninu v různých tkáních savců, jmenovitě krysy, v průběhu dne.⁴³ Určení malých množství D-aminokyselin a D-alaninu v tkáních savců pomocí dvoudimenzionální HPLC se využívá i pro lékařské výzkumy, neboť D-enantiomery aminokyselin se staly novými fyziologicky účinnými látkami a signálními molekulami nemocí.⁴⁴ Aparatura pro selektivní stanovení pomocí dvoudimenzionálního systému HPLC se skládá z mikro-ODS kolony zajišťující, aby aminokyseliny, jež mají být separovány, byly odděleny od ostatních látek a chirální kolony, na které jsou jednotlivé enantiomery aminokyselin odděleny. Před mikro-ODS kolonou probíhá ještě derivatizace pomocí NBD-F. Fluorescenční detekce je prováděna při 530 nm. Pro alanin je jako mikro-ODS kolona využíván Mightysil RP-18 GP a Sumichiral OA-2500S jako chirální stacionární fáze. Mobilní fází pro tuto chirální kolonu byl 5mM roztok kyseliny citronové s MeOH.

V druhém odvětví, využívajícím separace D- a L- alaninu, nalezneme taktéž velké množství zajímavých prací.

Aminokyseliny najdeme v potravinách buď jako volné molekuly, nebo ve formě proteinů a peptidů. Protože i zde mají jednotlivé enantiomerní formy různé vlastnosti, je nutná jejich separace. Obecně je uvažován příznivý vliv L- aminokyselin v potravinách. Naopak u D- aminokyselin najdeme v literatuře mnohé neshody o jejich prospěšnosti. Některé z nich byly potvrzeny mnohými výzkumy.⁴⁵

Separace a determinace D- a L- aminokyselin, respektive D- alaninu, v potravinách může být prováděna za využití HPLC spojené se specifickými enzymovými reakcemi a citlivou elektrochemickou detekcí. Proces je prováděn z toho důvodu, že zjištění D- alaninu v některých potravinářských výrobcích (jako je víno, ovocné džusy, pivo či cherry) nás informuje o jejich bakteriální kontaminaci. Jiné je to u kvašených výrobků, jako jsou mléčné výrobky, jogurty, sýry či u mořských plodů (ústřic), kde je jejich přítomnost přirozená.⁴⁵ V systému je enzymový reaktor (začleněný za kolonu), v němž probíhají reakce s komerčně dostupnými oxidázami D- a L- aminokyselin způsobující jejich deaminaci za vzniku peroxidu vodíku, jež je později detekován elektrochemicky. Separace je založena na kationtové výměnném principu. Obecně je nutná jen jednoduchá předpříprava vzorků bez předchozí izolace a derivatizace.⁴⁶ Ty mohou být během procesu vynechány, avšak pro zlepšení detekce D- alaninu (ale i u jiných aminokyselin) se jako derivatizační činidlo přidává OPA v kombinaci s *N*-isobutyryl-L-cysteinem (IBLC) či *N*-acetyl-L-cysteinem (NALC) za využití fluorescenční detekce. Jako stacionární fáze se používá lithiová kationtově výměnná kolona v kombinaci s lithiovým pufrem o pH 2,9, či 3,4 jako mobilní fází.⁴⁷

Chirální separace aminokyselin a alaninu se uplatňuje také při určení těchto látek v ovocných džusech. Aminokyseliny mohou být v ovocných džusech monitorovány ve formě (1-fluoro-2,4-dinitrofenyl)-5-L-alaninamid derivátů pomocí HPLC, využívající C-18 kolonu s acetonitrilem a vodou v různých objemových poměrech o pH 3, jako mobilní fázi.⁴⁸ Přímo pomerančové džusy pak můžeme charakterizovat a analyzovat pomocí HPLC v kombinaci s MS/MS detekcí, kde se vhodné separace docílí použitím acidix kolony od firmy Allure s vodou a acetonitrilem v poměru 20/80 (v/v), či vodou a methanolem v poměru 10/90 (v/v) při pH 3, jako mobilní fází.⁴⁹

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf:

Pumpa: DeltaChrom™ SDS 030 WATREX®, Praha, Česká Republika

Detektor: DeltaChrom™ UVD 200 WATREX®, Praha, Česká Republika

Dávkovací ventil: RHEODYNE s dávkovací smyčkou 20 µl, Cotati, CA, USA

Injekční stříkačka: objem 25 µl, Hamilton, Reno, Nevada, USA

Kolony:

CHIROBIOTIC T2 (délka: 25 cm, průměr: 4,6 mm, zrnění 5µm) Astec (Supelco)

CHIROBIOTIC T (délka: 25 cm, průměr: 4,6 mm, zrnění 5 µm) Astec (Supelco)

Filtry:

SPARTAN® 13, 0,45 µm, Whatman®, Německo

Minisart® 5,00 µm, Santorius, Německo

Minisart® 0,45 µm, Santorius, Německo

Další přístroje:

Ultrazvuková lázeň: Tesla, Česká Republika

Váhy: METTLER AE 240, Greinfensee, Švýcarsko

Centrifuga: Centrifuge 5418, Ependorf, Hamburg, Německo

Spektrofotometr: Helios α, CHROMSPEC, Velká Británie

Filtrovací systém pro přípravu deionizované vody: Mili-Q, Millipore, Milford, MA, USA

3.2. Použité chemikálie

Methanol , Sigma-Aldrich, Česká Republika

Izopropanol, Sigma- Aldrich, Česká Republika

Deionizovaná voda

DL-alanin, Lachema n.p., Česká Republika

D-alanin, Fluka Analytical, Německo

Pomerančový džus A: Dizzy, Lidl Stiftung & CO. Kg

Hydrogenuhlíčan sodný, Fluka Analytical, Německo

Aceton, Penta, Česká Republika

3.3. Roztoky vzorků

Roztoky použité pro porovnání separačních vlastností DL- alaninu a D- alaninu v jednotlivých mobilních a na obou stacionárních fázích byly připraveny rozpuštěním 1 mg těchto chemikálií v 1,00 ml destilované vody. Vzhledem k tomu, že při přípravě roztoku nedošlo k úplnému rozpuštění vzorku v použitém objemu vody, byly jednotlivé roztoky následně přefiltrovány.

Roztoky, použité pro sestavení kalibrační přímky závislosti plochy/výšky píku na koncentraci, byly připravené rozpuštěním 1,00 mg (přesně 1,02 mg) DL – alaninu v 5 ml destilované vody. Z tohoto množství bylo následně připraveno 5 roztoků o různých koncentracích, a to tak že původní množství roztoku bylo zředěno vodou v poměrech 5:0, 4:1, 3:2, 2:3 ,1:4 (viz Tab. 1).

Vzorky pomerančového džusu použité pro stanovení D a L-alaninu byly přefiltrovány přes 5,00 μm a následně přes 0,45 μm filtr značky Minisart.

Z takto připravených vzorků bylo odebráno nejprve 1,00 ml a poté 0,50 ml roztoku a toto množství bylo obohaceno vždy 1,00 mg DL-alaninu. Filtrace vzorků zde nebyla nutná, neboť DL-alanin se v pomerančovém džusu rozpouštěl bez problémů.

Vzorky DBS-Cl derivátů D- a L-alaninu byly připraveny následujícím postupem: roztoky aminokyselin připravené rozpuštěním D- a L- alaninu v 1M roztoku

hydrogenuhličitanu sodného v koncentraci 1,00 mg/ml (pH 9,0) byly smíseny se stejným množstvím roztoku DBS-Cl v acetonu (1,00 mg/ml) a tato směs ponechána reagovat při 50°C po dobu 25 minut. Po uplynutí tohoto času byla reakce zastavena prudkým ochlazením vzorků pomocí ledové lázně. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 15 min při rychlosti 6000 rpm a nakonec ještě přefiltrovány.

Tabulka 1 : Příprava roztoků pro kvantitativní analýzu

Č. vzorku	Původní roztok [ml]	Destilovaná voda[ml]	Výsledná koncentrace [mg/ml]
1.	5,00	0,00	0,20
2.	4,00	1,00	0,16
3.	3,00	2,00	0,12
4.	2,00	3,00	0,08
5.	1,00	4,00	0,04

3.4. Podmínky měření a mobilní fáze

Měření proběhlo za standardních laboratorních podmínek na sestavě přístrojů, která je zobrazena na obrázku č.2 . Průtok mobilní fáze kolonou byl konstantní a jeho hodnota byla 0,70 ml/min. Detekce byla prováděna nejdříve při vlnové délce 200 nm, kdy je alanin vidět nejlépe, ale poněvadž při této vlnové délce vznikaly problémy s detektorem, byla později přenastavena na 205 nm.

Během měření byly vystřídány celkem dvě kolony CHIROBIOTIC T2 a CHIROBIOTIC T a několik mobilních fází, které se skládaly z methanolu a vody v různých poměrech.

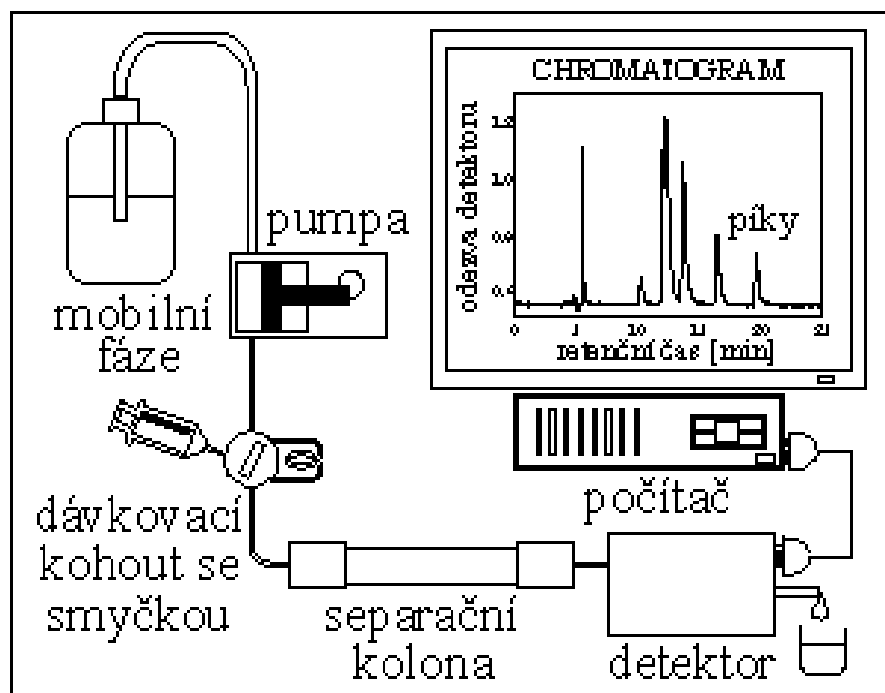
Mobilní fáze:

Methanol / voda v poměru 70 / 30 (v/v)

Methanol / voda v poměru 60 / 40 (v/v)

Methanol / voda v poměru 50 / 50 (v/v)

Methanol / voda v poměru 40 / 60 (v/v)



Obrázek 2: Sestava zařízení pro HPLC (převzato: web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr21.gif)

3.5. Použité vztahy

Pro vyjádření naměřených dat byly použity následující vztahy:

Výpočet retenčního faktoru k :

$$k = t_r - t_0 / t_0$$

Výpočet selektivity:

$$\alpha = k_{(D-ALA)} / k_{(L-ALA)}$$

Výpočet rozlišení:

$$R = 2(t_{R(D-ALA)} - t_{R(L-ALA)}) / w_{(L-ALA)} + w_{(D-ALA)}$$

Výpočet výšky šumu nulového vzorku:

$$S = h_{0\max} - h_{0\min}$$

Výpočet pro stanovení meze detekce:

$$LOD = 3 S$$

Výpočet pro stanovení meze stanovitelnosti:

$$LOQ = 10 S$$

Použité symboly:

k - retenční faktor

t_r - retenční čas píku

t_0 - mrtvý čas (retenční čas nesorbující látky)

w - šířka píku při základně

α - selektivita

R - rozlišení

S - výška šumu signálu nulového vzorku

$h_{0\max}$ - výška signálu nulového vzorku v maximu

$h_{0\min}$ - výška signálu nulového vzorku v minimu

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

4. Výsledky a diskuse

4.1. Volba separačního systému

K určení enantiomerů alaninu byly použity dvě stacionární fáze a to CHIROBIOTIC T a CHIROBIOTIC T2, jež se vzájemně liší pokrytím silikagelového nosičem chirálním selektorem a charakterem chemických vazeb teikoplaninu na nosič. U obou stacionárních fází bylo provedeno měření s různými mobilními fázemi a získané výsledky byly porovnány.

Vzhledem k tomu, že údaje získané z měření na jednotlivých kolonách byly velmi podobné (srov. Tab. 2 a 3), ukázalo se, že při separaci enantiomerů alaninu nezáleží na tom jak moc je nosič pokryt teikoplaninem. Interakce jsou zřejmě na obou CSP podobné a proto se retenční faktor ani selektivita příliš nemění a i rozlišení je málo odlišné.

Během této práce bylo použito několik mobilních fází tvořených methanolem a vodou v různých poměrech, aby bylo možné zjistit, jaká bude pro naši práci nejvhodnější. Srovnání jednotlivých mobilních fází nalezneme v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3). Při měření na koloně CHIROBIOTIC T byl mrtvý čas pro jednotlivé mobilní fáze změřen pomocí jodidu draselného. U kolony CHIROBIOTIC T2 byla pro všechny mobilní fáze použita pouze jedna hodnota mrtvého času, získaná při měření s mobilní fází metanol/voda v poměru 50/50 (v/v), neboť byla nejnižší.

Vzhledem ke zjištěným údajům se ukázalo, že nejvhodnější mobilní fází je methanol/voda v poměru 50/50 (v/v). Při větším obsahu organické fáze docházelo k zvýšení retenčního času, selektivity i rozlišení. Naopak při zvýšení obsahu vodné fáze docházelo ke zkrácení doby analýzy, ale také ke zhoršení rozlišení.

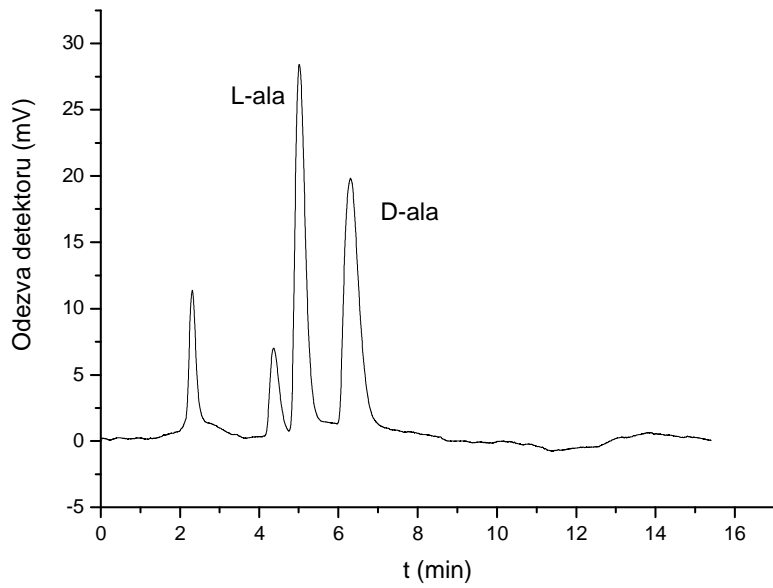
Tabulka 2: Porovnání separace enantiomerů alaninu v různých mobilních fázích na koloně CHIROBIOTIC T2

MeOH /H ₂ O	t ₀ [min]	t _R (D-ALA) [min]	t _R (L-ALA) [min]	w (D-ALA) [min]	w (L-ALA) [min]	k (D-ALA)	k (L-ALA)	α	R
40/60	2,29	6,29	5,02	1,13	0,86	1,75	1,20	1,47	1,28
50/50	2,29	7,37	5,71	1,11	0,93	2,22	1,50	1,48	1,63
60/40	2,29	8,37	5,85	1,41	1,12	2,66	1,56	1,71	1,99
70/30	2,29	9,77	6,52	1,54	0,93	3,27	1,85	1,77	2,64

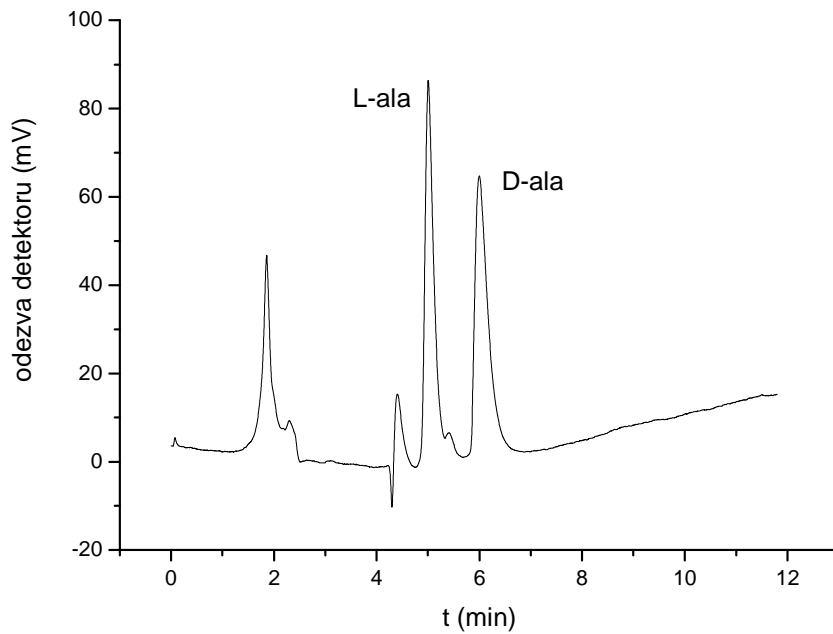
Tabulka 3: Porovnání separace enantiomerů alaninu v různých mobilních fázích na koloně CHIROBIOTIC T

MeOH /H ₂ O	t ₀ [min]	t _R (D-ALA) [min]	t _R (L-ALA) [min]	w (D-ALA) [min]	w (L-ALA) [min]	k (D-ALA)	k (L-ALA)	α	R
40/60	2,25	6,00	5,00	1,18	0,93	1,67	1,23	1,36	0,94
50/50	2,25	7,25	5,57	1,06	0,92	2,22	1,48	1,50	1,70
60/40	2,25	8,32	6,03	1,39	0,93	2,70	1,68	1,61	1,97
70/30	2,27	10,34	6,95	1,57	1,34	3,56	2,06	1,73	2,33

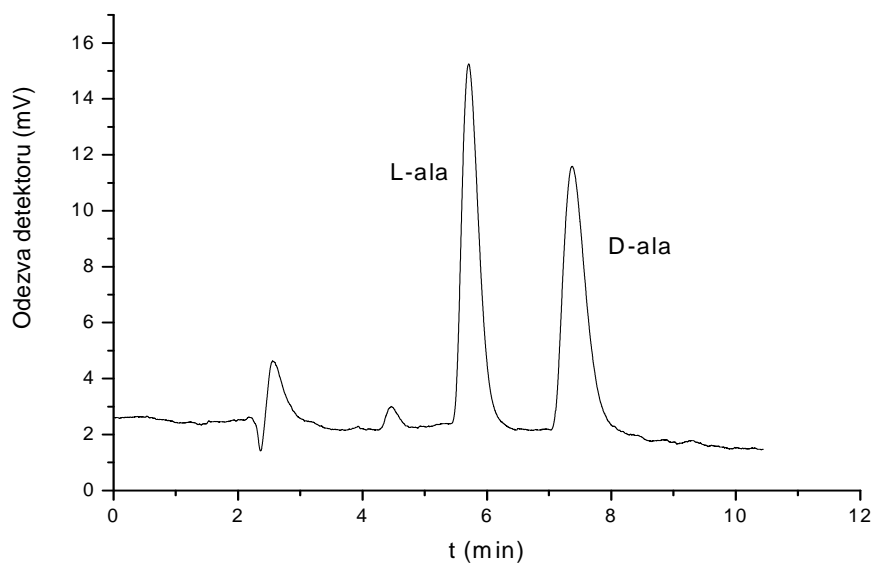
Chromatogramy v obr. 3-7 ukazují separace enantiomerů alaninu v různých testovaných separačních systémech.



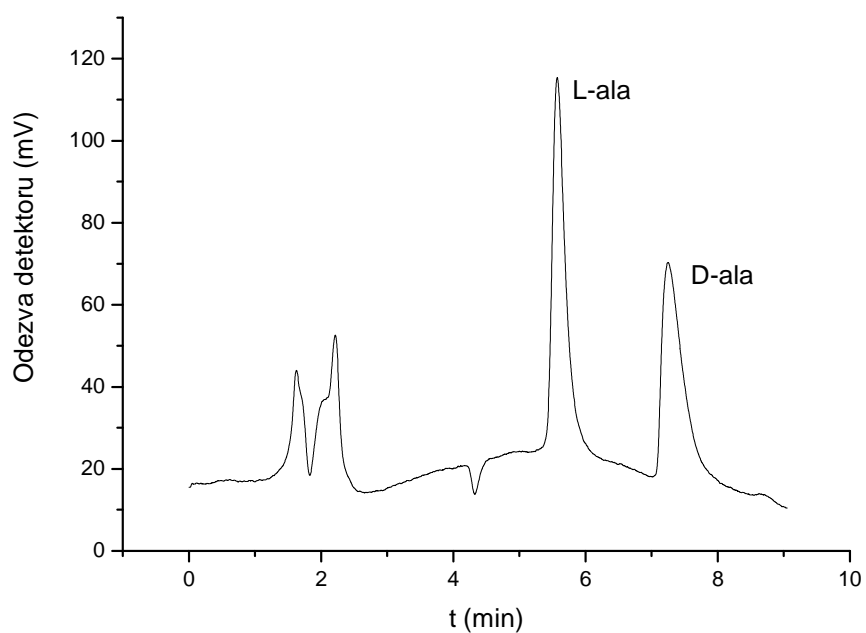
Obrázek 3: Chromatogram separace D- a L- alaninu na koloně CHIROBIOTIC T2 při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 40/60 (v/v)



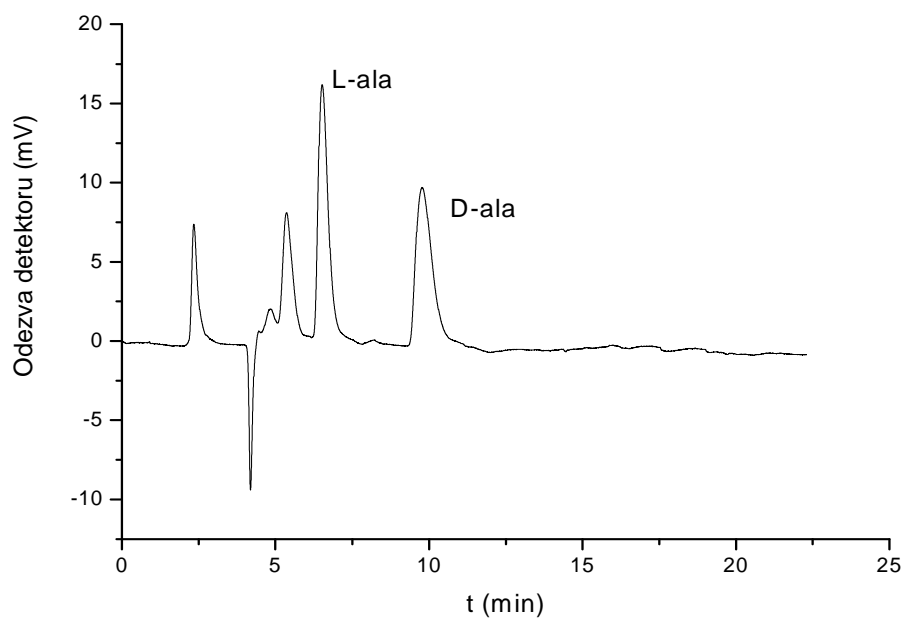
Obrázek 4: Chromatogram separace D- a L- alaninu na koloně CHIROBIOTIC T při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 40/60 (v/v)



Obrázek 5: Chromatogram separace D- a L- alaninu na koloně CHIROBIOTIC T2 při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v)



Obrázek 6: Chromatogram separace D- a L- alaninu na koloně CHIROBIOTIC T při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v)



Obrázek 7 : Chromatogram separace D- a L- alaninu na koloně CHIROBIOTIC T při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 70/30 (v/v)

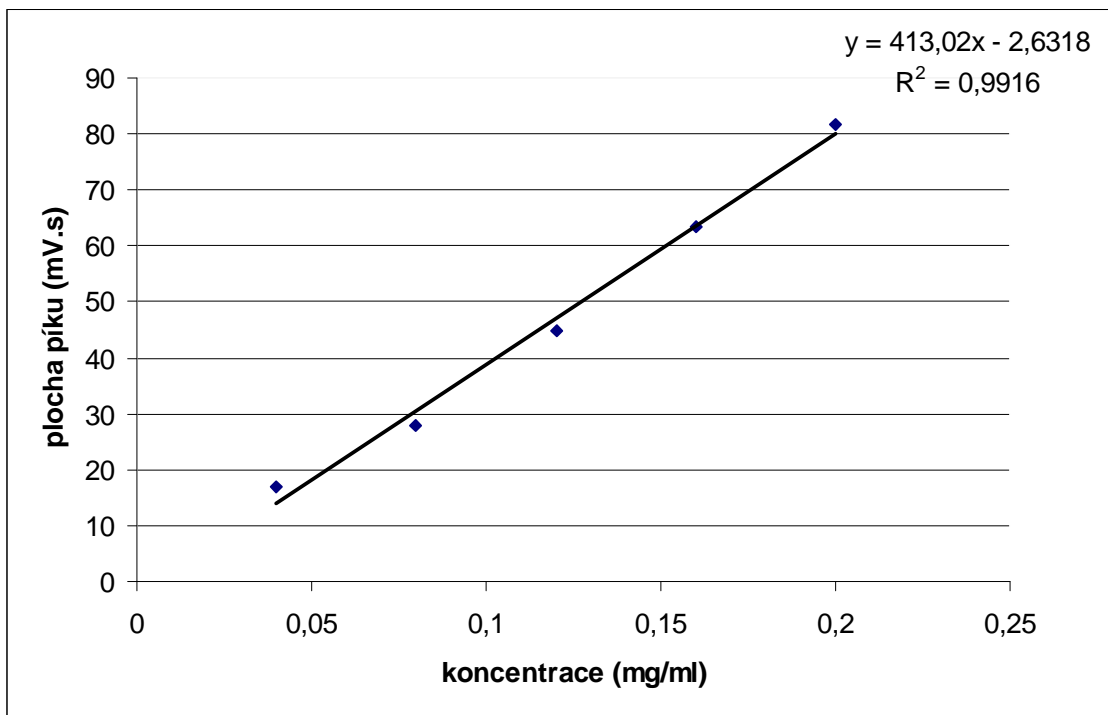
4.2. Kalibrace

Abychom mohly provést stanovení D- a L- alaninu, bylo nejprve nutné připravit si kalibrační závislost plochy / výšky píku D- a L- alaninu na koncentraci vzorků standardů.

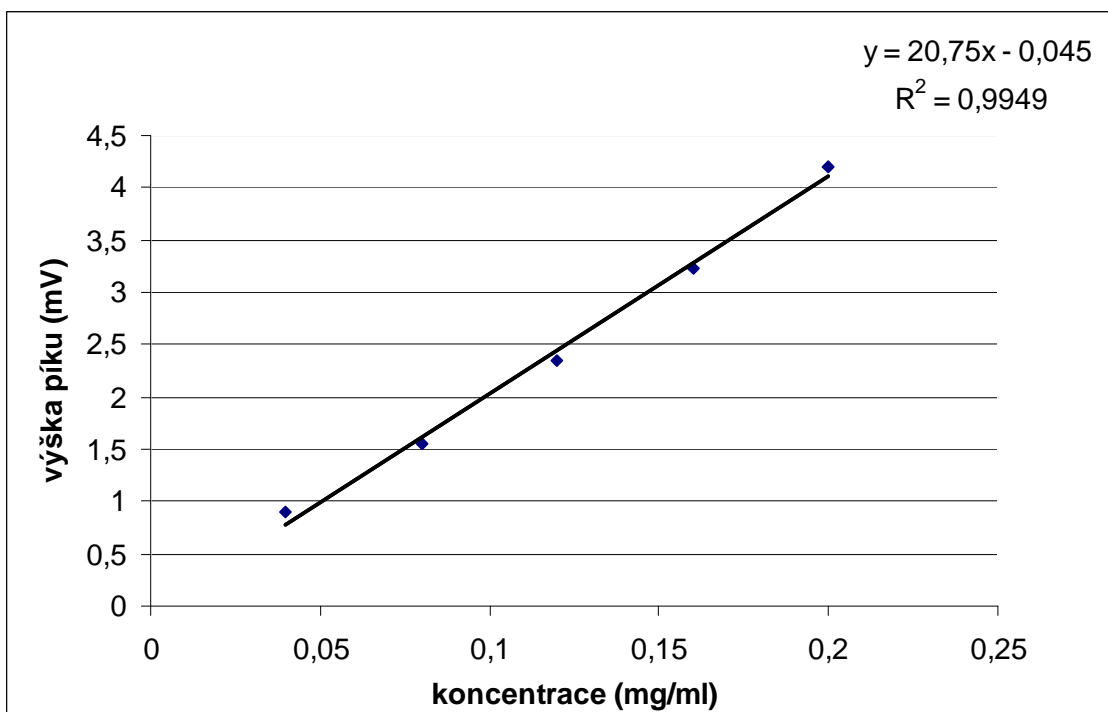
Kalibrace byla provedena na koloně CHIROBIOTIC T2 s mobilní fází methanol/voda v poměru 50 / 50 (v/v), neboť tento separační systém se ukázal jako nejvhodnější. Jako standardy byly použity roztoky DL- alaninu o různých koncentracích. Naměřené hodnoty jsou uvedené v tabulce č.4 a graficky zpracované na obr. 8-11.

Tabulka 4: Data pro kalibrační závislosti

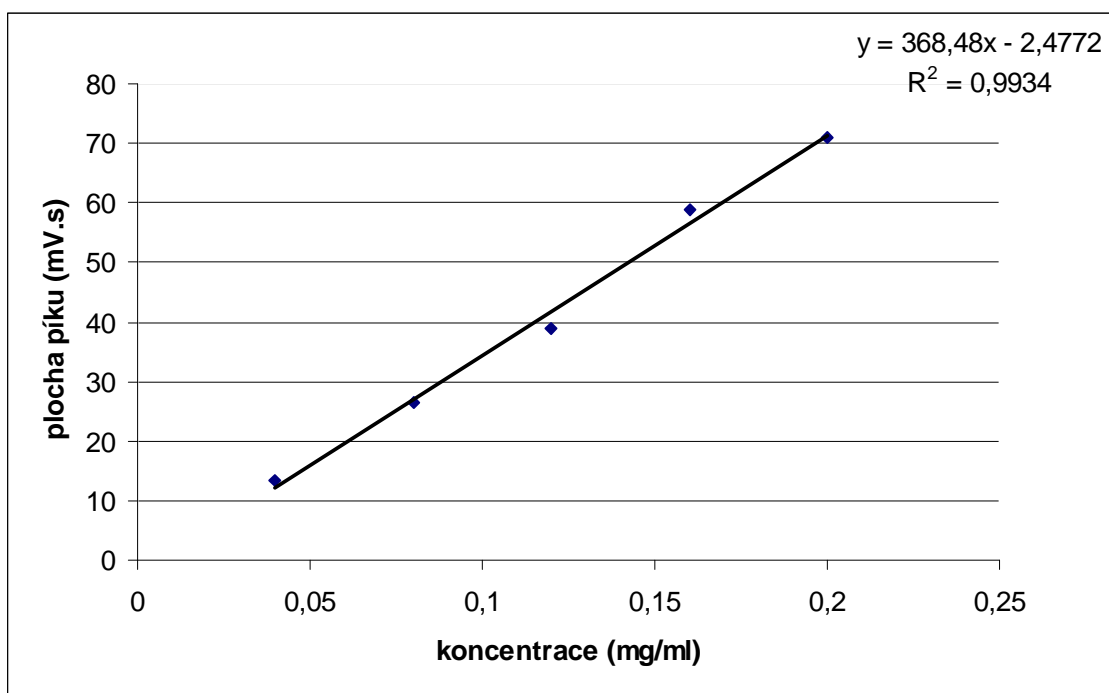
koncentrace (mg/ml)	Vzorek číslo	číslo měření	Plocha píku L-ALA [mV.s]	Plocha píku D-ALA [mV.s]	Výška píku L-ALA [mV]	Výška píku D-ALA [mV]
0,20	1	1	86,21	63,25	4,11	2,66
0,20	1	2	78,76	76,45	4,13	2,98
0,20	1	3	80,27	73,11	4,35	3,04
0,20	1	průměr	81,75	70,94	4,20	2,89
0,16	2	1	64,30	62,94	3,45	2,54
0,16	2	2	63,32	54,24	3,15	2,18
0,16	2	3	62,37	59,30	3,12	2,23
0,16	2	průměr	63,33	58,82	3,24	2,32
0,12	3	1	47,90	38,29	2,49	1,68
0,12	3	2	42,62	37,27	2,24	1,73
0,12	3	3	44,01	41,58	2,31	1,75
0,12	3	průměr	44,84	39,05	2,35	1,72
0,08	4	1	25,86	27,37	1,55	1,06
0,08	4	2	30,15	27,15	1,63	1,07
0,08	4	3	27,54	24,94	1,48	1,10
0,08	4	průměr	27,85	26,49	1,55	1,08
0,04	5	1	19,18	13,30	0,97	0,60
0,04	5	2	14,96	12,82	0,80	0,66
0,04	5	3	16,52	14,11	0,90	0,63
0,04	5	průměr	16,89	13,41	0,89	0,63



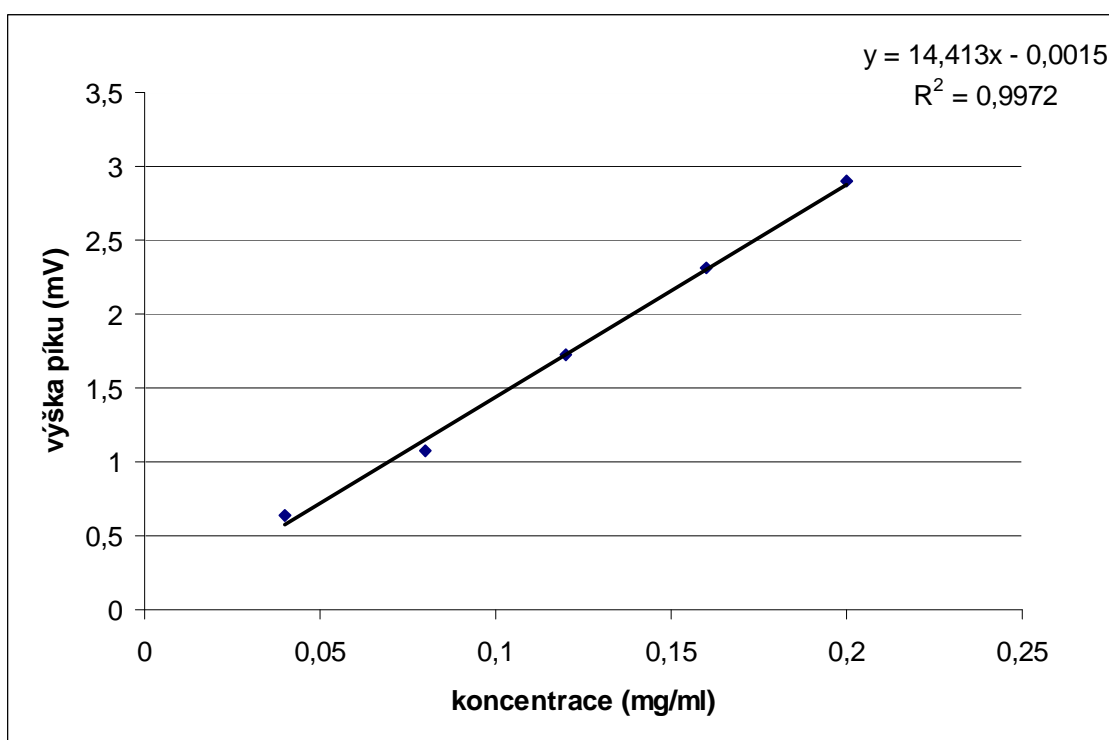
Obrázek 8: Kalibrační závislost plochy píku L-alaninu na koncentraci vzorku



Obrázek 9 : Kalibrační závislost výšky píku L-alaninu na koncentraci vzorku



Obrázek 10 : Kalibrační závislost plochy píku D-alaninu na koncentraci vzorku



Obrázek 11 : Kalibrační závislost výšky píku D- alaninu na koncentraci vzorku

Ze získaných kalibračních závislostí pro výšku píku L-alaninu a D-alaninu jsme vypočítali mez detekce LOD a mez stanovitelnosti LOQ tak, že jsme výšku šumu detektoru odpovídající hodnotě 0,29 mV dosadili do získaných regresních rovnic za veličinu y (v trojnásobku pro výpočet hodnoty LOD a desetinásobku pro výpočet hodnoty LOQ). Hodnota x pak odpovídala hledaným hodnotám koncentrací.

Pro L-alanin byla hodnota LOD 0,04 mg/ml a hodnota LOQ 0,14 mg/ml.

Pro D-alanin byla hodnota LOD 0,06 mg/ml a hodnota LOQ 0,20 mg/ml.

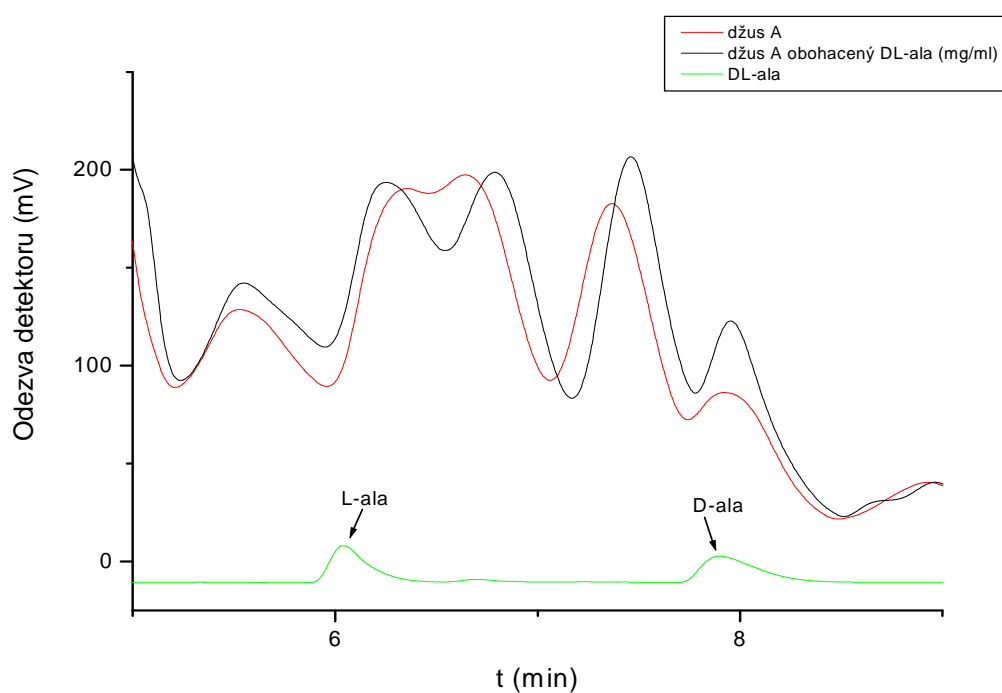
4.3. Stanovení D- a L- alaninu v ovocném džusu

Vzorky pomerančového džusu A: Dizzy, Lidl Stiftung & CO. Kg byly proměřeny při vlnové délce 205 nm na koloně CHIROBIOTIC T v kombinaci s mobilní fází methanol/voda v poměru 50/50 (v/v) (obr.12) a poté s mobilní fází methanol/voda v poměru 80/20 (v/v) (obr.13), neboť při zvolené vlnové délce absorbují téměř všechny látky obsažené v pomerančovém džusu a hledané píky D- a L- alaninu jsou obtížně identifikovatelné v množství píků (odezev) ostatních látek. Upravením mobilní fáze optimalizovaného složení na poměr methanol /voda 80/20 (v/v) jsme chtěli docílit vydělení píků D- a L- alaninu ze skupinu píků odpovídajících dalším látkám obsaženým v pomerančovém džusu zvýšením retenčního času D- a L- alaninu.

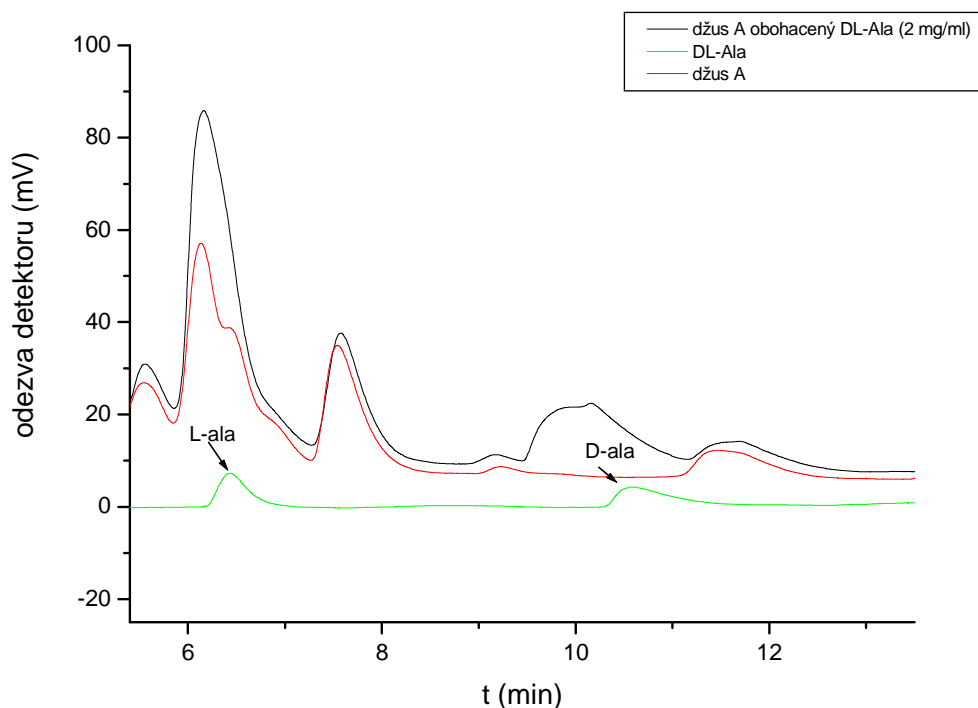
Poněvadž chromatogramy získané proměřením ovocného džusu v různých mobilních fázích nedávaly jasné výsledky, připravili jsme si ještě vzorky ovocného džusu, které jsme obohatili D- a L- alaninem nejprve v koncentraci 1 mg/ml a následně 2mg/ml, neboť první koncentrace neposkytovala příliš dobré výsledky. Tyto vzorky jsme proměřili za stejných podmínek jako ovocný džus. V místech, kde byla při proměření pomerančového džusu přítomnost D- a L- alaninu předpokládána a kde došlo ke zvýšení píků při proměření obohaceného pomerančového džusu, můžeme předpokládat přítomnost jednotlivých forem D- a L- alaninu.

Po vyhodnocení chromatogamu pomerančového džusu při použití mobilní fáze methanol/voda v poměru 80/20 (v/v) lze předpokládat přítomnost D-alaninu, neboť u obohaceného džusu vzrostl pík v místě, kde byla eluce očekávána. Naopak při použití mobilní fáze methanol/voda v poměru 50/50 (v/v) můžeme předpokládat přítomnost L- alaninu, neboť u obohaceného džusu vzrostl jeho pík v místě, kde měl L-alanin eluovat.

Vzhledem k tomu, že kombinace obou měření (s mobilními fázemi o odlišném složení) nepřinesla spolehlivé důkazy přítomnosti jednoho či druhého enantiomeru, nebylo možné přistoupit ani k jejich kvantifikaci. Řešením této situace může být derivatizace enantiomerů alaninu, a tím zvýšení citlivosti detekce.



Obrázek 12: Chromatogram pomerančového džusu A , pomerančového džusu A obohaceného DL-alaninem a DL-alaninu na koloně CHIROBIOTIC T při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v)



Obrázek 13: Chromatogram pomerančového džusu A , pomerančového džusu A obohaceného DL-alaninem a DL-alaninu na koloně CHIROBIOTIC T při použití mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 80/20 (v/v)

4.4. Derivatizace enantiomerů alaninu pomocí DBS-Cl

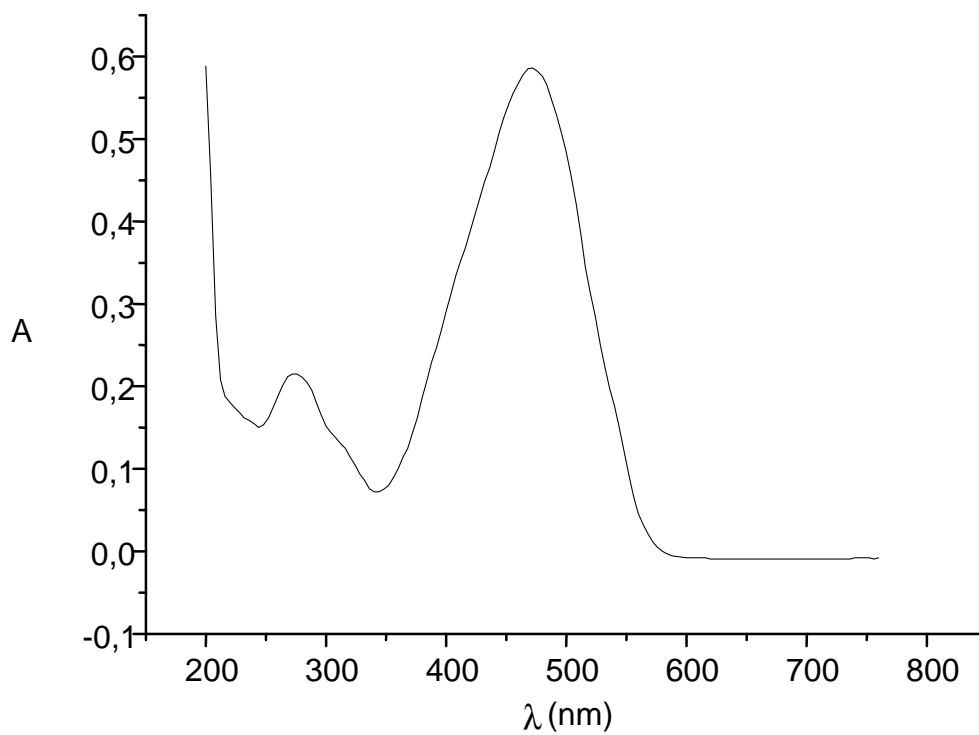
V této byla vyzkoušena derivatizace D- a L- alaninu dabsyl chloridem, pomocí které jsme chtěli docílit zlepšení detekce těchto látek.

Nejprve jsme si proměřili spektrum DBS-Cl (obr.14), abychom zjistily vlnovou délku, při které je absorbance DBS-Cl nejvyšší. Hodnota této vlnové délky byla 470 nm.

Derivatizace byla provedena postupem uvedeným v kap. 3.3.

Připravené zderivatizované vzorky D- a L- alaninu jsme proměřili na koloně CHIROBIOTIC T v mobilních fázích methanol/voda v různých objemových poměrech při zjištěné vlnové délce. Získané výsledky je možné považovat zatím pouze za

orientační. Je zřejmé, že pro úspěšnou separaci deprivatizovaných enantiomerů bude třeba vodu jako složku mobilní fáze nahradit pufrem.



Obrázek 14: Spektrum DBS-Cl

5. Závěr

Stanovení enantiomerů aminokyselin je využíváno v řadě aplikačních oblastí. Mezi metodami používanými pro enantioseparaci aminokyselin zaujímá významné postavení vysokoúčinná kapalinová chromatografie s chirálními stacionárními fázemi.

V této bakalářské práci byly použity pro separaci L- a D- alaninu dvě CSP na bázi teikoplaninu lišící se pokrytím a vazebnou chemií teikoplaninu na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze byly vyzkoušeny směsi vody a methanolu v různých poměrech. Výsledky na obou teikoplaninových kolonách se zásadně nelišily. Nejvhodnější poměr MeOH/H₂O v mobilní fázi byl 50/50 (v/v) na obou CSP.

V optimalizovaném separačním systému byla provedena kalibrace a zjištěny limity detekce a stanovitelnosti, které činily pro L-alanin : 0,04 mg/ml a 0,14 mg/ml a pro D-alanin 0,06 mg/ml a 0,20 mg/ml.

Následně bylo zkoušeno využití metody pro analýzu L- a D- alaninu v pomerančovém džusu. Analýza však nebyla průkazná.

Pro získání spolehlivých výsledků bude třeba provést derivatizaci. Derivatizační postup byl předběžně vyzkoušen za využití dabsyl chloridu.

6. Použitá literatura

1. Kroutil J., v knize: *Analýza chirálních sloučenin*, Chirální organické sloučeniny- přehled typů a jejich názvosloví, Pražské analytické centrum inovací, 2007
2. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2004
3. Mička Z., Lukeš I.: *Anorganická chemie I, Teoretická část*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1998
4. Sterblová E.: *Souhrné texty z chemie, II. Díl.*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2000
5. Tesařová E., Armstrong D.W., v knize: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl Z., ed), kap. 5.. Elsevier, Amsterdam 1998
6. Červinka O.: *Enantioselektivní reakce v organické chemii*, Academia, Praha 1985
7. Červinka O.: Chem. Listy 93, 294 (1999)
8. Srkalová S.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha 2006
9. Knocke B., Blaschke G.: J. Chromatogr., A 666, 235 (1994)
10. Nicholson G. J., Frank H., Bayer E.: J. High Resolut. Chromatogr. 2, 411 (2005)
11. Srkalová S., Kalíková K. Tesařová E.: Chem. Listy 102, 480 (2008)
12. Srkalová S.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 2009
13. Tesařová E., v knize : *Analýza chirálních sloučenin*, Chirální chování v přírodě a chirální separace. Pražské analytické centrum inovací, 2007
14. Marchelli R., Dossena A., Palla G.: Trends Food Sci. Technol. 7, 113(1996)
15. Gubitz G., Schmidt M.G.: Biopharm. Drug Dispos. 22 (2001) 291
16. Gubitz G., Schmidt M.G.(Eds.): *Chiral separations methods and protocols*, Methods in molecular biology, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003
17. Pryde A., Gilbert M.T.: *Applications of high performance liquid chromatography*, University Press, Cambridge, GB 1979 .
18. Tesařová E., v knize : *Analýza chirálních sloučenin*, Enantioselektivní separace v HPLC. Pražské analytické centrum inovací, 2007
19. Zhang T., Nguyen D., Franco P.: J. Chromatogr. A 1217, 1048 (2010)
20. Sugiura Y., Yamamoto C., Akai T., Kamigaito M., Okamoto Y.: Polym. J. 42,31(2010)

21. Tomalová I.: *Bakalářská práce*, Přírodovědecká fakulta Univerzity Masarykovy, Brno 2008
22. Ward T. J., Farris A.B.: *J. Chromatogr.* 906 , 73(2001)
23. *Chirobiotic Handbook: A guide to using macrocyclic glycopeptide binder phase for chiral LC separations*, Advanced Separations Technologies, USA 2004
24. Chang S.C., Wang L.R., Armstrong D.W.: *J. Liq. Chromatogr.* 15,1411(1992)
25. Honda S., Kuwada H.: *Anal. Chem.* 55, 2466 (1983)
26. Gfeller J. C., Huen J. M., Thevenin J. P.: *Chromatographia* 12, 368 (1979)
27. Girelli A. M., Matysek E.: *J. Chromatogr., B* 819, 3 (2005)
28. Kang-Lyung Woo: *Mol. Biotechnol.* 24, 69 (2003)
29. Syu K., Lin Ch., Juany H., Lin J.: *J. Agric Food Chem.* 56 , 7637 (2008)
30. Jambor A., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr.,A* 1216, 3064 (2009)
31. Bank R. A., Jansen E. J., Beekman B., Koppele J. M.: *Anal. Biochem.* 240, 167 (1996)
32. Jones B. N. v knize: *Methods of Protein Microcharacterization: A Practical Handbook*, Amino Acid Analysis by o-Phthaldialdehyde Precolumn Derivatization and Reverse-Phase HPLC, Unigene Laboratories, Inc., Fairfield, New Persey, 1986
33. Kutlán D., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr.,A* 987 , 311 (2003)
34. Molnár-Perl I.: *J.Chromatogr., A* 987,291 (2003)
35. Bartolomeo M.P., Maisano F.: *J. Biomol. Tech.* 17, 131 (2006)
36. Rizzi A.M., Briza P., Breitbach M.: *J. Chromatogr.* 582, 53(1992)
37. Kirschner D. L.,Green T. K.: *J. Sep. Sci.*32, 2305 (2009)
38. Van Kuilenburg A. B. P., Stroomer A. E. M., Petersand G. J., Van A. H.: *J. Chromatogr., B* 759,51(2001)
39. Kang X., Xiao J., Juany X., Gu Z.: *Clin.Chim. Acta* 366, 352 (2006)
40. Miyoshi Y., Hamase K.,Tojo Y., Mita M., Konno R., Zaitso K.: *J. Chromatogr., B* 877, 2506 (2008)
41. Morikawa A., Hamase K., Inoue T., Konno R., Niwa A., Zaitso K.: *J. Chromatogr.,B* 757, 119 (2001)
42. Hamase K., Zaitso K.: *BUNSEKI KAGAKU* 53 ,677(2004)
43. Morikawa A., Hamase K.,Miyoshi Y., Koyanagi S., Ohdo S., Zaitso K.: *J. Chromatogr.,B* 875, 168 (2008)
44. Hamase K.: *Chem. Pharm. Bull.*55, 503 (2007)

45. Rubio-Barroso S., *J. Dairy Sci.* 89, 82 (2006)
46. Chavesdas N. H., Braga M. Z.: *An. Quim. Int. Ed* 93, 98 (1997)
47. Voss K., Galensa R.: *Amino Acids* 18, 339 (2000)
48. Kuneman D. W., Braddock J. K., McChesney L. L.: *J. Agric. Food Chem.* 36, 6 (1988)
49. Gómez-Ariza J. L., Villegas-Portero M. J., Bernal-Daza V.: *Anal. Chim. Acta* 540, 221 (2005)