

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Pravdová

Optimalizace elektroforetického stanovení proteinogenních aminokyselin

Optimization of electrophoretic determination of proteinogenic amino acids

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. května 2017.

.....

Adéla Pravdová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za ochotu, odbornou pomoc a velkou trpělivost, bez nichž by tato práce nevznikla.

Obsah

Seznam zkratk	6
Seznam veličin a symbolů.....	7
1. Úvod	8
1.1 Cíl práce	8
2. Teoretická část	9
2.1 Aminokyseliny	9
2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti aminokyselin	9
2.1.2 Klasifikace aminokyselin.....	9
2.2 Metody stanovení.....	10
2.2.1 Ionově výměnná chromatografie (IEC)	10
2.2.2 Plynová chromatografie (GC).....	11
2.2.3 Kapalinová chromatografie (LC).....	11
2.3 Kapilární elektroforéza (CE).....	12
2.3.1 Vodivostní detekce v kapilární elektroforéze	12
2.3.2 Konkrétní aplikace kapilární zónové elektroforézy na separaci aminokyselin .	13
2.3.3 Prekoncentrační techniky.....	14
3. Experimentální část.....	17
3.1 Použité chemikálie	17
3.2 Přístrojové vybavení	17
3.3 Experimentální podmínky.....	17
3.4 Příprava roztoků BGE a vzorku aminokyselin	17
3.5 Standardizace odměrného roztoku a titrace roztoků octové kyseliny.....	18
3.6 Příprava základního elektrolytu a samotné měření	18
3.7 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrační techniky.....	18
3.8 Měření elektroosmotického toku	19
4. Výsledky a diskuze	21
4.1 Standardizace odměrného roztoku a titrace roztoků octové kyseliny.....	21
4.2 Elektroforetická separace směsi aminokyselin	22
4.3 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrační techniky.....	27

5. Závěr.....	31
Seznam použité literatury.....	32

Seznam zkratek

AMK – aminokyseliny

UV (ultraviolet) – ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření

IEC (ion-exchange chromatography) – iontově výměnná chromatografie

GC (gas chromatography) – plynová chromatografie

MS (mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie

LC (liquid chromatography) – kapalinová chromatografie

LC/ESI-MS (liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry) – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí za použití elektrospreje

CE (capillary electrophoresis) – kapilární elektroforéza

CZE (capillary zone electrophoresis) – kapilární zónová elektroforéza

MEKC (micellar electrokinetic chromatography) – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

CGE (capillary gel electrophoresis) – kapilární gelová elektroforéza

CIEF (capillary isoelectric focusing) – kapilární isoelektrická fokusace

CEC (capillary electrochromatography) – kapilární elektrochromatografie

BGE (background electrolyte) – základní elektrolyt

EOF (electroosmotic flow) – elektroosmotický tok

SPME (solid phase microextraction) – mikroextrakce na pevné fázi

LPME (liquid phase microextracton) – mikroextrakce na kapalné fázi

EME (electromembrane extraction) – extrakce na elektromembráně

FASS (field-amplified sample stacking) – zakoncentrování vzorku zesílením pole

LVSS (large volume sample stacking) – zakoncentrování vzorku z velkého objemu

HEC – hydroxyethylcelulosa

CZE/SERS (capillary electrophoresis/surface-enhanced Raman scattering) – kapilární elektroforéza s detekcí povrchové zesíleného Ramanova rozptylu

CCD (contactless conductivity detector) – bezkontaktní vodivostní detektor

Seznam veličin a symbolů

U – elektrické napětí (V)

μ_{EOF} – mobilita elektroosmotického toku ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

w/w – hmotnostní zlomek (%)

s_r – směrodatná odchylka (%)

n_m – počet měření

c_t – teoretická koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

c_s – skutečná koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

μ_z – zdánlivá mobilita ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

L_c – celková délka kapiláry (m)

L_d – délka kapiláry k detektoru (m)

t_m – migrační čas (s)

t_u – doba vkládaného napětí (s)

1. Úvod

Proteinogenní aminokyseliny jsou biomolekuly tvořící základní stavební kámen bílkovin – makromolekul nezbytných pro živé organismy. Analýza volných aminokyselin je klíčová pro diagnostiku metabolických poruch - klíčových především při sledování novorozenců, dále pro sledování výživy či správnosti některých hormonálních drah.

V dnešní době je známo několik způsobů analýzy vzorků obsahujících aminokyseliny. Jednou z často používaných metod je stanovení pomocí kapilární zónové elektroforézy, a to díky své vysoké citlivosti a časové nenáročnosti. K detekci se zpravidla používá bezkontaktní vodivostní detektor, díky svojí schopnosti detekovat celou škálu aminokyselin, na rozdíl např. od UV detekce.

1.1 Cíl práce

Cílem této práce je optimalizovat podmínky pro separaci směsi 19 proteinogenních aminokyselin pomocí kapilární zónové elektroforézy. Prvním úkolem je zjistit, zda má na separaci jednotlivých aminokyselin vliv použití octové kyseliny od různých výrobců. Tato kyselina je hlavní složkou používaného základního elektrolytu. Druhým problémem, kterým se bude tato práce zabývat, je, jaký vliv má různá koncentrace kyseliny octové na separaci směsi aminokyselin. Posledním bodem této práce je najít optimální způsob dávkování vzorku do separační kapiláry, spolu s využitím principů on-line prekoncentračních technik.

2. Teoretická část

2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou důležité organické látky vyskytující se v různých podobách v živých organismech. Zvláštní skupinou jsou proteinogenní AMK¹. Je to skupina 20 molekul, které jsou základním stavebním kamenem biologickým makromolekul – proteinů. Ty jsou velice významným prvkem jak pro tvorbu struktury buněk a tkání, tak pro katalýzu biochemických reakcí nebo signalizaci v podobě hormonů². Spojování AMK do dlouhých peptidových řetězců je umožněno díky jejich schopnosti vytvářet peptidové vazby. Ta se vždy tvoří mezi aminoskupinou jedné AMK a karboxylovou skupinou druhé AMK^{3,4}. Proteiny se skládají pouze z AMK, které mají svoji aminoskupinu navázanou na α -uhlíku řetězce⁴.

2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti aminokyselin

Molekuly AMK obsahují kyselou i bazickou skupinu. To je příčinou intramolekulární reakce, díky které se z AMK stane zwitteriont^{1,3}. Díky tomuto jevu jsou aminokyseliny dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je např. voda. Další vlastností AMK je amfoterní charakter. Jsou tedy schopné chovat se jako báze i kyselina³. To, v jaké podobě se bude AMK nacházet, záleží na hodnotě pH prostředí. pH, při kterém se molekula navenek jeví jako neutrální, se nazývá izoelektrický bod - pI ⁴.

V postraním řetězci se mohou také vyskytovat ionizovatelné skupiny, jejichž disociace závisí na pH. Těchto vlastností se hojně využívá pro separace směsi AMK¹. Ze struktury AMK je zřejmé, že vyjma glycinu mají všechny aspoň jeden asymetrický uhlík, tudíž jsou opticky aktivní. Všechny AMK vyskytující se v proteinech mají L-konfiguraci. Proteinogenní AMK neabsorbují světlo ve viditelné oblasti spektra. Jedinou schopnost absorpce vykazují molekuly obsahující aromatické jádro a to pouze v UV oblasti (190 – 400 nm). Tuto vlastnost lze použít k detekci proteinů v roztoku.

2.1.2 Klasifikace aminokyselin

Jak již bylo zmíněno, v organismech se vyskytuje 20 proteinogenních aminokyselin v L-konfiguraci^{1,4}. Těchto 20 molekul se dále rozděluje do skupin podle vlastností postranního řetězce do čtyř skupin:

- AMK s nepolárním postranním řetězcem – alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan, methionin
- AMK s polárním postranním řetězcem – obsahují hydroxylovou, amidovou nebo sulfanylovou skupinu; threonin, serin, tyrosin, asparagin, glutamin, cystein, glycin
- AMK s negativně nabitým postranním řetězcem – kyselina glutamová a asparagová obsahují další karboxylovou skupinu
- AMK s kladně nabitým postranním řetězcem – lysin, arginin, histidin

Vedle 20 proteinogenních AMK bylo identifikováno více než 150 dalších. Ty se ale běžně v proteinech nevyskytují.

2.2 Metody stanovení

Analýza volných AMK má uplatnění v různých oblastech, jako např. diagnostika dědičných metabolických poruch nebo sledování výživy novorozenců⁵. Je několik metod, jak můžeme tuto analýzu provádět.

2.2.1 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Jako první se separací směsi AMK zabývali v roce 1958 pánové Stanford Moore a William H. Stein⁵⁻⁷. Ti k separaci složek vzorku použili metodu iontově výměnné chromatografie (IEC) s postkolonovou derivatizací ninhydrinem. Za tuto práci dostali v roce 1972 Nobelovu cenu. Princip separace spočívá v tom, že se vzorek AMK rozpustí v lithém nebo sodném pufru, obsahujícím citronan sodný a HCl, o nízkém pH, kdy jsou všechny AMK kladně nabit^{6,7}. Takto připravený roztok se dávkuje do kolony. Funkční skupiny sorbentu nesou negativní náboj, tudíž se na něj všechny aminokyseliny ze vzorku naváží. Poté se kolona začne promývat pufrům o postupně se zvyšujícím pH. V momentě, kdy je hodnota pH pufru rovna hodnotě izoelektrického bodu specifického pro každou AMK, ztratí vzájemná interakce iontů na síle a AMK eluuje ven z kolony. Poté se eluent smísí s roztokem ninhydrinu, který je rozpuštěn v acetátovém pufru, za vzniku barevného komplexu. Absorbanci komplexu lze změřit na jakémkoliv fotometru. V případě kontinuálního odběru eluujících frakcí a následného měření jejich absorbance lze sestavit pík, který je možné použít pro stanovení kvantity.

2.2.2 Plynová chromatografie (GC)

Analýza AMK v plynové chromatografii je plně závislá na dostupnosti derivatizačních technik⁸. Tyto úpravy mají za úkol vytvářet deriváty méně náchylné na vodíkové interakce, které proces měření znesnadňují z důvodu zvyšování teploty varu⁹. Pro derivatizaci jsou nejvíce využívány dva přístupy. První je jednostupňový, tzv. silylace, druhý dvoustupňový – esterifikační a acylační krok¹⁰. Tyto techniky mají svá omezení, jsou časově náročné, vyžadují bezvodé prostředí a vysoké reakční teploty. Proces silylace vytváří nestabilní deriváty zejména bazických aminokyselin, nicméně i tak byly analýzy úspěšné za použití kapilárních kolon a převedení AMK na trifluoracetyl butyl estery nebo heptafluorobutyryl – isobutyl estery. Dvoustupňová derivatizace je prováděna pomocí 1,3-dichlortetrafluoroacetonu, který reaguje s α -amino skupinou a karboxylovou skupinou¹¹. Zároveň je acylací upraven postranní řetězec. Tímto postupem byl čas měření zkrácen na 30 minut. Dalším možným způsobem dvoustupňové derivatizace je modifikace aminoskupiny isobutylchlorformiátem s následnou esterifikací karboxylových skupin diazomethanem. Poté, co dojde k separaci analyzovaného vzorku na koloně, přivádí nosný plyn (H_2 , He, N_2) separovaný analyt do detektoru¹². Mezi nejpoužívanější detektory patří tepelně vodivostní detektor, plamenově ionizační detektor¹⁰ a hmotnostní spektrometr (MS)¹².

2.2.3 Kapalinová chromatografie (LC)

AMK je také možno separovat a stanovovat pomocí kapalinové chromatografie^{5,8,13,14}. Tato metoda má výhodu oproti GC v tom, že se dají analyzovat vzorky jak derivatizované⁸ tak i volné AMK^{5,13,14,15,16}. Běžná doba analýzy se pohybuje okolo 30 až 90 minut⁸.

V LC derivatizovaných AMK se preferuje předkolonová úprava vzorku, protože zajišťuje snadnější separaci i méně polárních derivátů⁸. Nejčastěji se využívá derivatizace pomocí arylových skupin, jelikož jejich aromatická jádra jsou schopná absorbovat záření v UV oblasti, tudíž je možné je detekovat pomocí měření absorbance nebo fluorescence. Další možností je AMK detekovat voltametriky. Fluorescenční detekce je nejrozšířenější, avšak hojně využívané je i MS nebo elektrochemické detektory.

Separace volných aminokyselin pomocí LC není tolik rozšířená. Přesto se v posledních letech objevuje stále více publikací, které se touto problematikou

zabývají^{5,11,13,15,16}. Separace většinou probíhá v uspořádání LC/ESI-MS. Používá se např. ke screeningu novorozenců, kdy se z kapky krve dají pomocí LC detekovat vážné metabolické poruchy^{13,15}.

2.3 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza se řadí do elektromigračních metod. Je to jedna z nejvyužívanějších metod separace díky svojí vysoké citlivosti v řádech 10^{-15} až 10^{-21} mol, a také kvůli účinnosti¹⁷. Další nespornou výhodou je malá spotřeba základního elektrolytu, potřeba malého množství měřeného vzorku a krátká doba měření^{2,18}. Analýza látek probíhá v tenkých křemenných kapilárách s vnitřním průměrem od 5 do 100 μm , které jsou potaženy vrstvou polyimidu, aby se snížila jejich křehkost. Nejběžněji používané kapiláry mají vnitřní průměr 50 – 75 μm . Takto malé vnitřní průměry umožňují dávkovat velmi malé objemy vzorků v řádu nanolitrů¹⁸, tím je však kladen velký nárok na citlivost detekčního zařízení¹⁷.

Kapilární elektroforéza se dělí dle způsobu provedení a druhu média na několik skupin: kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární elektrochromatografie (CEC)¹².

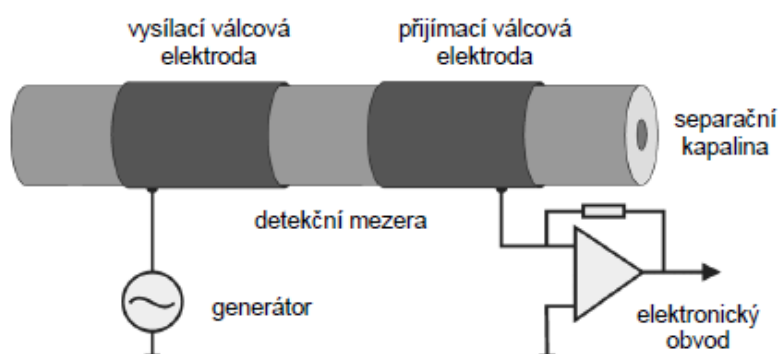
Kapilární elektroforéza, jako všechny elektromigrační metody, je založena na pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli^{2,12,17,19}. Vodivé prostředí zajišťuje základní elektrolyt (background electrolyte, BGE). Nabité částice jsou na základě svého náboje přitahovány buďto ke kladně nebo k záporně nabitě elektrodě. Na základě svých elektroforetických mobilit se všechny nabitě látky přítomné v kapiláře dělí do zón, které putují do detektoru. AMK, v závislosti na pH prostředí, jsou schopné se v tomto poli taktéž pohybovat, a tím je možné od sebe jejich směs separovat. Nejvíce se k tomu využívá CZE nebo CIEF.

2.3.1 Vodivostní detekce v kapilární elektroforéze

Nejčastěji se k detekci používá spektrofotometrická detekce v UV oblasti nebo detekce fluorescenční^{20,21}. Tyto druhy detekce ale vyžadují, aby analyt obsahoval ve své molekule chromofor nebo fluorofor. Je možné také využít detekci na hmotnostním spektrometru^{21,22}, který kromě identifikace analytu také poskytuje i informace o struktuře¹². Další možností detekce je měření elektrické vodivosti^{2,17,23–26}. Metoda je

vhodná jak pro málo, tak i pro vysoce pohyblivé analyty. Dle těchto vlastností se volí BGE s co největším rozdílem vodivosti oproti zónám analytů, aby byl detektor schopen tyto změny zachytit. Vodivostní detekce se zprvu prováděla v přímém kontaktu elektrod se základním elektrolytem. Avšak v tomto uspořádání docházelo jednak k nežádoucím jevům na elektrodách a adsorpci látek na jejich povrchu, a také k interferencím separačního elektrického pole se získaným signálem. Tyto jevy se později eliminovaly sestrojením bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD)^{2,17}.

Detekce na základně změn vodivosti se provádí pomocí dvou tubulárních elektrod, které jsou umístěny za sebou na povrchu kapiláry tak, aby vzdálenost mezi elektrodou a stěnou kapiláry byla co nejmenší a nedocházelo ke ztrátám signálu^{2,23}(Obr. 1). Na jednu elektrodu přichází signál z generátoru, ten prochází přes stěnu kapiláry a je zachycen druhou elektrodou. Síla signálu, který doputuje přes kapiláru k elektrodě, závisí na vodivosti kapaliny uvnitř kapiláry. Tento získaný signál poté putuje do zařízení, které rozdíly ve vodivosti zaznamenává²⁴.



Obr. 1 Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru. Převzato z².

2.3.2 Konkrétní aplikace kapilární zónové elektroforézy na separaci aminokyselin

Separaci aminokyselin se do této chvíle zabývalo již mnoho skupin. Jednou z dvojic byli Pierre Negri a Zachari D. Schultz, kteří zvolili techniku CZE/SERS²⁷. Vzorek obsahoval pouze 20 proteinogenních L-aminokyselin, jako separační pufr zvolili dekahydrát tetraboritanu sodného o pH 9,4. Další skupinou zabývající se touto problematikou byli Kevin Altria a kol., kteří používali BGE obsahující 50 mmol·l⁻¹ ethansulfonovou kyselinu²⁸. Detekci prováděli v UV oblasti při 185 nm, bez úpravy vzorku. I při této separaci nebyly všechny píky zcela rozlišené. Separaci nederivatizovaných proteinogenních aminokyselin z různých biologických vzorků s bezkontaktní vodivostní detekcí se také zabýval Coufal a kol²⁹.

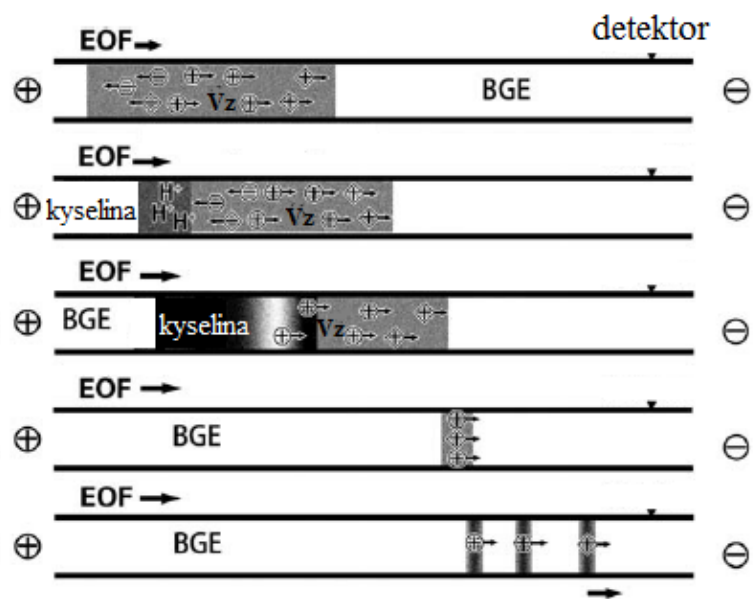
Jejich základní elektrolyt obsahoval 2,3 mol·l⁻¹ octovou kyselinu a 0,1 % HEC. Při takovémto složení BGE však docházelo ke ztrátám rozlišení jednotlivých píků. Petr Tůma a Eva Samcová z Centra biomedicínských oborů Třetí lékařské fakulty UK se zabývali analýzou celého spektra AMK v biologických tekutinách s CCD detekcí. Jako BGE používali 1,7 mol·l⁻¹ octovou kyselinu s přídavkem 0,1 % hydroxyethylcelulosity (HEC)². Výsledkem byla úplná separace všech 20 proteinogenních aminokyselin s dobou analýzy 60 minut bez předúpravy vzorků. Poslední z mnoha skupin, kteří prováděli separaci AMK z extraktu tabákových listů pomocí kapilární elektroforézy, byli O. Hodek a kol³⁰. Jako základní elektrolyt opět používali octovou kyselinu s přídavkem hydroxyethylcelulózy. Jako optimální koncentraci octové kyseliny zvolili 1,8 mol·l⁻¹, při které došlo k nejlepšímu rozlišení všech píků jednotlivých AMK. K detekci používali taktéž vodivostní detektor.

Právě velká nejednotnost ve složení používaného BGE byla podnětem pro sepsání této práce. Vědecká skupina O. Hodek a kol. také během své práce zaznamenala, že při některých stanoveních AMK v extraktech listů tabáku nebyla CCD detekce vždy dostatečně citlivá. Tento problém lze řešit použitím některých z prekoncentračních technik, proto je také tomuto tématu věnována část obsahu této práce.

2.3.3 Prekoncentrační techniky

Snížení meze detekce může být docíleno prekoncentrací, anglicky *stacking*³¹⁻³³. Prekoncentraci vzorků je možné provádět tzv. on-line nebo off-line. Off-line prekoncentrace spočívá v zakoncentrování vzorku ještě před aplikací do kapiláry. Provádět se může pomocí extrakcí (SPME, LPME, EME). Jejich nevýhodou je komplikovanost a časová náročnost. Výhodnější je tedy provádět on-line prekoncentraci přímo v separační kapiláře. Tato technika je prováděna několika způsoby. Prvním z nich, a také nejběžnějším, je FASS, *field amplified sample stacking* – zakoncentrování zesílením pole. Zakoncentrování probíhá na základě rozdílné vodivosti BGE a analyzovaného vzorku. Zóna vzorku má zpravidla nižší vodivost, tudíž je v ní kvůli zachování kontinuity elektrického proudu zvýšená intenzita elektrického pole a migrace iontů analytu je rychlejší, tím dochází k zakoncentrování na rozhraní zóny vzorku s BGE, kdy je migrace pomalejší. Díky tomuto postupu je možné docílit až stonásobného zesílení odezvy detektoru. Dalším způsobem prekoncentrace je LVSS, *large volume sample stacking* – zakoncentrování vzorku z velkého objemu. V tomto

případě se do kapiláry nadávkuje dlouhá zóna vzorku s nízkou vodivostí. Po nadávkování se změní polarita zdroje, tudíž dojde k pohybu matrice ven z kapiláry a zakoncentrování analytu na začátku kapiláry. Poté se polarita opět převrátí a zóny analytu putují směrem k detektoru. Limitující pro tuto techniku je vodivost vzorku, která musí být co nejnižší. Nametení, *sweeping*, je další z možností, jak dosáhnout vyšší citlivosti detekce. Do BGE se přidává aditivum, které proniká do zóny analytu a dochází k zakoncentrování na rozhraní zón. Rozdílem pH mezi vzorkem a BGE lze také dosáhnout zakoncentrování. Tuto techniku lze v literatuře nalézt pod názvem *dynamic pH junction*. Princip spočívá v různém pH vzorku a BGE. Při separaci má analyt určitou mobilitu, závislou na pH prostředí. Jakmile se dostane na rozhraní s BGE, které má jiné pH, ztrácí stupeň disociace, tudíž ztrácí svou elektroforetickou mobilitu, dochází k jeho zpomalování a zakoncentrování na rozhraní. Na podobném principu probíhá i technika *pH-mediated stacking* – zakoncentrování zprostředkované pomocí pH rozhraní, kdy se před nebo za zónu analytu dávkuje kyselina nebo báze, která titruje ionty BGE a vytváří tak zónu o nízké vodivosti^{22,34}. Pohybující se analyty se poté zakoncentrují na hranici se zónou BGE. Výhoda oproti FASS a LVSS je, že je takto možné zakoncentrovávat i vodivější vzorky. Princip pH – mediated stacking je znázorněn na Obr. 2, kde se nejprve do kapiláry nadávkuje vzorek. Následně se za vzorek nadávkuje kyselina a spustí se samotná separace. Ionty H^+ ze zóny kyseliny titrují ionty z BGE, ze kterých se poté stávají neutrální molekuly a vytváří tak méně vodivé prostředí. Nabitě analyty v takovéto zóně získávají na rychlosti a zakoncentrovávají se na rozhraní zóny o nízké vodivosti se zónou o vysoké vodivosti.



Obr. 2 Schéma *pH – mediated stacking* s dávkováním kyseliny za vzorek.

Převzato z³³ a upraveno.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Octová kyselina, 99 %, NaOH, p. a., CaCl₂, p. a., HCl, p. a., dihydrát kyseliny šřavelové, p. a. (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- Octová kyselina, 99 %, octová kyselina ledová, methylořanž, fenolftalein (Lachema, Brno, Česká republika)
- Octová kyselina, 99,8 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Deionizovaná voda připravena systémem Premier NFG/D Systems (Phoenix, AZ, USA)
- L-aminokyseliny (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxyethylcelulóza (Hercules Natrosol, Wilmington, Německo)

3.2 Přístrojové vybavení

- Kapilární elektroforéza Agilent Technologies 7100 CE vybavená bezkontaktním vodivostním detektorem
- Křemenná kapilára, délka 80,0 cm, efektivní délka 65,0 cm, vnitřní průměr 50 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)
- Signál vyhodnocován v programu OpenLAB CDS, ChemStation Edition, Rev. C.01.07[27]

3.3 Experimentální podmínky

- Teplota kazety s kapilárou 25 °C
- Příprava kapiláry před samotnou separací 60 s promývání BGE do odpadní nádoby, 60 s promývání BGE do nádoby s BGE, vložení napětí 30 kV na 2 min
- Separční napětí 30 kV

3.4 Příprava roztoků BGE a vzorku aminokyselin

Ze zásobních lahví octové kyseliny různých značek byly připraveny roztoky o objemu 25 ml tak, aby výsledné koncentrace po přidání HEC byly 2,3 mol·l⁻¹ a 1,7 mol·l⁻¹. Všechny roztoky byly doplněny deionizovanou vodou. Dále bylo připraveno 5 ml vzorku směsi aminokyselin ze zásobních roztoků o koncentraci 5·10⁻³ mol·l⁻¹.

Výsledná koncentrace každé aminokyseliny byla $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzorek obsahoval také $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl.

3.5 Standardizace odměrného roztoku a titrace roztoků octové kyseliny

Ze zásobní láhve 46% NaOH bylo připraveno 500 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku NaOH. Následně byly odváženy 3 vzorky dihydrátu šťavelové kyseliny tak, aby výsledná spotřeba připraveného roztoku NaOH činila asi 20 ml. Navážky byly kvantitativně převedeny do titračních baněk a následně titrovány $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokem NaOH na indikátor methylovanž. Před bodem ekvivalence bylo přidáno 10 ml 20% roztoku chloridu vápenatého pro zřetelnější barevný přechod indikátoru. Po standardizaci roztoku NaOH byly provedeny alkalimetrické titrace 5,00 ml připravených roztoků octové kyseliny na fenolftalein. Každý roztok octové kyseliny se titroval třikrát.

3.6 Příprava základního elektrolytu a samotné měření

Do nádobek byly pipetovány roztoky octové kyseliny o různých koncentracích společně s HEC tak, aby výsledný obsah HEC byl 0,1 % w/w. Takto připravené základní elektrolyty byly použity pro separaci směsi 19 aminokyselin kapilární elektroforézou. Doba analýzy byla 40 minut, podmínky měření viz kapitola 3.3. Po vyhodnocení naměřených elektroferogramů byly stejným způsobem připraveny roztoky BGE s výslednou koncentrací octové kyseliny $1,8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1,6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pouze ze zásobní láhve Sigma-Aldrich a byla provedena totožná analýza. Po vyhodnocení naměřených elektroferogramů byl v dalších analýzách používán BGE s nejlepšími separačními vlastnostmi, a to BGE obsahující octovou kyselinu v koncentraci $1,6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.7 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrační techniky

Byl připraven nový vzorek aminokyselin, který obsahoval pouze lysin, arginin a histidin. Výsledná koncentrace jednotlivých aminokyselin byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento vzorek byl naředěn tak, aby v konečné podobě obsahoval $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselinu chlorovodíkovou. Doba jednoho měření byla zkrácena na 14 minut. S takto připravenými vzorky bylo testováno elektrokinetické i hydrodynamické dávkování vzorku do kapiláry, následně několik způsobů prekoncentračních technik v podobě dávkování HCl a NaOH před nebo za zónu vzorku, změn koncentrací a doby dávkování jednotlivých složek. Po vyhodnocení všech takto naměřených elektroferogramů byly

optimální dávkování a způsob prekoncentrace aplikovány na analýzu původní směsi 19 aminokyselin.

3.8 Měření elektroosmotického toku

Aby bylo možné určit efektivní mobilitu jednotlivých aminokyselin, je nutné zjistit hodnotu mobility elektroosmotického toku. Jeho měření probíhalo pomocí sledování zóny deionizované vody. Dávkování viz Tab. 1. Postup měření vycházel z článku³⁵.

Tab. 1 Jednotlivé kroky měření elektroosmotického toku.

Krok	Dávkovaný roztok	Způsob dávkování
1	deionizovaná voda	5 kPa, 3 s
2	BGE	10 kPa, 60 s
3	deionizovaná voda	5 kPa, 3 s
4	BGE	10 kPa, 60 s
5	BGE	30 kV, 120 s
6	deionizovaná voda	5 kPa, 3 s

Po nadávkování byla kapilára ponořena nazpět do BGE a tlakem 10 kPa byly kapilárou tlačeny zóny deionizované vody do detektoru. Doba měření 18 minut, analýza probíhala třikrát pro roztok BGE s obsahem 2,3 mol·l⁻¹ a 1,6 mol·l⁻¹ octové kyseliny s 0,1% HEC.

Vzorec pro výpočet mobility elektroosmotického toku (1):

$$\mu_{EOF} = \frac{[(t_3 - t_2) - (t_2 - t_1)] \cdot L_d \cdot L_c}{t_u \cdot t_3 \cdot U} \quad (1)$$

μ_{EOF} – mobilita elektroosmotického toku (m²·V⁻¹·s⁻¹)

t_1, t_2, t_3 – migrační čas zóny deionizované vody (s)

t_u – doba vkládaného napětí (s)

L_c – celková délka kapiláry (m)

L_d – délka kapiláry k detektoru (m)

U – elektrické napětí (V)

Zdánlivá mobilita aminokyselin byla vypočítána podle vzorce (2):

$$\mu_z = \frac{L_c \cdot L_d}{U \cdot t_m} \quad (2)$$

μ_z – zdánlivá mobilita ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

t_m – migrační čas (s)

4. Výsledky a diskuze

Octové kyseliny od různých výrobců mohou obsahovat nečistoty či příměsi, které mohou mít vliv na separaci směsi AMK. Aby bylo možné porovnat vliv použití octové kyseliny od různých výrobců, bylo nejprve nutné provést alkalimetrickou titraci pro zjištění přesné koncentrace jednotlivých roztoků, které byly použity k přípravě BGE.

4.1 Standardizace odměrného roztoku a titrace roztoků octové kyseliny

Octová kyselina byla stanovena pomocí odměrného roztoku NaOH. Odměrný roztok však nelze připravit o přesné koncentraci, ale je třeba jej standardizovat. Standardizace probíhala dle rovnice (3):



Přesná koncentrace odměrného roztoku NaOH byla stanovena: $(0,515 \pm 0,009) \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $s_r = 0,76 \%$, $n_m = 3$.

Alkalimetrická titrace octové kyseliny probíhá dle rovnice (4):



Ze stechiometrie rovnice (4) je patrné, že látkové množství NaOH odpovídá látkovému množství kyseliny. Ze známé přesné koncentrace odměrného roztoku a jeho spotřeby při titraci je možné spočítat jak látkové množství octové kyseliny, tak její přesnou koncentraci v jednotlivých roztocích.

Jak je patrné z titrací, naměřené hodnoty koncentrací se velmi blíží k teoretickým hodnotám (Tab.2). Vzorek octové kyseliny značky Lach:ner s teoretickou koncentrací $1,89 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jako jediný vykazuje nižší obsah octové kyseliny. Jelikož vzorek o teoretické koncentraci $c_t = 2,56 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ toto snížení nevykazuje, i přes to, že oba roztoky byly připravovány ze stejného zásobního roztoku, jedná se s největší pravděpodobností o nepřesnost při přípravě tohoto roztoku nebo při titraci. Z podobných důvodů není nutno brát v úvahu také mírně vyšší hodnoty koncentrace pro octovou kyselinu firmy Sigma-Aldrich a ledovou octovou kyselinu firmy Lachema Brno.

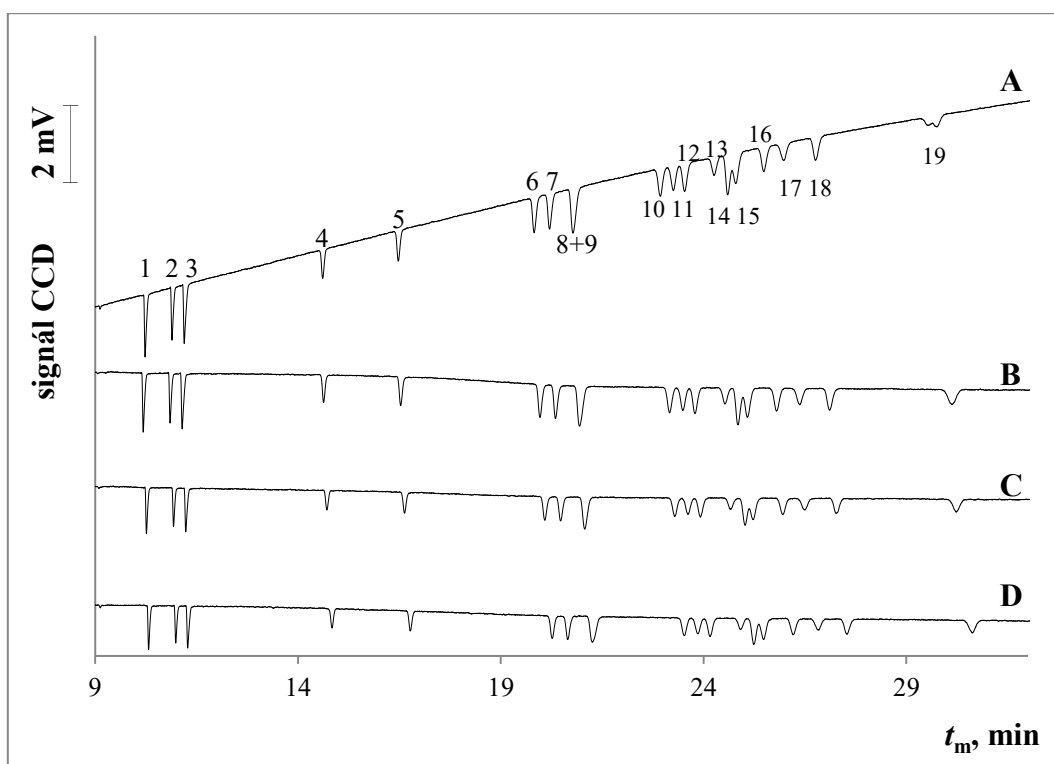
Tab. 2 Koncentrace jednotlivých vzorků octové kyseliny, c_t – teoretická koncentrace, c_s – koncentrace stanovená titrací, s_r – relativní směrodatná odchylka počet měření $n_m=3$.

Výrobce	$c_t, \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$c_s, \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$s_r, \%$
Lach:ner	1,89	$1,84 \pm 0,04$	0,99
Lachema Brno	1,89	$1,89 \pm 0,01$	0,32
Lachema Brno – ledová	1,89	$1,89 \pm 0,03$	0,64
Sigma-Aldrich	1,89	$1,94 \pm 0,01$	0,31
Lach:ner	2,56	$2,59 \pm 0,08$	1,41
Lachema Brno	2,56	$2,56 \pm 0,01$	0,24
Lachema Brno – ledová	2,56	$2,60 \pm 0,03$	0,59
Sigma-Aldrich	2,56	$2,60 \pm 0,05$	0,94
Sigma-Aldrich	1,78	$1,80 \pm 0,02$	0,51
Sigma-Aldrich	2,00	$2,04 \pm 0,02$	0,45

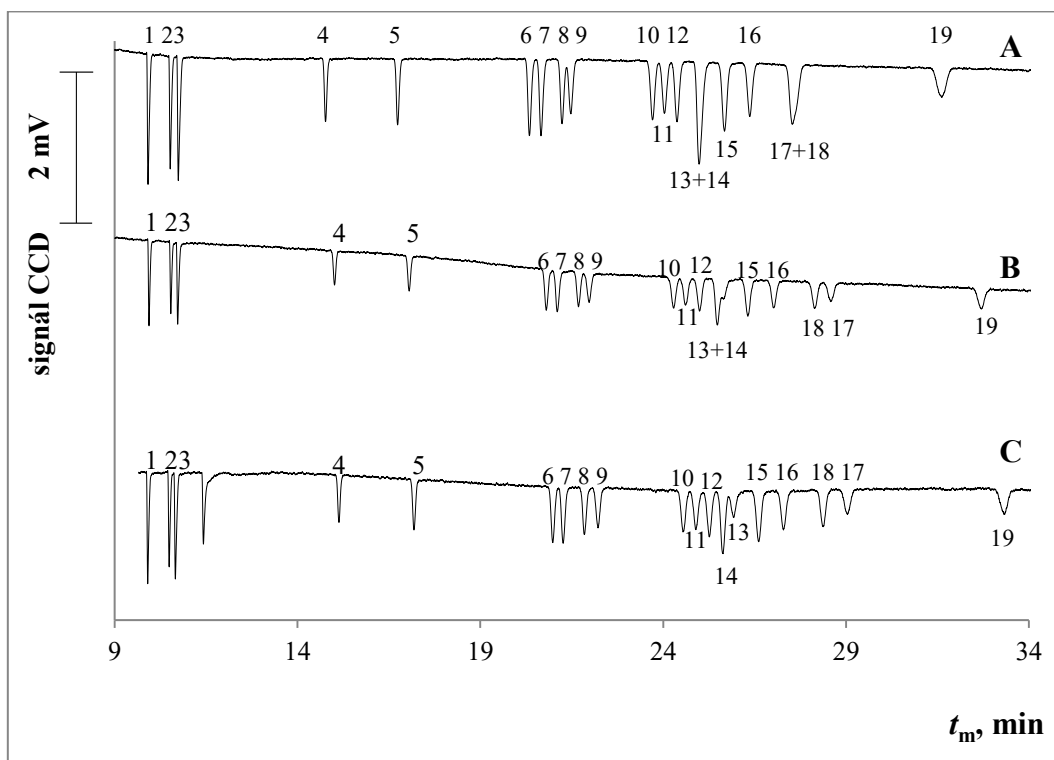
4.2 Elektroforetická separace směsi aminokyselin

V této práci byl používán vzorek pouze 19 proteinogenních aminokyselin, Z důvodu nestálosti cysteinu v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové nebyl do vzorku zahrnut. Na závěry práce by tento fakt neměl mít vliv, jelikož cystein je za daných podmínek dobře separován a nehrozí jeho překrytí s jinými aminokyselinami. Z roztoků octové kyseliny o známých koncentracích byly připraveny BGE pro následnou separaci směsi AMK. Na Obr. 3 je srovnání separace AMK v BGE

připravených z lahví různých výrobců. Je patrné, že ačkoliv se koncentrace octové kyseliny obsažené v BGE liší v řádu desetin $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, na separaci směsi aminokyselin to nemá prakticky žádný vliv. Na první pohled je ale patrné, že při této koncentraci dochází k překrývání nebo neúplnému rozlišení píků na pozicích 8 a 9, tedy leucin a serin, 14 a 15, tryptofan a glutamin (Obr. 4). BGE připravené z octové kyseliny různých výrobců o koncentraci $1,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nevykazovaly stejně jako při koncentraci $2,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ žádné změny. Na Obr. 4B je ukázána separace za použití BGE ze zásobní láhve Sigma-Aldrich. Jelikož separace při koncentraci $1,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vykazovala lepší výsledky, následovalo proměření stejné směsi, za stejných podmínek, ale s nižší koncentrací octové kyseliny (Obr. 4).



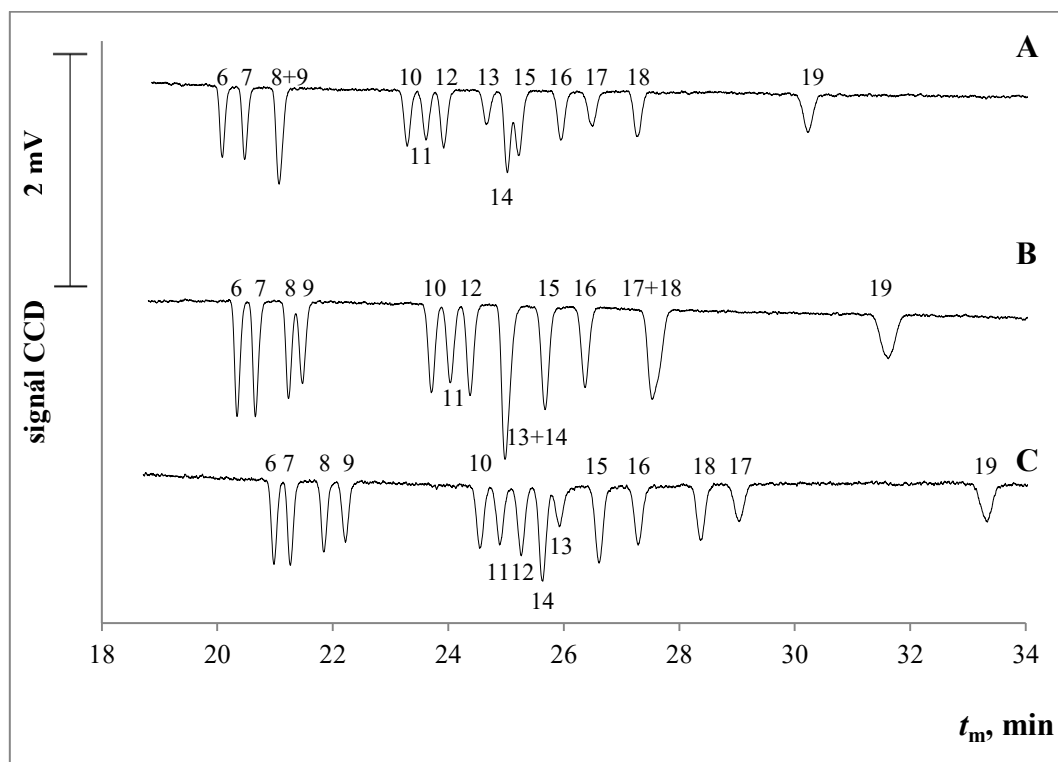
Obr. 3 Srovnání elektroferogramů separace směsi aminokyselin o koncentraci $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. BGE: A – octová kyselina o $c_s = 2,33 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lach:ner, B – octová kyselina o $c_s = 2,30 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lachema, C – octová kyselina o $c_s = 2,34 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Sigma-Aldrich, D – ledová octová kyselina o $c_s = 2,30 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lachema. Všechny BGE byly s přídatkem 0,1 % HEC. 1 – Lys, 2 – Arg, 3 – His, 4 – Gly, 5 – Ala, 6 – Val, 7 – Ile 8 – Leu, 9 – Ser, 10 – Thr, 11 – Asn, 12 – Met, 13 – Gln, 14 – Trp, 15 – Glu, 16 – Phe, 17 – Pro, 18 – Tyr, 19 – Asp



Obr. 4 Elektroferogram směsi aminokyselin měřené v BGE, který byl připraven ze zásobní láhve octové kyseliny Sigma-Aldrich o koncentraci A – 1,84 mol·l⁻¹, B – 1,75 mol·l⁻¹, C – 1,62 mol·l⁻¹. Všechny BGE byly s přidavkem 0,1 % HEC. 1 – Lys, 2 – Arg, 3 – His, 4 – Gly, 5 – Ala, 6 – Val, 7 – Ile 8 - Leu, 9 – Ser, 10 – Thr, 11 – Asn, 12 – Met, 13 - Gln, 14 - Trp, 15 - Glu, 16 – Phe, 17 - Pro, 18 – Tyr, 19 - Asp

Porovnáním elektroferogramů z Obr. 3 a 4 je patrné, že se snižováním koncentrace octové kyseliny v BGE dochází ke změnám v migračních časech některých aminokyselin. Je to způsobené změnou disociace jednotlivých AMK, která závisí na hodnotě disociačních konstant. Při nižší koncentraci mají AMK nižší efektivní náboj, tudíž se snižuje jejich elektroforetická mobilita. Důkazem je i Obr. 4, kde je patrné, že se snižující se koncentrací octové kyseliny se analýza podstatně prodlužuje. Z tohoto důvodu již nebyly zkoušeny koncentrace nižší než 1,6 mol·l⁻¹, jelikož doba jedné analýzy vzorku by už nebyla výhodná z důvodu časové náročnosti. Prvním příkladem pohybu AMK v závislosti na koncentraci kyseliny je pohyb na pozici 8 a 9, které přísluší leucinu a serinu. Za přítomnosti 2,3 mol·l⁻¹ octové kyseliny dochází v jejich případě k úplnému překrytí píků (Obr. 3 a 4). Čím více se ale koncentrace kyseliny

snižuje, tím více dochází ke zpomalování serinu, a tím k úplnému rozlišení těchto dvou aminokyselin. Další aminokyseliny, které mění svoji pozici, jsou glutamin, tryptofan a glutamová kyselina. Při koncentraci $2,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octové kyseliny se glutamin nachází v pozici před tryptofanem, při koncentraci kyseliny $1,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k jeho zpomalování a překrytí píku s tryptofanem. Při dalším snižování obsahu kyseliny dojde k jejich vzájemné výměně pozic, tudíž tryptofan se posouvá na přední pozici. Se snižující se koncentrací octové kyseliny dochází ke zpomalování kyseliny glutamové a tím k lepšímu rozlišení jejího píku. Poslední poziční změnou, která se na elektroferogramech objevuje, je výměna pozic prolinu a tyrosinu. Při nižších koncentracích se mobilita prolinu snižuje, tudíž dochází k posunu píku na pozici za tyrosin. Na výřezu z elektroferogramů (Obr. 5) jsou lépe znázorněny všechny změny, ke kterým při snižování koncentrace octové kyseliny dochází.

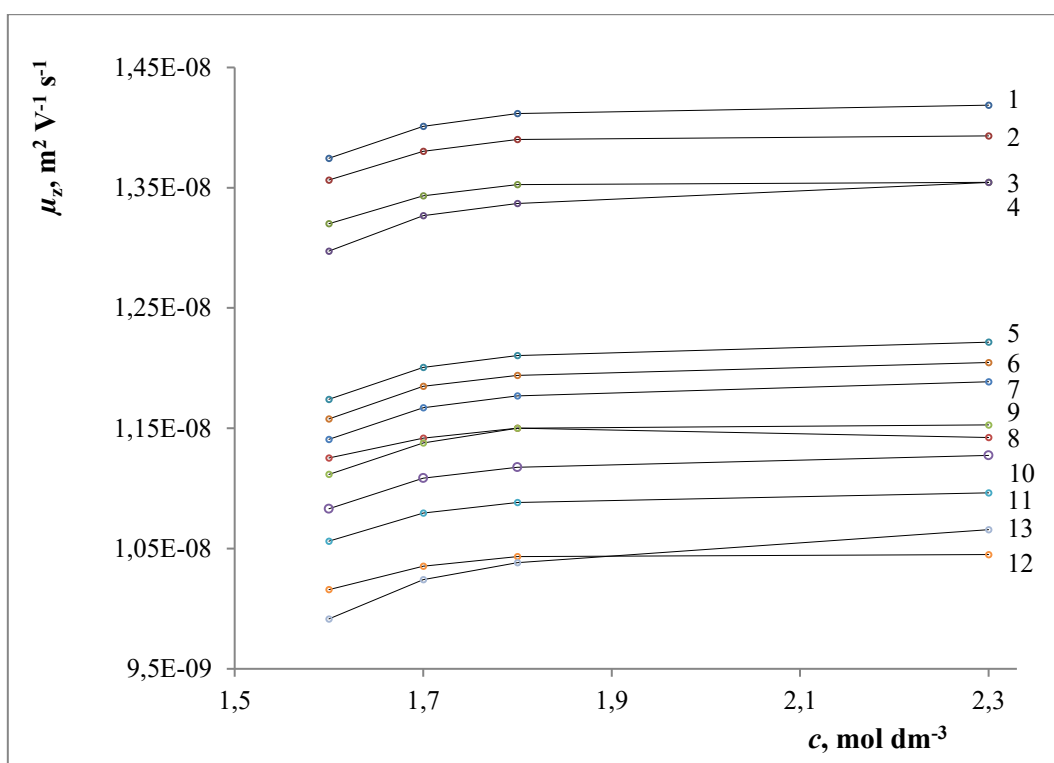


Obr. 5 Výřez z elektroferogramů. A - BGE o koncentraci $2,33 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octové kyseliny, B - BGE o koncentraci $1,84 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octové kyseliny, C - BGE o koncentraci $1,62 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octové kyseliny. Všechny BGE byly s přídavkem 0,1 % HEC. 6 – Val, 7 – Ile 8 - Leu, 9 – Ser, 10 – Thr, 11 – Asn, 12 – Met, 13 - Gln, 14 - Trp, 15 - Glu, 16 – Phe, 17 - Pro, 18 – Tyr, 19 - Asp

Z migračních časů byly vypočítány mobility pro jednotlivé aminokyseliny (Tab. 3). Část z nich byla použita pro sestavení grafu závislosti mobility na koncentraci octové kyseliny (Obr. 6). Aby bylo možné vypočítat efektivní mobilitu pro jednotlivou aminokyselinu, je nutné znát hodnotu mobility elektroosmotického toku. V případě experimentálních podmínek používaných v této práci byla mobilita elektroosmotického toku velice nízká, její hodnota byla stanovena na $(4 \pm 9) \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $s_r=37\%$, $n_m=2$ a je tedy statisticky nevýznamná. Příčinou jeho potlačení je především nízké pH BGE, díky kterému je vnitřní povrch kapiláry prakticky zcela protonovaný, druhým důvodem je přidavek HEC, která chrání vnitřní povrch kapiláry proti adsorpci nežádoucích látek z roztoku. EOF tudíž neměl na mobility prakticky žádný vliv a mohl se zanedbat.

Tab. 3 Efektivní mobilita aminokyselin vypočtená z migračních časů.

Aminokyselina	efektivní mobilita, $10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$			
	$c_t= 1,6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$c_t= 1,7 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$c_t= 1,8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$c_t= 2,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Lysin	$2,917 \pm 0,001$	$2,909 \pm 0,003$	$2,908 \pm 0,005$	$2,817 \pm 0,002$
Arginin	$2,754 \pm 0,004$	$2,743 \pm 0,002$	$2,741 \pm 0,004$	$2,647 \pm 0,005$
Histidin	$2,710 \pm 0,005$	$2,692 \pm 0,002$	$2,686 \pm 0,003$	$2,582 \pm 0,010$
Glycin	$1,905 \pm 0,003$	$1,937 \pm 0,013$	$1,946 \pm 0,010$	$1,943 \pm 0,020$
Alanin	$1,678 \pm 0,003$	$1,706 \pm 0,013$	$1,716 \pm 0,009$	$1,717 \pm 0,019$
Valin	$1,374 \pm 0,002$	$1,400 \pm 0,012$	$1,411 \pm 0,009$	$1,418 \pm 0,020$
Isoleucin	$1,356 \pm 0,002$	$1,380 \pm 0,012$	$1,390 \pm 0,008$	$1,393 \pm 0,018$
Leucin	$1,320 \pm 0,002$	$1,343 \pm 0,011$	$1,352 \pm 0,008$	$1,354 \pm 0,017$
Serin	$1,297 \pm 0,003$	$1,326 \pm 0,011$	$1,336 \pm 0,008$	$1,354 \pm 0,021$
Treonin	$1,174 \pm 0,003$	$1,200 \pm 0,012$	$1,210 \pm 0,008$	$1,221 \pm 0,019$
Asparagin	$1,157 \pm 0,003$	$1,184 \pm 0,011$	$1,193 \pm 0,008$	$1,204 \pm 0,019$
Methionin	$1,140 \pm 0,003$	$1,167 \pm 0,011$	$1,177 \pm 0,008$	$1,188 \pm 0,019$
Tryptofan	$1,125 \pm 0,002$	$1,141 \pm 0,008$	$1,150 \pm 0,006$	$1,150 \pm 0,019$
Glutamin	$1,111 \pm 0,003$	$1,137 \pm 0,012$	$1,150 \pm 0,007$	$1,140 \pm 0,012$
Glutamová kyselina	$1,083 \pm 0,003$	$1,108 \pm 0,011$	$1,117 \pm 0,008$	$1,127 \pm 0,018$
Fenylalanin	$1,056 \pm 0,003$	$1,079 \pm 0,010$	$1,088 \pm 0,007$	$1,096 \pm 0,017$
Tyrosin	$1,015 \pm 0,002$	$1,035 \pm 0,009$	$1,043 \pm 0,006$	$1,065 \pm 0,024$
Prolin	$0,991 \pm 0,003$	$1,024 \pm 0,013$	$1,038 \pm 0,013$	$1,045 \pm 0,014$
Asparagová kyselina	$0,859 \pm 0,007$	$0,895 \pm 0,012$	$0,906 \pm 0,008$	$0,933 \pm 0,025$

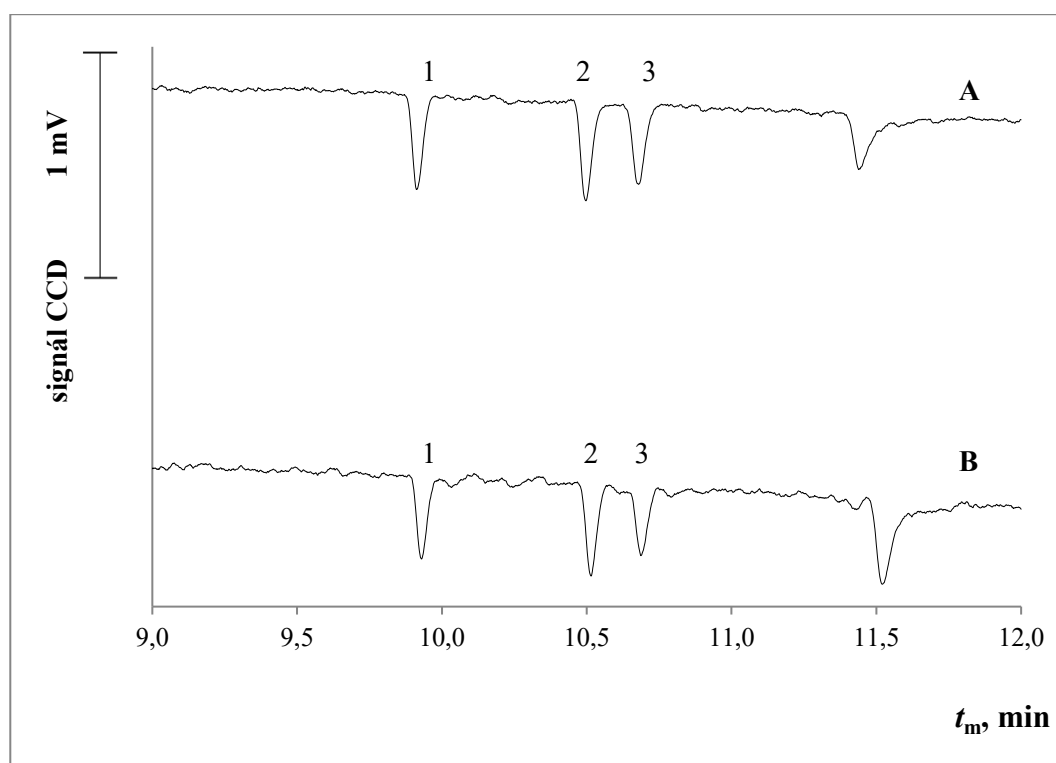


Obr. 6 Závislost mobility vybraných aminokyselin na koncentraci kyseliny octové v BGE. 1 - Val, 2 - Ile, 3 - Leu, 4 - Ser, 5 - Thr, 6 - Asn, 7 - Met, 8 - Trp, 9 - Gln, 10 - Glu, 11 - Phe, 12 - Tyr, 13 - Pro.

Ze získaných dat byla jako optimální koncentrace pro separaci směsi AMK vybrána $1,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kde došlo k prakticky úplnému odseparování jednotlivých aminokyselin. Nižší koncentrace nebyla použita z důvodu časové náročnosti, jak je patrné z Obr. 5 a 6.

4.3 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrační techniky

Po optimalizaci složení základního elektrolytu probíhala další měření za účelem objevení nejoptimálnějšího způsobu prekoncentrace, tudíž snížení meze detekce. Počáteční měření probíhala se směsí tří aminokyselin (lysin, arginin, histidin) o koncentraci $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že metoda byla optimalizována pro analýzu extraktů z tabákových listů, které mají vysokou vodivost, nebylo pro směs AMK vhodné použít FASS. Bylo tedy přistoupeno k metodě *pH-mediated stacking*. První sada měření zahrnovala samotné nadávkování vzorku (Obr. 7A), následně byl nadávkován vzorek a za ním $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCl}$ (Obr. 7B).



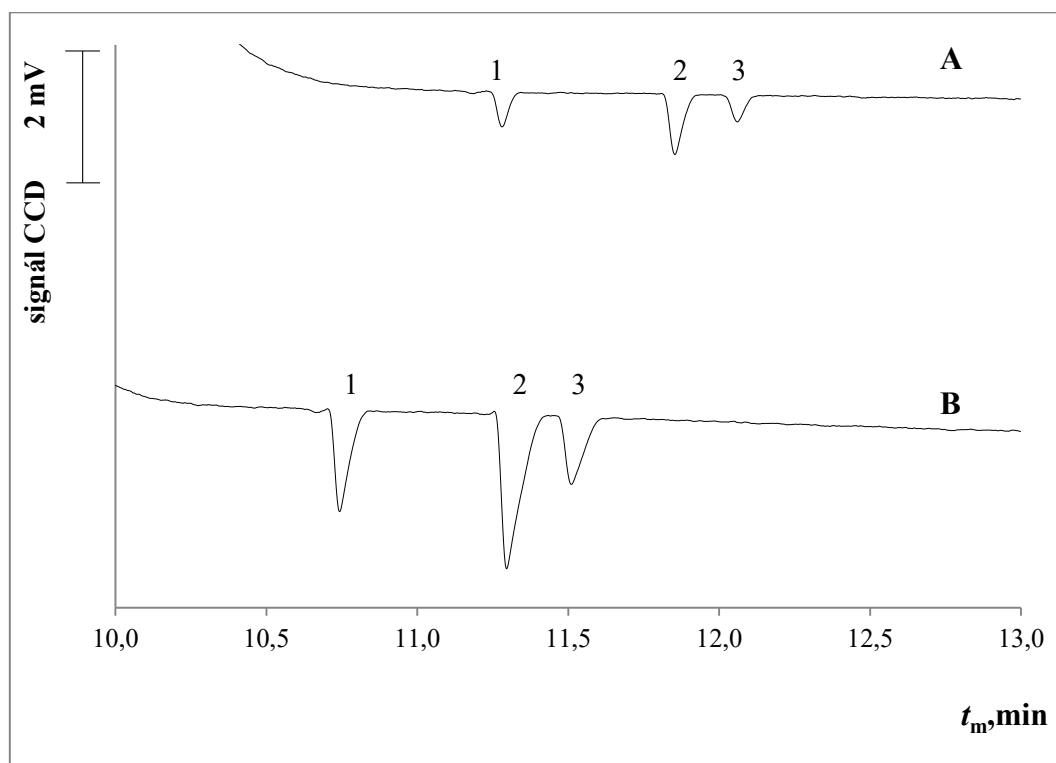
Obr. 7 Vliv dávkování HCl za zónu vzorku, koncentrace AMK $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

A - Dávkování samotného vzorku rozpuštěného v $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl 5kV, 10 s.

B - dávkování vzorku 5 kV, 10 s, $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl 5 kV, 10s. 1 – Lys, 2 – Arg, 3 – His

Dávkování kyseliny chlorovodíkové za vzorek nemělo na zkoncentrování prakticky žádný vliv (Obr. 7B), píky vypadají prakticky stejně. Dále bylo testováno dávkování NaOH před vzorek. Nadávkování $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH 5 kPa po dobu 5 s a vzorku 5 kV po dobu 10 s znehodnotilo celou analýzu. V dalším kroku proto bylo použito stejné dávkování obou složek s tím rozdílem, že koncentrace hydroxidu sodného byla $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Snížením koncentrace hydroxidu se výsledek analýzy výrazně zlepšil. Objevily se píky příslušných aminokyselin. Následoval tedy krok prodloužení doby dávkování jak samotného hydroxidu na 30 s, tak vzorku aminokyselin na 60 s. Tento způsob však přinesl značné zhoršení, jelikož množství vzorku už bylo příliš velké, a proto došlo k překrytí druhého a třetího píku a vznikl jeden masivní pík nepravidelného tvaru. Logickým krokem tedy bylo naředit vzorek aminokyselin. Výsledná koncentrace poté činila $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl takto připravený roztok změřen stejným způsobem jako vzorek předešlý. Tato analýza vykazovala daleko

pravidelnější tvar píků, avšak stále docházelo k překryvu píku argininu a histidinu, a tak bylo přistoupeno k prodloužení intervalu dávkování hydroxidu sodného (Obr. 8A).



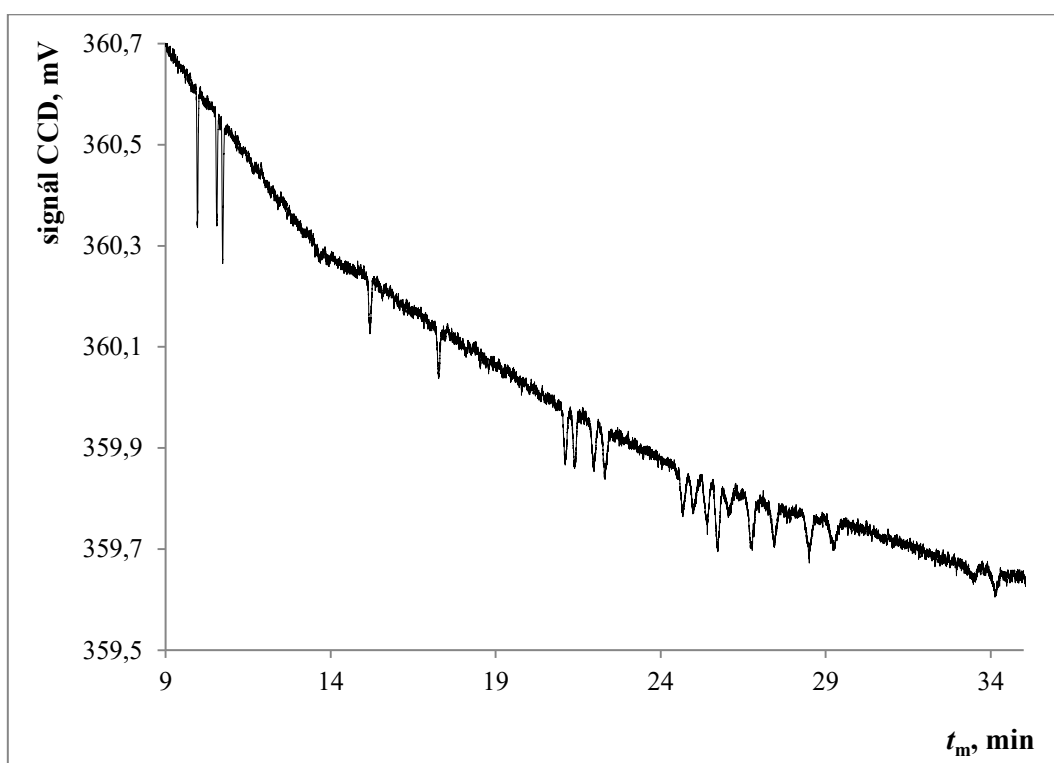
Obr. 8 Vliv dávkování NaOH před zónu vzorku, koncentrace AMK $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

A - $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH 5 kPa, 60 s, vzorek 5 kV, 60 s, B - $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH 5 kPa, 60 s, vzorek 5 kV, 200 s. 1 – Lys, 2 – Arg, 3 – His

Při dávkování hydroxidu po dobu jedné minuty lze zaznamenat výrazné zlepšení oproti předchozím měřením. Píky jsou vysoké, úzké a dobře rozlišené. Další postup zahrnoval zvyšování doby dávkování vzorku. Čas dávkování bylo prodlužováno nejprve na 90 s, 120 s, 150 s a nakonec na 200 s (Obr. 8B). Na samotný tvar píků prodloužení doby dávkování nemělo žádný vliv, avšak čím déle dávkování trvalo, tím více se snižovalo rozlišení píků argininu a histidinu. Poté bylo testováno prodlužování dávkování NaOH. Bylo vyzkoušeno dávkování 90 s, 120 s, a 150 s, ale na separaci nemělo žádný vliv. Po provedení všech experimentů byla u vybraných způsobů dávkování odhadnuta mez stanovitelnosti (LOQ) pro lysin jako desetinásobek šumu základní linie. Pro dávkování samotného vzorku (5 kV, 10 s) byla LOQ odhadnuta na $278 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při dávkování $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH 5 kPa, 60 s a vzorku 5 kV, 60 s se LOQ snížila na $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při prodloužení doby dávkování vzorku na 200 s byla LOQ

$0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Je tedy zřejmé, že optimalizované dávkování snížilo LOQ pro lysin o více než dva řády.

Optimalizované dávkování bylo použito na původní směs 19 aminokyselin o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se na elektroferogramu objevily píky pouze některých aminokyselin. Pro koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se už objevily píky všech aminokyselin ve směsi. Nejostřejší jsou píky prvních tří aminokyselin – lysinu, argininu a histidinu. S rostoucím migračním časem dochází k rozšiřování píků a ztrátě rozlišení (Obr. 9).



Obr. 9 Optimalizované dávkování ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH 5 kPa, 60 s, vzorek 5 kV, 200 s) původní směsi aminokyselin o koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

5. Závěr

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky separace směsi aminokyselin pomocí kapilární zónové elektroforézy. Po vyhodnocení naměřených dat je možné prohlásit, že použití octové kyseliny od různých výrobců pro přípravu základního elektrolytu nemá na separaci žádný významný vliv.

Druhým úkolem bylo najít optimální koncentraci octové kyseliny v základním elektrolytu tak, aby bylo dosaženo co nejlepší separace s co nejvyšším rozlišením. Tato koncentrace byla vyhodnocena jako $1,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při vyšších koncentracích dochází ke zrychlování některých aminokyselin, a to vede následně k překrývání jednotlivých píků.

Na závěr byl optimalizován způsob dávkování vzorku s vyžitím on-line prekoncentrace. Jako nejúčinnější se ukázalo dlouhé elektrokinetické dávkování vzorku napětím 5 kV po dobu 200 s. K zakoncentrování vzorku se nejlépe osvědčilo nadávkování zóny $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidu sodného hydrodynamicky 5 kPa po dobu 60 s před vzorek. Tímto způsobem se podařilo snížit mez stanovitelnosti rychle migrujících aminokyselin o více než dva řády. S klesající mobilitou aminokyselin se účinnost prekoncentrace snižovala.

Seznam použité literatury

1. Univerzita Karlova. *Biochemie: základní kurz*. (Karolinum, 2009).
2. Tůma, P. & Samcová, E. Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické listy* **101**, 200–207 (2007).
3. McMurry, J. *Organická chemie*. (VUTIUM ; Vysoká škola chemicko-technologická, 2007).
4. Řezáčová, M., Stoklasová, A. & Univerzita Karlova. *Základy biochemie lidského organismu*. (Karolinum, 2008).
5. Armstrong, M., Jonscher, K. & Reisdorph, N. A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2717–2726 (2007).
6. Moore, S., Spackman, D. H. & Stein, W. H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry* **30**, 1185–1190 (1958).
7. Csapó, J., Albert, C., Lóki, K. & Csapó-Kiss, Z. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria* **1**, 5–29 (2008).
8. Hušek, P. & Šimek, P. Advances in Amino Acid Analysis. *LC-GC North America* **19**, 986–999 (2001).
9. Hobza, P. Nekovalentní interakce s přímou participací vodíku: Vodíková vazba, nepravá vodíková vazba a dvouvodíková vazba. *Chemické listy* **102**, 884–888 (2008).
10. Zahradníčková, H., Hartvich, P., Šimek, P. & Hušek, P. Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after fast derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. *Amino Acids* **35**, 445–450 (2008).
11. Trontel, A. *et al.* Applying gas chromatography to monitor extracellular free amino acids content in cultivation medium during lactic acid fermentation. *The EuroBiotech Journal* **1**, 27–35 (2017).
12. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. (Pavel Klouda, 2003).
13. Zoppa, M., Gallo, L., Zacchello, F. & Giordano, G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC–ESI–MS/MS. *Journal of Chromatography B* **831**, 267–273 (2006).
14. Kašička, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320–329 (1997).
15. Vilches, A. P., Norström, S. H. & Bylund, D. Direct analysis of free amino acids by mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* (2017). doi:10.1002/jssc.201601097
16. Takano, Y., Chikaraishi, Y. & Ohkouchi, N. Isolation of underivatized amino acids by ion-pair high performance liquid chromatography for precise measurement of nitrogen isotopic composition of amino acids: Development of comprehensive LC×GC/C/IRMS method. *International Journal of Mass Spectrometry* **379**, 16–25 (2015).
17. Šolínová, V., Jelínek, I., Opekar, F. & Kašička, V. Stanovení vybraných kationtů v minerálních vodách a infúzním roztoku prokainu kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí. *Chemické listy* 191–196 (2004).
18. Holland, L. Capillary electrophoresis of biomolecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 6909–6910 (2015).
19. Schwer, C. & Kenndler, E. Capillary electrophoresis. *Chromatographia* **30**, 546–554 (1990).

20. Omar, M. M. A., Elbashir, A. A. & Schmitz, O. J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. *Food Chemistry* **214**, 300–307 (2017).
21. Soga, T. & Imaizumi, M. Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *ELECTROPHORESIS* **22**, 3418–3425 (2001).
22. Šlampová, A., Malá, Z., Pantůčková, P., Gebauer, P. & Boček, P. Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis: CE and CEC. *ELECTROPHORESIS* **34**, 3–18 (2013).
23. Lucy, C. A. & Wu, Q. Characteristics and Calibration of Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science* **36**, 33–36 (1998).
24. Opekar, F. Využití integrovaného obvodu pro středovlnné radiové přijímače v bezkontaktním vodivostním detektoru pro detekci látek v roztoku. *Chemické listy* **103**, 839–842 (2009).
25. Huang, X. & Zare, R. N. Improved end-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **63**, 2193–2196 (1991).
26. Haber, C., Jones, W. R., Soglia, J., Surve, M. A., McGlynn, M., Caplan, A., Reineck, J. R. & Krstanovic, C. Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis – A Powerful Tool in Ion Analysis. *Journal of Capillary Electrophoresis* **3**, 1–11 (1996).
27. Negri, P. & Schultz, Z. D. Online SERS detection of the 20 proteinogenic L -amino acids separated by capillary zone electrophoresis. *The Analyst* **139**, 5989–5998 (2014).
28. Altria, K., Marsh, A. & Sängler-van de Griend, C. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *ELECTROPHORESIS* **27**, 2263–2282 (2006).
29. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V. & Gaš, B. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *ELECTROPHORESIS* **24**, 671–677 (2003).
30. Hodek, O., Křížek, T., Coufal, P. & Ryšlavá, H. Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 2383–2391 (2017).
31. Horáková, J., Maier, V. & Ševčík, J. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chemické listy* **100**, 163–168 (2006).
32. Kitagawa, F. & Otsuka, K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1335**, 43–60 (2014).
33. Meng, P., Wang, Y. & Meng, L. pH-mediated stacking in capillary electrophoresis for analysis of opiates in saliva. *Analytical Methods* **4**, 3695 (2012).
34. Zhao, Y. & Lunte, C. E. pH-Mediated Field Amplification On-Column Preconcentration of Anions in Physiological Samples for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **71**, 3985–3991 (1999).
35. Williams, B. A. & Vigh, G. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **68**, 1174–1180 (1996).