

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

V { uqmqÀ kpp² 'tgr ct ceg'čó kpmuugkp
''''''c'r dwp ej 'h vgm

Rgt 'Tb gmc'Rgt 'J w-gm
Dkqmqi kenř "egpvtwo "CX" T" gunř 'Dwf lqxkeg





7. VYSOKOÚČINNÉ SEPARACE AMINOKYSELIN a PŘÍBUZNÝCH LÁTEK

Petr ŠIMEK a Petr HUŠEK

Biologické centrum AV ČR

Laboratoř analytické biochemie

Branišovská 31

CZ – 370 05 České Budějovice

www.bclab.eu



Analýza aminokyselin a příbuzných látek

7.1.ÚVOD

- **Stále významný úkol a výzva v oboru analytické chemie organických látek**
- **Prakticky každá nově vyvinutá technika vysokoúčinné separace látek je testována na analýze aminokyselin**
- **Popsáno enormní množství metod ke stanovení AA**
- **Neexistuje jediná, universální metoda pro řešení konkrétního problému analýzy aminokyselin**
- **Zvolený postup analýzy vždy odvíjí:**
 - **konkrétní přístrojové vybavení**
 - **znalosti a zkušenosti řešitele, jeho invence**
 - **povaha samotného analytického problému**



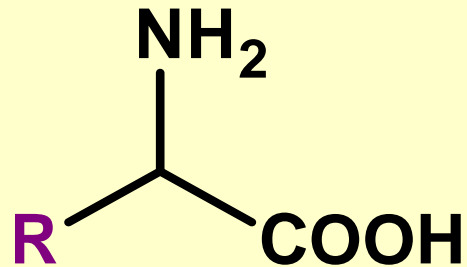
Analýza aminokyselin a příbuzných látek

7. Program přednášky

- 7.1. Přehled struktur a fyzikálně-chemické vlastnosti**
- 7.2. Příprava vzorku k analýze AAs**
- 7.3. Vysokoúčinné separace látek**
 - 7.3.1. Ionexová chromatografie**
 - 7.3.2. Separace bez předkolumnové derivatizace**
 - 7.3.3. Předkolumnová derivatizace pro HPLC a CE separace**
 - 7.3.4. Předkolumnová derivatizace pro GC**
 - 7.3.5. Nové metody pro cílenou metabolomickou analýzu AAs a příbuzných látek**
- 7.4. Závěr**

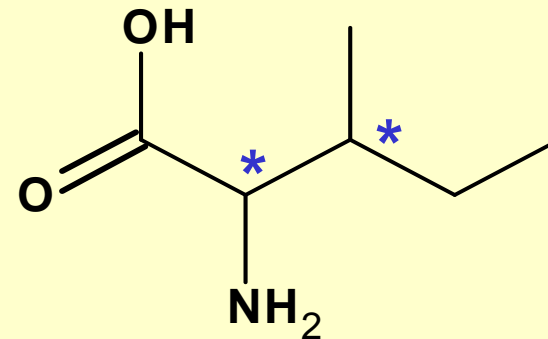
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností



Alifatické - Gly (75), Ala (89), Val (117), Leu, Ile, Met (131)

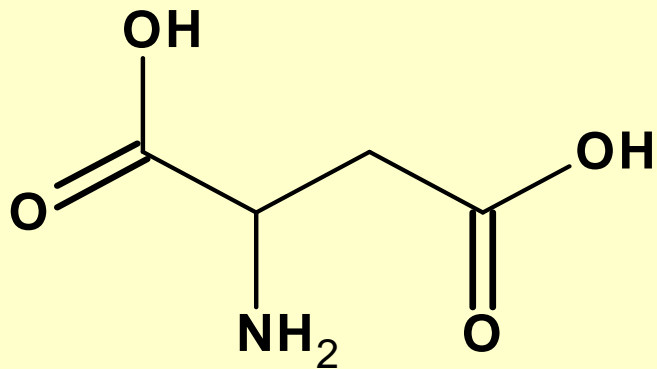
Ile (131)



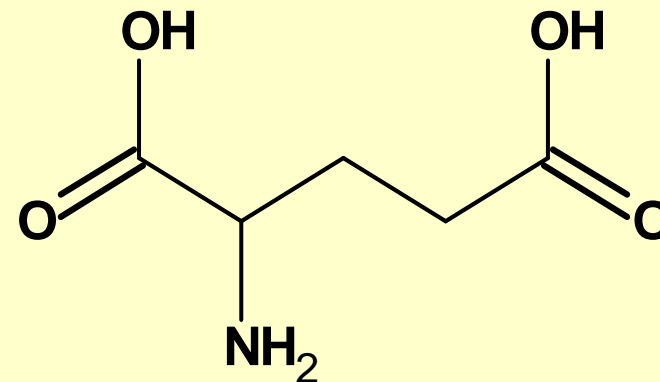
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností

Asp (133)



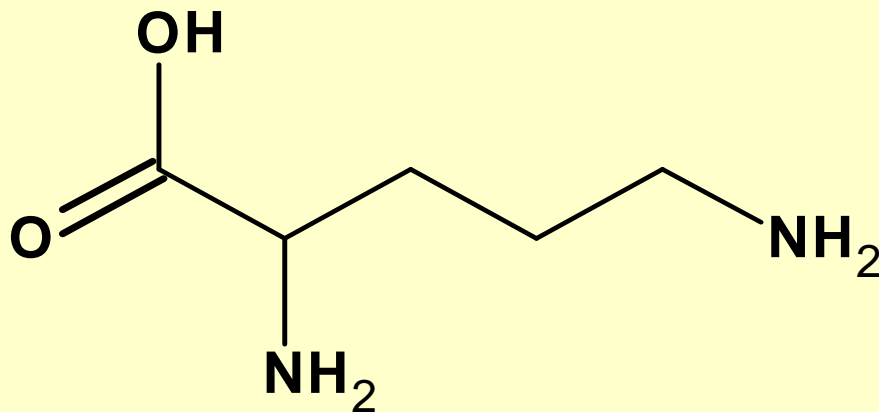
Glu (147)



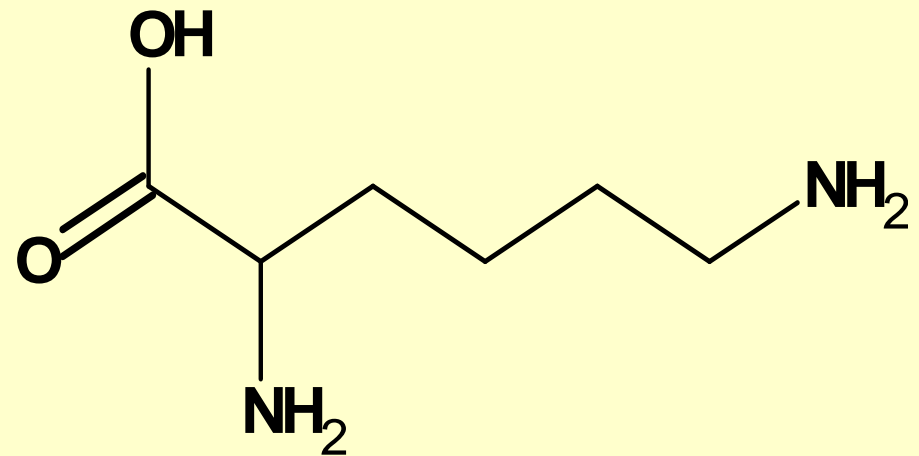
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fy-che vlastnosti

Orn (128)



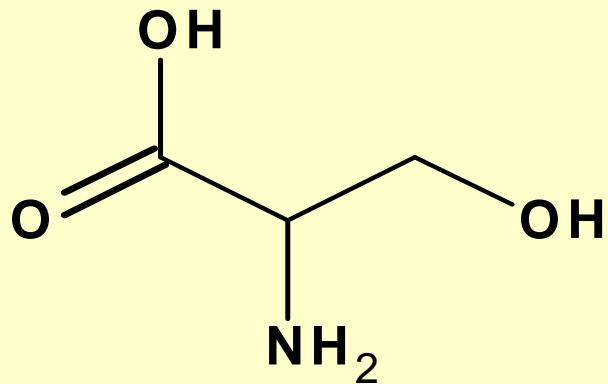
Lys (146)



Aminokyseliny a příbuzné látky

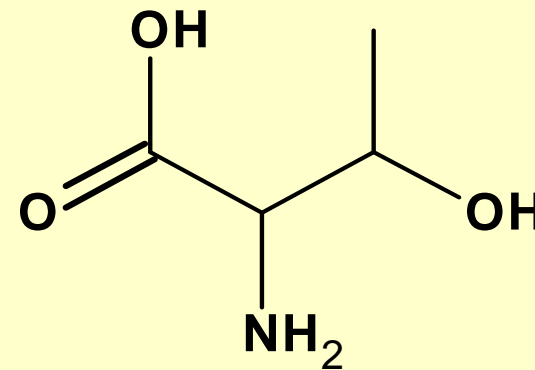
7.1.2. Přehled struktur a fy-che vlastnosti

Ser (105)



sweet

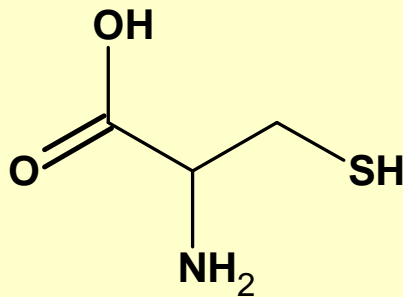
Thr (119)



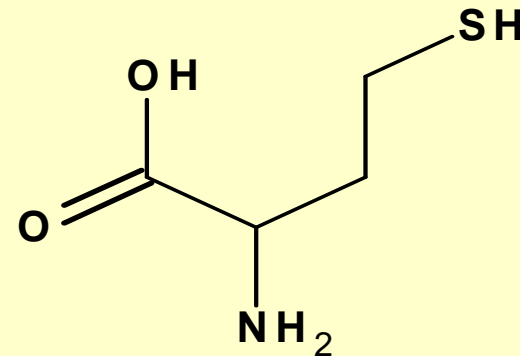
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fy-che vlastnosti

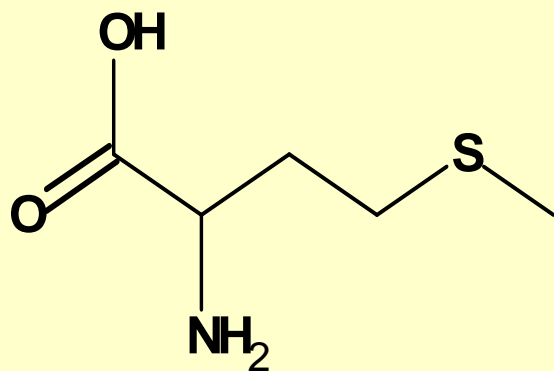
Cys (121)



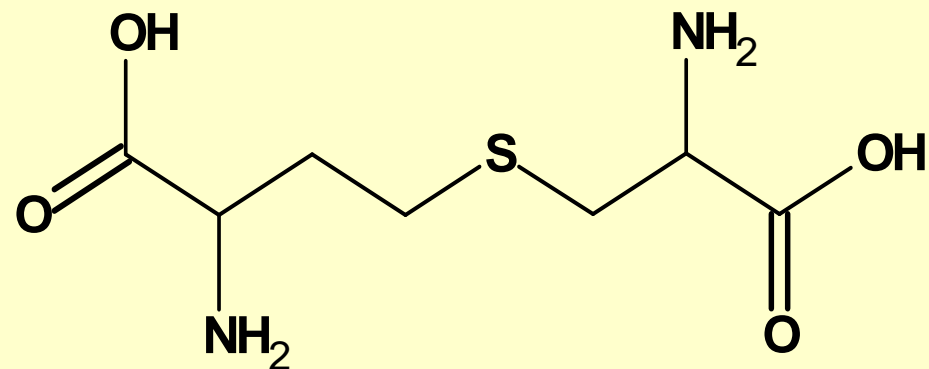
Hcy (135)



Met (147)



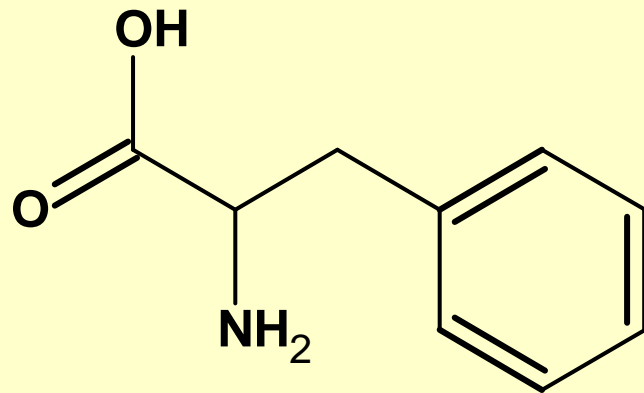
CTH (222)



Aminokyseliny a příbuzné látky

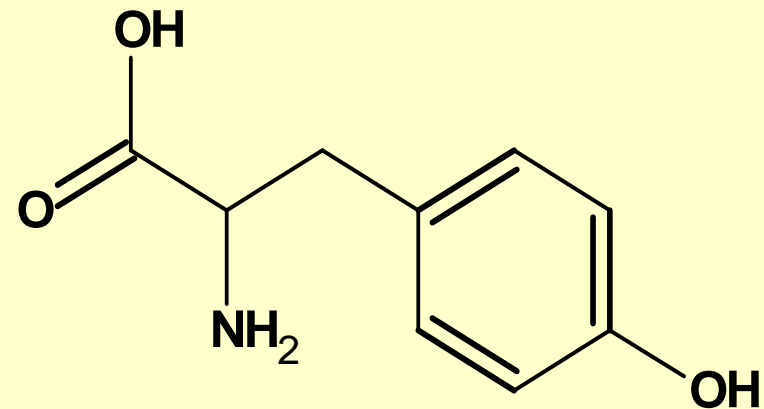
7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností

Phe (165)



bitter

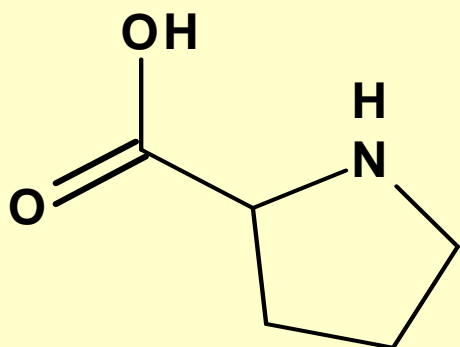
Tyr (181)



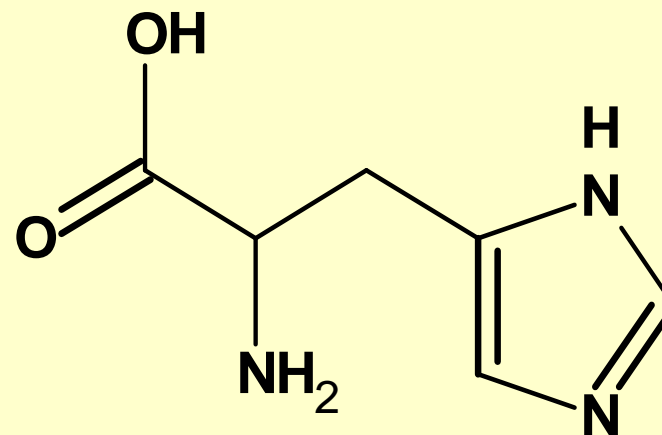
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností

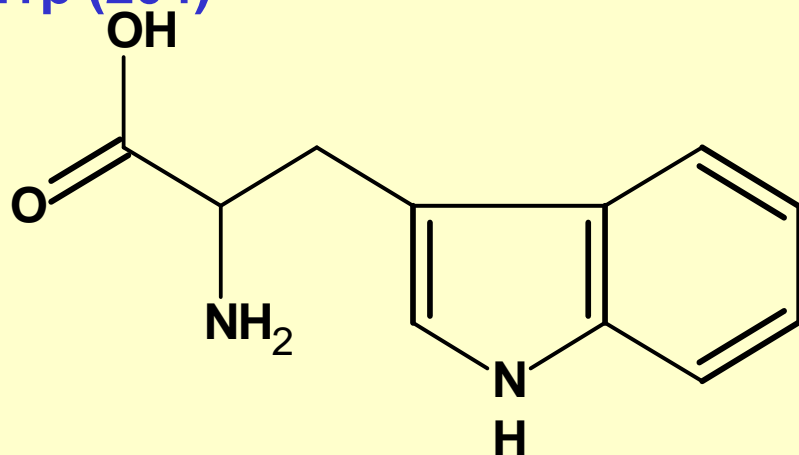
Pro (115)



His (155)



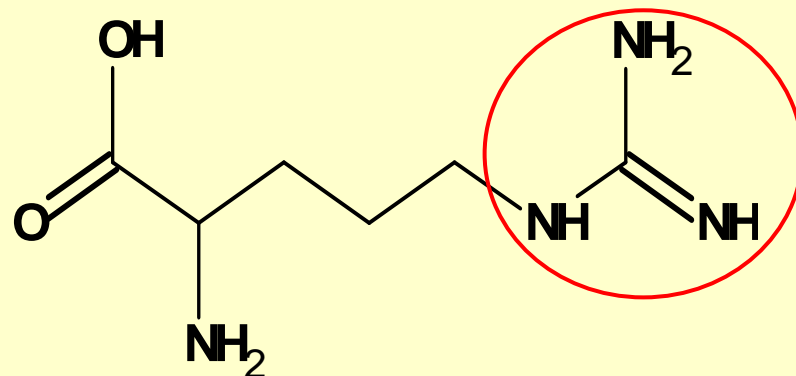
Trp (204)



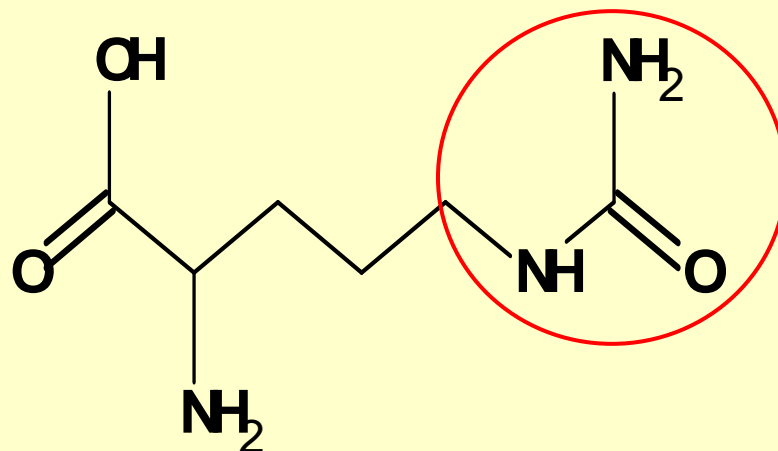
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností

Arg (174)



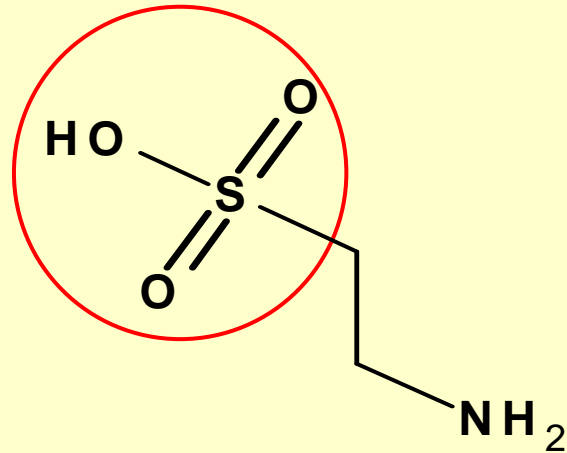
CIT (175)



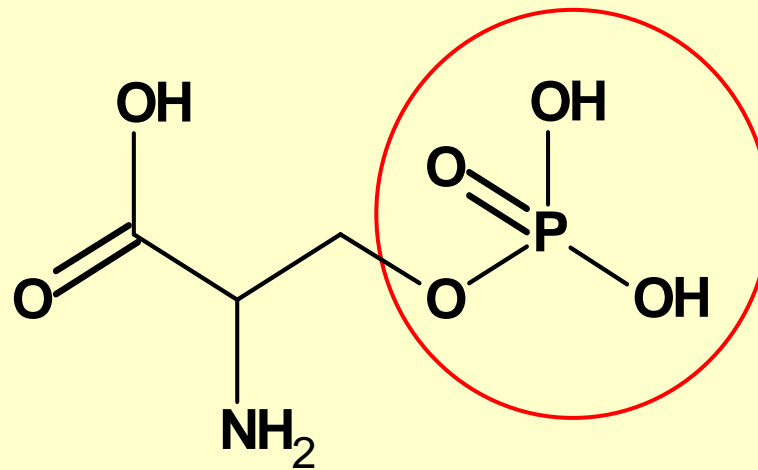
Aminokyseliny a příbuzné látky

7.1.2. Přehled struktur a fyzikálně-chemických vlastností

Taurine (125)



PSer (185)





7.2. PŘÍPRAVA VZORKU K ANALÝZE

Zásobní roztoky

Reálné vzorky

Matrice - komplexní, heterogenní směs anorganických solí, nízkomolekulárních látek (metabolitů) a biopolymerů (proteiny, polysacharidy, lipidy a jejich kombinace)

Matrice negativně ovlivňuje separační proces

- ireverzibilní sorpcí na povrch stacionární fáze ucpáváním, postupnou „otravou“ separačního systému
- zahlcováním detektoru tvorbou nežádoucího šumu, potlačováním a překryvem signálu sledovaných analytů

Dobře promyšlená a provedená příprava vzorku rozhoduje o celkové kvalitě vypracované metody ke stanovení aminokyselin

Vedle optimalizace separace, příprava vzorku časově a metodicky nejnáročnější krok celé analýzy aminokyselin

7.2. Extrakce aminokyselin a příprava vzorku k separaci

Hlavní praktické postupy extrakce aminokyselin

- ❑ Naředit biologický vzorek vhodným médiem, zpravidla puforem o definovaném pH a nadávkovat vzorek přímo do vysokoúčinného separačního systému, tzv. postup „dilute and shoot“;
- ❑ Nadávkování extraktu po vysrážení polymerních struktur (bílkovin, polysacharidů) do vysokoúčinného separačního systému a následná separace látek a jejich detekce;
- ❑ Záchyt aminokyselin přímo s matricí vzorku nebo vodného extraktu na vhodném sorbentu, zpravidla silném katexu;
- ❑ Derivatizace analytu, v tomto případě AA, vhodným derivatizačním činidlem na reakční produkt s výhodnými separačními a detekčními vlastnostmi.



7.2. Extrakce aminokyselin a příprava vzorku k separaci

Hlavní postupy přípravy vzorků

7.2.1. Vysrážení biopolymerů (deproteinace) vhodným médiem

kyselina 5-sulfosalicylová

kyselina chloristá

organická rozpouštědla, acetonitril, ethanol, aceton



7.2. Extrakce aminokyselin a příprava vzorku k separaci

Hlavní postupy přípravy vzorků

7.2.2. Kyselá hydrolýza peptidů a proteinů v inertní atmosféře (vakuu)

6 M konstantně vroucí HCl v kapalně či plynné fázi

za přesně určených podmínek (110°C / 20 – 24, 48 a 72 hod)

Trp – nutná přítomnost redukující kyseliny k minimalizaci oxidace indolového kruhu, nejčastěji kys. thioglykolová, merkaptoethansulfonová (MESA)

Cys/CC/Met – oxidace kyselinou peroxymravenčí před vlastní hydrolýzou



7.2. Extrakce aminokyselin a příprava vzorku k separaci

Hlavní postupy přípravy vzorků

7.2.3. Záchyt aminokyselin na vhodném sorbentu

zpravidla silný katex v H cyklu, aminokyseliny jsou zadrženy na ionexu a eluovány bazickým roztokem amoniaku nebo NaOH

7.2.3. Záchyt biopolymerů na vhodném sorbentu

záchyt lipidů, proteinů na kolonce Sep-Pak C18 (Pico-Tag kit)



7.2. Extrakce aminokyselin a příprava vzorku k separaci – hlavní postupy přípravy vzorků

7.2.4. Derivatizace aminokyselin a příbuzných látek a jejich transformace na produkt se žádanými separačními a detekčními vlastnostmi

IEC - separace aminokyselin na ionexové koloně a postkolonová derivatizace ninhydrinem

HPLC a CE - modifikace aminoskupiny na fluorofor či chromofor pro citlivou detekci (FD, LIFD, UVD) a lepší separaci
PITC, OPA, FMOC, AQC.....

GC - úplné zablokování protických funkčních skupin a zvýšení jejich těkavosti

Silylace

Esterifikace a acylace

Chlorformiáty



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem

7.3.2. Techniky bez předkolonové derivatizace

HPLC/MS přímá separace aminokyselin bez derivatizace

CE/MS

7.3.3. HPLC a CE s předkolonovou derivatizací

7.3.4. GC s předkolonovou derivatizací všech protických funkčních skupin

7.3.5. Metody cílené metabolomické analýzy – analýza aminokyselin a příbuzných látek po derivatizaci ITRAQ či RCF paralelní GC/MS a HPLC/MS



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem

- ❑ Původní práce z konce 50.let Spackman D.H., Stein W.H., Moore S., Anal. Chem. **1958**, 30, 1190
- ❑ Rozšířena v klinické praxi dopsud
- ❑ Kvantitativní stanovení 80 aminokyselin a příbuzných látek v tělních tekutinách (sérum, plasma, moč, moškomíšní mok)
- ❑ Analyzátor aminokyselin – např. Beckman 6300, Hitachi L-8900, Biochrom 30, česká firma Ingos, AAA 400. <http://instruments.ingos.cz/>



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem

Postup analýzy

200-500 ul serum



Pufr pH=4.65 (pH<7) + 20% sulfosalicylic a. (300:200)



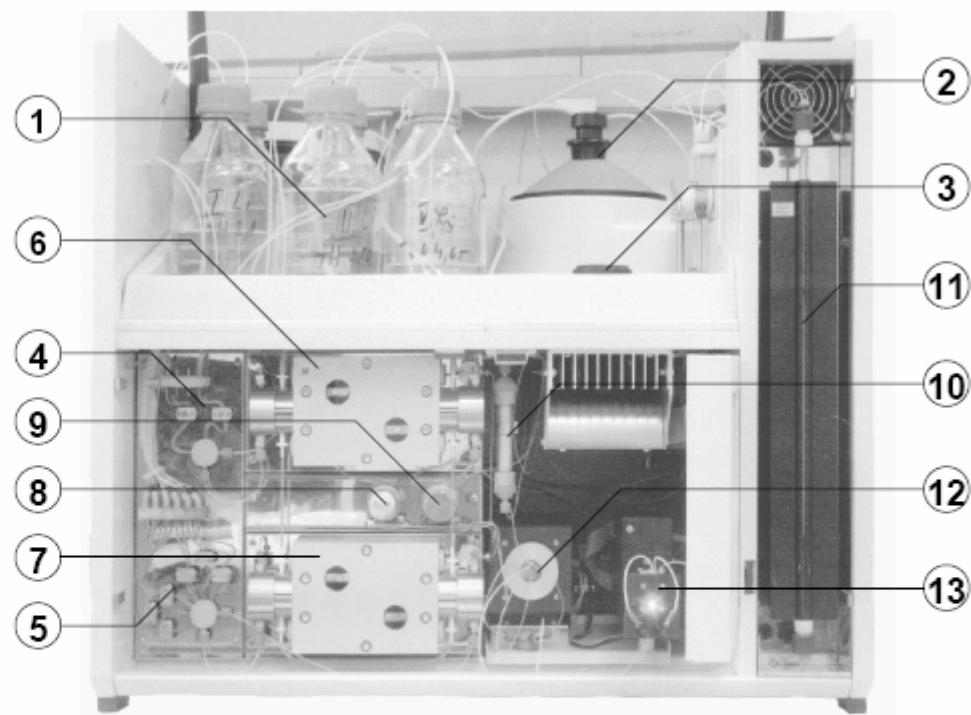
Centrifuge (5 min)



250 ul inject into an AAA analyser

or freeze and store at – 20° C (1 year)

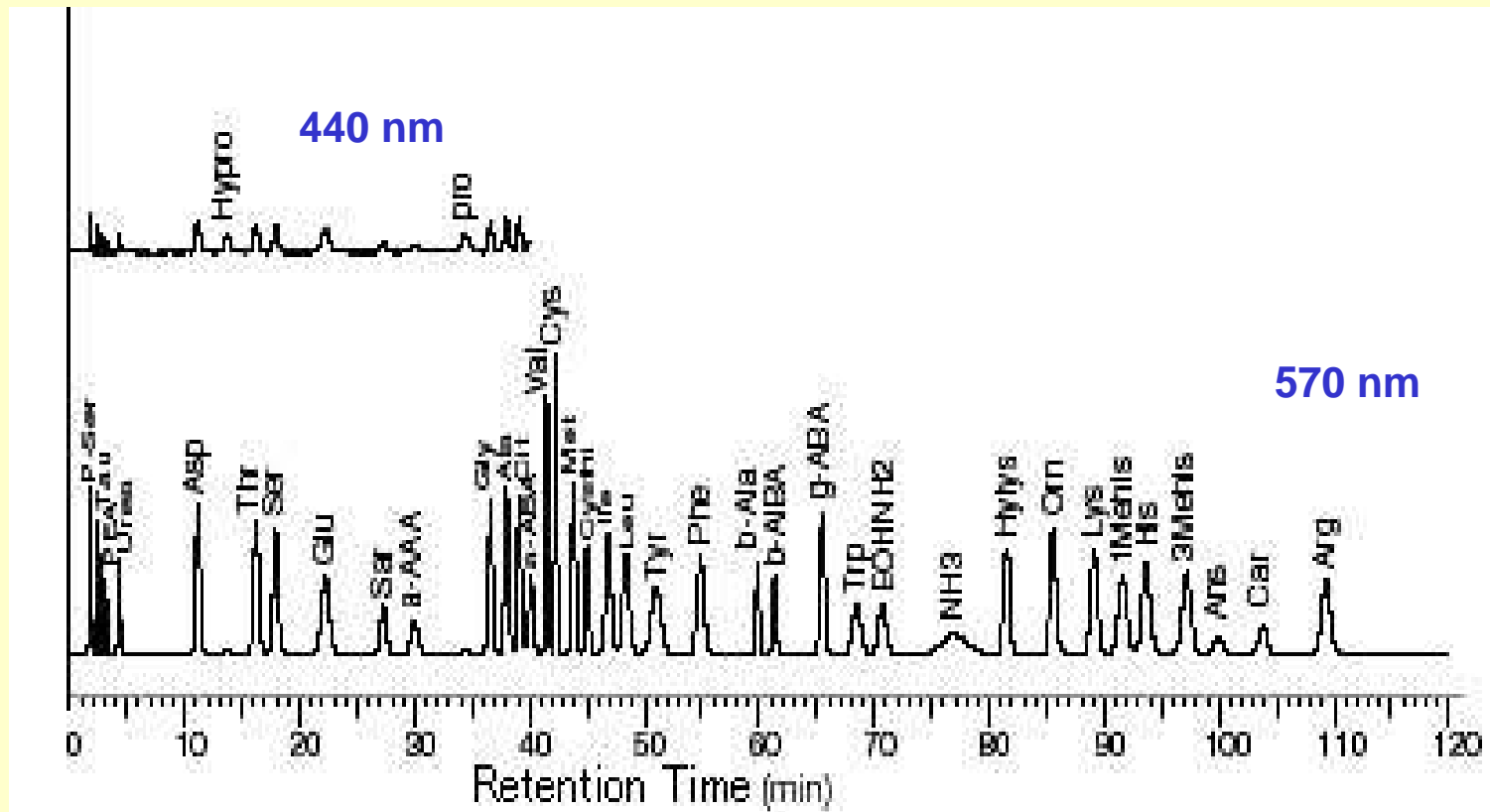
7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem



- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. Pufry | 8. Odvzdušňovací ventil pro ninhydrin |
| 2. Ninhydrin | 9. Odvzdušňovací ventil pro pufry |
| 3. Kotouč dávkovače | 10. Předkolona |
| 4. Ventily pro přepínání NHD/H ₂ O | 11. Kolona |
| 5. Ventily pro přepínání pufřů | 12. Reaktor |
| 6. Pumpa 2 | 13. Detektor |
| 7. Pumpa 1 | |

7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem



Ukázka separace 50 fyziologických aminokyselin a příbuzných látek technikou IEC pomocí analyzátoru Hichai L8900, gradientová eluce citronanem sodným. UV detekce současně při 440 a 570 nm. Zdroj, firemní materiály Hitachi.



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.1. Ionexová chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem

- ❑ Analýza na skleněné ionexové koloně 3.7 x 450 mm trvá do 156 min, $p < 40$ bar, eluce gradientem Li pufru s rostoucí iontovou silou a pH
- ❑ Kalibrace se provádí po vyčerpání ninhydrinu
- ❑ Validovaná, úřady uznávaná metoda stanovení aminokyselin a příbuzných látek
- ❑ LOD 10-50 pmol, lze sledovat komponenty 20 – 500 pmol.
- ❑ Zdlouhavá, ne zcela provozně spolehlivá technika
- ❑ Cena přístroje > 2 mil. Kč
- ❑ Pochopitelná snaha tento letitý, zdlouhavý standard nahradit rychlejší a levnější metodou



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.2. HPLC a CE nederivatizovaných aminokyselin

- ❑ v souvislosti s diagnostikou novorozeneckých poruch je věnována velká pozornost sledování AA technikou HPLC/MS/MS
- ❑ 40 diagnostických komponent lze sledovat semikvantitativně během 10 min a odhalit metabolickou poruchu novorozence v kapce krve (ca 8 ul)
- ❑ Reverzní systém C18, extrakce vysušené kapky krve MeOH, přímé dávkování extraktu na kolonu
- ❑ Piraud M., et al., Rapid Commun in Mass Spec 19 (2006), 1587.
- ❑ Zoppa M., et al., J. Chromatogr. B 831 (2006), 267-273.

7.3.2. HPLC a CE nederivatizovaných aminokyselin

Porovnání LOD souboru 12 aminokyselin různými detektory

[Petritis K., Elfakir C. et al, JCH A 961 (2002), 9-21]

Těkavá mobilní fáze 0.5 mM pentadekafluoroktanová kyselina ve vodě

Detektor	LOD [ug/mL]
Vodivostní detektor	1.0-5.0
NMR	100-500
MS/MS	0.05-0.5
CLND	0.3-0.6
UV	NA, 0.9-3
ELSD	1-7.5



7.3. Hlavní metody vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek

7.3.2. CE nederivatizovaných aminokyselin

Poinsot V. et al., Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 27 (2006), 176-194

Klampfl Ch. W., Determination of underivatized amino acids by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, kap. 1.3.1. a kap. 2.3.1. v monografii *Quantitation of amino acids and amines by chromatography, Method and protocols*, J. Chromatogr. Library – Vol 70., Molnar-Perl I, ed., Elsevier 2005. Amsterdam.

7.3.3. DERIVATIZACE aminokyselin pro HPLC/CE aplikace

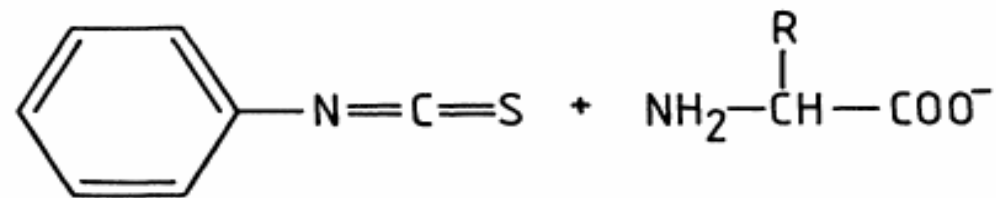
- **Derivatizační činidla reagují s primární, a s výjimkou OPA i sekundární aminoskupinou AA ve vysokých výtěžcích.**
- **Každé z činidel má určité přednosti a nevýhody.**
- **Kritické faktory bývají:**
 - **rušivý nadbytek derivatizačního činidla**
 - **rušivý vliv matrice vzorku**
 - **nestabilita produktů, tvorba více derivátů**
 - **omezená rozpustnost činidel ve vodných pufovaných médiích,**

což snižuje reaktivitu činidel a ovlivňuje celkově separační procesy a kvantitativní stanovení.

7.3.3. DERIVATIZACE aminokyselin pro HPLC separace

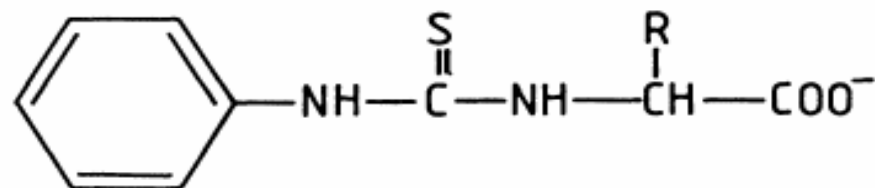
7.3.3.1. Derivatizace phenylisothiokyanátem (PITC)

- Reaguje s primární i sekundární aminokupinou během 5 min



Phenylisothiocyanate
(PITC)

Amino acid





7.3.3. DERIVATIZACE aminokyselin pro HPLC separace

Derivatizace phenylisothiokyanátem (PITC)

- Reaguje s primární i sekundární aminoskupinou během 5 min
- Výborná stabilita derivátů
- Detekce – stačí binární pumpa a UV detektor
- 27 aminokyselin lze separovat během 40 min
- LOD (UV detekce) ca kolem 1 pmol, pracovní oblast 20 – 500 pmol
- Nutné eliminovat nadbytek činidla



7.3.3. DERIVATIZACE aminokyselin pro HPLC aplikace

7.3.3.1. Derivatizace phenylisothiokyanátem (PITC)

Postup analýzy

0.2 g protein food + IS (norleucine)



6 M HCl hydrolysis with 0.1 % phenol



(Sep-pak clean-up procedure)



Extract drying at 65 mtorr



Redrying with EtOH-water-TEA (2:2:1)



Derivatization with EtOH-water-TEA-PITC (7:1:1:1), 20ul, 20min



Excess reagent and by-products removal at 65 millitorr

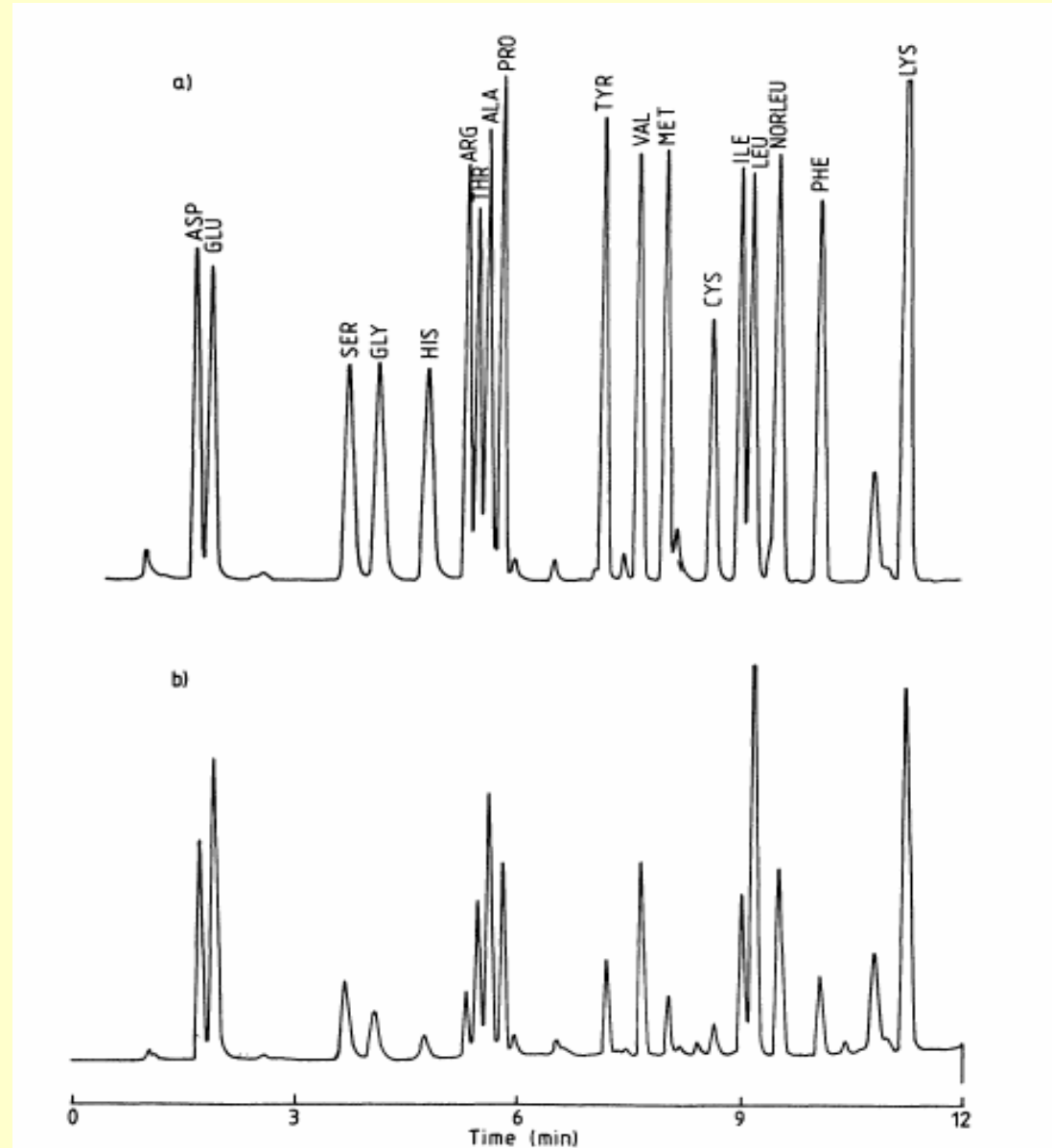


HPLC gradient (0.14 M NaAc, pH=6.4, MeCN-water), UV=254 nm

31

7.3.3.1. Derivatizace phenylisothiokyanátem (PITC)

a) Standard mix



Zdroj, White J.A. et al., J.
Automatic Chem. 8, (1986), 170.



7.3.3.1. Derivatizace fenylisothiokyanátem (PITC)

PITC/HPLC analýza sojové melasy

Přesnost a správnost stanovení ?

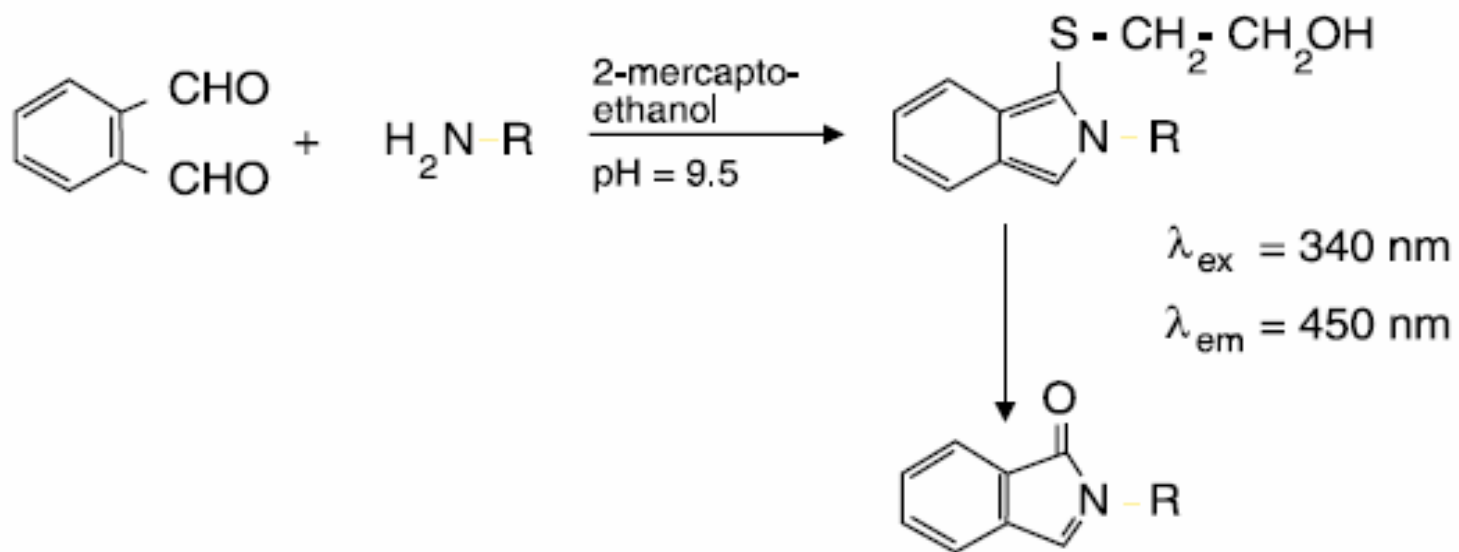
Amino-acid [mg/g]	Composition from IEC system	Composition from Pico-Tag	Apparent composition from Pico-Tag after sample clean-up
ASP	6.0	5.5	7.3
GLU	8.0	8.7	10.7
SER	1.7	1.8	2.3
GLY	1.9	1.9	2.4
HIS	1.4	1.9	2.7
ARG	2.9	3.5	4.5
THR	1.8	2.0	2.6
ALA	2.0	2.1	2.6
PRO	2.0	2.1	2.6
TYR	2.2	2.2	2.9
VAL	1.4	1.4	1.6
MET	0.9	1.8	2.2
CYS	1.3	0.4	0.5
ILE	1.3	1.4	1.3
LEU	1.9	1.9	1.9
PHE	2.2	2.3	1.7
LYS	+	++	1.4

+ impossible to quantify as co-eluted with other ninhydrin positive compound.

++ cannot be quantified due to shoulder on peak.

7.3.3.2. Derivatizace o-ftaldialdehydem (OPA)

Reaction scheme



Používané thioly - 2ME, NAC, MPA

7.3.3.2. Derivatizace o-ftaldialdehydem (OPA)

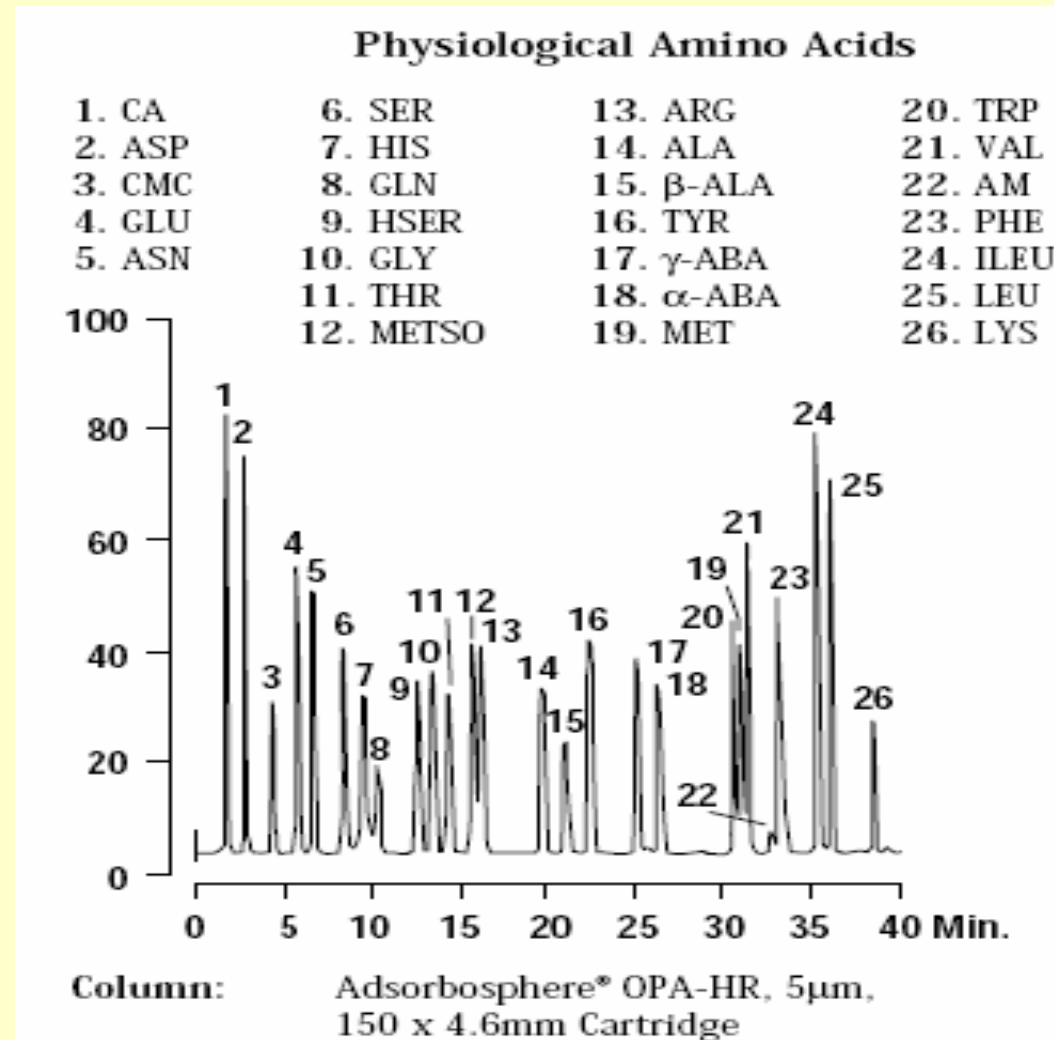
- **Vysoce fluoreskující, avšak nestabilní isoindolové deriváty**
- **Velmi jednoduchá, dostupná metoda**
- **Výborná separace komponent**
- **Nutno provést analýzu ihned po derivatizační reakci**
- **Sekundární aminoskupina nereaguje, postkolonová oxidace chlornanem či kombinace derivatizace s FMOC**
- **Některé (zejména bazické) AA tvoří více derivátů**
- **LOD ca 50 fmol, pracovní oblast 1-500 pmol**
- **Detailní studium vlastností OPA derivátů I. Molnár-Perl:**
 - molární poměr OPA/SH/AA 20:60:1
 - činidla uchovávaná při 4°C by měla být stará 90 min – 9 dnů
 - reakční médium se nesmí okyselit před dávkováním na HPLC kolonu



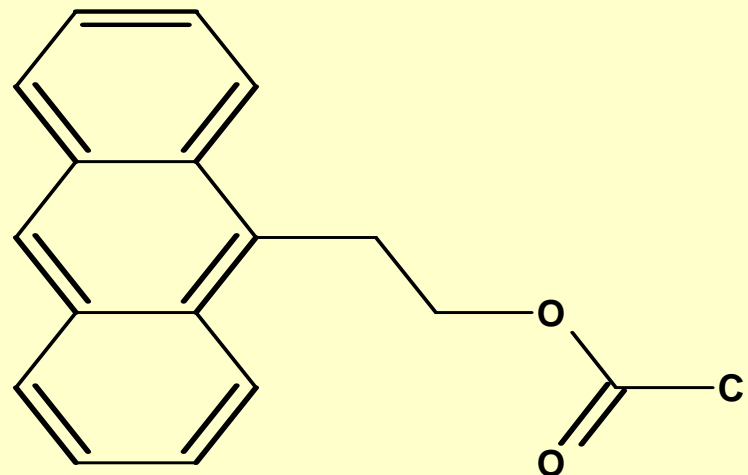
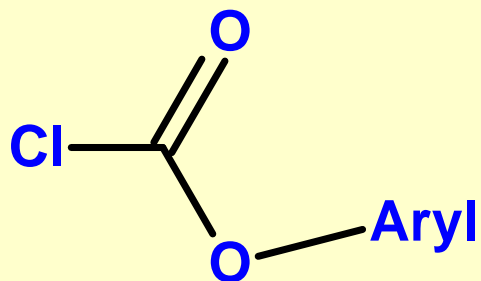
7.3.3.2. Derivatizace o-ftaldialdehydem (OPA)

- Vysoce fluoreskující, avšak nestabilní isoindolové deriváty
- Nutno provést analýzu ihned po derivatizační reakci
- Sekundární aminoskupina nereaguje, některé AA tvoří více derivátů
- LOD ca 50 fmol, pracovní oblast 1-500 pmol
- Výborná separace komponent
- Detailní studium vlastností OPA derivátů I. Molnár-Perl:
 - molární poměr OPA/SH/AA 20:60:1
 - činidla uchovávaná při 4°C by měla být stará 90 min – 9 dnů
 - reakční médium se nesmí okyselit před dávkováním na HPLC kolonu

7.3.3.2. Derivatizace o-ftaldialdehydem (OPA)



7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty



AEOC (9-anthrylethyl CF)

Derivatizační činidla (chlorokarbonáty, oxykarbonyl chloridy) reagují s aminoskupinou ve vodně-bazickém prostředí na karbamáty (urethany)

FMOC

AminoTag kit (Varian Inc.)

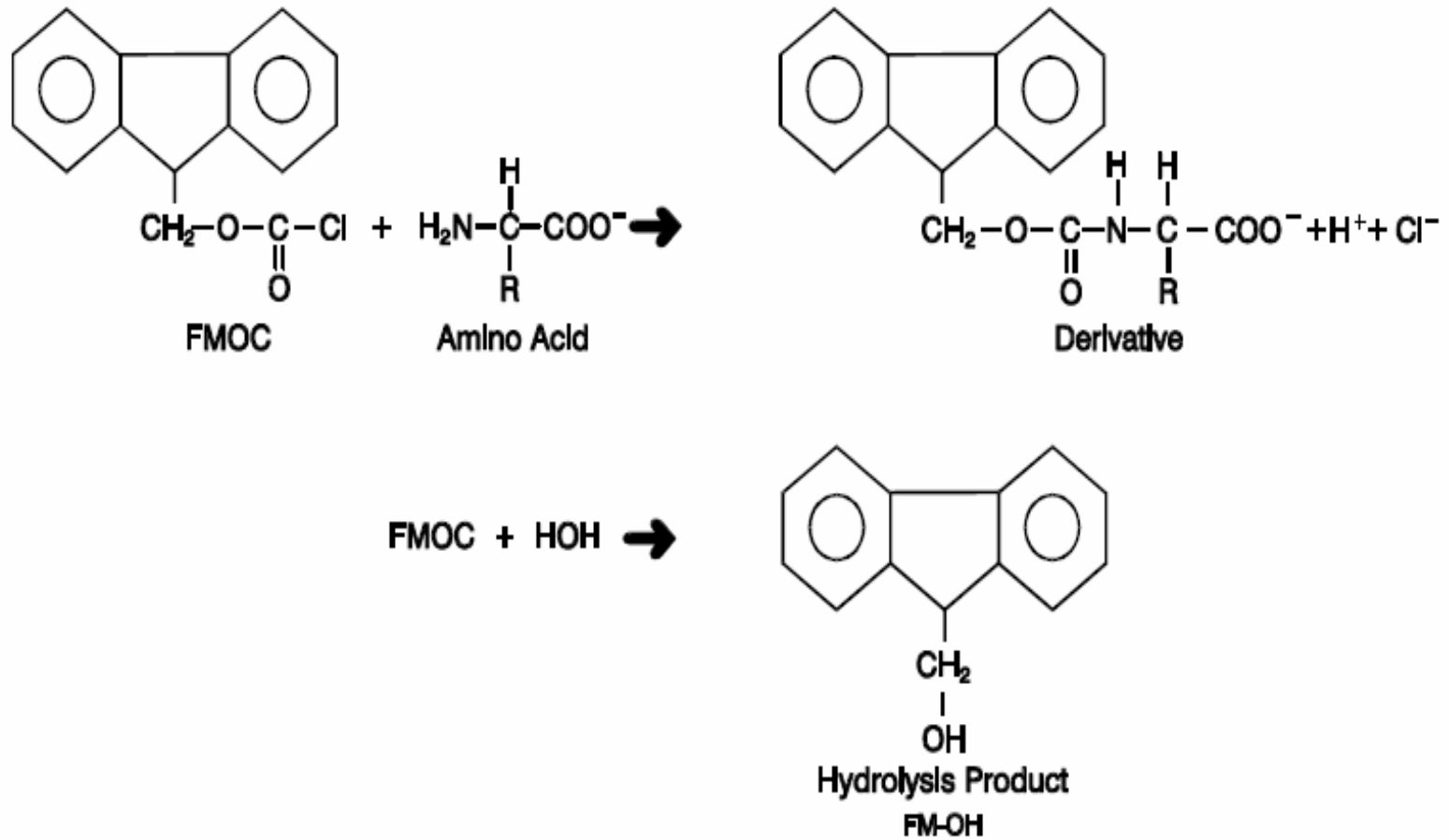
FLEC

chirální

AEOC

7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty

Reaction scheme with FMOC





7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty

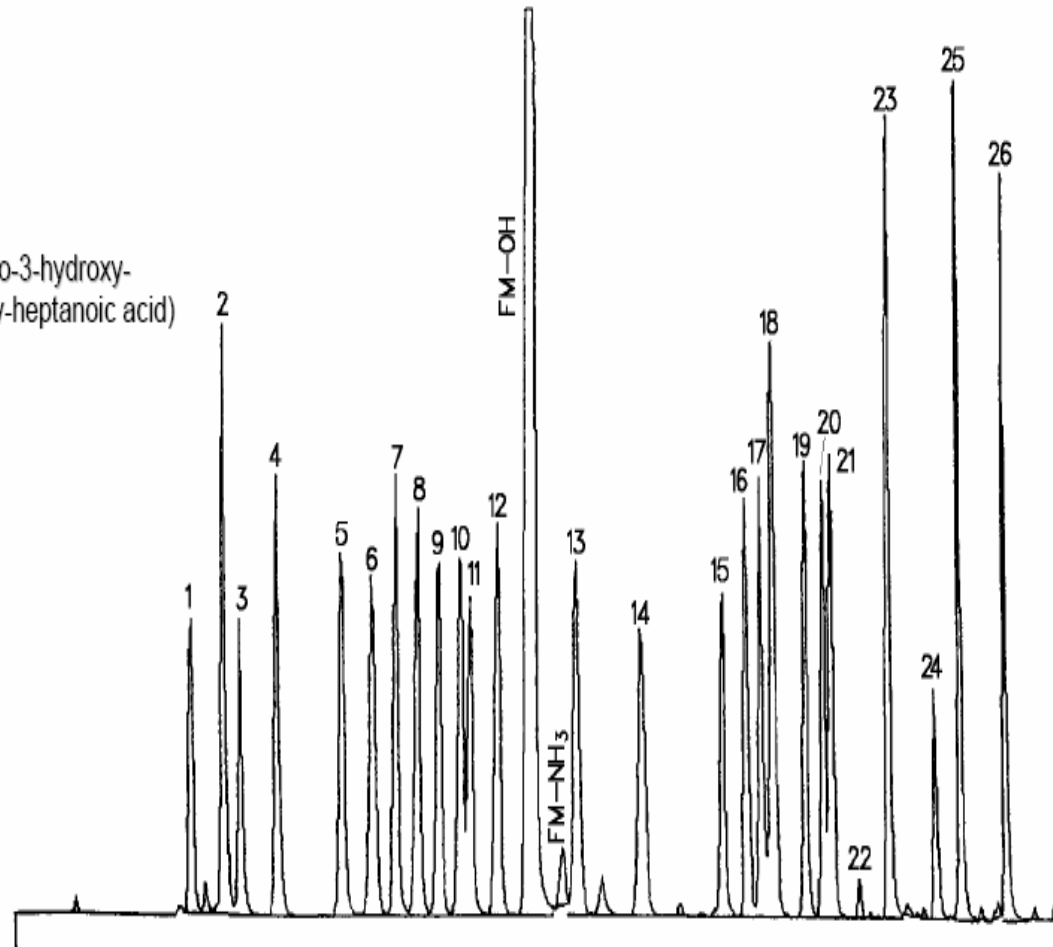
Charakteristiky metody

- ❑ Reakce probíhá v min. za laboratorní teploty
- ❑ Výborná HPLC separace a selektivita
- ❑ Automatizace metody
- ❑ FD detekce (exc/emise 265/345 nm)
- ❑ Stabilní nulová linie chromatogramu
- ❑ LOD 400 fmol
- ❑ UVD při 265 nmol pro koncentrace > 100 pmol
- ❑ His a Tyr tvoří 2 deriváty v závislosti na podmínkách reakce

7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty

HPLC separace FMOC derivátů (200 pmol)

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Phosphoserine | 14. Proline |
| 2. Phosphothreonine | 15. Methionine |
| 3. Cysteic Acid | 16. Valine |
| 4. Arginine | 17. Norvaline |
| 5. Methionine Sulfoxide | 18. Statine (4-Amino-3-hydroxy-
6-methylhydroxy-heptanoic acid) |
| 6. Hydroxyproline | 19. Phenylalanine |
| 7. Serine | 20. Isoleucine |
| 8. Aspartic Acid | 21. Leucine |
| 9. Glutamic Acid | 22. Cystine |
| 10. Threonine | 23. Hydroxylysine |
| 11. Carboxymethyl
cystine | 24. Histidine |
| 12. Glycine | 25. Lysine |
| 13. Alanine | 26. Tyrosine |



Varian AminoTag chromatogram



7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty

Postup analýzy

Blood serum 1:50



Sodium borate buffer pH = 7.8 - 8



Mixing for 1 min



Pentane/ethyl acetate 9:1 extraction of the reagents or the reaction scavenging by ADAM or heptylamine



HPLC gradient with sodium acetate buffers and THF additive at the end



7.3.3.3. Derivatizace aminoskupiny chlorformiáty

Kombinovaný postup analýzy OPA/FMOC– Aminoquant (Agilent™)

Blood serum 1:50



Sodium borate buffer pH = 10.4



OPA - 3MPA



FMOC



HPLC gradient with sodium acetate buffers and THF additive at the end

340/450 nm: primary amines (OPA)

266/305 nm: secondary amines (FMOC)

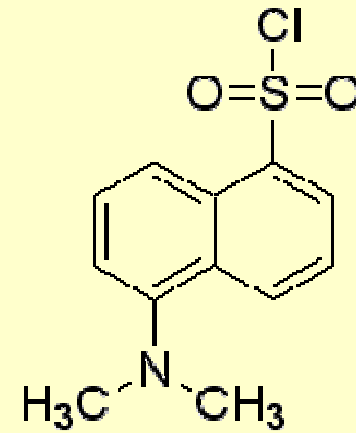
Linear response: 5 – 250 pmol inj. into col., LOD ca 500 fmol

Total analysis time 25 min, RSD < 6%.

7.3.3.4. Derivatizace dansyl nebo dabsyl chloridem

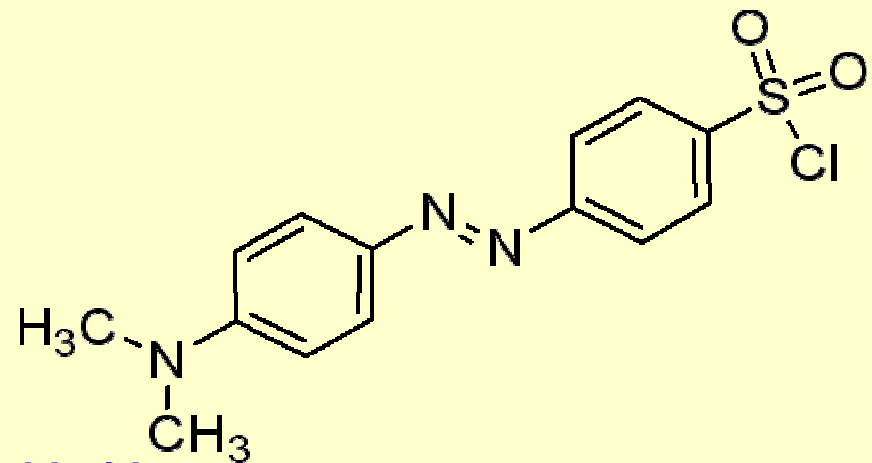
Dansyl chlorid

5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride



Dabsyl chlorid

4-(Dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl chloride



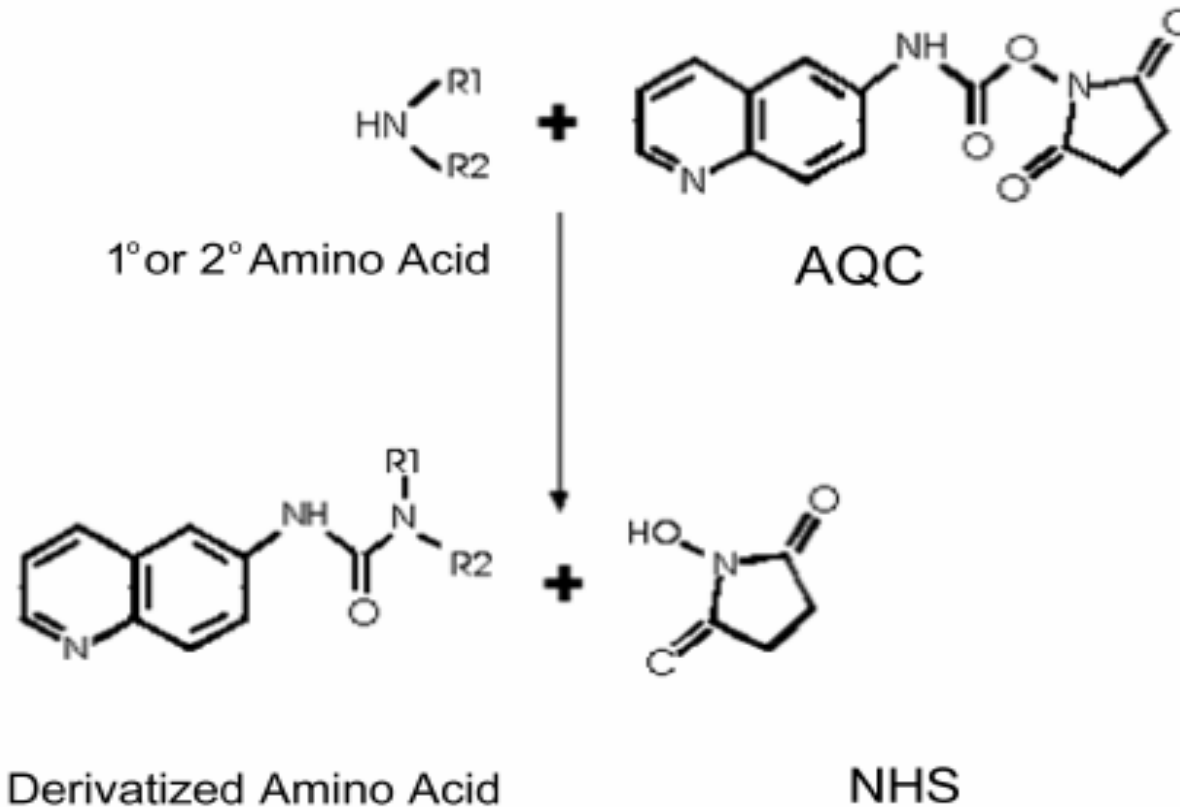
7.3.3.4. Derivatizace dansyl nebo dabsyl chloridem

Charakteristiky derivatizační metody

- ❑ Reagují v bazickém prostředí (pH 9.5) s primární a sekundární aminoskupinou
- ❑ Reakce je prováděna za zvýšené teploty 60°C/30 min
- ❑ Dansyl/dabsyl exc./emise = 320/559 nm // 270/473 nm.
- ❑ Jednoduchá příprava, velmi dobrá stabilita produktů
- ❑ Obdobná oblast aplikací

7.3.3.5. Derivatizace 6-aminochinolinyli -N-hydroxysukcinimidem (AQC)

Charakteristiky derivatizační metody



Scheme 1. Derivatization reaction of primary and secondary amino acid with AQC.



7.3.3.5. Derivatizace 6-aminochinolinyl -N-hydroxysukcinimidem (AQC)

Charakteristiky derivatizační metody

- Reakce probíhá pH=8.5-10 v sekundách
- Tyr, Orn, Lys, Cys – reagují 2 funkční skupiny
- FD exc./emise = 248/395 nm, AMQ hydrolytický produkt emituje při 395 nm slabě
- Jednoduchá příprava, velmi dobrá stabilita produktů.
- **Waters AccQ·Tag™ Ultra kit**



7.3.3.5. Derivatizace 6-aminochinolinyli -N-hydroxysukcinimidyl karbamátem (AQC)

POSTUP ANALÝZY

80 ul buffered sample (0.2 M sodium borate, pH=8.8)



20 ul 10mM AQC < MeCN



Mixing for 10 s



Heating 55°C/10 min for Tyr single product

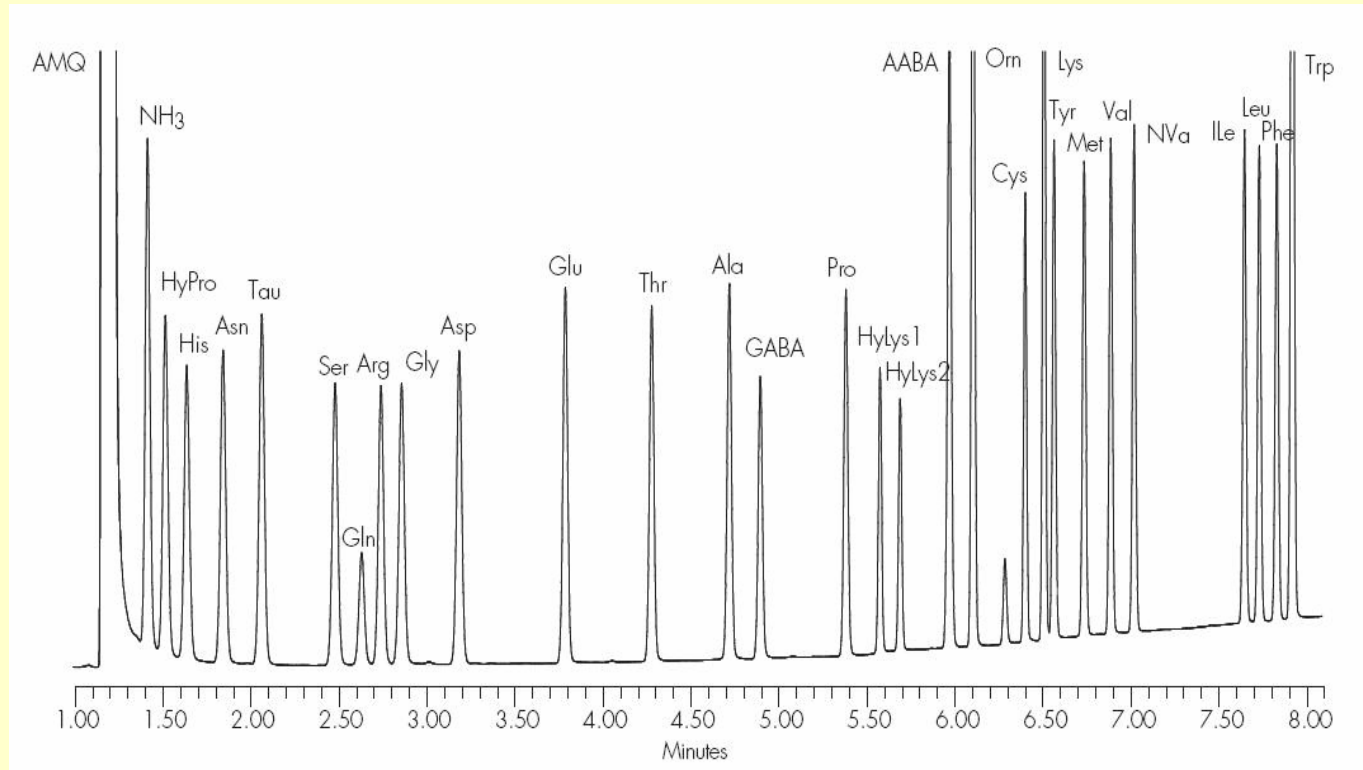


HPLC gradient with sodium acetate buffers and MeCN modifier

Ukázka UPLC separace 10 pmol 27 fyziologických aminokyselin pomocí UPLC na koloně Xbridge C18, 2,1x100 mm, sorbent 1,7 µm, UVD = 260 nm.

7.3.3.5. Derivatizace 6-aminochinolinyl -N-hydroxysukcinimidyl karbamátem (AQC)

UPLC separace aminokyselin po derivatizaci AQC



Ukázka UPLC separace 10 pmol 27 fyziologických aminokyselin pomocí UPLC na koloně Xbridge C18, 2,1x100 mm, sorbent 1,7 μm, UVD = 260 nm.



7.3.4. Plynová chromatografie aminokyselin

Derivatizace je nezbytnou podmínkou pro separaci technikou GC

Hlavní metody

1. **Esterifikace karboxylu** bezvodým alkoholem v HCl a následná **acylace** dalších protických skupin

Hlavní oblast aplikací – chirální separace AAs

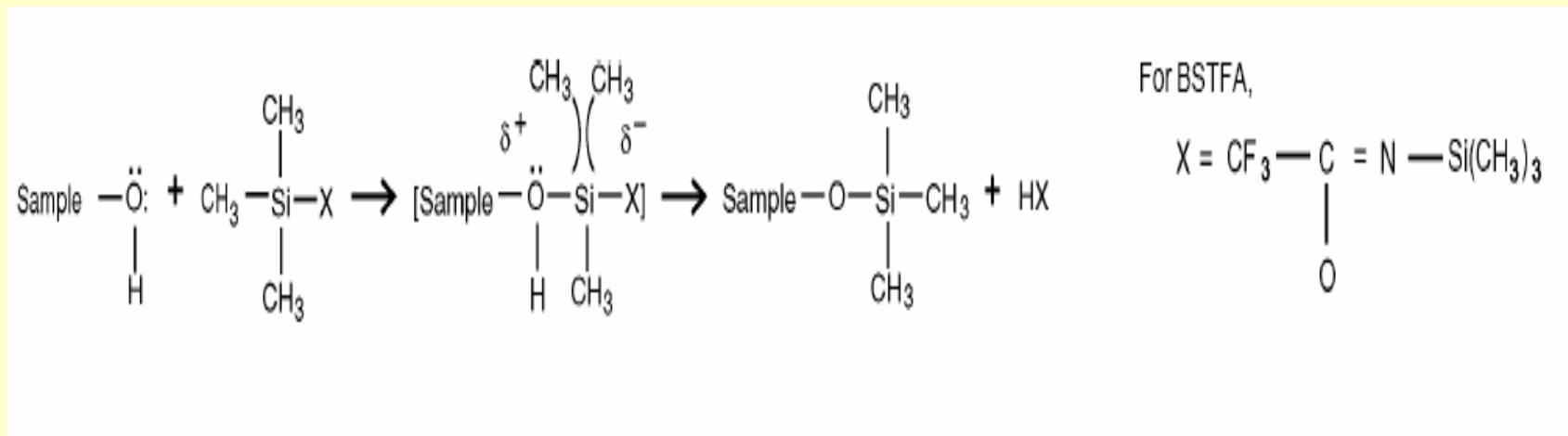
7.3.4. Plynová chromatografie aminokyselin

Derivatizace je nezbytnou podmínkou pro separaci technikou GC

Hlavní metody

2. Silylace protických funkčních skupin

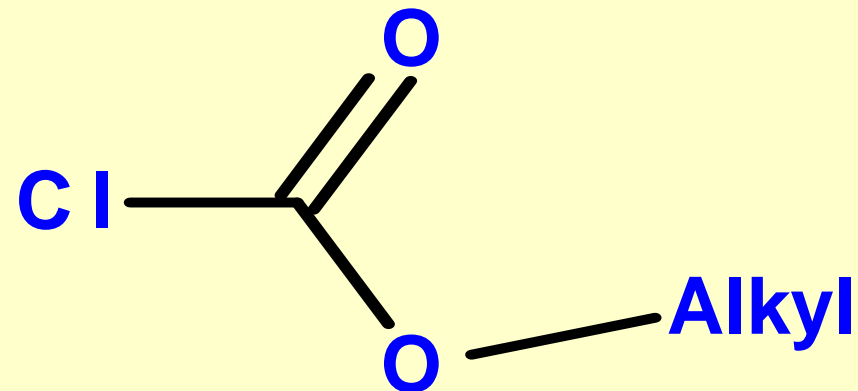
Trimethylsilyl nebo terc.butyldimethylsilyl deriváty



Nutnost bezvodého prostředí a zahřívání vzorku

7.3.4. Plynová chromatografie aminokyselin

3. Derivatizace alkylchlorformiáty



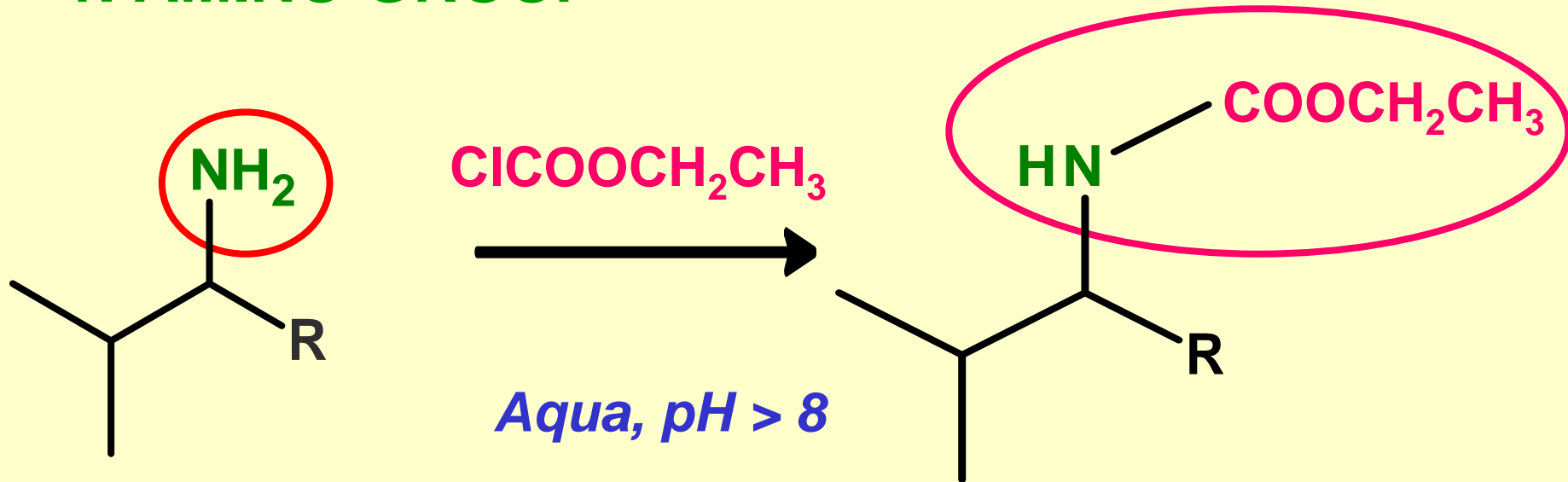
Jednoduchá činidla schopná reagovat s protickými funkčními skupinami ve vodném prostředí v sekundách



Ethyl chloroformate (ECF)

Alkyl Chloroformate Reactions

1. AMINO GROUP

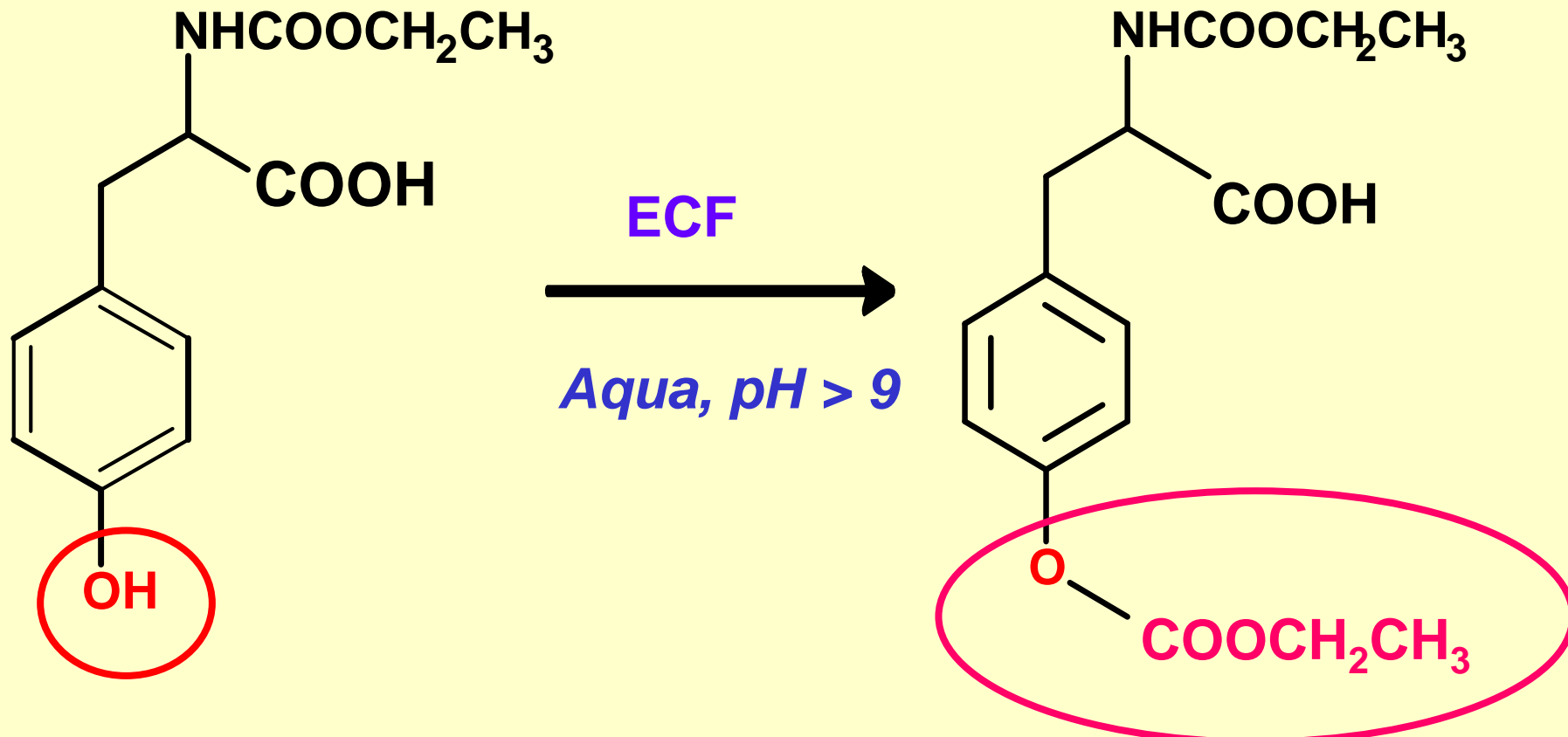


Amine +
(primary, secondary)

ECF \rightarrow

**Ethyl carbamate
derivative**

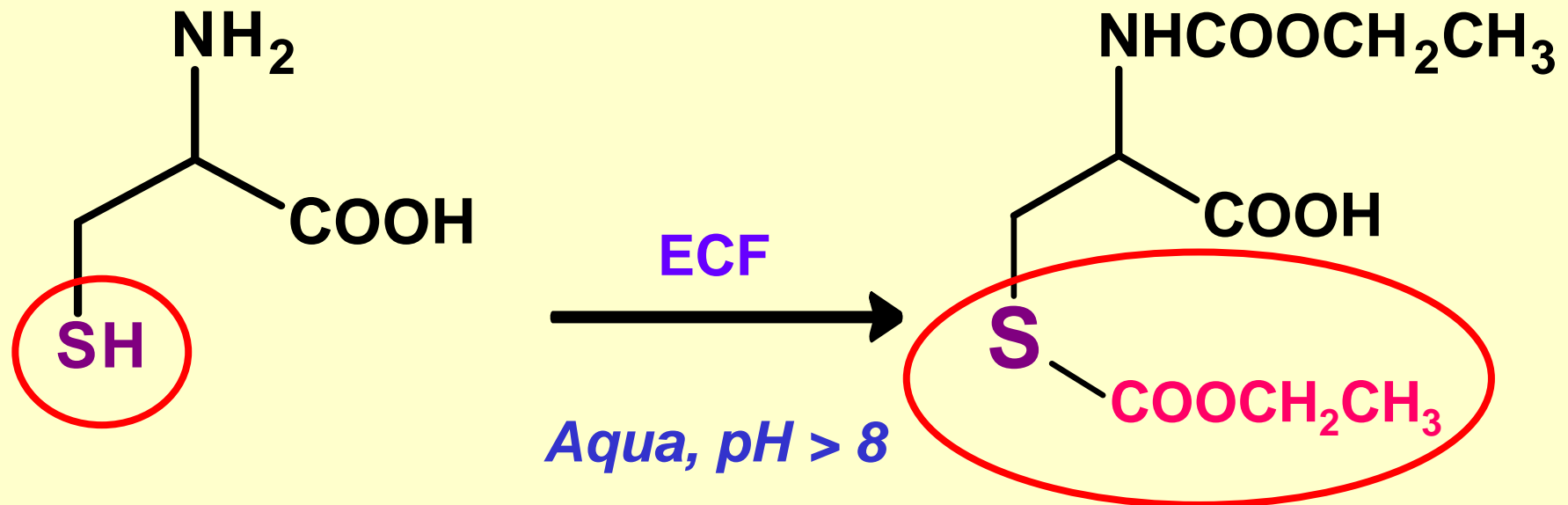
2. HYDROXY GROUP



OH + Ethyl chloroformate →
(phenolic, activated aliphatic)

**Ethyl carbonate
derivative**

3. THIOL GROUP

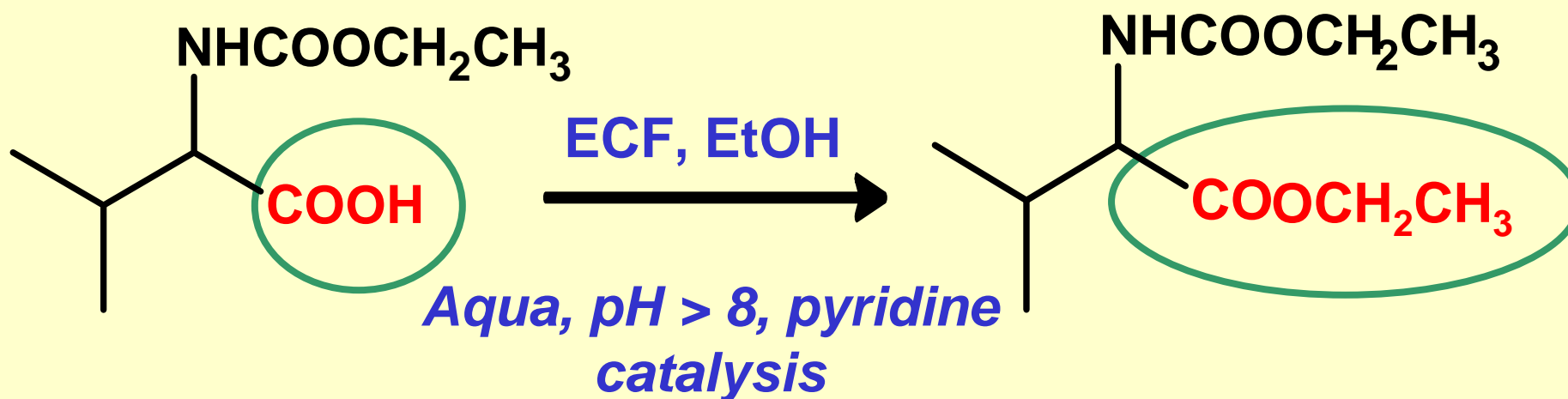


SH thiol + Ethyl chloroformate →
(alkyl)

Ethyl thiocarbonate
derivative

4. CARBOXY GROUP

P. Hušek, FEBS Letts 1991



Alcoholysis by ROH

Carboxyl
(aromatic, aliphatic)

+

ECF →

**Ethyl ester
derivative**

Derivatization with alkyl chloroformates

DERIVATIZATION SUMMARY – what does work ?

Functional Group	Derivative Product	Application field
NH₂	Carbamate	Amines (aliphatic)
NHR	Carbamate	Amino acids
N- heterocyclic	Carbamate	Imidazolyl
OH (phenolic)	Carbonate	Phenols
SH	Thiocarbonate	Thiols
COOH	Ester	Carboxylic acids

Derivatization with alkyl chloroformates

DERIVATIZATION SUMMARY – what does not work ?

Functional Group	Compound Class
OH (aliphatic)	Polyhydroxylated, sugars
Indolyl	Indoles (Trp)
Guanidino	Guanidino (Arg)
Ureido	Ureido (Cit)
Amide	Amino acids (Gln)
Keto	Ketocarboxylic acids
Strong inorganic acids	Phosphate, sulphate
Strong RCOOH	TFA, PCA, salicylic a.
	RCOOH with pKa < 3.5



Derivatization with alkyl chloroformates

CHARACTERISTICS of the REACTION

- **Aqueous environment**
- **Completed in seconds with high reaction yields**
- **The analyte polarity is significantly decreased** and is **easily transferred** to immiscible organic phase
- **The reaction and liquid extraction are performed simultaneously** in the same time (“phase-transfer” or “extractive alkylation”)
- **The cleaning step** removing inorganic salts and other polar interferences otherwise deteriorating subsequent separation and MS detection steps
- The reaction is **not affected by commonly used buffers** (borate, carbonate, saline)
- **The alcoholysis of carboxylic groups** requires **primary alcohol** and **pyridine catalysis**



7.3.5. Nové metody pro cílenou metabolomickou analýzu aminokyselin a příbuzných látek

Ukázka recentních nových přístupů

A. Paralelní GC a HPLC analýza aminokyselin a příbuzných metabolitů po derivatizaci alkylchlorformiáty

P. Šimek, P. Hušek et al.

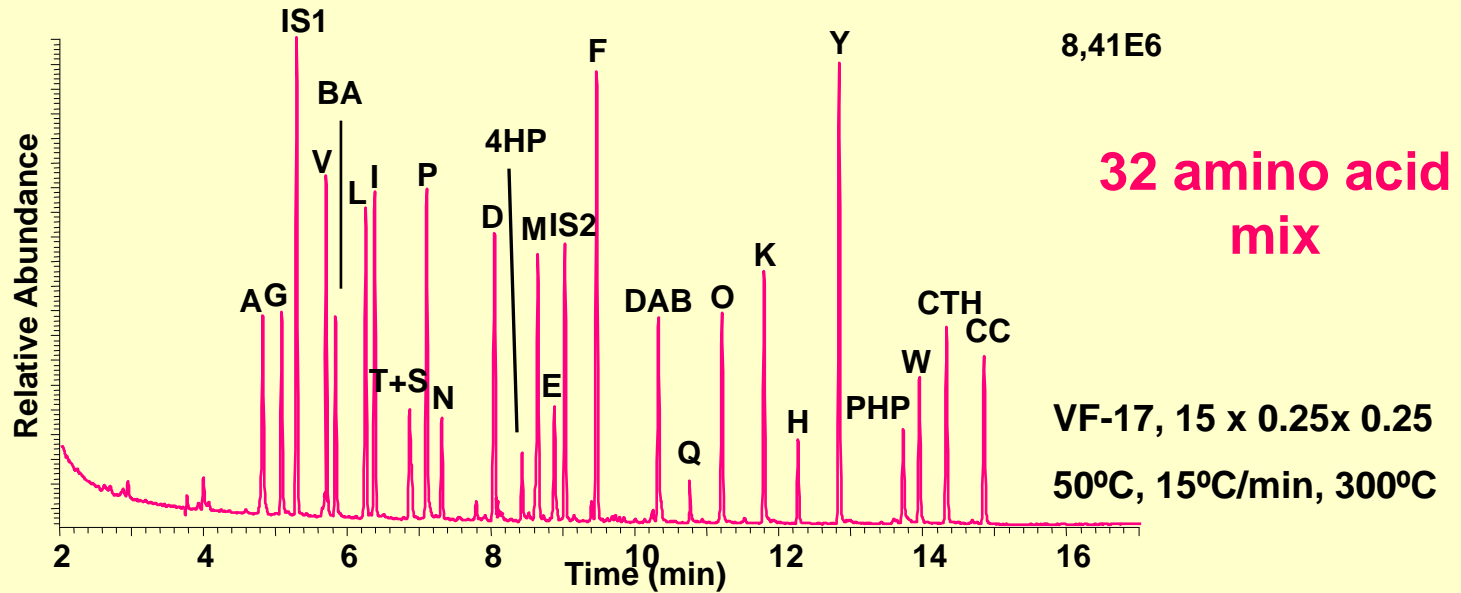
B. HPLC/MS analýza aminokyselin po ITRAQ derivatizaci

Applied Biosystems

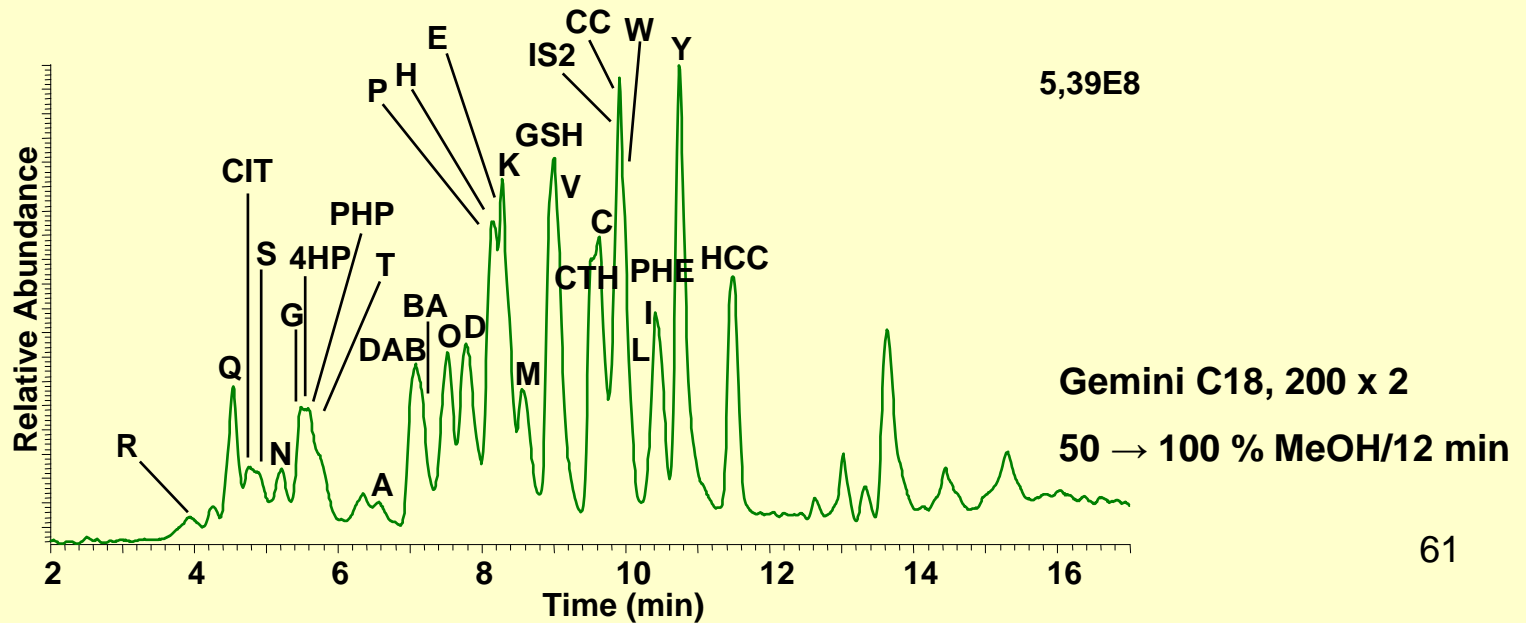


Ukázka paralelní GC a HPLC separace

GC/MS



HPLC/MS





GC Properties of the N,O,S Alkoxycarbonyl Esters

- Thermally stable (carbonates, thiocarbonates, carbamates, esters) to be analysed by **GC** technology
- Excellent GC separations are accomplished on capillary columns of medium polarity
- Diagnostic EI and PCI mass spectra for characterization and identification of metabolites in biological material

PRINCIPAL METABOLITE CLASSES amenable to GC/MS

Fatty acids, ketocarboxylic acids, polycarboxylic acids, hydroxycarboxylic acids, amino acids, most biogenic amines, dipeptides



HPLC Properties of the N,O,S Alkoxycarbonyl Esters

- The derivatives are stable in commonly used organic solvents and in aqueous HPLC mobile phases to be separated by **HPLC** technologies
- Very good ionization efficiency of the arising carbamate group in positive ESI and APCI
- Diagnostic CID MS/MS and MSⁿ product ion mass spectra for characterization of metabolites in biological material
- Organic acids are hardly ionized in the ESI process and not detectable

PRINCIPAL METABOLITE CLASSES amenable to HPLC/MS

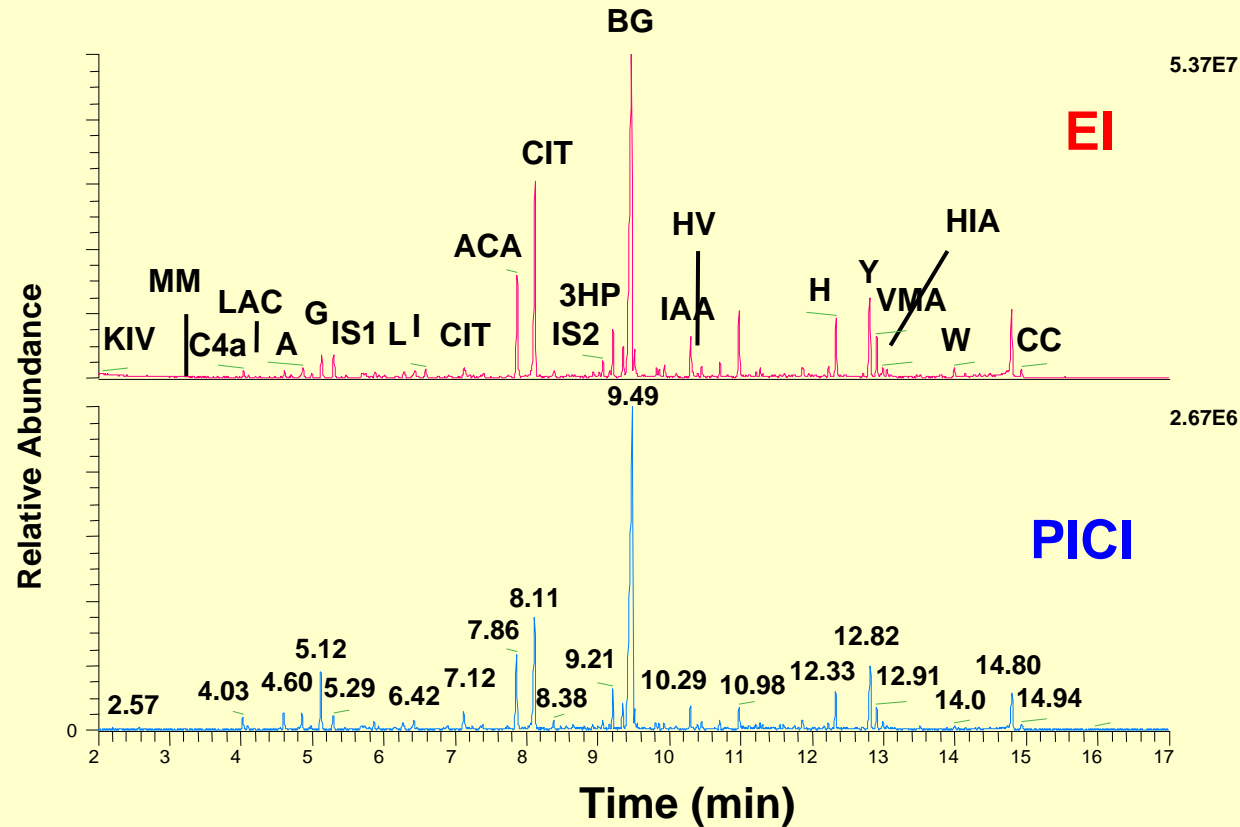
N-containing compounds such as **amino acids**, **biogenic amines**, **small peptides** and other extractable analytes with basic functional groups, nonvolatile, thermally labile functional groups



Parallel GC and HPLC Analysis of Biofluids

Human urine

GC/MS

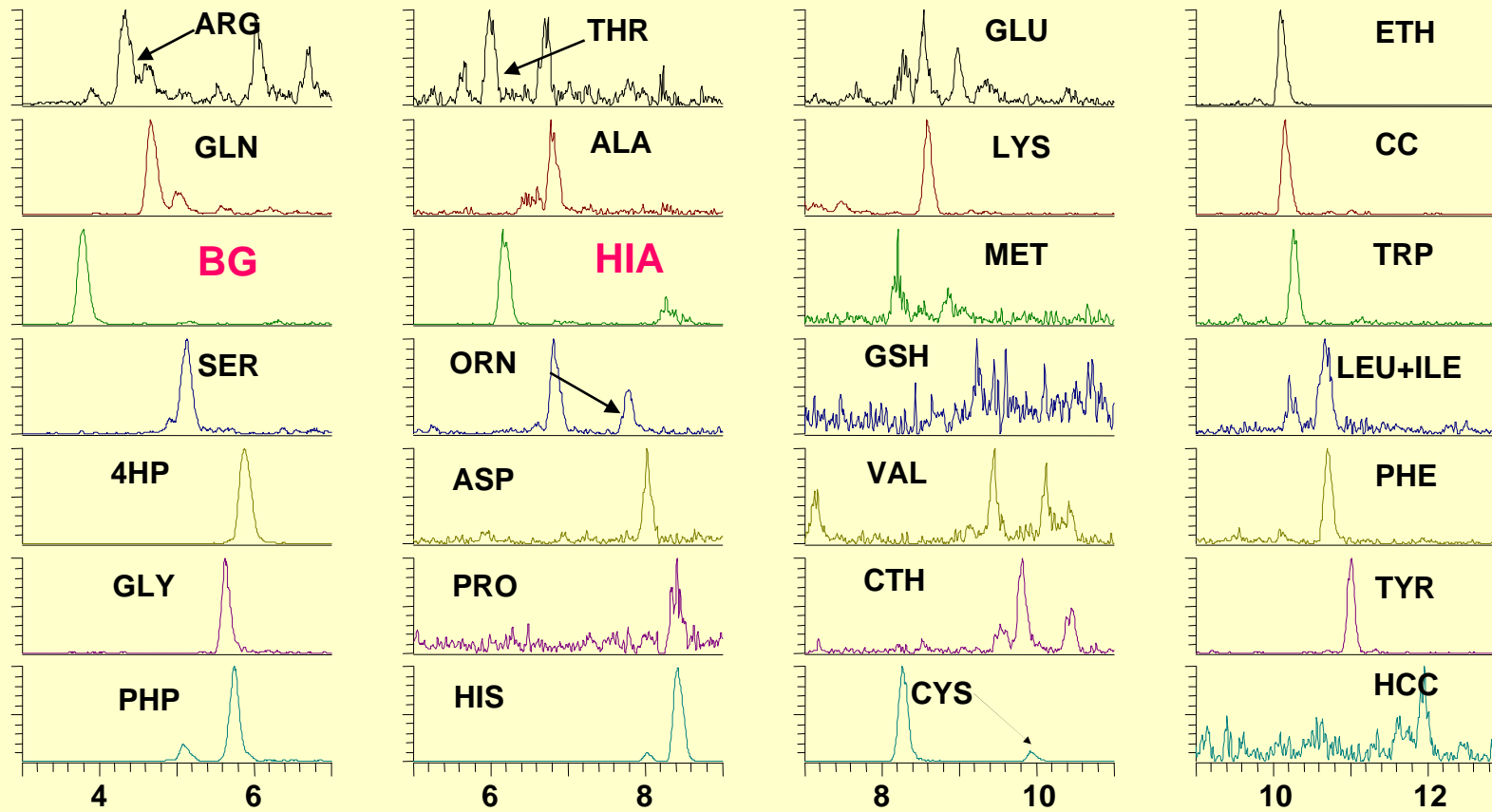


ca 150 components detected, > 45 AAs

Parallel Analysis of Biofluids

Human urine

HPLC/MS

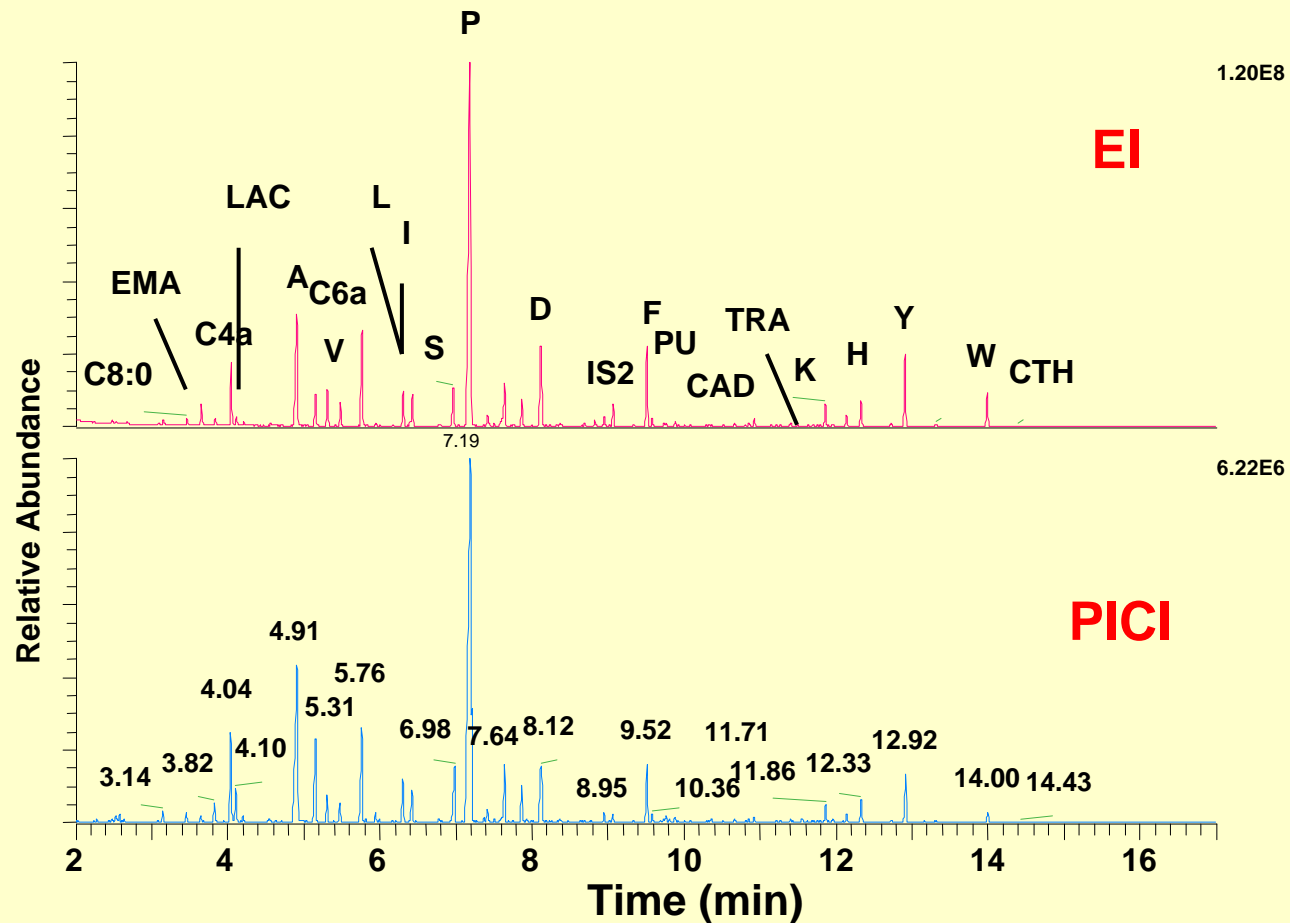


ca 150 components detected

Parallel Analysis of Biofluids

Beer (Czech Budweiser, fresh lager)

GC/MS



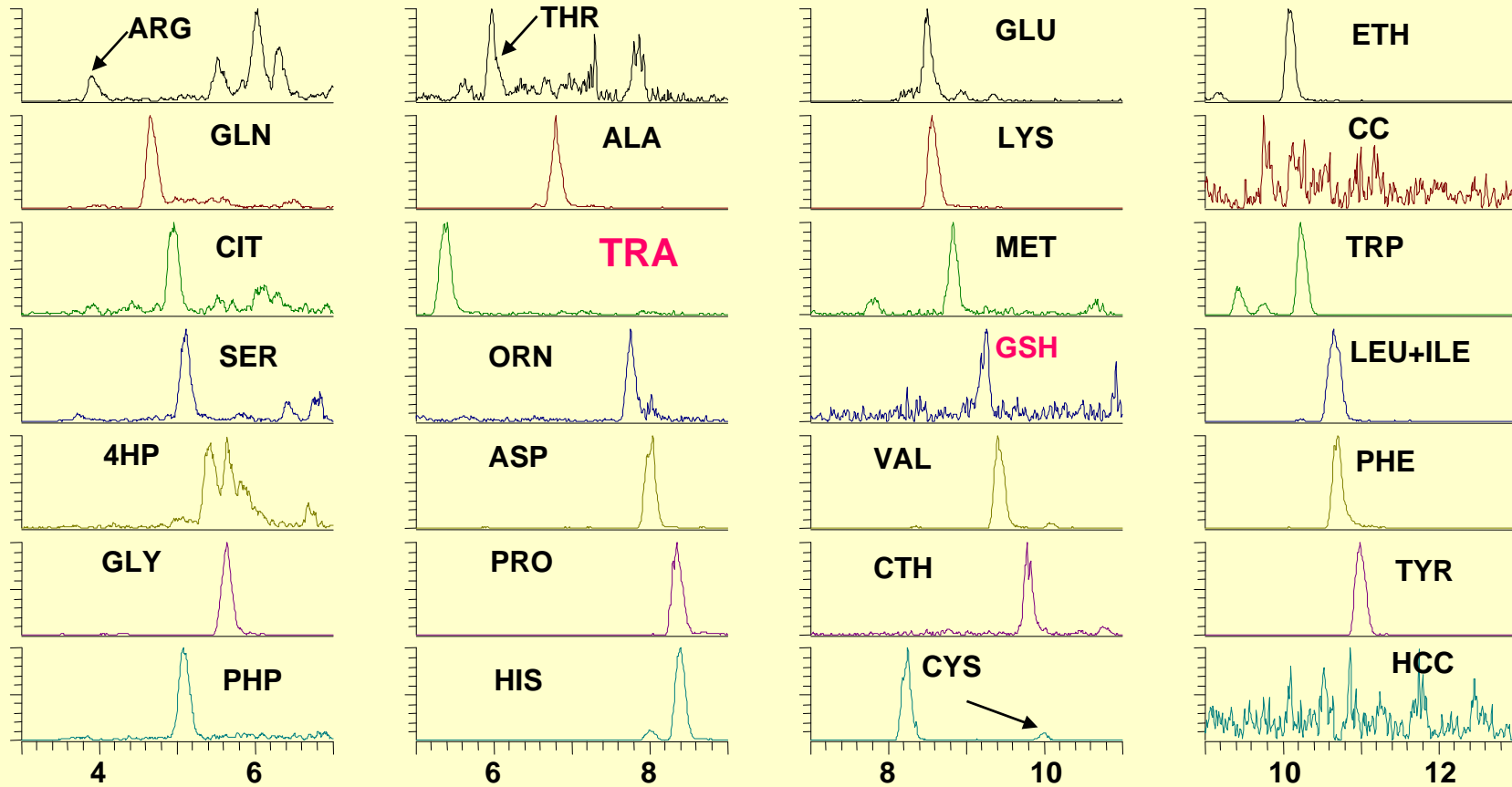
ca 170 components detected



Parallel Analysis of Biofluids

Beer (Czech Budweiser, fresh lager)

HPLC/MS

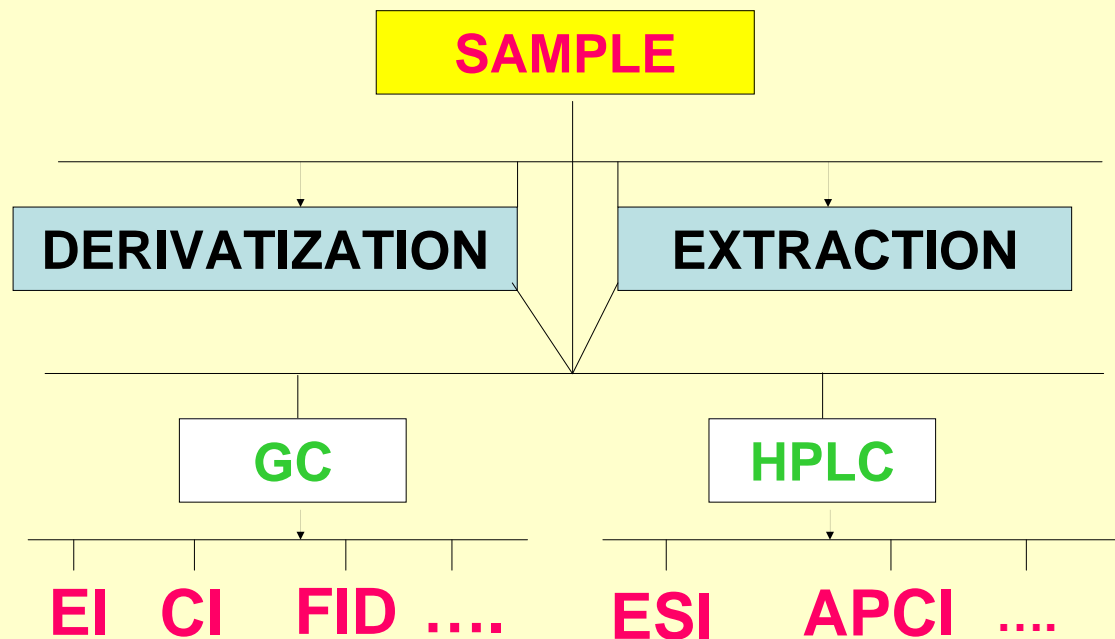


ca 150 components detected

Metabolomická analýza paralelní GC/MS a HPLC/MS

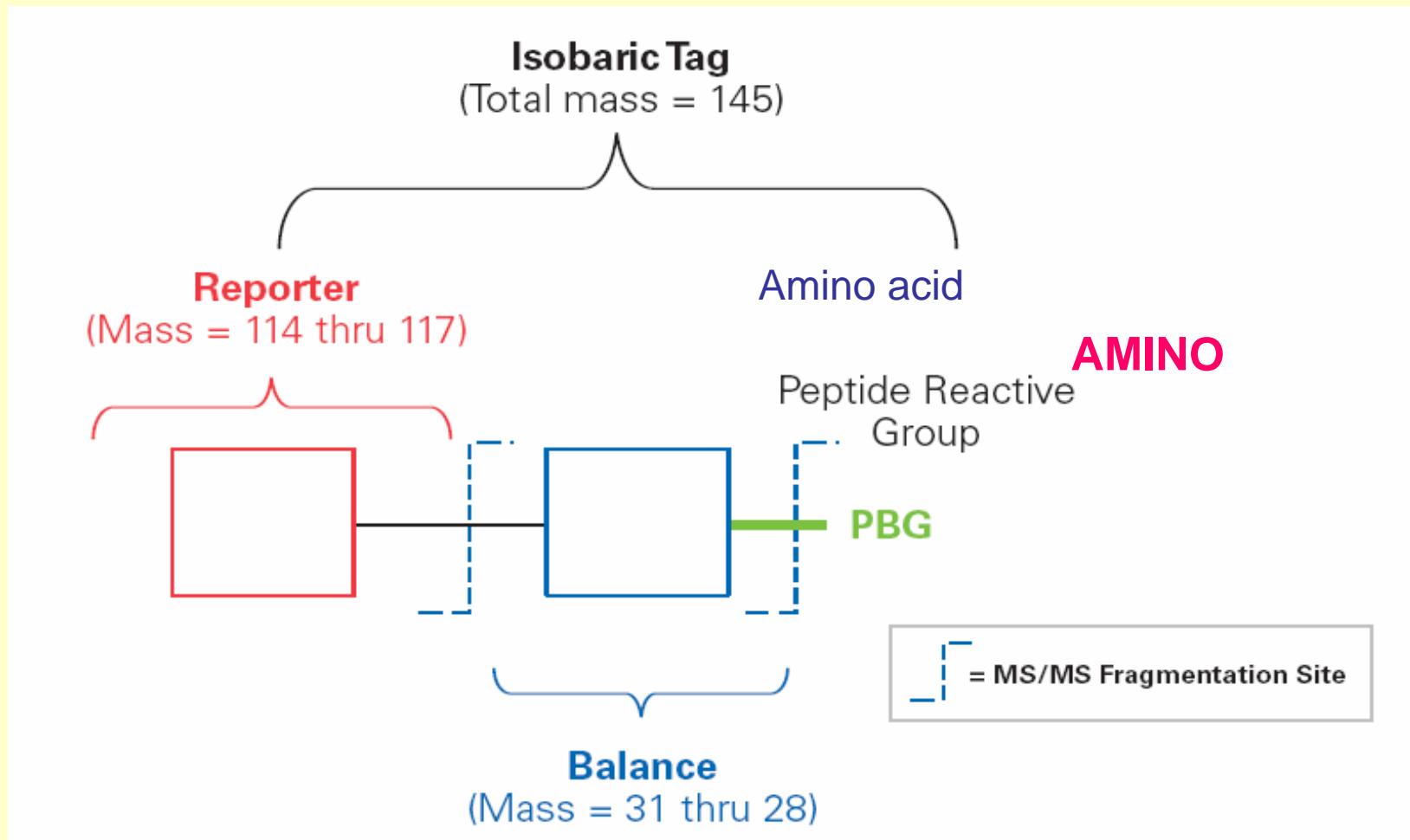
- funguje pro různé typy biologického materiálu
- Jednoduchá, rychlá, robustní

Univerzální, paralelní analytický workflow:



7.3.3.5B. Derivatizace 2-(N-methylpiperazinyl)- -N-hydroxysukcinimidyl acetátem (iTRAQ™)

iTRAQ reagent (Applied Biosystems) – hlavní uplatnění v proteomické analýze

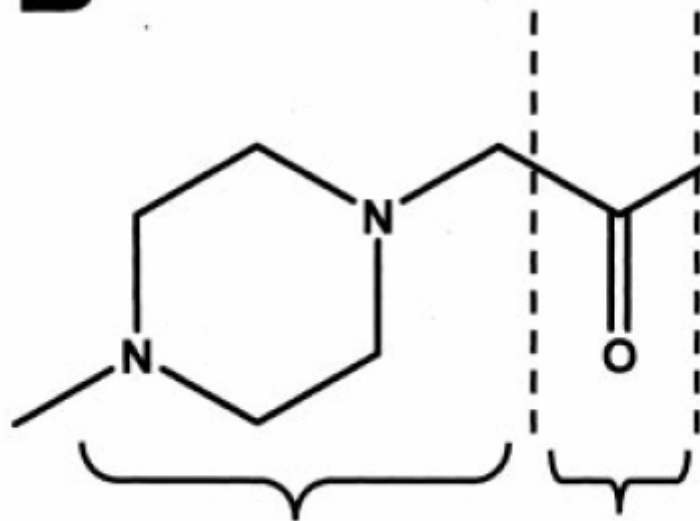


7.3.3.5B. Derivatizace 2-(N-methylpiperazinyl)- -N-hydroxysukcinimidyl acetátem (iTRAQ™)

iTRAQ reagent (Applied Biosystems)

Amino acid + iTRAQ reagent →

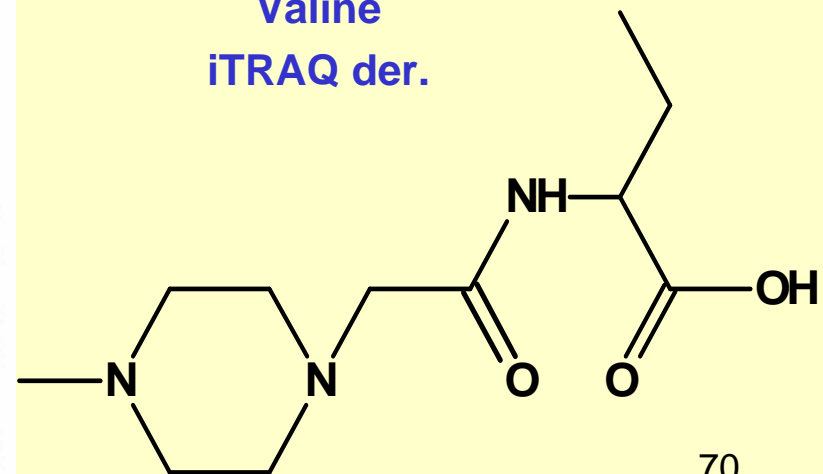
B



m/z 114 (+1)	^{13}C	^{13}C ^{18}O	(+3)
m/z 115 (+2)	$^{13}\text{C}_2$	^{18}O	(+2)
m/z 116 (+3)	$^{13}\text{C}_2$ ^{15}N	^{13}C	(+1)

Amino acid residue

Valine
iTRAQ der.



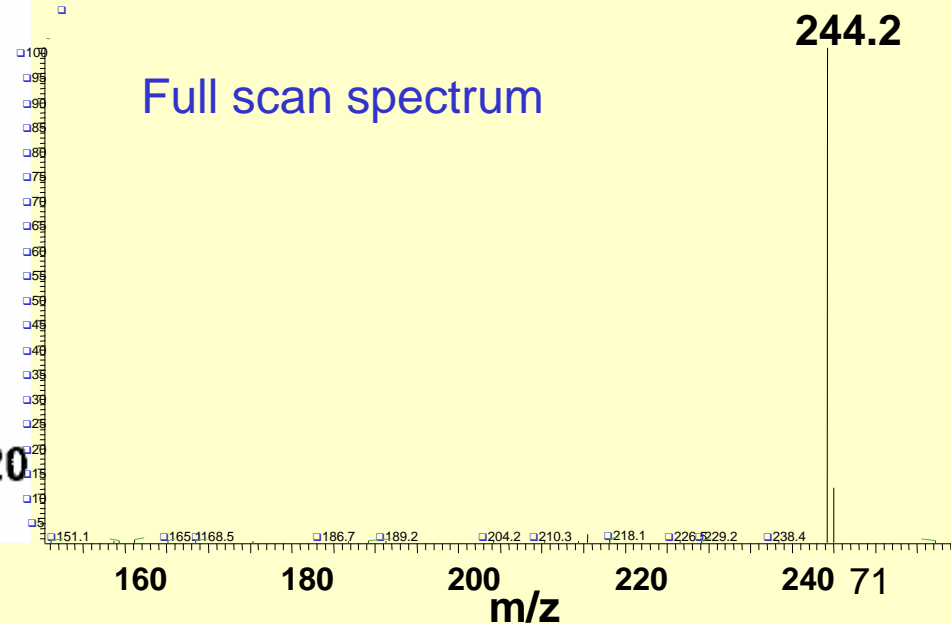
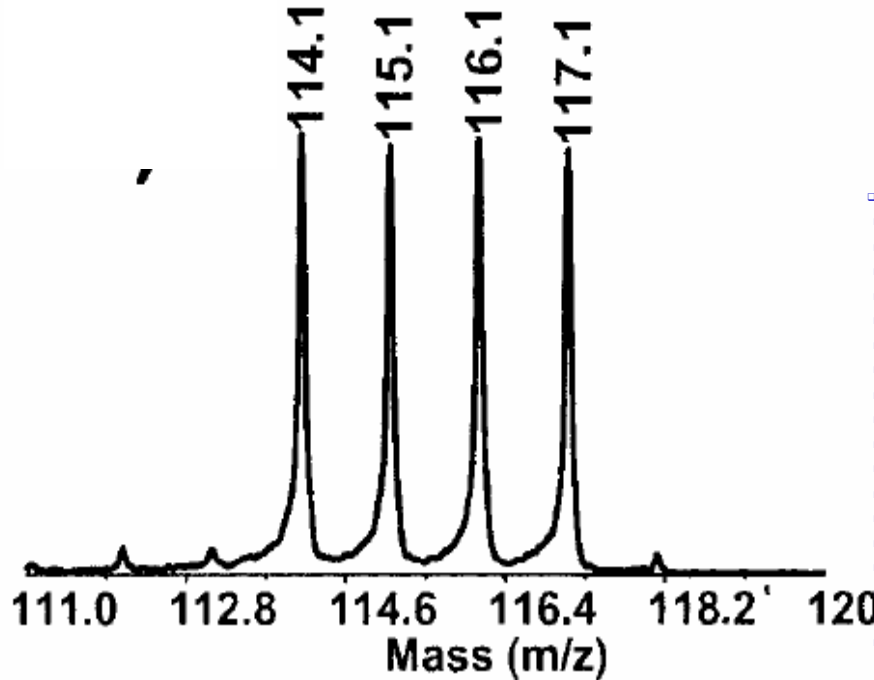
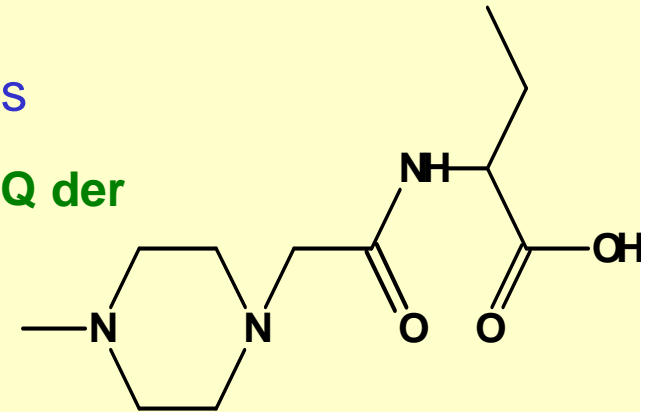


7.3.3.6. Derivatizace 2-(N-methylpiperaziny)- -N-hydroxysukcinimidyl acetátem (iTRAQ™)

Full scan spectrum generates MH^+ signal with the identical mass for particular reagent

MS/MS spectrum generates diagnostic isotopic shifts

Valine iTRAQ der



Diagnostic applications



Analýza aminokyselin a příbuzných látek

7.4. ZÁVĚR

- **Stále významný úkol a výzva v oboru analytické chemie organických látek**
- **Prakticky každá nově vyvinutá technika vysokoúčinné separace látek je testována na analýze aminokyselin**
- **Popsáno enormní množství metod ke stanovení AA**
- **Neexistuje jediná, univerzální metoda pro řešení konkrétního problému analýzy aminokyselin**
- **Zvolený postup analýzy vždy odvíjí:**
 - **konkrétní přístrojové vybavení**
 - **znalosti a zkušenosti řešitele, jeho invence**
 - **povaha samotného analytického problému**