



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Stabilita vybraných aminokyselin v moči a vodných roztocích

Vypracoval: Vít Prokop
Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Šimek, Csc.

České Budějovice 2015

Abstrakt

V teoretické části mé bakalářské práce se zabývám literární rešerší o aminokyselinách se zaměřením na glutamin a jeho stabilitu. Glutamin je v roztocích značně nestabilní. Jeho degradace je velmi nespecifická, není známý systém jeho rozkladu. Je to nejrozšířenější aminokyselina v krvi, patří mezi neesenciální glukoplastické aminokyseliny a jeho hlavní funkcí je detoxikace amoniaku z těla. Dále zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě a prostorovým rozložením dipólů umožňuje specifickou vazbu větších polárních molekul. Část rešerše se zaměřuje na chromatografii a hmotnostní spektrometrii, jejich součástmi a využitím v analýze. Spojení těchto dvou metod vede k efektivní analytické soustavě použitelné pro mnoho různých stanovení.

Praktickou část jsem prováděl v laboratořích Akademie věd pod odborným dohledem. Roztoky glutaminu jsem analyzoval metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, byl využit hmotnostní analyzátor typu lineární iontová past (LTQ) s elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+). U každého vzorku jsem pozoroval degradaci glutaminu v časových intervalech.

Vyhodnocením výsledků a vypracováním grafických závislostí jsme došli k závěrům, které potvrzují již předchozí experimenty. Stabilita glutaminu je velmi ovlivněná teplotou a hodnotami pH. Nepodařilo se nalézt optimální podmínky skladování pro vzorky glutaminu, degradace probíhala více či méně ve všech testovaných typech rozpouštědel a to velkou rychlostí.

Klíčová slova: Aminokyseliny – glutamin – stabilita – chromatografie – hmotnostní spektrometrie

Abstract

The theoretical part of the bachelor's thesis deals with the retrieval of amino acids with a focus on Glutamine and its stability. The Glutamine solution is highly unstable. The disintegration is very unspecific, not known to the system in its decomposition. It is the most common amino acid in the blood, is a nonessential glucoplastic amino acid and its main function is the detoxification of ammonia from the body. It also increases the solubility of proteins in water and the spatial distribution of dipoles allows specific binding of larger polar molecules. Part of the research focuses on chromatography and mass spectrometry, their parts and use in analysis. The combination of these two methods result in efficient analytical system useful for many different assays.

The practical part was conducted in the laboratories of the Academy of Sciences under professional supervision. Glutamine solutions were analyzed by liquid chromatography with mass detection, was used mass analyzer type linear ion trap (LTQ) with electrospray positive mode (ESI +). For each sample, I have observed the degradation of glutamine intervals.

Evaluation of results and preparation of charts we have come to conclusions that confirm previous experiments already. The stability of glutamine is very influenced by temperature and pH values. Unable to find the optimal storage conditions for samples Gln degradation proceeded more or less in all the samples and with great speed.

Keywords: Amino acids - glutamine - stability - chromatography - mass spectrometry

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (10. 8. 2015)

.....

(Vít Prokop)

Poděkování:

Rád bych touto cestou poděkoval RNDr. Petrovi Šimkovi CSc., Ing. Martinovi Moosovi Ph.D. a Ing. Ivě Opekarové za ochotu, vstřícnost a cenné rady při vypracovávání mé bakalářské práce. Všem výše zmíněným pak děkuji za přátelskou atmosféru, kterou se jim podařilo v laboratoři vytvořit. A nakonec děkuji své rodině, která mě po celou dobu mého studia podporovala.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 ÚVOD	10
1.1 Cíle práce	11
1.2 Hypotézy	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Aminokyseliny	12
2.1.1 Dělení aminokyselin podle struktury postranního řetězce	13
2.1.2 Dělení aminokyselin podle esenciality	13
2.1.3 Vlastnosti aminokyselin	14
2.1.4 Funkce aminokyselin	15
2.2 L- Glutamin	15
2.2.1 Funkce a metabolismus	16
2.2.2 Zdroj Gln	16
2.2.3 Vylučování a metabolismus Gln	17
2.2.4 Skladování Gln a studie stability	17
2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	20
2.3.1 Mobilní fáze	21
2.3.2 Čerpadla (pumpy)	21
2.3.3 Kolona	22
2.3.4 Možnosti stanovení Gln	23
2.3.5 Analyzátor	23
2.4 Hmotnostní spektrometrie	24
2.4.1 Ionizační techniky	24
2.4.2 Typy Ionizací	25
2.4.2.1 elektronová ionizace (EI)	25
2.4.2.2 chemická ionizace (CI)	25
2.4.2.3 Sprejové ionizační techniky	26
2.4.2.4 Elektorsprej (ESI)	26
2.4.2.5 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)	27

2.4.2.6	Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)	27
2.4.3	Hmotnostní analyzátory	28
2.4.3.1	Magnetický sektorový analyzátor.....	28
2.4.3.2	Kvadrupolový analyzátor	29
2.4.3.3	Iontová past	29
2.4.3.4	Průletový analyzátor	29
2.4.4	Detektory	30
2.4.4.1	Elektronásobičové detektory	30
2.4.4.2	Fotonásobičové detektory.....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Použité přístroje a nástroje:	31
3.2	Chemikálie.....	31
3.3	Pracovní postup:	32
3.3.1	Studie stability	32
3.3.2	Stabilita v extraktech vzorků	33
4	VÝSLEDKY:	34
4.1	Výsledky 1. studie:	35
4.2	Výsledky 2. studie :	40
5	DISKUZE:.....	46
6	ZÁVĚR:.....	47
7	ZDROJE	48

Seznam použitých zkratek

Gln – glutamin

Glu – kyselina glutamová

Ala – alanin

Val – valin

Leu – leucin

Ile – isoleucin

Ser – serin

Thr – threonin

Cys – cystein

Met – methionin

Asp – kyselina asparagová

Asn – asparagin

Lys – lysin

Arg – arginin

Phe – fenylalanin

Trp – tryptofan

Tyr – tyrosin

Pro – prolin

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

GC – plynová chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

ESI – elektrosprejová ionizace

APCI - chemické ionizace za atmosférického tlaku

MALDI - Ionizace laserem za přítomnosti matrice a analýza doby letu

CI – chemická ionizace

EI – elektronová ionizace

F - Trp – 4-fluorotryptofan

Nrl – norleucin

Nor – norvalin

ACN - acetonitril

HCl – kyselina chlorovodíková

EtOH – 70% ethanol

1 ÚVOD

Organismus je složitý soubor metabolických procesů, obsahující tisíce intermediátů, které si sám vytváří, nebo je musí přijímat potravou. Tyto procesy jsou tělní enzymatické reakce, u nichž se přeměňují látky a energie v buňkách. Dělí se na anabolismus (výstavbový proces, biosyntéza) a katabolismus (rozkladový proces). Součástí těchto procesů jsou i aminokyseliny. Jejich základní a nejdůležitější funkcí je schopnost spojovat se peptidovou vazbou do dlouhých řetězců, bílkovin.

V této práci se zabývám glutaminem (Gln), který je nezbytný pro metabolismus dusíku v organismu, jeho detoxikaci a jako zásobárna energie pro rychle rostoucí buňky. Kvantitativní analytické stanovení glutaminu je problematické, poněvadž nebyla dostatečně popsána studie stability v roztocích ani v biologických materiálech.

Teoretická část předkládané bakalářské práce se zabývá obecně aminokyselinami a samotným Gln, možnostmi jak ho stanovit pomocí různých HPLC/MS technik a pojednává o jeho stabilitě.

Cílem experimentální části je tvorba křivek stability glutaminu za různých podmínek skladování v rozdílných rozpouštědlech. V diskuzi jsou porovnány naměřené hodnoty a vytvořeno pořadí vhodnosti jednotlivých rozpouštědel v závislosti na stabilitě glutaminu.

1.1 Cíle práce

1. Literární rešerše o stabilitě glutaminu a možnostech jeho chromatografického stanovení
2. Stanovení optimálního rozpouštědla a teploty pro skladování roztoku standardu glutaminu
3. Simulace stability glutaminu v reálných vzorcích
4. Vliv rozpouštědla na tvorbu rozkladných produktů

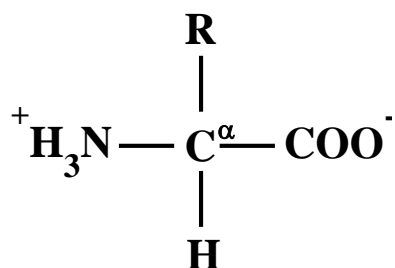
1.2 Hypotézy

1. Glutamin je stabilnější v neutrálním pH
2. Stabilita je ovlivněna teplotou
3. Rozkladné produkty glutaminu se tvoří bez ohledu na typ rozpouštědla

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou aminoderiváty karboxylových kyselin. V přírodě bylo identifikováno přes 700 aminokyselin a vyskytují se dominantně v L-konformaci. Nejdůležitější skupinu tvoří 20 L- α -aminokyselin tzv. kódovaných aminokyselin, z nichž jsou vytvořeny molekuly bílkovin. Obsahují karboxylovou skupinu, aminoskupinu, atom H a R-substituent navázané na svém alfa-uhlíku. R-substituent dává aminokyselině její další vlastnosti. R-substituenty aminokyselin jsou krátké uhlíkaté řetězce, které mohou obsahovat další funkční skupiny, např.: -OH, -SH, -NH₂, -COOH. Všechny aminokyseliny mají alespoň jeden asymetrický uhlík a mohou se vyskytovat jako enantiomery L- (S-) nebo D- (R-). Výjimku tvoří aminokyselina glycin, která má místo R-substituentu atom H, a proto nemá asymetrický uhlík. (2, 3)



Obr. č. 1 - Strukturovaný vzorec aminokyseliny.

2.1.1 Dělení aminokyselin podle struktury postranního řetězce:

alifatické aminokyseliny	glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin
alifatické hydroxyaminokyseliny	serin, threonin
alifatické sírné kyseliny	cystein, methionin
Aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci	kyselina aspargová, kyselina glutamová
monoamidy aminokyselin s karboxylovou skupinou v postranním řetězci	asparagin, glutamin
aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci	lysin, arginin
aminokyseliny s aromatickým a heterocyklickým postranním řetězcem	phenylalanin, tyrosin, tryptofan
cyklická aminokyselina	prolin

Tab. č. 1 – Dělení aminokyselin.

2.1.2 Dělení aminokyselin podle esenciality:

1) **esenciální**: valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin, tryptofan

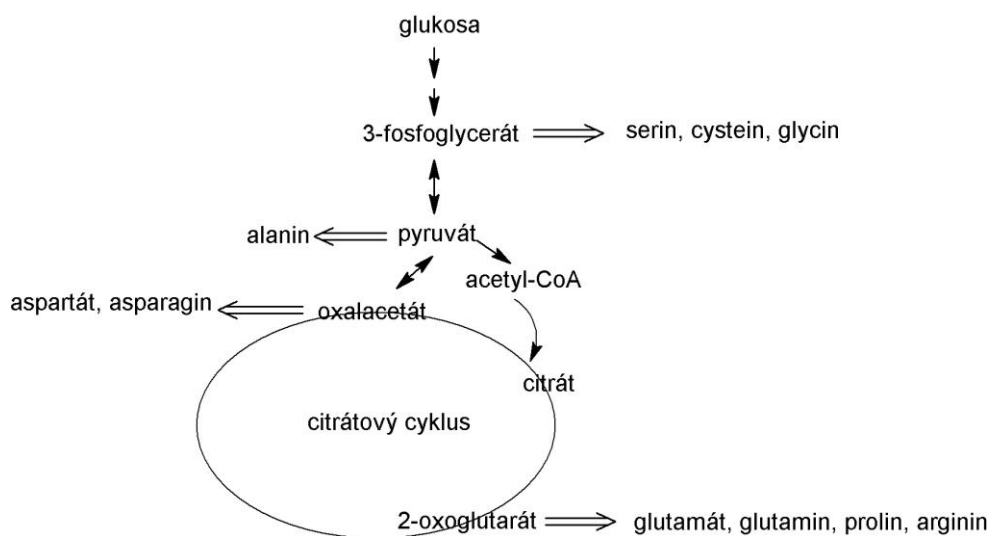
Lidský organismus je nedokáže syntetizovat v množství, dostačující pro růst dítěte nebo pro udržení dobrého zdravotního stavu v dospělosti. Esenciální aminokyseliny se musejí získávat z příjmu potravin ve formě bílkovin. Při nedostatečném příjmu bílkovin v potravě vznikají vážné poruchy látkové přeměny (porucha růstu, ubývání na hmotnosti) a genetické choroby (fenylketonurie a syndrom javorového sirupu).

2) **polo-esenciální**: arginin, histidin (pro děti esenciální)

Vzhledem k rychlému vývoji dětí se Arg a His nestačí syntetizovat v dostatečném množství. Postupně se stávají neesenciálními.

3) **neesenciální**: všechny ostatní aminokyseliny

Lidský organismus si je dokáže syntetizovat v dostatečném množství z glukózy, mastných kyselin nebo z jiných aminokyselin viz obr č. 2. (1,2,5)



Obr. č. 2 - Obecné schéma biosyntézy neesenciálních aminokyselin v lidském organismu.

2.1.3 Vlastnosti aminokyselin

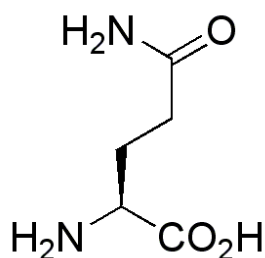
Karboxylová skupina, aminoskupina, atom H a R-substituent jsou navázány na stejném atomu C, a proto je chirální (Gly je výjimkou, nemá asymetrický uhlík). Chiralita je prostorově-geometrická vlastnost molekuly nebo jiného objektu. Chirální objekt není totožný se svým zrcadlovým obrazem, nemá střed ani rovinu symetrie, může však mít osu symetrie. Chirální molekuly jsou opticky aktivní, tzn., že jejich roztoky stáčejí rovinu lineárně polarizovaného světla. Aminokyseliny jsou řazeny mezi amfolyty (též amfoterní látky, amfionty), protože obsahují kyselé i bazické skupiny. Mají bipolární charakter, mohou se tedy chovat jako kyseliny i jako zásady v závislosti na pH prostředí. Náboj funkčních skupin závisí na pH. Takové pH v kterém mají aminokyseliny nulový náboj a nepohybuje se tak v elektrickém poli, se nazývá isoelektrický bod (pI). Při nulovém náboji se aminokyselina vyskytuje ve formě amfiontu. Každý amfion má svůj isoelektrický bod. (1, 2, 3)

2.1.4 Funkce aminokyselin

Aminokyseliny jsou základní stavební jednotkou bílkovin. Jsou zde spojovány tzv. peptidovou vazbou, která je druhem kovalentní chemické vazby obsahující seskupení atomů $-\text{CO}-\text{NH}-$, a pro aminokyseliny je typická. Peptidové vazby se tvoří mezi α -aminoskupinou jedné aminokyseliny a α -karboxylem druhé aminokyseliny za odštěpení jedné molekuly vody. Aminokyseliny kromě své hlavní úlohy, stavební jednotky bílkovin, mají ještě další významné metabolické funkce v živých objektech. Jsou především výchozími látkami pro syntézu mnohých biologicky aktivních látek nebílkovinného charakteru, např. vznik některých vitaminů, zvláště tzv. B-komplexu, vznik četných rostlinných barviv (flavonoidy) nebo alkaloidů. Podílejí se spolu se svými deriváty na mnohých intracelulárních procesech, jako je nervový přenos, regulace buněčného růstu a biosyntéza porfyrinů, purinů, pyrimidinů a močoviny. V podobě nízkomolekulárních peptidů mají L-aminokyseliny další významnou úlohu jako hormony a jsou součástí polypeptidových antibiotik, produkovaných mikroorganismy. (2)

2.2 L- Glutamin

Gln (2-amino-4-karbamidobutyrát, molekulární hmotnost: 146,1 g/mol) patří mezi polární neesenciální glukoplastické aminokyseliny (látky, ze kterých může sérií metabolických dějů vznikat glukóza). Polární funkční skupina glutaminu vytváří snadno polární interakce, zejména vodíkové vazby. Glutamin zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě a prostorovým rozložením dipólů umožňuje specifickou vazbu větších polárních molekul. Vyskytuje se ve dvou enantiomerních konfiguracích – D a L, v bílkovinách se vyskytují pouze L-formy. Na obr. č. 3 vzorec L-Gln (4, 2, 24)



Obr. č. 3 – chemický vzorec aminokyseliny L-glutaminu.

2.2.1 Funkce a metabolismus

Gln je nejrozšířenější aminokyselina v krvi, hlavní tkání pro syntézu, skladování a uvolňování je kosterní sval. Je zdrojem energie pro rychle rostoucí buňky, včetně enterocytů, retikulocytů a lymfocytů. Tvoří spolu s asparaginem latentní zásobu amoniaku v organismech a hraje důležitou roli při využívání amoniaku v biosyntetických dějích. Amidový dusík glutaminu se uplatňuje při různých reakcích – syntéza aminokyselin transaminací, purinových nukleotidů a dalších dusíkatých látek (histidin, glukosamin). Glutamin a asparagin jsou stavební jednotky bílkovin, ale také transportéry (lehce přechází přes buněčnou membránu). Reguluje membránový transport sodíku a tím je i regulátorem objemu buňky a anabolických dějů. Glutamin se vyskytuje ve všech tělních tekutinách, je to nejvýraznější aminokyselina v likvoru. Zvýšené hladiny glutaminu se vyskytují při dědičné hyperamonémii v moči nebo při sekundární a generalizované hyperaminoacidurii. (2, 4)

2.2.2 Zdroj Gln

Glutamin se tvoří amidací kyseliny glutamové za katalýzy glutaminsyntetázy. Průmyslově se glutamin vyrábí biosyntézou užitím mikroorganismů, chemickou syntézou nebo kombinací chemické syntézy a různých biotechnologických postupů. (2)

2.2.3 Vylučování a metabolismus Gln

Detoxikace amoniaku začíná vazbou amoniaku na glutamát, vzniká glutamin a ten je přenášen krví do jater, kde odevzdá většinu amoniaku do močovinového cyklu a menší část do ledvin, zde glutaminázou uvolněný amoniak neutralizuje kyseliny vznikající v metabolismu a vylučuje se s nimi močí. Gln je v ledvinách deamidován na glutamát za katalýzy glutaminázy a je přeměněn oxidační deaminací na 2-oxoglutarát, který vstupuje do citrátového cyklu jako konečný produkt odbourávání glutaminu. (4, 10)

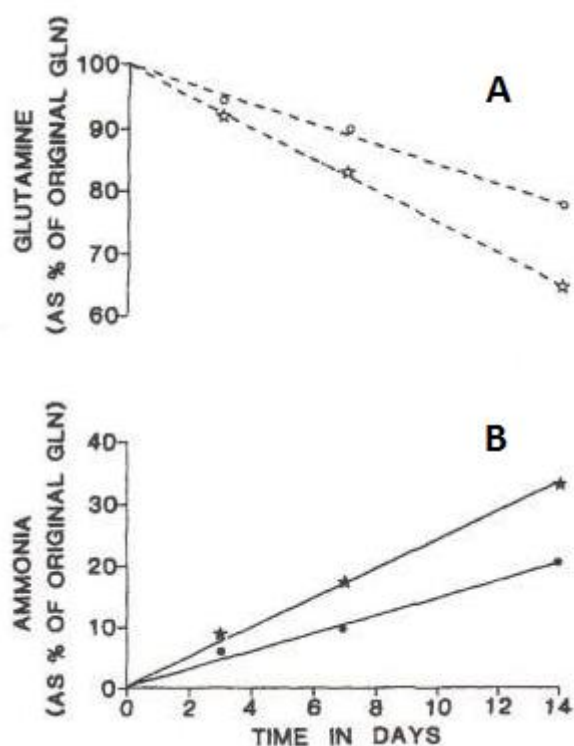
2.2.4 Skladování Gln a studie stability

Na určení stability a vlivu různých degradačních faktorů bylo provedeno několik pokusů a zkoušek. Výzkumy stability se ovšem liší a nebyla popsána ideální forma skladování glutaminu v roztocích. Glutamin je méně stabilní než ostatní aminokyseliny, v roztocích spontánně degraduje, zejm. na kyselinu pyroglutamovou. Rychlost a rozsah degradace ovlivňuje především pH, teplota, přítomnost hydrogenuhličitanu, fosforečnanů a doba skladování. Stabilnější krystalická forma je dlouhodobě skladována při 10–30 °C. (10, 19)

Stabilitou roztoků aminokyselin, včetně Gln, se již zabývalo několik studií. Sledována je především závislost vlivu teploty, pH a typu rozpouštědla na dobu skladování. Lze vysledovat několik obecných závěrů: Gln podléhá spontánní degradaci i při správném skladování. Degradace se radikálně zvyšuje ve vyšších teplotách, což vede k tvorbě potenciálně škodlivého amoniaku. Optimální jsou tedy chladnější teploty nebo mražení. Při zmražení Gln dochází k výraznému zpomalení degradačních procesů. Materiál by měl být zmražen v menších objemech. Při rozmrazování se může glutamin srážet, a proto je nádoba umístěna do vodní lázně s teplotou 37 °C, která je včas vyjmuta. Jakmile dochází k rozmražení produktu, hrozí riziko zvýšené degradace. Optimální je spíše mírně kyselé až neutrální pH. Přítomnost hydrogenuhličitanů a fosforečných iontů je nepříznivá pro skladování. Stabilita

aminokyselin se často stanovuje v biologických tkáních a materiálech, potravě, kultivačních půdách a v roztocích. (28, 29, 30)

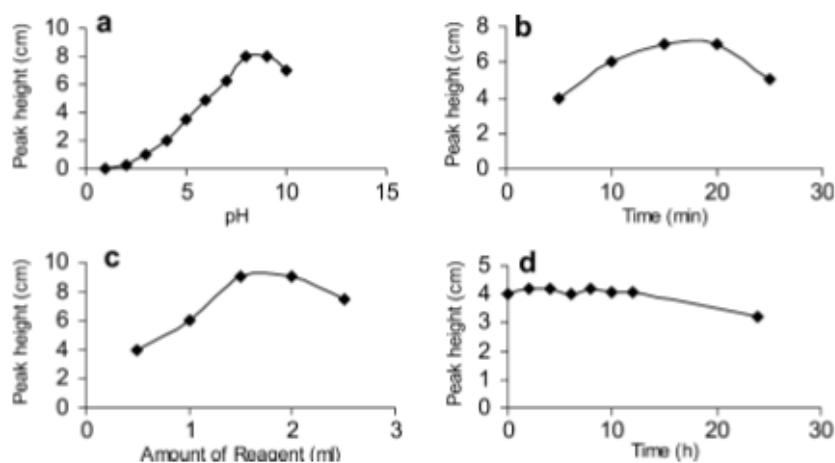
Jedna ze studií byla založena na sledování degradace L-glutaminu ve vodě, různých pufrch a intravenózních roztocích po dobu dvou týdnů. Měření probíhalo v teplotách 22-24 °C, 4 °C, -20 °C a -80 °C, v různém pH prostředí a za přítomnosti či nepřítomnosti kyslíku a světla. Pro stanovení byla použita enzymatická metoda měření amoniaku (Urea – UV method Kit No: 0711144) v přístroji Cobas Bio Autoanalyzer. V intravenózním roztoku byla pozorována ztráta 0,1-0,15 % za den při teplotě 4°C, při pokojové teplotě byla degradace rychlejší 0,8-0,9 %. Rozpad při teplotách -80 °C a -20 °C byl nulový. Kyslík ani světlo neovlivňují degradaci vzorku. Rozpad a zvyšování koncentrace NH_4 je znázorněn v Grafu č. 1. (19)



Graf č. 1 – (A) Degradace Gln při teplotě 22 – 24 °C za pH 4 (o) a 2 (*), (B) – zvyšující se koncentrace amoniaku ve vzorku při pH 2 (*) a 4 (o). (19)

Další studie se zabývala rozkladem volného argininu, glutaminu, a β -alaninu v nutričních produktech a potravinových doplňcích. Aminokyseliny jsou derivatizovány s fluorescenčním značením 9-fluorenylmethoxykarbonylem (Fmoc) a jsou stanoveny pomocí HPLC. Tato metoda se použila pro stanovení stability volného glutaminu v rekonstituovaných prášcích, které byly inkubovány při různých teplotách. Při teplotě 22-23 °C degradovalo $\leq 1,7$ % Gln za den, při pokojové teplotě byly ztráty 0,7-0,9 % za den. Maximální stabilita byla dosažena při pH 5,0-7,5. (26)

Studie byla zaměřena na vyvinutí metody pro stanovení glutaminu, argininu a tyraminu v mozkomíšním moku (CNF). Tato práce zkoumá selektivní stanovení glutaminu pomocí jednoduchého isokratického systému s použitím 2-hydroxynafthaldehydu (HN) jako derivatizačního činidla. pH se měnilo mezi hodnotami 1-10, množství přidaného činidla HN od 0,5 až 2,0 ml a doba ohřevu se střídala od 5-20 min při 75 °C. Nejvyšší bod na křivce je považován za optimální (viz Obr. č. 4). (27)

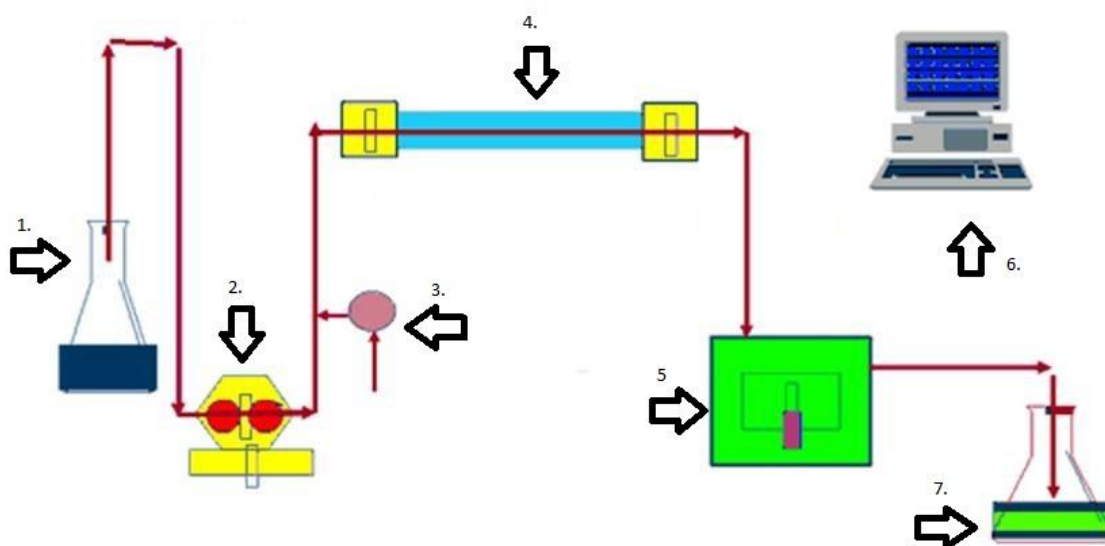


Obr. č. 4 – (a) – velikosti píků v závislosti na pH, Glutamin tedy jevil největší stabilitu při pH 8 (b) změna velikosti píku za dobu zahřívání na 75 °C, (c) – závislost degradace na množství přidaného činidla HN, neoptimálnější množství se pohybuje mezi 1,5 – 2 ml (d) – stabilita roztoku závislá na čase, Gln degradojuje rychle už po prvních hodinách. (27)

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie umožňuje vzájemnou separaci látek obsažených ve směsi díky odlišné afinitě k mobilní a stacionární fázi. Mobilní (pohyblivá) fáze se vyskytuje v plynném (GC, plynová chromatografie) či kapalném skupenství (LC, kapalinová chromatografie). Stacionární (nepohyblivá) fáze je ve skupenství pevném, nebo jako film kapaliny zakotvený na pevné látce. Je možná kvalitativní (separace látky) i kvantitativní analýza (množství látky).

Zkratka HPLC odvozená od „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fáze je kapalná. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Kapalinový chromatograf je tvořen zásobníky s mobilními fázemi, vysokotlakou pumpou, dávkovačem vzorku, kolonou a detektorem (obr. č. 5). Pro stanovení aminokyselin je HPLC spolu s GC nejběžnější metoda. Separace těmito metodami může obsahovat před i po kolonovou derivatizaci s UV nebo fluorescenční detekcí. Obecné schéma HPLC je zobrazeno na obrázku č. 5 (7, 11, 12, 15)



Obr. č. 5 – zásobní lahve pro mobilní fáze (1), vysokotlaké čerpadlo (2), otočný ventil (3), kolona (4), detektoru (5), shromáždění dat (6), odpad (7).

2.3.1 Mobilní fáze

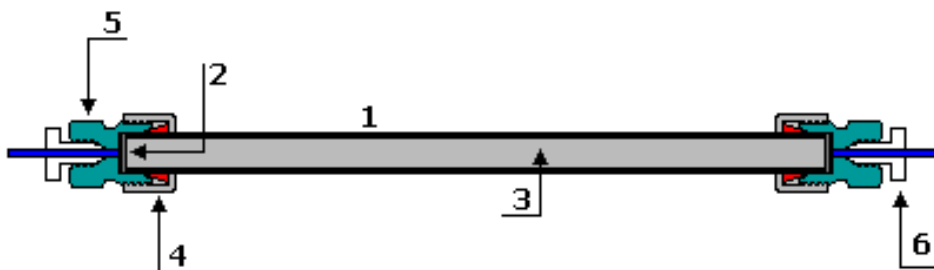
Mobilní fáze může být voda, methanol, acetonitril, jejich směsi v různých poměrech a pufry. Jsou uchovávány v láhvích, na kapalinový chromatograf může být napojeno několik různých mobilních fází, které se mísí v závislosti na zadaném koncentračním gradientu. Nejvíce je charakterizována polaritou a selektivitou. Polarita souvisí se schopností rozpouštědla podílet se na interakcích, zatímco selektivita má vliv na relativní retenci dvou sousedních látek. Potřebný tlak a stálý průtok mobilní fáze je zprostředkován vysokotlakou pumpou. (16, 6)

2.3.2 Čerpadla (pumpy)

HPLC kolony se plní mikročásticemi, které při procházení přes stacionární fázi kladou odpor, proto je mobilní fáze pod vysokým tlakem, aby mohla projít přes kolonu. Potřebný tlak a stálý průtok mobilní fáze je zprostředkován vysokotlakými čerpadly. Jsou dva druhy čerpadel, které lze použít pro vytvoření tlaku – lineární čerpadlo a čerpadlo s recipročním uspořádáním. Lineární čerpadlo se skládá z pístu, válce o objemu až několik set ml. Mobilní fáze je před analýzou naplněna do válce a posunem pístu je vytlačována do dávkovacího ventilu a separační kolony. Recipročně uspořádané čerpadlo ve válci periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. Válec má objem až několik stovek μl . Dále jsou čerpadla isokratická, a gradientová. Isokratická eluce je přivádění mobilní fáze s konstantním složením a gradientová přivádění mobilní fáze ve složení, které se mění podle předem daného programu. (15, 22, 6)

2.3.3 Kolona

Kolona je trubice nejčastěji z nerezů s průměrem 0,5 – 4,6 mm a o délce 3 – 30 cm, ve které se nachází stacionární fáze. O účinnosti separace směsí rozhoduje typ stacionární fáze a velikost částic. Základní požadavky na kolonu jsou: musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. HPLC je používána v normálním a reversním (RP) uspořádání. U normální fáze jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, a mobilní fáze je nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi. Mobilní fáze v systému RP je polární. Nepolární kolony jsou vhodné spíše pro separaci nepolárních látek, polární kolony pro polárnější látky. Reversní HPLC se často užívá k stanovení aminokyselin. Stacionární fáze je porézní materiál, nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, celulóza. Může být představována i nepolárními uhlovodíky (oktan, oktadekan) nebo polárnějšími uhlovodíky, které mají funkční skupinu (např. -CN,...). Mohou být povrchově pórovité nebo pórovité mikropartikulární. V povrchově pórovité je na neporézní jádro nanášena pórovitá vrstva anorganického materiálu případně s chemicky vázanou stacionární fází. Pórovité mikropartikulární má menší průměr pórů, velmi specifický povrch, vysokou kapacitu, ale pracuje za vyššího tlaku. Jednotlivé části HPLC kolony jsou na obr. č. 6. (11, 20, 21, 7, 16)



Obr. č. 6 - kovový plášť (1), porézní kovová frit (2), stacionární fáze (3) ochranný kroužek (4) koncová hlavice (5), vstup pro kapiláru se šroubem (6). (21)

2.3.4 Možnosti stanovení Gln:

Jednou z možností stanovení glutaminu je postup, který byl proveden na modelu Agilent 1100 HPLC systému (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) s použitým detektorem G1321A fluorescence (FLD) (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Excitační vlnová délka byla 262 nm a emisní vlnová délka 310nm. Použitá kolona YMC-Pack ODS-AQ s reverzní fází analytické HPLC (5 μ m, 120 A, 4,6 x 250 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Kolona byla udržována na 50 °C. (26)

Jiný analytický postup byl vyvinut pro selektivní stanovení glutaminu za použití 2-hydroxynafththaldehydu (HN) jako derivatizační činidlo. HPLC se prováděla na kapalinovém chromatografu Hitachi 655A. Separace se provedla na koloně Phenomenex C-18, (150 · 4,6 mm) s UV detekcí při 330 nm. HPLC metoda byla navržena pro selektivní stanovení glutaminu a použití HN jako derivatizačního činidla. (27)

2.3.5 Analyzátor

V HPLC se používá množství odlišných analyzátorů, lišících se principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Mohou být použity fluorescenční spektrofotometry, diferenční refraktometry, elektrochemické detektory, hmotnostní spektrometry, detektory na bázi rozptylu světla nebo měření radioaktivity a jiné speciální detektory. Pro HPLC není žádný zcela univerzální detektor. Použití detektoru závisí na konkrétní aplikaci. Nejvíce se používá hmotnostní spektrometr (MS), protože poskytuje nejvíce informací a je téměř univerzální. Při použití spektrofotometrického (UV-VIS) a fluorescenčního detektoru je nutná absorpce analytu na určité vlnové délce nebo emise fluorescenčního záření. Pokud analyt neemituje fluorescenční záření a neabsorbuje UV a VIS záření, musí se vzorek derivatizovat nebo použít jiný detektor. (22)

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Metoda pracuje s dělením podle poměru m/z , kde m je hmotnost a z je náboj iontu. Využívá se pro stanovení molekulové hmotnosti látek dále pro stanovení základní struktury molekuly. Při obvyklém postupu se vzorek ve stroji nejdříve odpaří a následně se ionizuje pomocí různých metod. Pak je vzorek ve formě iontů transportován do hmotnostního analyzátoru, kde dojde k separaci iontů na základě jejich m/z a následné detekci v detektoru.(6)

2.4.1 Ionizační techniky

Při ionizaci se z neutrálně nabitě molekuly stává anion či kation. Ionizační techniky jsou závislé na povaze látky a na volbě separační metody. Ionizaci v základě rozdělujeme na měkkou ionizaci (ESI, APCI, MALDI, CI, TSI) a tvrdou ionizaci (EI). Liší se množstvím dodané energie, při čemž u měkké ionizace je dodaný energetický přebytek molekule malý a proto i fragmentace primárně vzniklého iontu je malá. U tvrdé ionizace dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, které se mohou lišit z různých chemických hledisek, proto je vždy třeba vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku. Mohou pracovat za sníženého nebo atmosférického tlaku. (18, 25)

2.4.2 Typy Ionizací

2.4.2.1 elektronová ionizace (EI)

Tvrdá ionizační metoda v plynné fázi. Nejběžnější způsob ionizace, obvyklý v GC-MS. Ionizace molekul analyzované látky je způsobena proudem urychlených elektronů. Molekula získá velký přebytek vnitřní energie, projevující se fragmentací molekulárního iontu. V prostoru iontového zdroje je udržované vakuum, což snižuje pravděpodobnost mezičásticových interakcí a vznikají radikalkationty. Jako zdrojem elektronů se nejčastěji používá wolframové nebo rheniové vlákno. Standardní energie při kontaktu elektronu s ionizovanou látkou je 70eV, při níž většina látek poskytuje optimální fragmentační spektrum, které je porovnatelné s rozsáhlými knihovnamí EI spekter. (6, 25)

2.4.2.2 chemická ionizace (CI)

Běžně používaná měkká ionizace, spolu s EI se používá nejčastěji s plynovou chromatografií. Ionizace molekul probíhá v plynném stavu interakcí s reakčními ionty. Zdrojem energie podobně jako u EI je proud urychlených elektronů, jejich energie je však přenášena přes reakční médium a ne přímo. Probíhá pod relativně velkým tlakem (50–150 Pa) z důvodu zvýšení pravděpodobnosti mezimolekulárních a meziiontových interakcí. Reakční médium je v plynném skupenství. Nejčastější reakční médium je methan, isobutan nebo amoniak. Iontový zdroj pro chemickou ionizaci je podobný zdroji pro elektronovou ionizaci, ale zde je přítomen tzv. reakční plyn. (25, 6)

2.4.2.3 Sprejové ionizační techniky

Jsou to měkké ionizační techniky v kapalně fázi. Sprejové techniky jsou vhodné pro kombinaci hmotnostního spektrometru s kapalinovým chromatografem a kapilární elektroforézou. Nejčastější variantou těchto technik je elektrosprejová ionizace (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

2.4.2.4 Elektrosprej (ESI)

Elektrosprej je nejčastěji používaný iontový zdroj pro spojení LC-MS. Pracuje za atmosférického tlaku. Ke zmlžení mobilní fáze dochází pomocí kovové kapiláry s nehomogenním elektrickým polem mezi ústím kapiláry, s napětím v jednotkách kilovoltů a protielektrodou, která je uzemněna. Vznikají malé kapičky na výstupu z kapiláry, nesoucích vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarity vloženého napětí na kapiláru. Kapičky jsou vysušeny horkým interním plynem, který je v protiproudu (dusík nejčastěji) a má teplotu kolem 200 °C. Rozpuštěné ionty přecházejí rovnou do plynné fáze a míří přes vstupní štěrbinu a iontovou optiku přímo do hmotnostního analyzátoru. Mohou zde vznikat kladné, ale i záporné ionty v závislosti na polaritě napětí na protielektrodě. Zejména kvůli schopnosti ESI vytvářet vícenásobně nabitě ionty, čehož se nejčastěji využívá v proteomice, kde lze detekovat i vysokomolekulární polypeptidy a bílkoviny při relativně nízkých poměrech molekulové hmotnosti k náboji m/z . (13, 6, 23)

2.4.2.5 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Spolu s ESI se řadí mezi ionizační techniky, ve kterých dochází ke vzniku iontů za atmosférického tlaku. U APCI není na kapiláru vloženo žádné napětí a na jejím konci je přidána výbojová jehla (elektroda). Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu (až 600 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou ionizovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Ionty vzniklé z mobilní fáze (tzv. reakční plyn) následně ionizují molekuly analytu, podobně jako při klasické chemické ionizaci. (13)

2.4.2.6 Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

Ionizace molekul s velkou molekulovou hmotností – biopolymery, syntetické polymery, proteiny, oligonukleotidy, lipidy a polymery. Může probíhat za různého tlaku. Nízkotlaké MALDI probíhá za vakua (< 1 Pa), střednětlaké MALDI pracuje za sníženého tlaku a atmosférické MALDI (AP-MALDI) pracuje za okolního tlaku. Tato technika může být vhodná i pro ionizaci vysokomolekulárních látek, protože dochází k tvorbě jedno i vícenásobně nabitých iontů. (23, 14).

2.4.3 Hmotnostní analyzátory

Slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Jeho umístění je mezi iontovým zdrojem a detektorem. Dělení iontů v analyzátoru probíhá za vysokého vakua. Dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:

- 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (analyzátoru)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR).
- (6, 8, 9)

2.4.3.1 Magnetický sektorový analyzátor

Princip je založen na zakřivení dráhy letu iontu, které je způsobeno průchodem magnetickým polem, u iontů s nižší hodnotou m/z je zakřivení větší. Umožňuje vysokoenergetické MS/MS experimenty jako určení poloh dvojných vazeb nebo větvení v acylovém řetězci mastných kyselin na základě fragmentových iontů vzniklých při těchto experimentech. Používá se jako klasický analyzátor pro GC/MS analýzu dioxinů, furanů, bromovaných difenyletherů a polychlorovaných naftalenů. (6)

2.4.3.2 Kvadrupolový analyzátor

Uplatňuje se při spojení hmotnostních spektrometrů s kapalinovou nebo plynovou chromatografií či s kapilární elektroforézou. Skládá se ze čtyř kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné napětí a na druhé dvě záporné. Společně na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Průběžnou změnou U (napětí) a V (amplituda) jsou kvadrupolem propouštěny na detektor ionty s určitou m/z . Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V určitém časovém okamžiku při určitém poměru U/V jsou oscilace stabilní jen pro určitý ion s danou hodnotou m/z který za těchto podmínek projde kvadrupolem. Ostatní ionty jsou zachyceny na povrchu tyčí v kvadrupolu. (9, 6, 17)

2.4.3.3 Iontová past

Vychází z principu kvadrupolového analyzátoru. Uvnitř je vytvořeno hyperbolické elektrické pole. Umožňuje pomocí střídavého proudu udržet ionty v ohraničeném prostoru. Je tvořena jednou prstencovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Vhodnými poměry napětí vloženého na kruhovou elektrodu a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Při postupném měnění napětí jsou ionty podle jejich m/z vypuzovány na detektor. (9)

2.4.3.4 Průletový analyzátor

Tento analyzátor, je tvořen evakuovanou trubicí, v níž se ionty rozdělují na základě doby letu ze zdroje do detektoru. Ionty jsou do trubice urychleny napěťovým pulsem, kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z a dopadají na detektor v různém čase. Ionty s menší hodnotou m/z se pohybují rychleji než ionty s větší hodnotou m/z , proto na detektor dopadají dříve. (6, 9)

2.4.4 Detektory

Detektory se rozdělují na dvě kategorie a to detektory pro přímá měření (deskový detektor, Faradayuv pohár) a násobičové detektory (fotonásobiče, elektronásobiče). Detektory pro přímé měření detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů a násobičové využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a poskytují měřitelné signály i pro jednotlivé ionty. (6)

2.4.4.1 Elektronásobičové detektory

Mají dvě konstrukce a to konstrukci s diskretním dynodovým polem a s kontinuální dynodou. První druh detektorů je tvořen ze série kovových destiček (dynod). Tyto dynody jsou propojeny odpory tak, že po vpuštění vysokého napětí mezi první a poslední destičku jsou elektrony urychlovány směrem kupředu a zachyceny kolektorem na konci. Při dopadu iontů jsou vyřazeny elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody násobí. Druhý typ je tvořen zakřivenou trubicí z olovnatého skla s velkým elektrickým odporem. Na vnitřní stěně je trubice pokryta vrstvičkou oxidu berylnatého anebo hlinitého. Kontakty při ústí a na konci trubice jsou navázány na zdroj vysokého napětí. Urychlení elektronů, které jsou po dopadu iontů vyzářeny z materiálu trubice, je způsobeno elektrickým polem a probíhá směrem ke kolektoru. (6)

2.4.4.2 Fotonásobičové detektory

Při této detekci jsou ionty na pomocné kovové elektrodě konvertovány na elektrony, které po dopadu na scintilační stínítko poskytují fotony a ty vstupují do fotonásobiče. Je konstrukčně složitější než elektronásobič, ale převyšuje ho svou vyšší citlivostí a delší životností. Podle polarit napětí vloženého na elektrodu se určuje typ detekovaných iontů. Na velikosti tohoto napětí závisí poté i citlivost detekce iontů s vyšší hmotností. (6)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a nástroje:

zkumavky eppendorf 1,5 ml (Eppendorf, Česká republika)

skleněné odměrné válce

automatická pipeta Biohit Proline 20-200 µl (Sartorius)

analytické váhy R200D (Sartorius AG, Německo)

poloautomatický dávkovač eVol (SGE Analytical Science, Austrálie)

deionizační zařízení Barnstead NANOPure (Thermo Scientific, USA)

hmotnostní detektor LTQ XL (Thermo Fisher, San Jose, USA)

ACCELA 600 Pump (Thermo Fisher, San Jose, USA)

ACCELA Autosampler (Thermo Fisher, San Jose, USA)

LC kolona - Synergi Hydro RP, 100A, 100 x 2,00 mm, 2,5 µm (Phenomenex, Torrance, Kanada)

LC kolona – Gemini 5µm C18, 110A. 150 x 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kanada)

3.2 Chemikálie

Acetonitril pro stopovou analýzu (Merck, Německo)

Ethanol pro stopovou analýzu (Merck, Německo)

Kyselina mravenčí (Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika).

NaCl (Lachema, Česká republika)

L-glutamin (99,5%, Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika)

Norleucin (Calbiochem, Merck Millipore, Německo)

Norvalin (Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika).

L-Tryptofan (Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika)

4-fluorotryptofan (Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika)

Dusík 5.0. (Siad s.r.o., Česká republika)

3.3 Pracovní postup:

Studie stability byla rozdělena do dvou fází. První fáze sledovala stabilitu Gln v roztoku a hledala vhodné podmínky pro jeho skladování. Druhá fáze simulovala stabilitu Gln v extraktech vzorků použitím jiných extrakčních rozpouštědel.

3.3.1 Studie stability

Při první studii byl připraven zásobní roztok Gln o koncentraci 0,5 nmol/μl ve vodě o pH 6,4, 20% acetonitrilu (ACN) o pH 4,4 a 0,1 mol/l kyselině chlorovodíkové (HCl) s pH 1,2. Vnitřní standard norleucin (Nrl) měl koncentraci 2 nmol/μl ve vodě.

Roztoky byly pipetou rozděleny po 1 ml do eppendorfek a uskladněny při teplotách -18 °C v mrazáku, 6 °C v lednici a 22 °C na polici v laboratoři. Měření probíhalo v časových intervalech 0, 1, 4, 7, 14, 21 a 28 dní od začátku měření pokaždé ve třech opakováních.

Do každé vialky bylo odpipetováno 200 μl roztoku Gln (absolutně 100 nmol) a 10 μl vnitřního standardu (absolutně 20 nmol) a poté byly analyzovány pomocí LC-MS s hmotnostním analyzátořem typu lineární iontová past v módu ESI+. Kolona byla vyhřátá na teplotu 35 °C, autosampler chlazen na 10 °C. Objem nástřiku činil 5 μl. Rychlost průtoku mobilní fáze 300 μl/min. Napětí na kapiláře: 2,5 kV. Teplota iontového zdroje: 275 °C. Desolvatační teplota: 150° C. Celková analýza jednoho vzorku trvala 8 min. První dvě měření na LTQ (0. a 1. den) se využila kolona Gemini 5 μm C18, 110A, 150 x 2,00 mm. Na další měření byla však vybrána kolona s lepším separačním potenciálem a vyšší stabilitou při 100% vodné mobilní fázi a to Synergi Hydro RP,100A, 100 x 2,00 mm, 2.5 μl. Mobilní fáze byly 0,1% roztok mravenčí kyseliny v acetonitrilu (A) a roztok 0,1% roztok mravenčí kyseliny ve vodě (B), koncentrační gradient v průběhu analýzy je uveden v tabulce 2.

Čas (min)	%A	%B
0,0	0,0	100,0
3,5	5,0	95,0
3,6	90,0	10,0
4,5	90,0	10,0
4,6	0,0	100,0
8,0	0,0	100,0

Tab. č. 2 – koncentrační gradient mobilních fází.

3.3.2 Stabilita v extraktech vzorků

K simulaci stability Gln ve vzorcích se vybrala 3 média – voda, fyziologický roztok (0,9% NaCl ve vodě) a 70% ethanol (EtOH). Jako vnitřní standard byl vybrán norvalin (Nor) z důvodu rozmývání Nrl v předchozích měřeních. V tomto pokusu se připravil i roztok tryptofanu (Trp) s vnitřním standardem 4-fluorotryptofan (F-Trp). Trp by měl být v roztocích stabilní, jeho koncentrace byla 0,5 nmol/μl a koncentrace standardu 4 nmol/μl. Příprava a koncentrace vzorků Gln a Nor byla obdobná jako v kapitole 3.4.1.

Pro skladování se připravilo 45 zkumavek typu eppendorf, do kterých se přenesly vzorky skladované v teplotě -18 °C. Pro teploty 25 °C a 6 °C stačilo skladování v zásobních lahvích, které nebylo pro teplotu -18 °C možné z důvodu degradace vzorku při opakovaném rozmrazování. Analyzovalo se v časových intervalech 0, 1, 4, 7, 14, a 30 dní. Byla použita stejná metoda, jako v předchozím experimentu viz kapitola 3.1.4.

Do vialek se pomocí poloautomatického dávkovače přidaly vnitřní standardy Nor a FTrp po 5 μl (každého absolutně 20 nmol). Automatickou pipetou bylo poté přeneseno 50 μl roztoku Gln (absolutně 50 nmol) a 40 μl Trp (absolutně 20 nmol). Samotná analýza vzorků probíhala shodně s předchozím měření viz kapitola 3.1.4. Skladování probíhalo za stejných teplot, jako v předchozím experimentu viz kapitola 3.1.4.

4 VÝSLEDKY:

V předkládané bakalářské práci je provedena studie stability glutaminu při různých teplotách a v různých rozpouštědlech. Na základě naměřených dat jsem sestavil křivky stability znázorňující závislost poměru glutaminu a jeho vnitřního standardu na čase.

Skladovací médium	Poměr Gln/Nrl(*)
H₂O	1,18
ACN	1,39
HCl	1,71

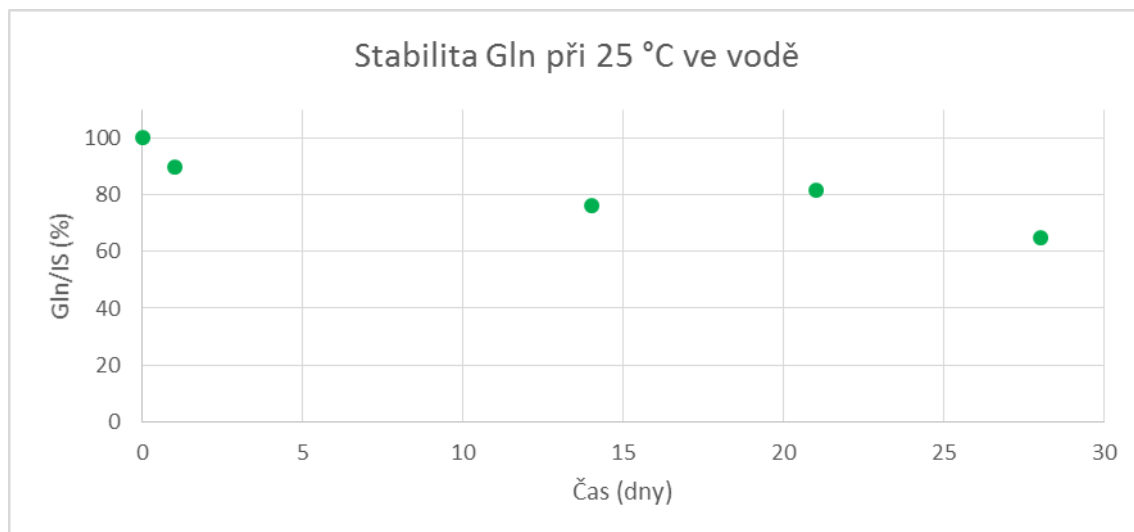
Tab. č. 4 – počáteční vztažné hodnoty 1. série pokusů (* = aritmetický průměr tří opakování).

Skladovací médium	Poměr Gln/Nor (*)
W	2,27
Fyz	0,17
EtOH	2,48

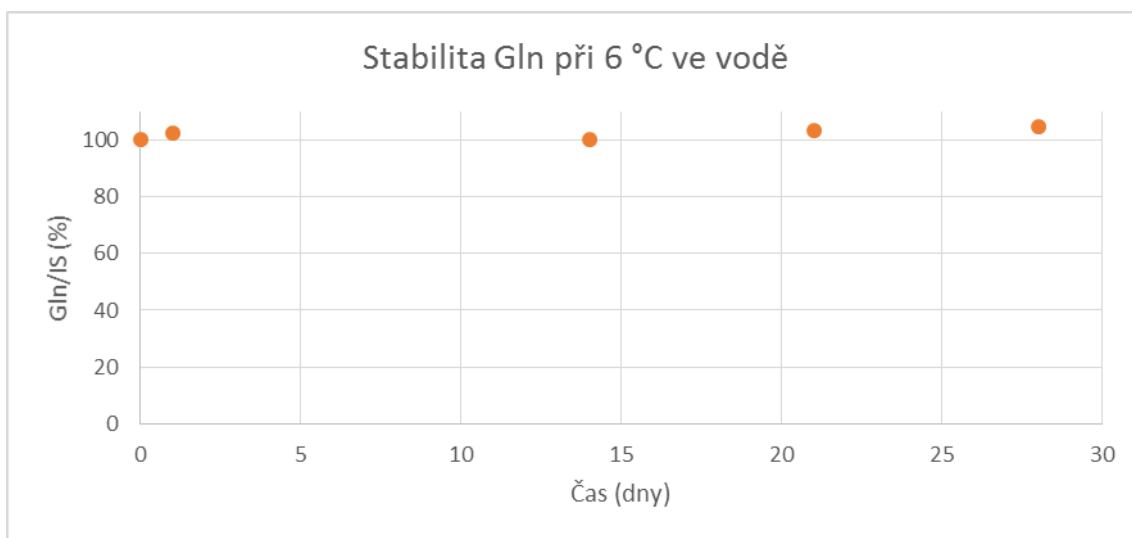
Tab. č. 5 – počáteční vztažné hodnoty 2. série pokusů (* = aritmetický průměr tří opakování).

4.1 Výsledky 1. studie:

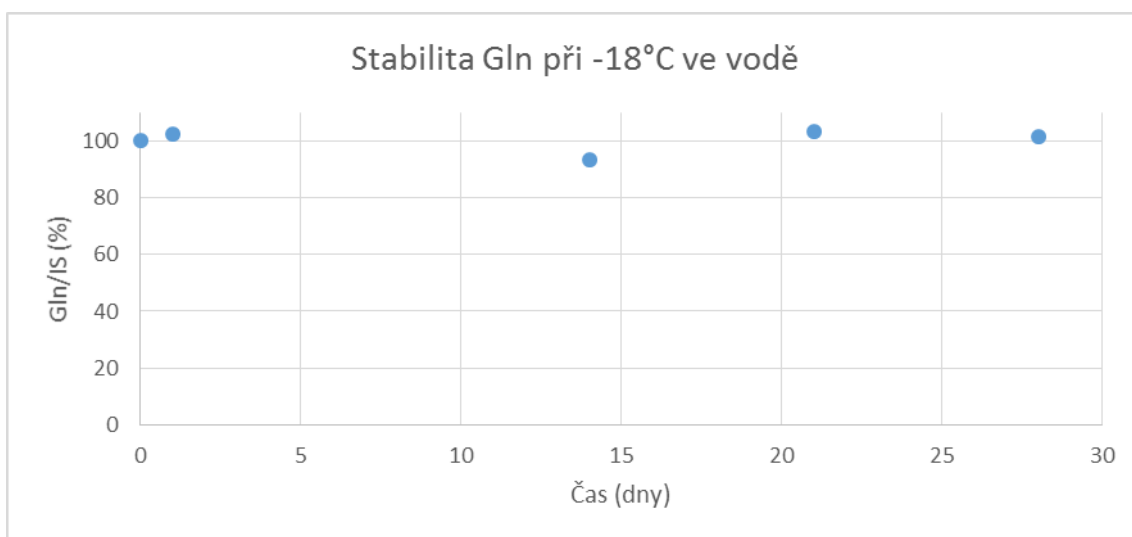
V první části experimentů jsem se snažil nalézt nejvhodnější rozpouštědlo a teplotní podmínky pro dlouhodobé skladování glutaminu v roztoku. Gln byl po dobu jednoho měsíce skladován při různých teplotách (-18 °C, 6 °C, 25 °C) a různých rozpouštědlech (voda, 20 % ACN, 0,1 mol/l HCl ve vodě). Ve vodě byl dokázán negativní vliv rostoucí teploty (viz Graf č. 2). Silně kyselé prostředí je naprosto nevhodné pro skladování glutaminu z důvodu rychlé spontánní degradace. Nastupuje prakticky okamžitě a nezávisle na teplotě je po 10 dnech přítomno jen méně než 10 % původního množství glutaminu (viz Graf č. 8, 9, 10). Studie dokazuje, že Gln je stabilnější spíše v neutrálním pH. Tyto výsledky potvrzují vypořádané závěry v kapitole 2.2.5.



Graf č. 2. – Degradace Gln v H₂O při teplotě 25 °C.

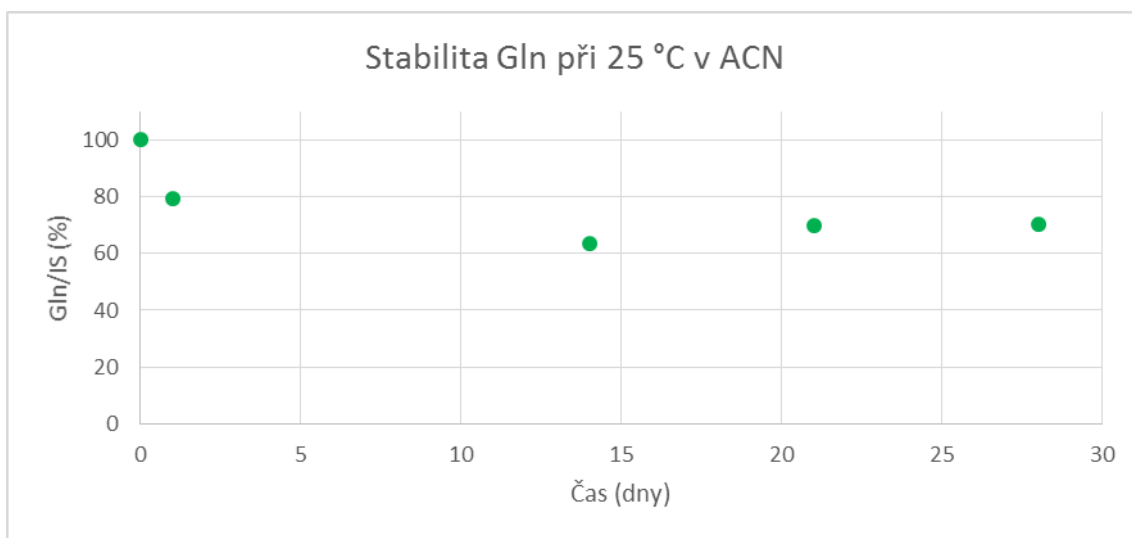


Graf č. 3. - Degradace Gln v H₂O při teplotě 6 °C.

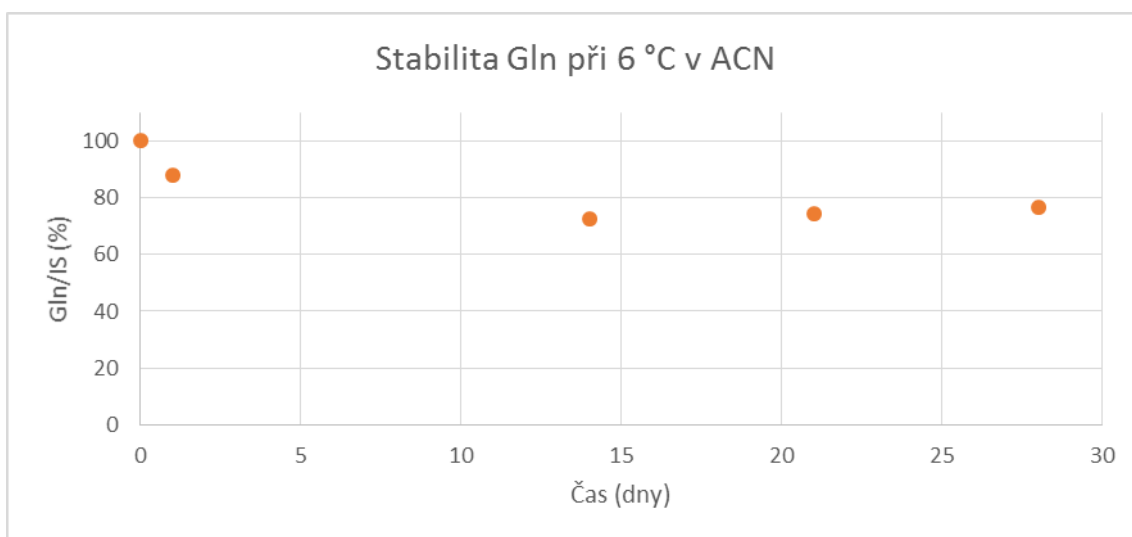


Graf č. 4. – Degradace Gln v H₂O při teplotě – 18 °C.

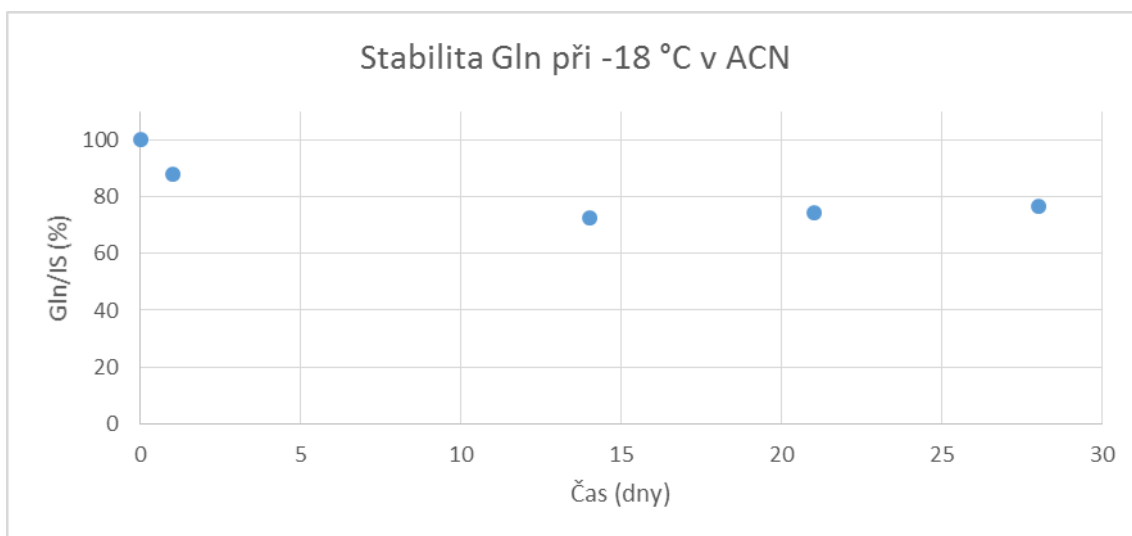
Gln je nejvíce stabilní při nižších teplotách. Nejlepší stabilita byla naměřena při teplotách 6 °C a -18 °C v zásobním roztoku H₂O (viz Graf č. 3, 4). Degradace byla tak nízká, že nebyla zaznamenána. Při teplotě 25 °C v H₂O byla zjevná ztráta 40 % (viz Graf č. 2). Tyto měření dokazují závislost teploty na rozpad Gln, potvrzují závěry zmíněné v kapitole 2.2.5.



Graf č. 5 – Degradace Gln v ACN při teplotě 25 °C.

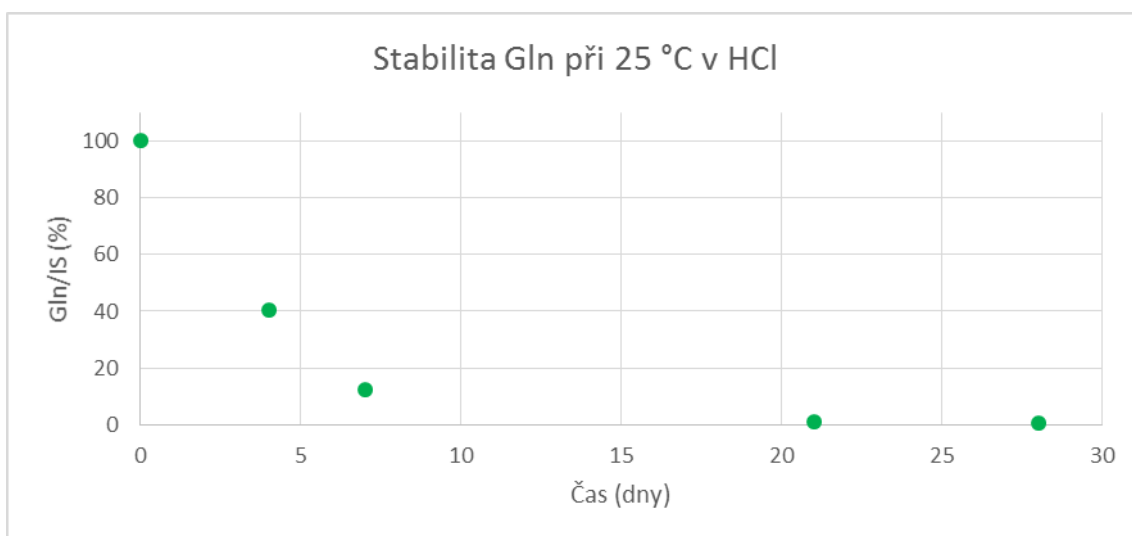


Graf č. 6 – Degradace Gln v ACN při teplotě 6 °C.

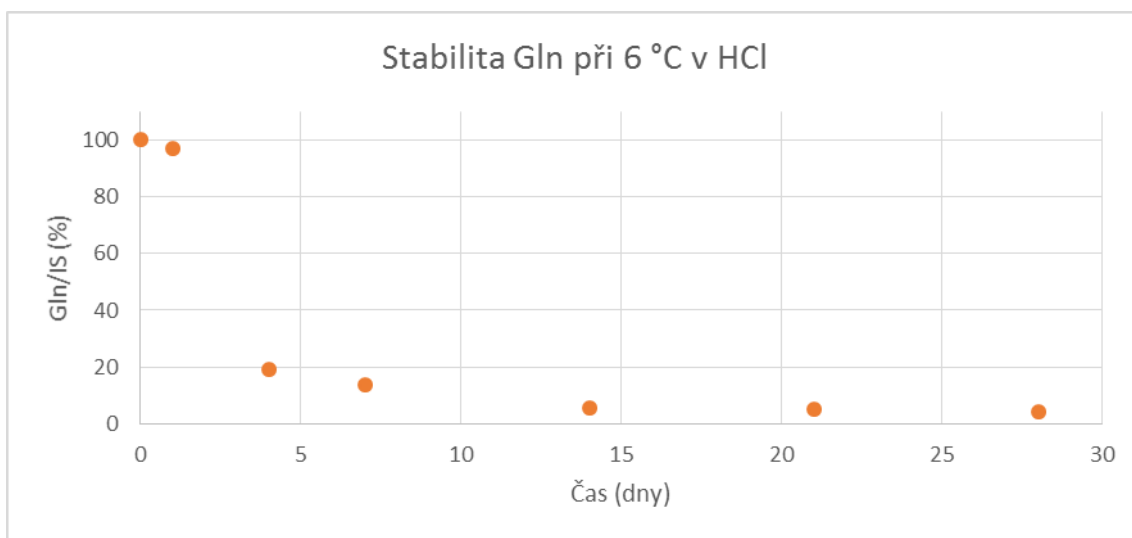


Graf č. 7 – Degradace Gln v ACN při teplotě -18 °C.

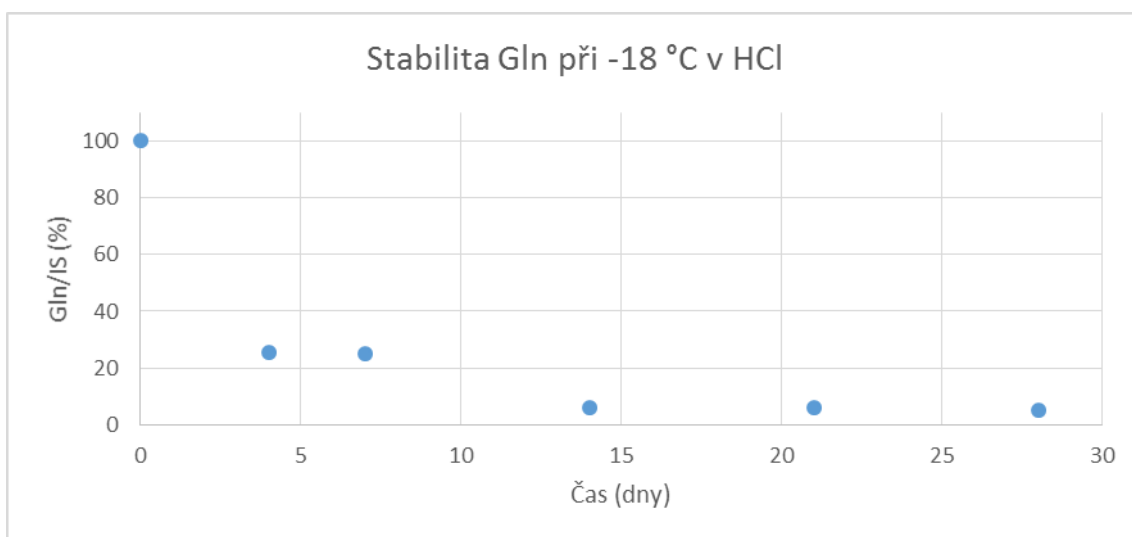
Při skladování v ACN byl pozorován téměř shodný rozpad za všech teplot, kde Gln klesl ve všech měření stejně a to na cca 75 %, těchto hodnot však Gln dosáhl již 15. den měření, poté se rozklad zastavil (viz Graf č. 5, 6, 7).



Graf č. 8 – Degradace Gln v HCl při teplotě 25 °C.



Graf č. 9 – Degradace Gln v HCl při teplotě 6 °C.



Graf č. 10 – Degradace Gln v HCl při teplotě -18 °C.

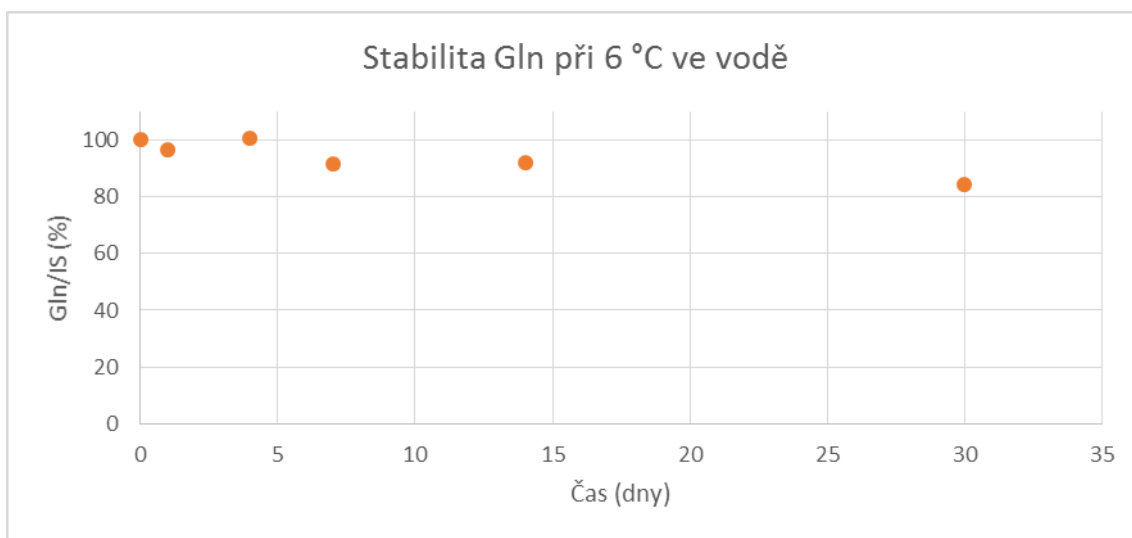
Nejrozsáhlejší degradaci jsme však zaznamenali v 0,1 mol/l HCl, kde se v roztoku již za 5 dnů vyskytovalo méně než 50 % ze základu Gln a na konci měření klesnul obsah ve všech vzorcích téměř na 0 % (viz Graf č. 8, 9, 10).

4.2 Výsledky 2. studie :

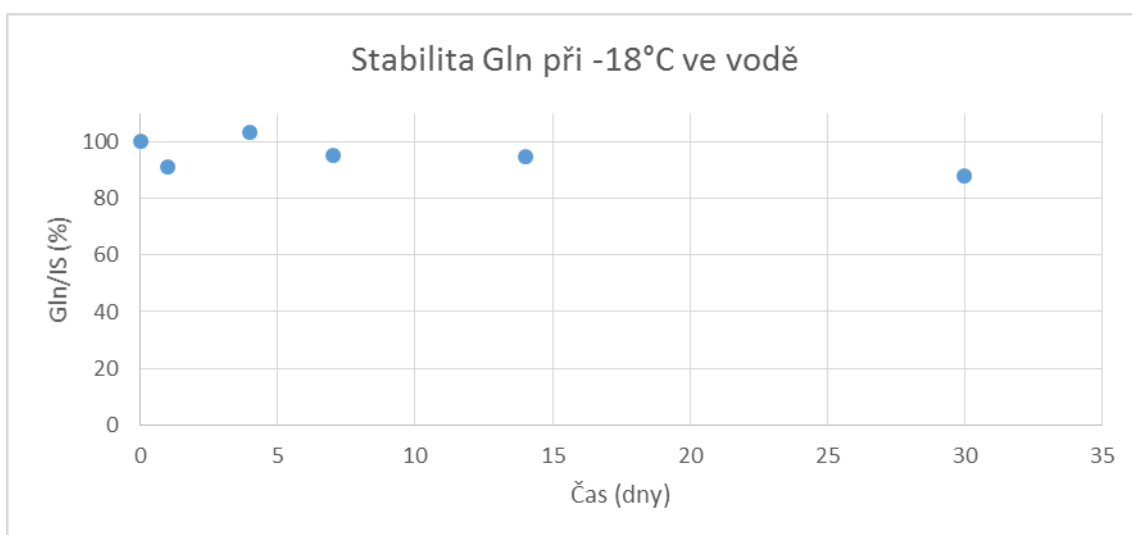
K dosažení relevantních výsledků je třeba znát stabilitu reálného vzorku. Je třeba prokázat, zdali je možné vzorek skladovat a za jakých podmínek, nebo je zapotřebí jej měřit bezprostředně po odebrání. Jako rozpouštědla v této studii jsme použili vodu, fyziologický roztok a 70 % EtOH, tyto činidla se často používají pro analýzy v metabolomice. Byl pozorován průkazný vliv teploty na degradaci Gln. Všechny vzorky skladované při teplotě 25 °C měli vždy v daném mediu nejnižší koncentraci Gln (viz Graf č. 11, 14, 17), nejedná se o převratné rozdíly ve ztrátě, ale ovlivnění teplotou je zjevné a opakující se u vzorků skladovaných ve stejných podmínkách. Nejnižší rozpad opět proběhl v H₂O, kde klesla koncentrace na 79 % (viz Graf č. 11) až 89 % (viz Graf č. 13) původního množství. Nejhorší ztráty Gln proběhly při skladování ve fyziologickém roztoku, kde na konci měření zůstalo 40 % původního množství při teplotách 6 °C a 25 °C (viz Graf č. 14, 15) respektive 54 % v teplotě -18 °C (viz Graf č. 16). V roztocích 70% EtOH proběhl také značný úbytek podobně jako ve fyziologickém roztoku. Největší rozklad proběhl v teplotě 25 °C a to na 40 % (viz Graf č. 17), při 6 °C koncentrace klesla na 45 % (viz Graf č. 18) a v -18 °C zůstala koncentrace 60 % (viz Graf č. 19) původního množství Gln. Studie dokazuje, že se zvyšující teplotou, se zvyšuje i rychlost rozkladu Gln v roztocích (viz kapitola 2.2.4).



Graf č. 11 – Degradace Gln v H₂O při 25 °C.

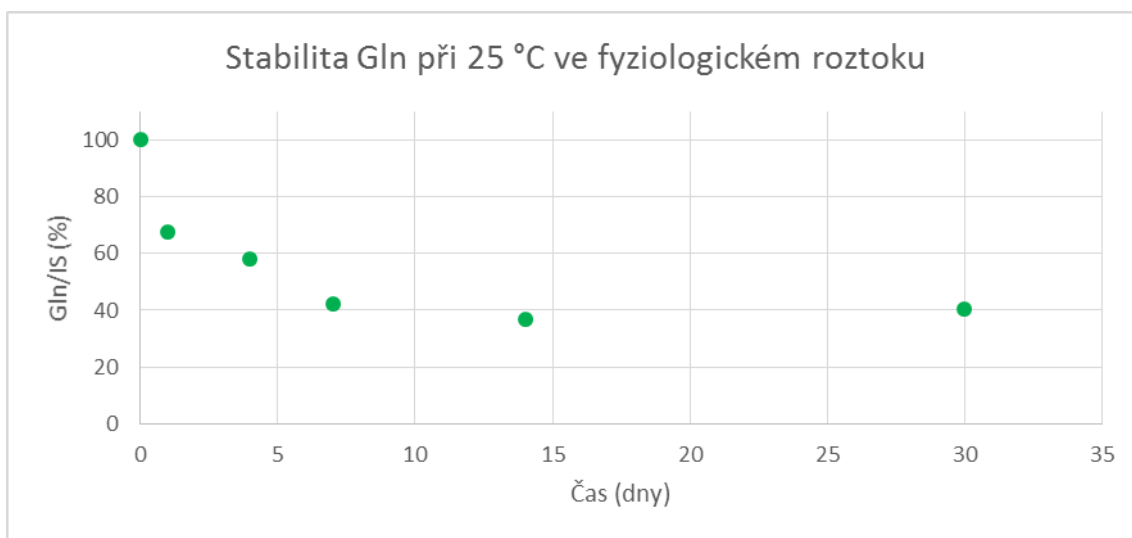


Graf č. 12 – Degradace Gln v H₂O při 6 °C.

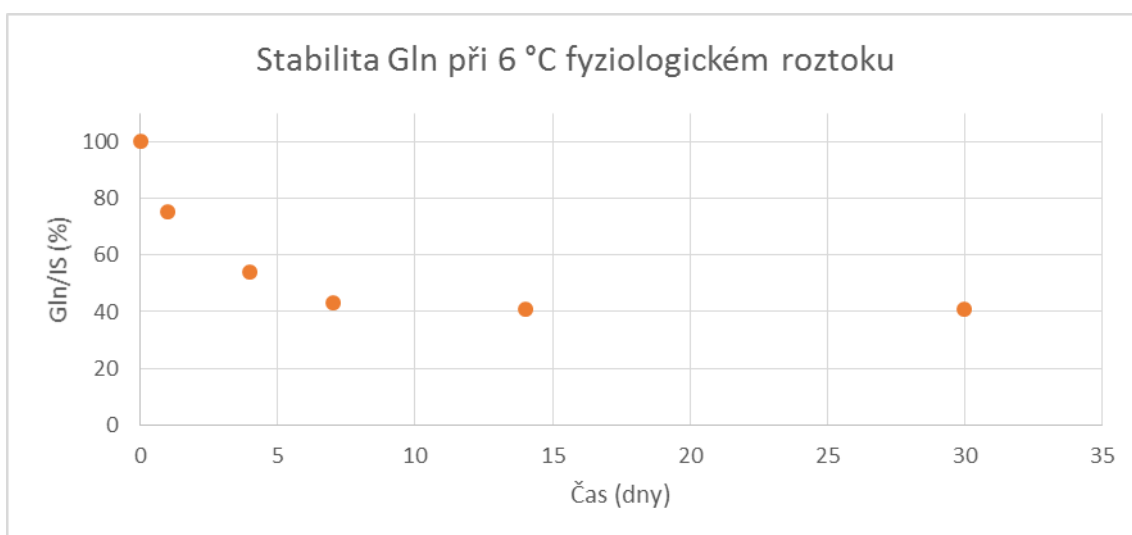


Graf č. 13 – Degradace Gln v H₂O při - 18 °C.

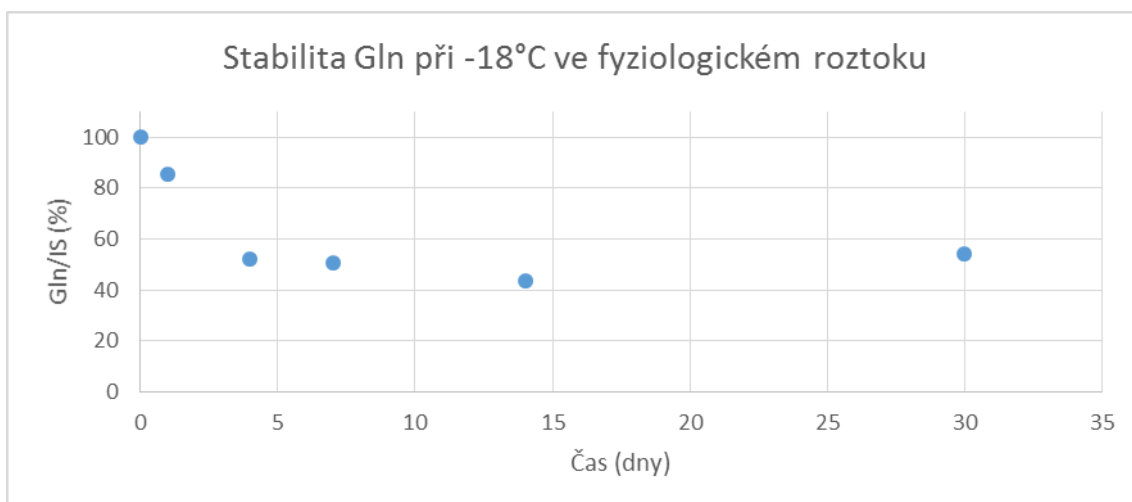
Rozdíly ve stabilitních křivkách roztoku glutaminu v deionizované vodě za různých teplot byly menší než v první sérii pokusů. Koncentrace ve všech vzorcích klesla na 79 % (25 °C) až 89 % (-18 °C) původního množství (viz Graf č. 11, 12, 13). V souladu s první sérií měření je deionizovaná voda nejvýhodnějším rozpouštědlem glutaminu z hlediska jeho stability.



Graf č. 14 – Degradace Gln ve fyziologickém roztoku při teplotě 25 °C.

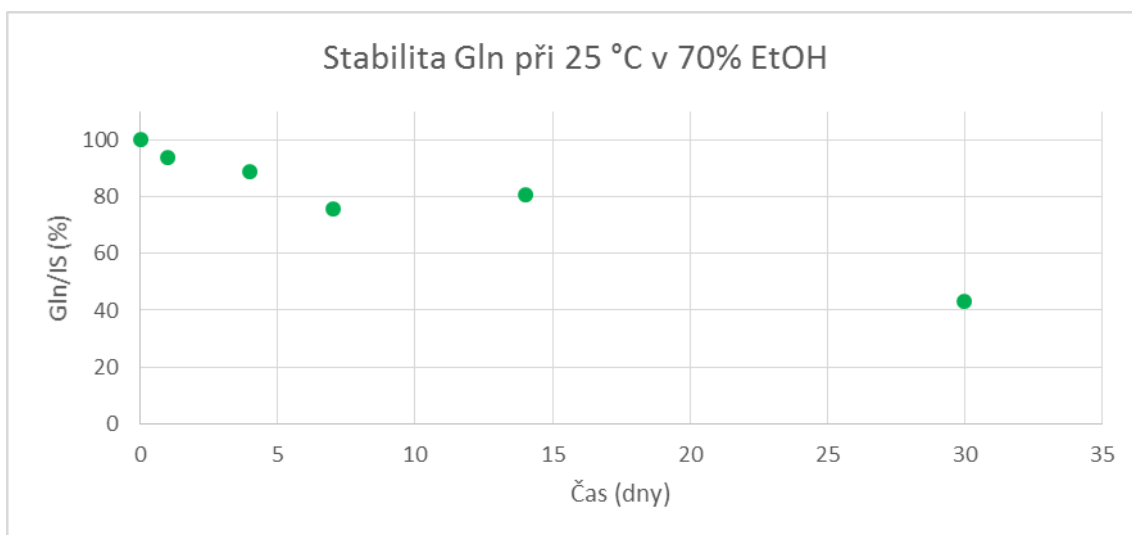


Graf č. 15 – Degradace Gln ve fyziologickém roztoku při teplotě 6 °C

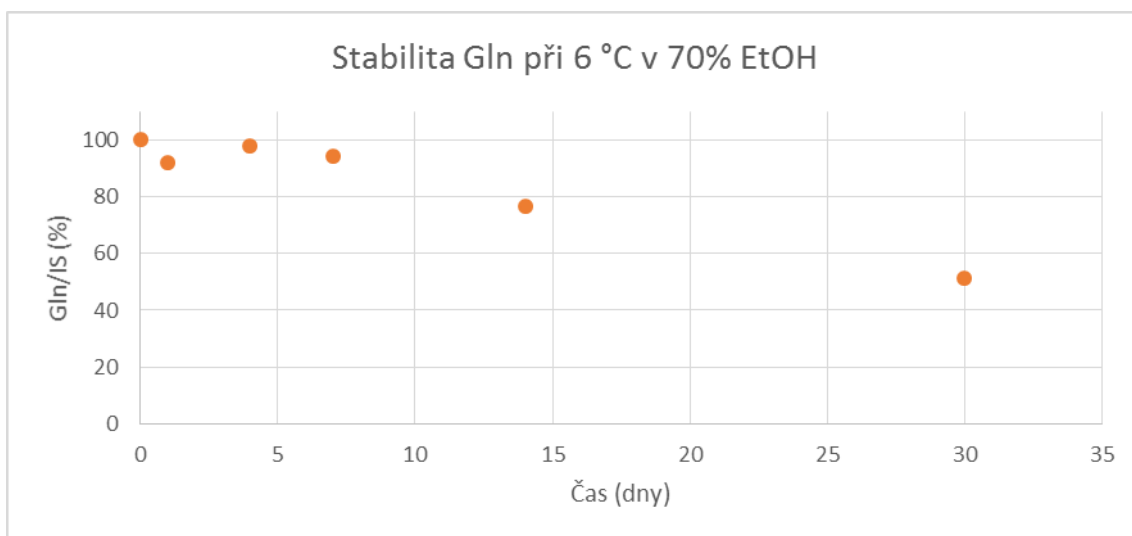


Graf č. 16 – Degradace Gln ve fyziologickém roztoku při teplotě – 18 °C.

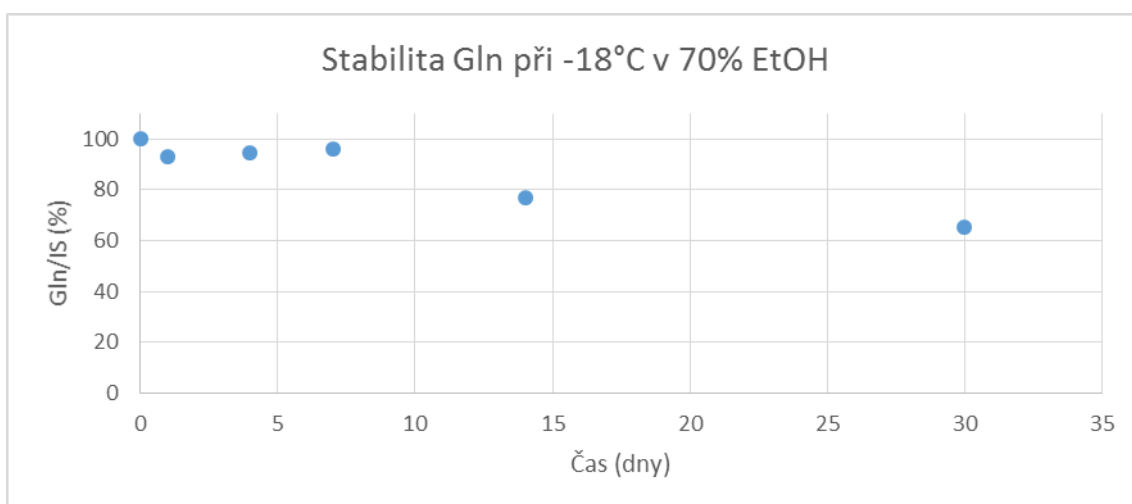
Ve fyziologickém roztoku nebyl zaznamenaný významný vliv teploty na skladování Gln. Ve všech měřeních probíhal rozklad podobně. Do 6. dne Gln degradoval na 40 % při teplotách 6 °C a 25 °C (viz Graf č. 14, 15) a na 54 % původního množství v teplotě -18 °C (viz Graf č. 16), tato koncentrace setrvala až do konce měření beze změny.



Graf č. 17 – Degradace Gln v EtOH při teplotě 25 °C.

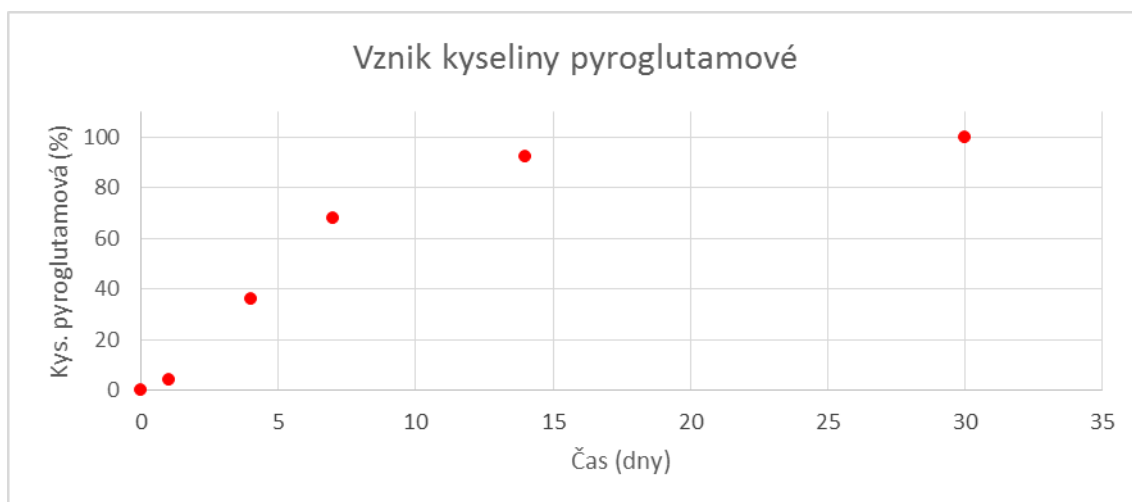


Graf č. 18 – Degradace Gln v EtOH při teplotě 6 °C.



Graf č. 19 – Degradace Gln v 70%EtOH při teplotě – 18 °C.

V roztocích 70% EtOH lze pozorovat závislost teploty na skladování. Se zvyšující se teplotou roste míra degradace. V teplotě 25 °C byl rozpad největší, koncentrace Gln klesla na 40 % (viz Graf č. 17). V 6 °C byl rozklad menší, koncentrace klesla na 45 % (viz Graf č. 18). Degradace v -18 °C byla nejmenší, konečná koncentrace Gln byla 60 % (viz Graf č. 19).



Graf č. 20 - Vznik kyseliny pyroglutamové ve fyziologickém roztoku při 25 °C.

5 DISKUZE:

Cílem mé bakalářské práce bylo najít optimální skladovací podmínky pro roztoky Gln. Nasimulovat jeho chování v reálných vzorcích, kde v sérii vytvořených závislostí zhodnotit vliv degradačních faktorů na jeho rozklad a určit vliv rozpouštědel na tvorbu degradačních produktů.

První a druhou hypotézu se mi povedlo potvrdit. Podle mé studie je jasný vliv pH a teploty na rozklad Gln. Při kyselém nebo zásaditém pH byla zaznamenána zásadně rychlejší degradace než při neutrálních pH. Ovlivnění vzorku hodnotou pH je zásadnější než ovlivnění teplotou. Při skladování vzorku ve velmi kyselém pH došlo k rapidnímu úbytku za stejný čas ve všech testovaných teplotách. Pro skladování jsou nejvhodnější teploty kolem 6°C a nižší. Při vyšších teplotách jsou jasně prokazatelné zvýšené úbytky Gln v roztocích. Jako lepší varianta byly vyhodnocené teploty okolo 6°C, které jsou méně náročné na zpracování - neustále zmrazování a rozmrazování vzorku. Úbytky při teplotách 6°C a -18°C jsou velmi podobné.

Třetí hypotéza se nepotvrdila. Zjistil jsem, že skladovací média mají velký vliv na vznik kyseliny pyroglutamové, která se nejvíce tvoří pouze při skladování ve fyziologickém roztoku, kde byl zřejmý její nárůst při každém měření. V ostatních médiích byla občasná tvorba zachycena, ale nebyla tak zásadní a narůstající.

6 ZÁVĚR:

Nepodařilo se nalézt optimální medium pro skladování Gln. Podle výsledků naší studie je nejlepší variantou voda, kvůli jejímu neutrálnímu pH. Ve vodě Gln v obou studiích jevil největší stabilitu a to i s ohledem na teplotu byly výsledky ve vodě zdaleka nejlepší. Jako nejideálnější teplota skladování byla vybrána teplota 6 °C, jelikož konečné koncentrace ve 25 °C byly nízké. Při teplotě -18 °C byl rozdíl koncentrace s teplotou 6 °C jen minimální, ale jelikož je skladování v 6 °C jednodušší, zvolili jsme ji jako vhodnější teplotu.

Glutamin v reálných vzorcích a jejich extraktech degraduje v rozdílných mírách. Největší rozpad byl pozorován ve fyziologickém roztoku, kde již 6. den bylo pouhých 40 % základu Gln, tato koncentrace však vydržela až do konce měření. Při použití 70% EtOH jako skladovacího media probíhala degradace postupně, až došla k podobným hodnotám mezi 40 % - 50 %. Největší koncentrace byla naměřena ve vzorku z deionizovanou vodou, kde ztráta činila asi jen 20 %.

K zásadnímu vzniku kyseliny pyroglutamové docházelo pouze ve fyziologickém roztoku při 25 °C (viz Graf č. 20). V 6 °C byl nárůst asi o 75% menší a -18 °C byl téměř nulový. V ostatních médiích nebyl vůbec zaznamenán.

7 ZDROJE

- 1) KODÍČEK, M.: *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004, 171 s. ISBN 80-7080-551-x.
- 2) VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, c1996, 180, 135, 191 s. ISBN 9788020006004.
- 3) MURRAY, R. K.: *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002, ix, 872 s. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- 4) KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W.: *Pathobiochemie*. Praha: Academia, 1987.
- 5) AL], authors W.C. Chan .. [et] a editor J.S. DAVIES. *Amino acids, peptides and proteins*. Cambridge: RSC Pub, 2006. ISBN 0854042474.
- 6) ŠTULÍK, K.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
- 7) NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
- 8) Dostupné z www: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_43.htm [cit. 2015-04-12].
- 9) Dostupné z www: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf [cit. 2015-07-22].
- 10) Dostupné z www: <http://www.himedialabs.com/TD/TC243.pdf> [cit. 2015-07-22].
- 11) Dostupné z www: <http://www.anl.zshk.cz/vyuka/separacni-metody.aspx> [cit. 2015-07-22].
- 12) Dostupné z www: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit. 2015-07-22].
- 13) HOLČAPEK, M., JANDERA, J.: *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. Chem. Listy 1998, 278–286 s.
- 14) GODULA, M.: *Ionizace laserem za přítomnosti matrice a atmosférického tlaku (AP - MALDI) - nový směr v analýze peptidů a proteinů*. Chem. Listy 2005, 930–936 s.
- 15) OPEKAR, F.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 201 s. ISBN 978-80-246-0553-1.

- 16) Dostupné z <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOAJALB.htm> [cit. 2015-07-22].
- 17) Dostupné z [www: http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC_MS_MS.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC_MS_MS.pdf) [cit. 2015-07-22]
- 18) Dostupné z [www: http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/978.pdf](http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/978.pdf) [cit. 2015-07-22]
- 19) KHAN, K., ELIA, M.: *Factors affecting the stability of L-glutamine in solution*. Clinical Nutrition. 1991, vol. 10, issue 4, s. 186-192. [DOI: 10.1016/0261-5614(91)90037-d].
- 20) Dostupné z [www: http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202013%20teorie.pdf](http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202013%20teorie.pdf) [cit. 2015-07-22].
- 21) Dostupné z [www: http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html](http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html) [cit. 2015-07-22].
- 22) Dostupné z [www: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_29.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_29.htm) [cit. 2015-07-22].
- 23) NORKOVÁ, R., JAKLOVÁ, J., VÁCLAV, K.: *Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrmetrickou detekcí*. Chem. Listy 2013, 949–955 s.
- 24) Dostupné z [www: http://lekarske.slovniky.cz/](http://lekarske.slovniky.cz/) [cit. 2015-07-22].
- 25) Dostupné z [www: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf) [cit. 2015-07-22].
- 26) BAXTER, J. H., JOHNS, P. W.: *Determination of Free Arginine, Glutamine, and β -alanine in Nutritional Products and Dietary Supplements*. Food Analytical Methods. 2012, 5(4): 821-827. DOI: 10.1007/s12161-011-9318-x. ISSN 1936-9751. Dostupné také z [www: http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9318-x](http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9318-x) [cit. 2015-07-22]. [online].

- 27) KHUHAWAR, M., RAJPER, A.: *Liquid Chromatographic Determination of Glutamine in Cerebrospinal Fluid Using 2-Hydroxynaphthaldehyde Derivatizing Reagent*. 2003.
- 28) GILBERT, J. B., PRICE, Y. E., GREENSTEIN, J. P.: *Effect of anions on the nonenzymatic desamination of glutamine*. *J. Biol. Chem.* 1949;180: 209-48.
- 29) SMITH, R. J.: *Glutamine metabolism and its physiologic importance*. *J Parent Ent Nutr* 1990;14:40S-448.
- 30) GREENSTEIN, J. P.: *Winitz M. Glutamic acid and glutamine*. In: *Chemistry of the amino acids*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1961:1933-4. 14.