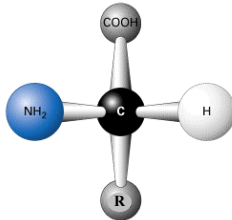


AMINOKYSELINY



Obecná struktura

STANOVENÍ AMINOKYSELINOVÉHO SLOŽENÍ BÍLKOVIN

1. IZOLACE (jen v některých případech)


2. HYDROLÝZA

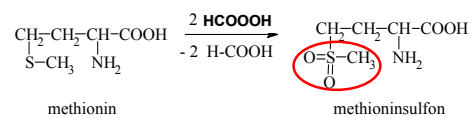
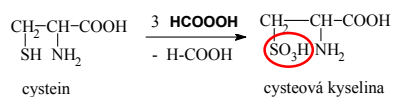
- kyselá hydrolyza pomocí HCl ($c = 5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
klasicky: 105 - 120°C, 18 - 24 h, inertní atmosféra, někdy přídavek thioglykolové kyseliny
nově: **mikrovlnný ohřev** (trvá minuty)



destrukce některých AA za podmínek hydrolyzy
- **tryptofan, sírné aminokyseliny, amidy aminokyselin**
(částečně serin, threonin)

Stanovení sírných aminokyselin

 Kyselá hydrolyza – oxidace kyselinou permravnčí (kyselá hydrolyza)



Stanovení tryptofanu

↳ po alkalické hydrolyze, nejčastěji $Ba(OH)_2$ ($c = 5 \text{ mol.dm}^{-3}$),
125 - 130 °C, 24 hodin

Stanovení asparaginu a glutaminu

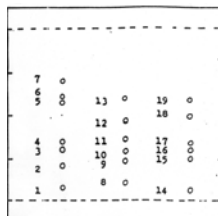
↳ enzymovou hydrolyzou

- pepsin
- trypsin
- papain
- peptidasy

SEPARACE A KVANTIFIKACE AMINOKYSELIN

- Chromatografie v plošném uspořádání
- KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE**
- Plynová chromatografie
- Elektromigrační metody

Dělení aminokyselin chromatografií na tenké vrstvě



detekce: ninhydrin
stac. fáze: silikagel
mobil. fáze: 1-butanol - octová
kyselina - voda (4:1:1)

1 = histidin,	10 = asparagová kys.,
2 = cystin,	11 = glutamová kys.,
3 = serin,	12 = valin,
4 = alanin,	13 = leucin,
5 = isoleucin,	14 = lysin,
6 = fenylalanin,	15 = hydroxyprolin,
7 = tryptofan,	16 = glycin,
8 = arginin,	17 = threonin,
9 = prolin,	18 = methionin,
	19 = tyrosin

DĚLENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ (HP)LC

Různé typy separačních mechanismů

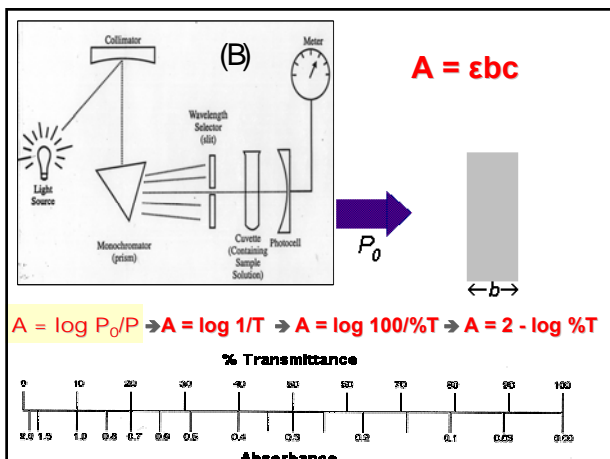
- **Chromatografie (nízkotlaká) na měničích iontů**
silně kyselé katexy - mobilní fáze: pufrů se vzrůstající hodnotou pH a iontovou silou

- nižší pH - neutrální a kyselé aminokyseliny
- vzrůst pH - bazické aminokyseliny

automatický analyzátor aminokyselin

- **Chromatografie v reverzní fázi**
často předkolonová derivatizace

- **Iontově párová chromatografie**
typicky pokolonová derivatizace - snadná automatizace, snazší manipulace se vzorkem



Otázka: jak detekovat aminokyseliny ?

- absorpce v UV - jen aromatické aminokyseliny
- fluorescence - tryptofan
- změna indexu lomu (refraktometrie) - nespecifické, málo citlivé

⇒ potřeba derivatizace

1. TVORBA DERIVÁTŮ PRO (HPLC)

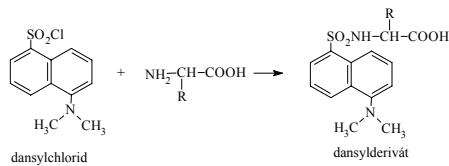
základní aspekty zvažované při volbě derivatizační metody

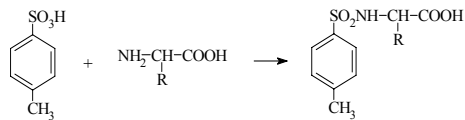
- ☐ Dobrá LC separace analytů
- ☐ Snadnost přípravy derivátu, jeho stabilita, možnost automatizace
- ☐ Citlivost a selektivita detekce

A. Derivatizace před separací - prekolonová

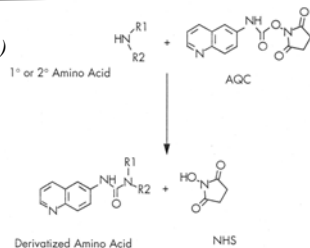
⇒ Požadována tvorba stabilních projektů

A1. fluoreskující produkty

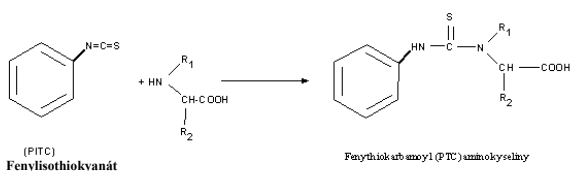
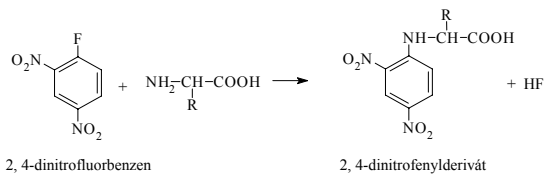




AQC (6-aminoquinolyl *N*-hydroxysuccinimidylcarbamate)
- vznikají stabilní deriváty
absorbující též v UV



A2. UV- absorbuující produkty



B. derivatizace po separaci - pokolonová

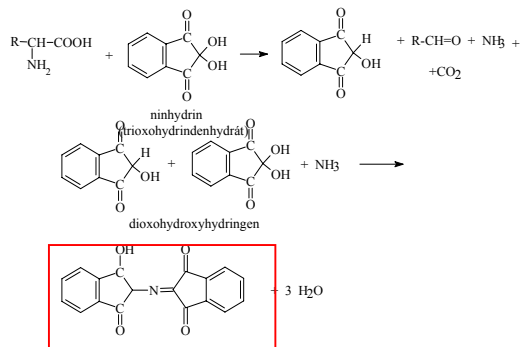
⇒ musí být velmi rychlá, stabilita derivátu není rozhodující

Nejčastější činidla:

- **OPA** (o- falddehyd), fluorescence (někdy i prekolonově)
- **ninhydrin** - produkty absorbující ve viditelné části spektra

Nejčastější činidla:

- **OPA** (o- falddehyd), fluorescence (někdy i prekolonově)
- **ninhydrin** - produkty absorbující ve viditelné části spektra



2. TVORBA DERIVÁTŮ PRO GC

požadavek: **těkavé produkty**

⇒ nutné derivatizovat obě funkční skupiny

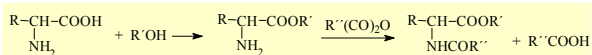
A. estery *N*-acylaminokyselin

esterifikační činidla (derivatizace COOH):

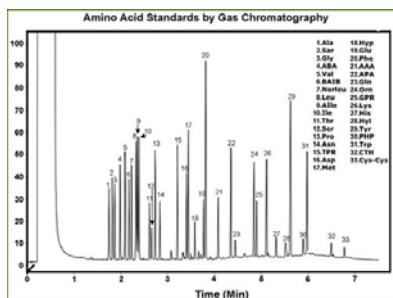
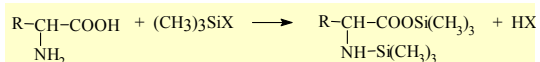
isopropanol, isobutanol, *n*-butanol, metanol, isobutanol... + 3M HCl

***N*-acylační činidla (derivatizace aminoskupiny):**

anhydridy kyselin - pentafluor- propionové, heptafluormáslé, trifluoroctové



B. Trimethylsilylestery *N*-trimethylsilyl aminokyselin

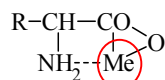


ANALÝZA AMINOKYSELIN - speciální aspekty

volné - izolace po oxyselení (*obtíže s rozpustností leucinu, cysteinu aj.*)

► Důkaz aminokyselin

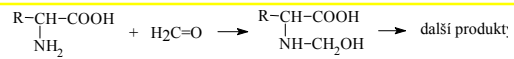
a) Reakce s kovovými ionty → barevné komplexy s Cu^{2+} , Fe^{3+} aj.



b) Reakce s ninhydrinem (Streckerova degradace aminokyselin)

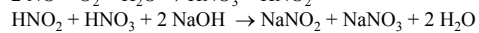
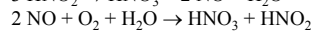
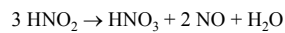
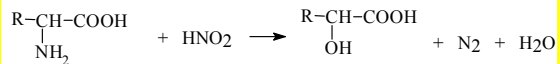
A. STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU AMINOKYSELIN

▶ Formolová titrace



▶ Titrace karboxylové skupiny alkalimetry

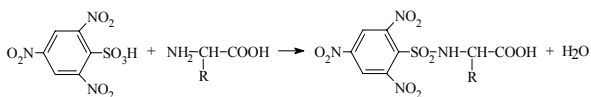
▶ Manometrická van Slykeova metoda



4. Spektrofotometrické metody

▶ Reakce s ninhydrinem - měření fialového zbarvení viz důkaz aminokyselin

▶ Reakce s 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou kyselinou

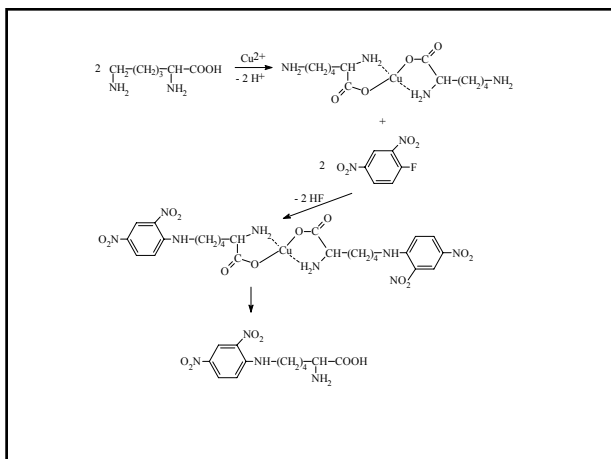


B. STANOVENÍ NĚKTERÝCH POTRAVINÁŘSKY DŮLEŽITÝCH AMINOKYSELIN

• Stanovení lysinu

CELKOVÝ OBSAH

▶ Spektrofotometrická metoda - vznik komplexu s Cu (II) a derivatizace ε-aminoskupiny 2,4-dinitrofluorbenzenem, redukce vzniklého produktu




► **Enzymová metoda**

- L-lysinkarboxylasa,
EC 4.1.1.18. (= lysindekarboxylasa)


→ měření uvolněného oxidu uhličitého či kadaverinu

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ | \qquad | \\ \text{NH}_2 \qquad \text{NH}_2 \\ \text{lysin} \end{array} & \longrightarrow & \begin{array}{c} \text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2 \\ | \qquad | \\ \text{NH}_2 \qquad \text{NH}_2 \\ \text{kadaverin} \end{array} + \text{CO}_2
 \end{array}$$

CHARAKTERIZACE ENZYMŮVÝCH METOD

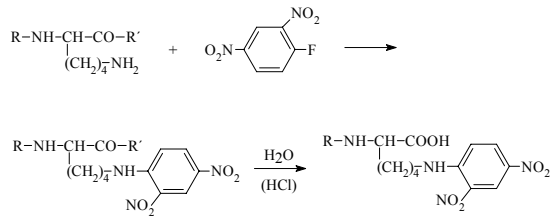
-  reakce jsou specifické ⇒ není třeba selektivně izolovat analyt ze vzorku ⇒ jednoduché provedení

*specifita enzymu - ve vztahu k typu katalyzované reakce
- pro daný substrát, který je konvertován*

-  nelze získat informaci o jednotlivých komponentách spektra sloučenin, měří se jednotlivé analyty

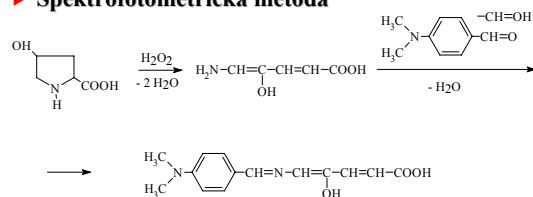
• **Využitelný lysin**

▶ **Spektrofotometrická metoda**



• **Stanovení hydroxyprolinu**

▶ **Spektrofotometrická metoda**



Využití: Stanovení obsahu kolagenu v masných výrobcích
(příliš vysoký obsah kolagenu je známkou nadměrného obsahu pojivové tkáně)

Obsah kolagenu se získá vynásobením obsahu hydroxyprolinu **faktorem 8.0**

• **Stanovení tryptofanu**

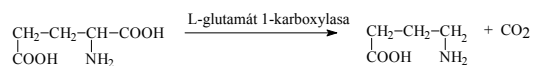
▶ **Spektrofotometrická metoda**

měření intenzity zbarvení s *N, N*-dimethylamino-benzaldehydem v přítomnosti HNO_2

• **Stanovení glutamové kyseliny**

▶ **Enzymové metody**

Varianta A



možno stanovit 4-aminomáselnou kyselinu nebo CO_2

• **Stanovení různých aminokyselin**

- Prolin (ninhydrin, HCOOH)
- Arginin (8-hydroxycholelin, HCOOH)
- Kreatin, resp. kreatinfosfát (biacetyl, 2-naftol; enzymové stanovení)
- Kreatinin (pikrová kyselina, enzymové stanovení)

ANALÝZA PEPTIDŮ

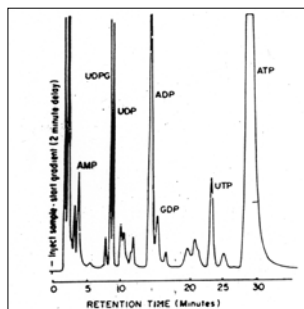
Karnosin, anserin: histidylalaninové peptidy
reakce s 2, 4-dinitrofluorbenzenem

2, 6-dioxopiperaziny (cyklické dipeptidy)
chromatografické metody

Vyšší peptidy - chromatografické metody, **LC/MS**

Další dusíkaté sloučeniny

- nukleotidy (volné nukleotidy, nukleosidy, báze nukleových kyselin)
- aminy, biogenní aminy
- dusitany, dusičnany



Stanovení nukleotidů v hovězích játrech (HPLC/UV, ionex)
