

## **OPTIMALIZACE SEPARACE AMINOKYSELIN OBSAŽENÝCH V MEDOVINÁCH A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PROLINU S VYUŽITÍM KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE**

Jitka Klikarová, Jana Šebková, Lenka Česlová a Jan Fischer

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,  
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

### **Abstract**

This work was focused on optimization of SPE extraction of proline and other amino acids in mead and their following derivatization by dansyl-chloride (DNS-Cl) agent. Further, the attention is paid on optimization of chromatographic separation of amino acids derivatives and quantitative determination of proline in mead using reversed-phase liquid chromatography with octadecylsilicagel stationary phase. The mobile phase was formed by mixture of acetonitrile and water with addition of triethylamine and formic acid. Fluorescence detector was employed for detection of DNS derivatives of amino acids.

### **Souhrn**

Tato práce byla zaměřena na optimalizaci SPE extrakce prolinu a dalších aminokyselin z medoviny a jejich následnou derivatizaci pomocí dansylchloridu (DNS-Cl). Dále je pozornost zaměřena na optimalizaci separace derivátů aminokyselin a na kvantitativní stanovení prolinu v medovinách pomocí kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi s chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou stacionární fází. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody s přísadkou triethylaminu a kyseliny mravenčí. Pro detekci DNS derivátů aminokyselin byl použit fluorescenční detektor.

## **1. Úvod**

Medovina je jeden z nejstarších alkoholických nápojů na světě, jejíž moderní výrobní postup zahrnuje několik kroků. Nejprve se včelí med naředí pitnou vodou v určitém poměru a přidají se živiny pro správný růst kvasinek. Následně se vzniklý medový roztok pasteruje a po ochlazení se zaočkovává čistou, často šlechtěnou kvasinkovou kulturou, která během samotné fermentace přeměňuje přirozeně se vyskytující cukry v medu (zejména glukózu a fruktózu) na oxid uhličitý a ethanol. Po bouřlivém kvašení následuje dokvašování, finální úpravy a zrání medoviny po dobu i několik let [1–4].

Med je komplexní potravinou obsahující více než 180 druhů látek, které se samozřejmě mohou dostávat během výroby i do medoviny [1]. V medu, respektive i v medovinách,

nalezneme velké množství volných aminokyselin, jejichž stanovení hraje klíčovou roli v posuzování kvality či autentičnosti potravin a nápojů [2,5]. Naše pozornost byla věnována především prolinu, jehož obsah je v medu oproti ostatním aminokyselinám naprosto dominantní. Přímá analýza prolinu je však poměrně složitá, jelikož je netěkavý a v jeho struktuře navíc abscentuje chromofor či fluorofor. Před vlastní separací se proto obvykle zařazuje derivatizační krok, a to za pomoci různých komerčně dostupných činidel [5–8].

## 2. Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Standardy aminokyselin (AMK) o čistotě  $\geq 98\%$  ( $\beta$ -alanin,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA), glycin, L-alanin, L-arginin hydrochlorid, L-asparagin, L-asparagová kyselina, L-cystein hydrochlorid, L-fenylalanin, L-glutamin, L-glutamová kyselina, L-histidin hydrochlorid, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin hydrochlorid, L-methionin, L-prolin, L-serin, L-threonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Pro správný průběh derivatizace byl kromě činidla dansylchloridu (DNS-Cl) (TCI Toshima, Tokyo, Japonsko) používán také uhličitán litný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), hydroxid sodný p.a. (Penta, Praha, ČR) a uhličitán sodný p.a. (Lachema, Brno, ČR). Vzorke medovin, případně standardy aminokyselin se před SPE extrakcí upravovaly 35% kyselinou chlorovodíkovou (Lach-Ner, Neratovice, ČR). Pro přípravu mobilních fází byl použit acetonitril a methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), dále triethylamin, kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR) a kyselina mravenčí (Penta, Praha, ČR). Deionizovaná voda byla upravená přes čisticí zařízení Mili-Q (Merck, Darmstadt, Německo).

### 2.2 Přístroje a zařízení

Všechny separace připravených derivátů byly realizovány za použití kapalinového chromatografu složeného z degaseru DGU-20 A<sub>5</sub>, dvou vysokotlakých čerpadel LC-30AD, fluorescenčního detektoru RF-20A XS Prominence (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s dávkovacím systémem s vnější dávkovací smyčkou 2  $\mu$ l (Valco-Vici, Schenkon, Švýcarsko) a termostatem kolon LCO 102 (Ecom, Praha, ČR). Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 o rozměrech 150 mm x 3 mm, plněné povrchově porézními částicemi o velikosti 2,7  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, USA). K chromatografu byl připojen počítač s vyhodnocovacím programem Clarity. Deriváty aminokyselin byly zahřívány na topném tělese. Vzorke medovin byly extrahovány na zařízení pro SPE extrakci (Labicom, Olomouc, ČR) s vakuovou jednotkou Labobase SBC 860 (KnF, Stockholm, Švédsko) a regulátorem vakua CVC 3000

(Vacubrand, Wertheim, Německo). Bylo porovnááno hned několik SPE kolonek (a) Supelco LC-SCX, 1 ml, 100 mg (Supelco, Bellefonte, USA), (b) Strata SCX, 3 ml, 500 mg, (c) Strata X-C, 6 ml, 500 mg, (d) Strata Screen-C, 6 ml, 500 mg, (e) Strata DSX-SCX, 6 ml, 500 mg (vše Phenomenex, Torrance, USA).

### 2.3 Analyzované vzorky medovin

K analýze bylo použito 24 medovin (tabulka 1). Vzorky byly uskladněny v lednici a před analýzou vytemperovány na laboratorní teplotu.

**Tabulka 1:** Seznam vzorků medovin

číslo	název	výrobce/včelař
1	Tradiční medovina z Kunětických stránek	E. Báčor, Pardubice
2	Medové Velkomoravské	Naturel s. r. o. s Ing. Sznapkou, Třebechovice p. Orebem
3	Přibyslavská medovina, lípa	M. Zelený, Nové Město n. Metují
4	Včelovina	Včelco s. r. o., Smolenice SK
5	Medovina	p. Pleva
6	Medovina	p. Lstibůrek, Domažlice
7	Tmavá staroslovanská medovina z lesního medu	Ing. Petr Krupáč-APIMED, Slovensko
8	Přibyslavská medovina, javorová jarní	M. Zelený, Apifarm, Nové Město n. Metují
9	Křivoklátská medovina	J. Halada, Česká včela s. r. o.
10	Hromčíkova hořká medovina ELISA	D. Hromčík, Nivnice
11	Staročeská medovina	Včelařství Sláma, Havlíčkův Brod
12	Přibyslavská medovina, medovicová	M. Zelený, Nové Město n. Metují
13	Přibyslavská medovina, slunečnicová	M. Zelený, Nové Město n. Metují
14	Medovina z Vysočiny	Včelařství Sláma, Havlíčkův Brod
15	Staroslovanská medovina	Včela PRO, p. Löffelmann
16	Domácí jemná medovina	vinařství UHER Josef
17	Keltská medovina	Sznapka, Hlučín
18	Medové víno z Českého lesa, rybízové	p. Lstibůrek, Domažlice
19	Medovina (z plastu)	Ing. Petr Krupáč-APIMED, Slovensko
20	Originální medovina z kunětických stránek	E. Báčor, Pardubice
21	BIO medovina	Včelařství Sláma, Havlíčkův Brod
22	Medvědí objetí	Medovinka s.r.o., Hlinsko
23	Medové víno archivní	p. Lstibůrek, Domažlice
24	Medvědí objetí	Medovinka s.r.o., Hlinsko

## 2.4 Kvantitativní stanovení prolinu v medovinách

Kvantitativní stanovení prolinu v medovinách bylo provedeno metodou kalibrační přímky. Standardní roztok prolinu byl připraven navážením 29,8 mg L-prolinu do 25 ml odměrné baňky a jejím doplněním destilovanou vodou po rysku ( $c = 1,192 \text{ g/l}$ ). Účinnost extrakce na jednotlivých SPE kolonkách byla zjištěna pomocí tří modelových roztoků prolinu, jež byly připraveny odměřením 2, 3 a 4 ml z již zmiňovaného standardního roztoku prolinu a doplněním v odměrné baňce destilovanou vodou na objem 10 ml.

### Obecný postup extrakce:

Kationtová SPE kolonka byla aktivována 6 ml methanolu a 6 ml okyselené destilované vody o pH 3,0 (HCl). Poté byla provedena aplikace 10 ml připraveného standardního roztoku prolinu (1 kapka/s), v případě extrakce vzorků bylo aplikováno 20 ml vzorku medoviny okyselené na pH 1,9 (1 kapka/s). Následně byla kolonka promyta 1 ml (pro standard prolinu) a 5 ml (pro vzorek medoviny) okyselené destilované vody o pH 3,0 (HCl). K eluci byly použity vždy 2 ml 1 M NaOH (1 kapka/s).

### Postup derivatizace standardů kalibrační řady a vzorků medovin:

Z připraveného standardního roztoku prolinu ( $1,192 \text{ g/l}$ ) byla připravena kalibrační řada o koncentracích od 108,2 mg/l do 238,0 mg/l. K jednotlivým roztokům kalibrační řady bylo přidáno 5 mg pevného uhličitanu litného a 1 ml 0,01M DNS-Cl rozpuštěného v acetonitrilu. K derivatizaci vzorku medoviny bylo použito 0,5 ml extraktu medoviny, 5 mg pevného uhličitanu litného a 1,5 ml 0,01M DNS-Cl v acetonitrilu. Množství použitých roztoků bylo v obou případech předem důkladně optimalizováno. Derivatizace probíhala vždy při 40 °C na vodní lázni po dobu 20 minut bez přístupu světla. Po 30 minutách ustavování rovnováhy při laboratorní teplotě byl roztok zfiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  stříkačkový PTFE filtr a připraven k nástříku.

### Podmínky chromatografická separace:

2  $\mu\text{l}$  připraveného dansyl derivátu byly nadávkovány do kapalinového chromatografu a separovány na koloně Ascentis Express C18 (150 mm x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ). Organickou složkou mobilní fáze (B) byl 100% acetonitril a druhou složkou (A) byla voda s přídavkem 0,1 % triethylaminu okyselená na pH 3,0 (HCOOH). Bylo využito gradientové eluce s následujícím gradientem: 0 min – 30 % B, 7 min – 45 % B, 8 min – 100 % B, 9 min – 30 % B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml/min a vlnové délky fluorescenčního

detektoru měly hodnoty  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ . Každý roztok kalibrační řady i vzorek medoviny byl proměřen nejméně třikrát.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Optimalizace podmínek pro SPE extrakci

Pro odstranění nežádoucího vlivu matrice byla provedena izolace aminokyselin extrakcí na tuhou fázi. Při extrakci se vycházelo z postupu uvedeného v disertační práci Ing. Soni Řezkové, Ph.D. [9]. Výtěžnost extrakce prolinu na různých SPE kolonkách byla stanovena porovnáním ploch píků prolinu pro derivatizovaný standard bez extrakce a s jeho extrakcí. Proměřené byly tři vybrané koncentrace prolinu, každý derivát byl proměřen třikrát (tzn.  $n = 9$ ). Na základě porovnání výtěžností uvedených v tabulce 2 byla pro další experimenty zvolena kolonka Strata SCX (3 ml, 500 mg).

**Tabulka 2:** Výtěžnosti extrakcí s uvedenou směrodatnou odchylkou

kolonka	výtěžnost (%) $\pm$ RSD
Supelco LC-SCX	0
Strata X-C	67,25 $\pm$ 2,55
Strata Screen-C	31,5 $\pm$ 1,65
Strata DSC-SCX	60,72 $\pm$ 2,35
Strata SCX	84,26 $\pm$ 4,89

K extrakci bylo nejprve použito různé množství medoviny (10 – 20 ml), avšak bylo zjištěno, že optimální odezva detektoru je při množství 20 ml.

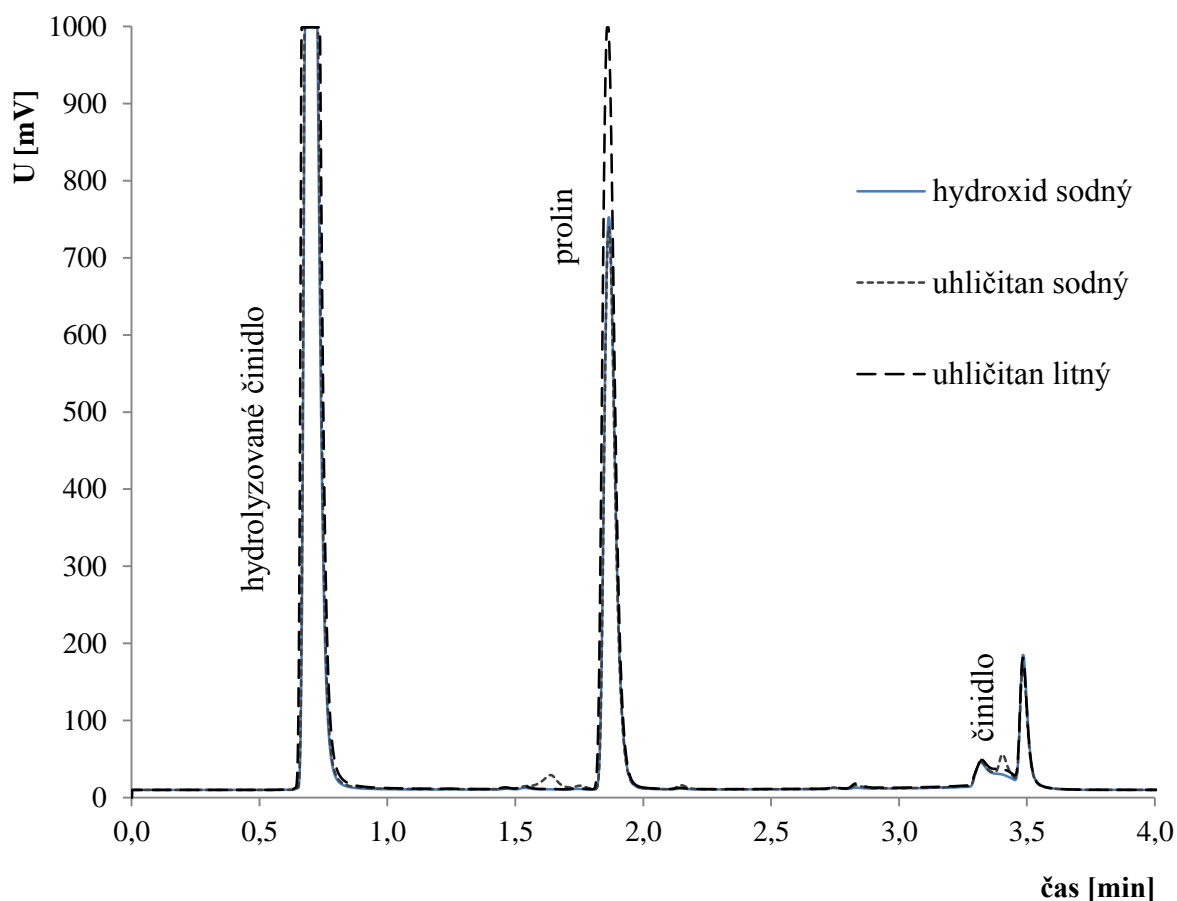
Dále byla provedena i optimalizace množství 1M hydroxidu sodného potřebného k vymytí aminokyselin z SPE kolonky, kdy byly odebírány a zároveň i proměřovány jednotlivé frakce eluátu. Jelikož byla naprostá většina aminokyselin eluována v prvních dvou mililitrech (v dalších podílech bylo množství aminokyselin téměř nulové), byly dále k eluci používány vždy 2 ml 1M NaOH.

Pro zajištění správného průběhu extrakce a získání co největšího výtěžku aminokyselin musel být standard i vzorek medoviny před kationtovou SPE extrakcí protonován kyselinou chlorovodíkovou. Byly vyzkoušeny různé hodnoty pH (1,6 – 3,0). Nejlepší adsorpce aminokyselin na kolonku probíhala při pH 1,9 a na tuto hodnotu byly následně upraveny všechny aplikované roztoky.

### 3.2 Optimalizace podmínek derivatizace

Prvotní podmínky derivatizace i separace vycházely opět z informací získaných v disertační práci Řezkové [9]. Byla optimalizována hodnota pH vhodná pro derivatizaci a dále množství jednotlivých komponent (derivatizačního činidla, vzorku/standardu, činidla na úpravu pH).

Derivatizace dansylchloridem probíhá zásadně v mírně alkalickém prostředí (okolo pH 9,5). V uvedené disertační práci byl pro získání vhodného derivatizačního prostředí použit uhličitan litný. V naší studii byla tedy ověřována nutnost použití právě tohoto ve vodě nerozpustného činidla, kdy místo něj byl také použit hydroxid a uhličitan sodný. S přidavkem uhličitanu litného byla však odezva detektoru nejvyšší (obrázek 1). Pravděpodobně tedy slouží nejen na úpravu pH, ale i ke katalýze derivatizační reakce, a proto byl zachován doporučený postup.



**Obrázek 1:** Vliv různých pomocných činidel na výtěžek derivatizace; kolona: Ascentis Express C18 (150 mm x 3 mm x 2,7  $\mu$ m), MF A: voda + 1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0,1 % TEA, MF B: 100% ACN, gradientová eluce: 0 min – 40 % B, 2 min – 50 % B, 4 min – 100 %, teplota: 25  $^\circ\text{C}$ , průtok: 0,8 ml/min, detekce:  $\lambda_{\text{ex}} = 270$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500$  nm.

Přestože je derivatizační činidlo připraveno jeho rozpuštěním v organickém rozpouštědle, dochází po přidavku standardu prolinu nebo eluátu z SPE kolonky (oba to jsou vodné roztoky) k jeho silné hydrolýze. Tento jev je jasně patrný i na výše uvedeném obrázku 1. Abychom předešli masivní hydrolýze činidla, muselo být množství a koncentrace přidávaných vodných roztoků také důkladně optimalizováno. 500  $\mu$ l standardu prolinu o koncentraci 1,192 g/l bylo derivatizováno pomocí 0,5 – 2 ml 0,01M dansylchloridu. Nejvhodnějším objemem byl 1 ml, který byl ve všech dalších případech aplikován.

### 3.3 Optimalizace separačních podmínek:

Pro správné zvolení vlnových délek fluorescenčního detektoru byly připravené dansyl deriváty všech aminokyselin proměřeny na spektrofotometru Fuorat-02-Panorama. Dle získaných maxim excitačních a emisních spekter derivátů (tabulka 3) byly na detektoru nastaveny hodnoty  $\lambda_{ex} = 270$  nm a  $\lambda_{em} = 500$  nm. Z důvodu návaznosti na tuto studii byly fluorescenční parametry získány nejen pro prolin, ale pro všechny aminokyseliny.

**Tabulka 3:** Excitační a emisní vlnové délky maxim aminokyselin

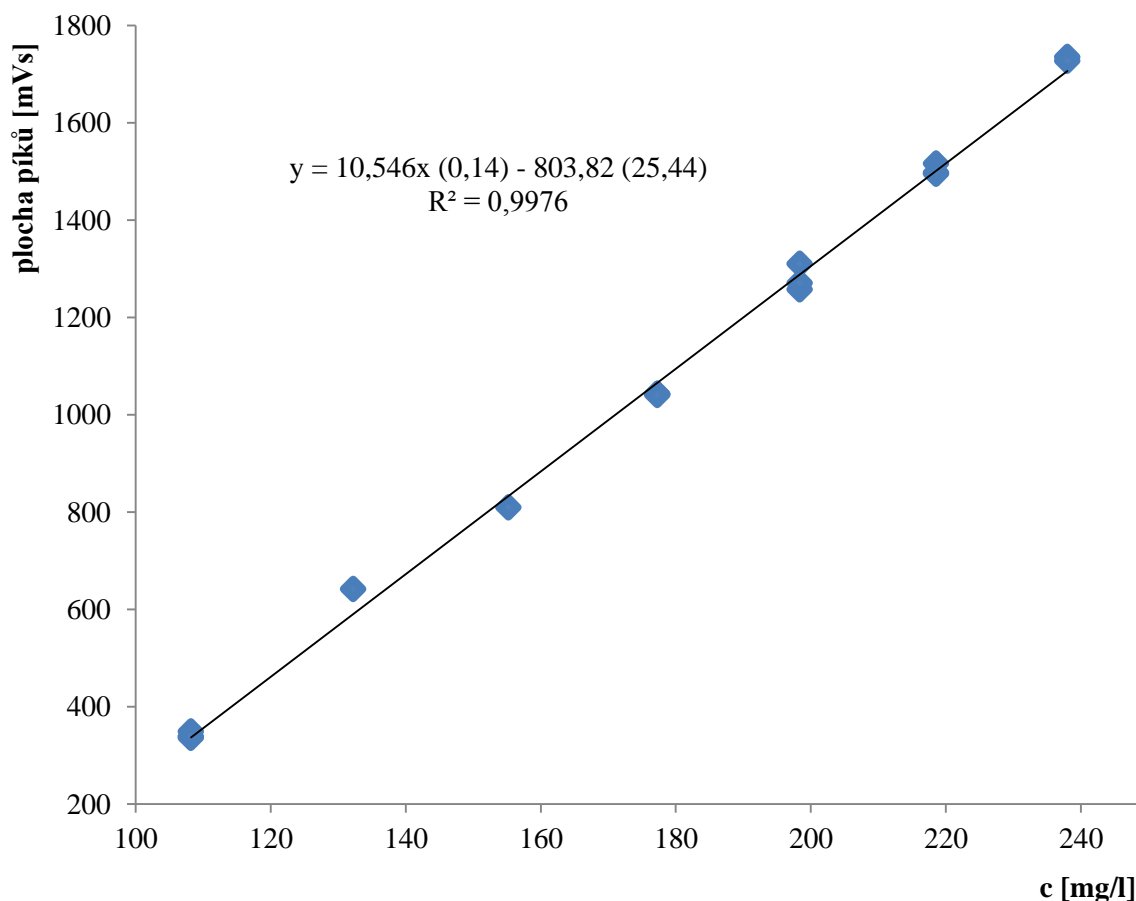
AMK	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	AMK	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
$\beta$ -alanin	274	500	L-histidin	303	500
GABA	276	500	L-isooleucin	260, 309, 325	497
L-alanin	267	503	L-leucin	308	502
L-arginin	272	498	L-lysin	267	497
L-asp. kys.	340	494	L-methionin	308, 325	494
L-asparagin	268, 339	497	L-prolin	264, 328	497
L-cystein	285, 356	497	L-serin	265, 330	500
L-fenylalanin	263, 329	498	L-valin	270, 345	496
L-glutamin	285, 358	498	L-threonin	310	497
L-glut. kys.	286, 356	495	L-tryptofan	310, 326	498
L-glycin	285, 358	498	L-tyrosin	275, 330	500

Dále bylo optimalizováno pH vodné mobilní fáze (pH 2,5 – 3,5), nutnost přidavku triethylaminu do vodné mobilní fáze a výběr organické složky mobilní fáze (methanol, acetonitril, případně jejich směs). Bylo zjištěno, že pH významně ovlivňuje separaci, avšak pro kvantitativní stanovení pouze prolinu postačí mírné okyselení na pH 3,5. Vliv přidavku triethylaminu do vodné mobilní fáze byl studován na směsi derivatizovaných aminokyselin. Z příslušných záznamů bylo patrné, že triethylamin mění nejen selektivitu separovaných

látek, ale také vzhled výsledných píků. Vzhledem k tomu, že píky jsou v přítomnosti triethylaminu užší, nedochází k tak velké difuzi a účinnost separace je vyšší, byl v nízké koncentraci dále do mobilní fáze přidáván. Co se týče organické mobilní fáze, bylo zjištěno, že methanol je v tomto případě naprosto nevhodným rozpouštědlem, jelikož během separace dochází ke chvostování a rozmývání píků. Pro další separace byl proto zvolen 100% acetonitril.

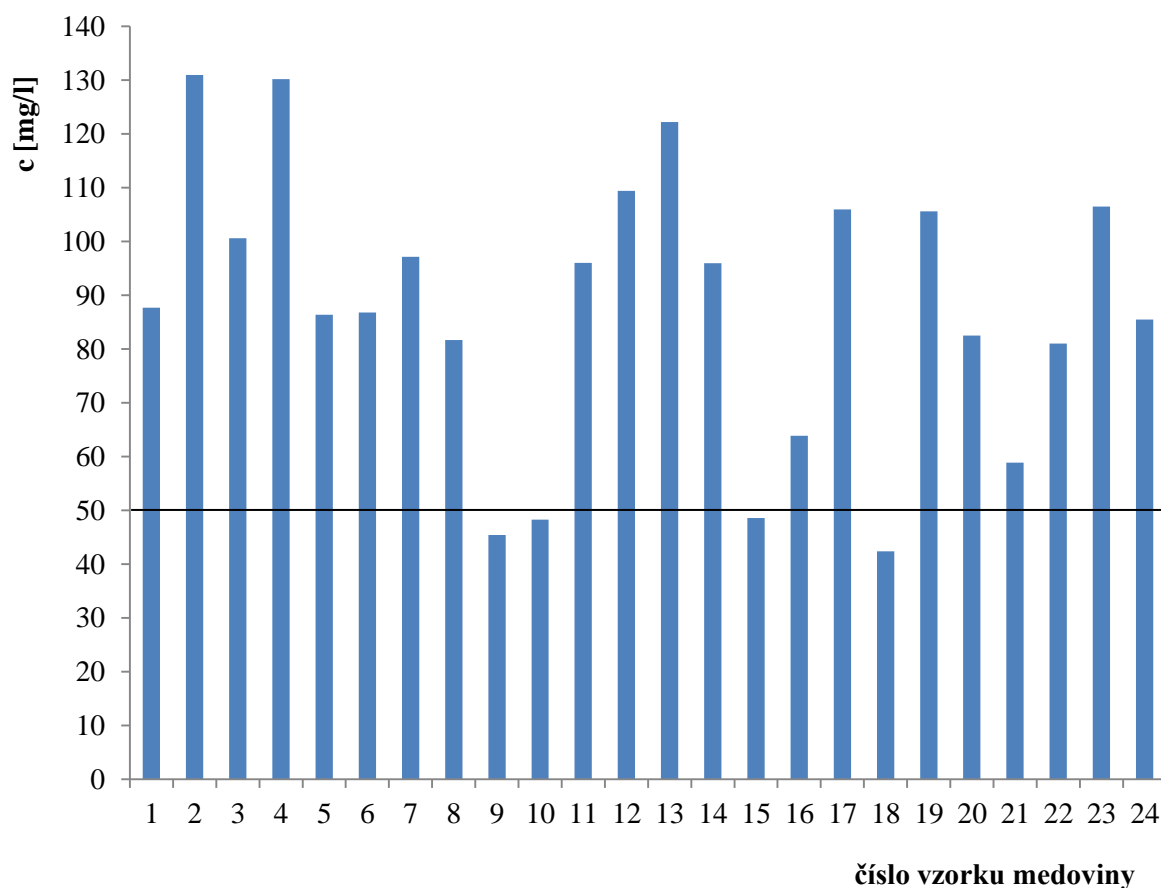
### 3.4 Kvantitativní stanovení prolinu

Obsah prolinu byl v medovinách stanoven za optimalizovaných podmínek metodou kalibrační přímky. Kalibrační křivka byla připravena pracovním postupem uvedeným v kapitole 2.4. Pomocí statistického programu QC Expert 2.9 (Trilobite, ČR) byly grafickými testy odhaleny a odstraněny vlivné body a výsledné parametry kalibrační přímky jsou spolu se směrodatnými odchylkami a koeficienty determinace uvedeny na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Kalibrační přímka pro stanovení obsahu prolinu v medovinách





**Obrázek 3:** Obsah prolinu v jednotlivých vzorcích medovin

Obsah prolinu pro jednotlivé vzorky medovin byl tedy vypočten z rovnice kalibrační přímky uvedené na obrázku 2 a výsledné hodnoty jsou zobrazeny na obrázku 3.

Obsah prolinu v medu by měl být minimálně 180 mg/kg medu. Vzhledem k tomu, že na výrobu medoviny se musí použít minimálně 280 kg medu na 100 litrů medoviny (Vyhláška č. 335/1997) nemělo by množství prolinu klesnout pod 50 mg/l medoviny. U většiny studovaných vzorků byl obsah prolinu v nadlimitním množství, avšak vzorky č. 9, 10, 15 a 18 se pohybují těsně u této hranice či pod ní. Minimálně u dvou vzorků (č. 9 a 18) došlo jasně k porušení vyhlášky o minimálním množství medu potřebného pro výrobu medoviny a je tedy podezření na falšování produktu. Další dva vzorky (č. 10 a 15) jsou dalšími kandidáty pro podrobnější prozkoumání, zda pro výrobu medoviny nebyla použita i jiná surovina, než med.

#### 4. Závěr

Tato práce se zabývala optimalizací kvantitativního stanovení prolinu v medovinách s využitím kapalinové chromatografie. Zkoumané vzorky medovin byly zakoupeny od domácích výrobců a v komerčních obchodech.

Prolin byl ze vzorků medovin nejprve extrahován na kolonce Strata SCX za účelem zakoncentrování, přečištění a odstranění matrice a poté derivatizován dansylchloridem. Vzniklý derivát byl separován na koloně Ascentis Express C18 pomocí směsi vody (pH 3,0 (HCOOH) + 0,1 % TEA) a acetonitrilu jako mobilních fází a detekován fluorescenčním detektorem s nastavenými vlnovými délkami na hodnoty  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ .

Obsah prolinu ve studovaných vzorcích medovin se pohyboval v rozmezí od 42,4 do 131,0 mg/l. Množství prolinu u vzorků č. 9, 10, 15 a 18 nespĺňuje vyhláškou dané požadavky na minimální obsah prolinu v medovinách a lze tedy usuzovat, že výrobce se neřídil předepsaným technologickým postupem.

#### Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Studentské grantové soutěže Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, projekt č. SGS\_2017\_001.

#### Literatura

1. Iglesias A., Pascoal A., Choupina A. B., Carvalho C. A., Feás X., Estevinho L. M.: *Molecules* **19** (2014) 12577–12590.
2. Mohammed Ali H. S., Patzold R., Bruckner H.: *Amino Acids* **38** (2010) 951–958.
3. Báchor E., Duchová J., Havrda J., Marhan J., Vojtěch J., Poskočil S., Vlach J.: *Sto let včelařství na Pardubicku*. Český svaz včelařů, Pardubice, 2008.
4. Cibulka, J.: *Domácí vína, piva, likéry a medoviny*. GEN, Liberec, 2003.
5. Oldekop M.-L., Herodes K., Rebane R.: *Journal of Chromatography B* **967** (2014) 147–155.
6. Boonchiangma S., Ratchakrut P., Chanthai S., Srijaranai S.: *Chromatographia* **78** (2015) 923–927.
7. Casella G. I., Contursi M.: *Analytica Chimica Acta* **478** (2003) 179–189.
8. Guo M., Shi T., Duan Y., Zhu J., Li J., Cao Y.: *Journal of Food Composition and Analysis* **42** (2005) 84–90.
9. Řezková, S.: *Dizertační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice, 2007.