

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

LUKAS TAUJENIS

BALTYMŲ AMINORŪGŠČIŲ IDENTIFIKAVIMAS IR
STEREOSELEKTYVUS NUSTATYMAS TRĄŠOSE HIDROFILINĖS
SĄVEIKOS IR CHIRALINĖS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS –
TANDEMINĖS MASIŲ SPEKTROMETRIJOS METODAIS

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2016 metai

Disertacija rengta 2011-2015 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Chemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. dr. Stasys Tautkus (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Nariai:

doc. dr. Algirdas Brukštus (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija - 03P);

dr. Sigita Jurkonienė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

dr. Germanas Peleckis (Australijos Volongongo universiteto Superlaidžių ir elektronikos medžiagų institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P);

doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. birželio 17 d. 14 val. Vilniaus universiteto Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko 24, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. gegužės mėn. 17 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, FTMC Chemijos instituto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

LUKAS TAUJENIS

IDENTIFICATION AND ENANTIOSELECTIVE DETERMINATION
OF PROTEIN AMINO ACIDS IN FERTILIZERS BY HYDROPHILIC
INTERACTION AND CHIRAL CHROMATOGRAPHY COUPLED
TO TANDEM MASS SPECTROMETRY

Summary of doctoral dissertation,

Physical sciences, chemistry (03 P)

Vilnius, 2016

The research was carried out at Vilnius University in the period of 2011 - 2015.

Scientific supervisor:

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P).

Evaluation board:

Chairman – prof. dr. Stasys Tautkus (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P).

Members:

doc. dr. Algirdas Brukštus (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P);

dr. Sigita Jurkonienė (Nature Research Centre, biomedical sciences, biology – 01B);

dr. Germanas Peleckis (Australian Institute of Superconducting and Electronic Materials, Wollongong University, physical sciences, chemistry – 03P);

doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P).

The official discussion will be held on 2 p.m. 17th June 2016 at the public meeting of the Evaluation board at the auditorium of Inorganic Chemistry of the Faculty of Chemistry of Vilnius University.

Address: Naugarduko 24, Vilnius, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation was mailed on the 17 of May 2016.

The dissertation is available at the library of Vilnius University, library of Institute of Chemistry CPST and in VU website: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

ĮVADAS

Nepaliaujamai didėjant žmonių skaičiui ir sparčiai besivystant trečiųjų Pasaulio šalių gyvenimo lygiui, maisto poreikis vis auga. Siekiant efektyvesnės žemės ūkio pramonės buvo plačiai vystoma sintetinių/neorganinių trąšų gamyba. Nors dirvos sotinimas azotu ar fosforu klasikiniiais metodais yra greitas ir efektyvus, tačiau sintetinių trąšų naudojimas daro didelį neigiamą poveikį aplinkai bei gali sumenkinti produktų kokybę. Šiuolaikinėmis žemės ūkio technologijomis siekiama sintetinius trąšų preparatus pakeisti aplinkai draugiškais produktais, išlaikant derliaus efektyvumą. Vienas iš būtų augalams įsisavinti azotą yra natūralios aminorūgštys. Hidrolizuotų baltymų pagrindu kuriamos šiuolaikinės trąšos ir dirvos papildai yra natūralūs ir ekologiški azoto šaltiniai. Svarbu paminėti, kad augalai efektyviai įsisavina tik L-aminorūgštis, tuo tarpu D-aminorūgščių enantiomerai yra neįsisavinami arba, kai kuriais atvejais, gali būti net toksiški. Baltymų šarminės hidrolizės, gaminant trąšas, gali sąlygoti L-aminorūgščių racemizaciją, todėl svarbus parametras, nusakantis aminorūgščių pagrindu gaminamų trąšų kokybę yra ne tik laisvųjų amino rūgščių kiekis tačiau ir jų enantiomerinis grynumas.

Baltymuose yra 21 natūraliai egzistuojanti aminorūgštis. Jų atskyrimui ir nustatymui dažniausiai naudojami efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodai. Deja, tradiciniais atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodais polinių junginių, tokių kaip aminorūgštys, atskyrimas yra sudėtingas uždavinys. Mažos polinės molekulės ar jonai silpnai sąveikauja su nepoliniu sorbentu, todėl būtina analizių derivatizacija, arba jonų porų reagentų naudojimas. Pastarieji, dėl stipraus foninio signalo, labai apsunkina masių spektrometrinio (MS) detektoriaus panaudojimo galimybes. Be to, aminorūgštys silpnai arba beveik neabsorbuoja UV-Vis bangos ilgių srityje. Taigi, norint chromatografiškai atskirti ir detektuoti aminorūgštis diodinės matricos detektoriumi būtina jų derivatizacija.

Alternatyvus būdas chromatografiškai atskirti aminorūgštis yra hidrofiliinės sąveikos chromatografija (HILIC). Šiame, pastaruoju metodu ypač

populiariame chromatografijos metode, naudojamos polinės stacionarios fazės, su kuriomis stipriai sąveikauja cviterijoninės analizės – aminorūgštys. Be to, HILIC metode naudojami su MS detektoriumi puikiai suderinami lakūs buferiniai tirpalai, o judrioje fazėje dominuojantis organinis tirpiklis (acetonitrilas arba metanolis) padidina analičių jonizacijos efektyvumą. Šis chromatografijos variantas puikiai tinka aminorūgščių sudėčiai įvertinti, tačiau nesuteikia informacijos apie enantiomerinę aminorūgščių grynumą.

Tarp 21-os natūraliai baltymuose egzistuojančios aminorūgšties tik viena iš jų, glicinas, neturi chiralinio centro. Taigi, norint įvertinti hidrolizuoto baltymo preparato aminorūgščių enantio-grynumą, reikia nustatyti net 41-os aminorūgšties kiekį jame. Yra keletas būdų atlikti enantiomerų chromatografinį atskyrimą: derivatizuojant analites enantio atrankiu reagentu, į judrią fazę pridėdant chiralinio modifikatoriaus arba atskyrimui panaudojant chiralinę stacionariąją fazę. Pastarasis metodas yra ypač patrauklus, nes nereikalingas papildomas mėginių paruošimas – derivatizacija, judrioje fazėje nėra junginio, kuris galėtų slopinti MS detektoriaus signalą, o šiuolaikinės chiralinės stacionarios fazės pasižymi puikiu atrankumu bei efektyvumu. Viena iš chiralinių sorbentų klasių – sorbentai makrociklinių antibiotikų pagrindu. Dėl funkcinų grupių įvairovės ir sferinių ypatumų šie sorbentai pasižymi daugialype sąveika su analite ir labai efektyviu enantiomerų atskyrimu.

Disertacijos darbo tikslas - ištirti ir pritaikyti skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos (MS/MS) metodus greitam ir efektyviam baltymų aminorūgščių identifikavimui ir enantioselektyviam jų nustatymui trąšose.

Iškelti uždaviniai:

1. Optimizuoti HILIC-MS/MS metodą baltymų aminorūgštims atskirti ir identifikuoti.
2. Ištirti aminorūgščių enantiomerų atskyrimo chiralinės HPLC-MS/MS metodu ant teikoplaninu modifikuoto sorbento ypatumus.

3. Įteisinti HILIC-MS/MS ir chiralinės HPLC-MS/MS metodus bei pritaikyti juos baltymų aminorūgščių identifikavimui ir enantioselektyviam jų nustatymui komercinėse trąšose.

Ginamieji teiginiai:

1. Amido funkcinėmis grupėmis modifikuotas silikagelio sorbentas pasižymi geriausiomis aminorūgščių atskyrimo HILIC metodu savybėmis.
2. HILIC sąlygomis aminorūgštys yra sulaikomos mišriu pasiskirstymo ir adsorbcijos mechanizmu.
3. Aminorūgščių sulaikymo chiraliniu teikoplanino sorbentu mechanizmas yra giminingas jų sulaikymo HILIC metodu mechanizmui.
4. Tandeminė masių spektrometrija daugialypių reakcijų stebėjimo režime yra atrankus ir jautrus aminorūgščių detektavimo būdas.
5. HILIC-MS/MS ir chiralinės HPLC-MS/MS metodai yra tinkami atlikti komercinių trąšų analizę.

1. EKSPERIMENTO METODIKA

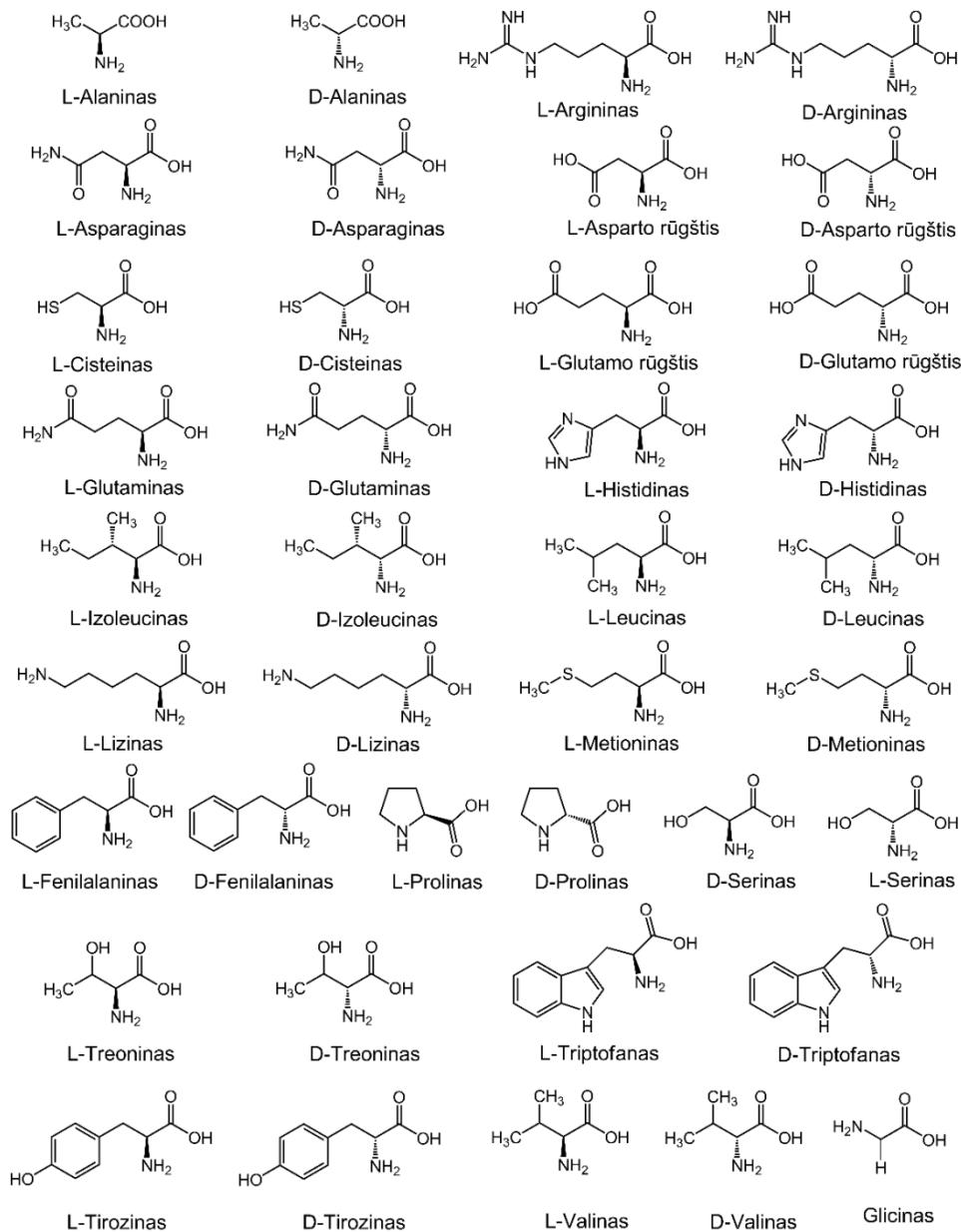
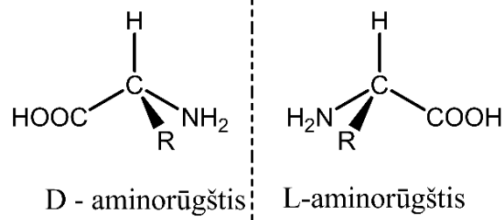
Matavimai atlikti ultraefektyviosios skysčių chromatografijos sistema Agilent 1290 Infinity, nuosekliai sujungta su trigubo kvadrupolio tandeminiu masių spektrometru Agilent 6410 su atmosferos slėgio elektropurkštuvinės jonizacijos (ESI) jonų šaltiniu. Hidrofilinės sąveikos chromatografijos tyrimai atlikti su trimis kolonėlėmis: Acquity BEH Amide (100 × 2,1 mm, 1,7 μm), Acquity BEH HILIC (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) ir Atlantis HILIC (100 × 2,1 mm, 3,0 μm). Chiralinės skysčių chromatografijos tyrimai atlikti naudojant makrocikliniu antibiotiku teikoplaninu modifikuotą sorbentą Astec CHROBIOTIC T2 (100 × 2,1 mm, 5,0 μm). Duomenys surinkti ir apdoroti programine įranga Mass Hunter 5.0 (Agilent technologies), OrginPro 8.5 ir Avogadro 1.1.

2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2.1. Masių spektrometrinis aminorūgščių detektavimas

Aminorūgštys – tai chiralinį centrą turinčios cviterijoninės molekulės, kurių struktūrinės formulės pateiktos 1 pav. Dėl savo struktūros vos kelios aminorūgštys pakankamai gerai absorbuoja šviesą UV srityje, todėl jų tiesioginiam nustatymui fotometriniu detektoriumi nėra tinkamas. Tačiau šios, vandenyje besijonizuojančios analitės, gali būti detektuojamos MS detektoriumi su atmosferos slėgio jonizacijos šaltiniu. Elektropurkštuvinė jonizacija puikiai tinka jonizuoti aminorūgštis tiek teigiamos, tiek ir neigiamos jonizacijos režimais. Tačiau pirminiai bandymai atskleidė, kad intensyvesni signalai registruojami teigiamos ESI jonizacijos režimu.

ESI parametrai buvo optimizuoti hidrofilinės sąveikos ir chiralinės chromatografijos sąlygoms ir yra pateikti 1 lentelėje. Dėl didesnio vandens kiekio chiralinės chromatografijos judrioje fazėje, maksimalus jonizacijos efektyvumas pasiekiamas esant didesnėms kapiliaro įtampos ir dujų greičio vertėms.

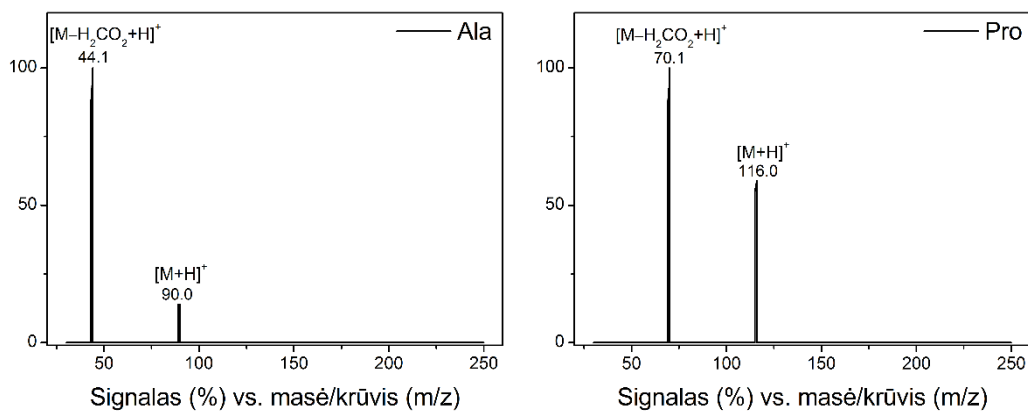


1 pav. D-/L-aminorūgščių struktūros.

1 lentelė. Optimizuoti ESI jonų šaltinio parametrai hidrofilinės sąveikos ir chiralinės skysčių chromatografijos metodams.

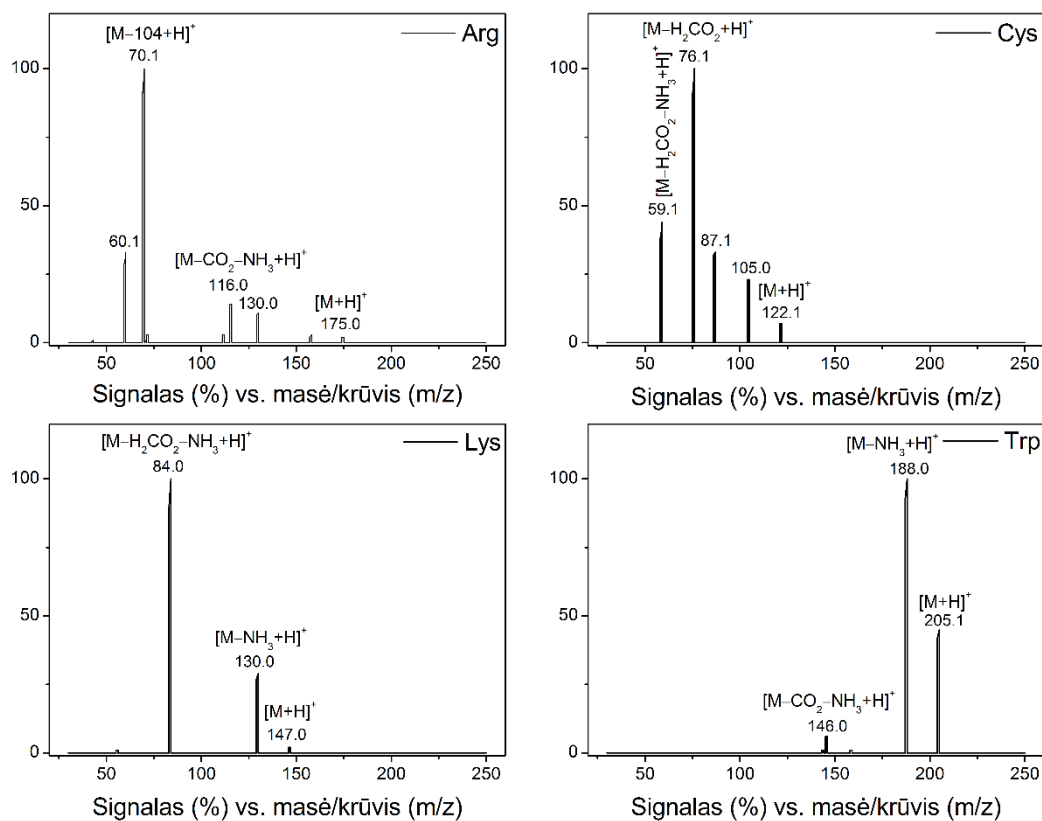
Parametras	HILIC	Chiralinė chromatografija
Kapiliaro įtampa, kV	3	4
Dujų temperatūra, °C	300	300
Dujų srautas, l/min	7	8
Purkštuvo dujų slėgis, psi	30	30

MS/MS detektavimui buvo pasirinktas jautriausias daugialypių reakcijų stebėjimo (MRM) režimas. Trigubo kvadrupolio masių analizatoriaus parametrai buvo optimizuoti tiesiogiai įleidžiant 100 µg/l koncentracijos analičių standartus. Aminorūgščių pilno skenavimo masių spektruose kiekvienai rūgščiai buvo identifikuoti intensyviausi protonizuoti $[M+H]^+$ jonai, kurie buvo izoliuoti pirmajame kvadrupolyje, suskaldyti skaldymo celėje, o fragmentai išanalizuoti trečiuoju kvadrupoliu. Alanino ir prolino fragmentacijos spektruose buvo registruojama tik po vieną intensyvių fragmentą (2 pav.). Kitos rūgštys skilo į du ir daugiau fragmentų. Kiekvienai iš jų buvo pasirinkti du intensyviausi fragmentai – vienas kiekybinei analizei, o kitas patvirtinimui.



2 pav. Alanino ir prolino pirmtakų jonų skaldymo spektrai.

Daugeliui analičių intensyviausi fragmentai susidaro atskylus karboksi ($[M-HCOOH+H]^+$) arba karboksi ir amino ($[M-HCOOH-NH_3+H]^+$) grupėms. Tuo tarpu argininui ir triptofanui intensyviausi fragmentai buvo atitinkamai $[M-104+H]^+$ ir $[M-NH_3+H]^+$ (3 pav.). Kiekvienai analitei pasirinkti intensyviausi MRM skilimai kartu su optimaliais jonų optikos parametrais ir skaldymo energijomis pateikti 2 lentelėje.



3 pav. Arginino, cisteino, lizino ir triptofano pirmtakų jonų skaldymo spektrai.

2 lentelė. Optimizuoti MRM parametrai.

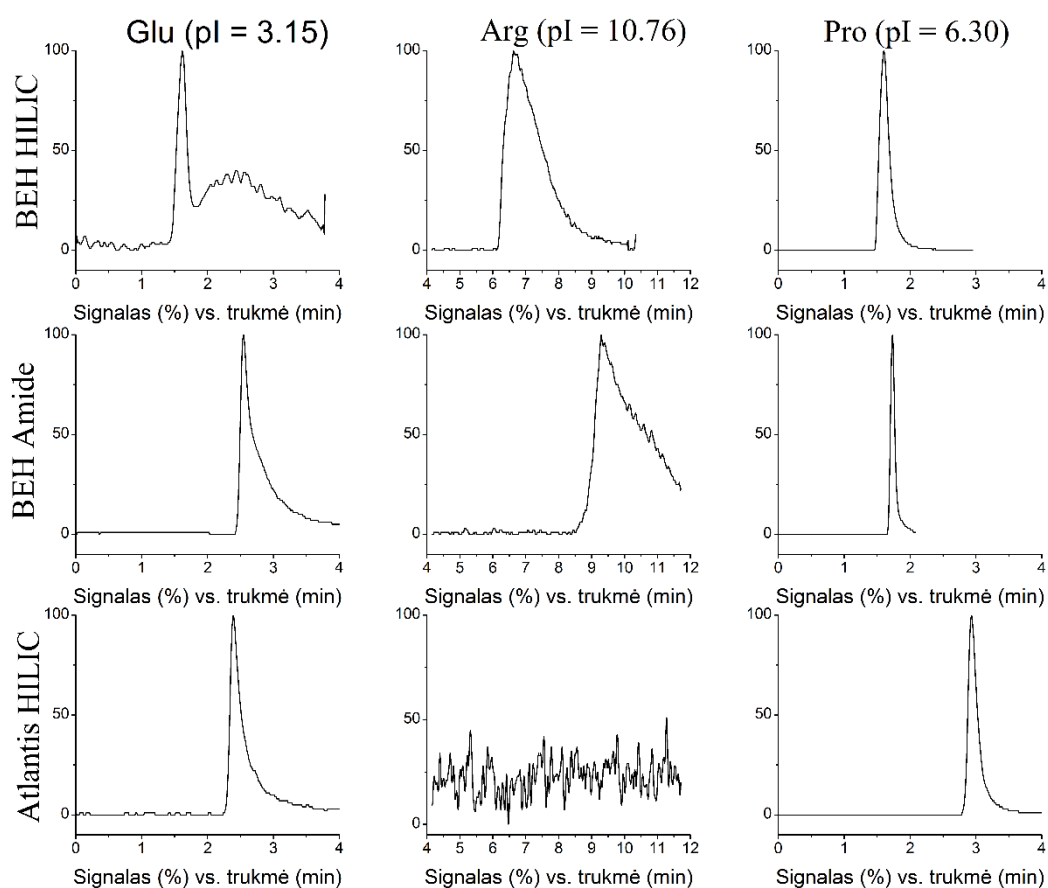
Aminorūgštis	Santrumpa	Jonas pirmtakas	MRM skilimai ^a	Įtampa, V	Skaldymo energija, eV
Alaninas	Ala	90	90 → 44	70	10
Argininas	Arg	175	175 → 70 175 → 116	90	25 11
Asparaginas	Asn	133	133 → 74 133 → 87	70	13 4
Asparto rūgštis	Asp	134	134 → 74 134 → 88	70	12 5
Cisteinas	Cys	122	122 → 76 122 → 59	70	11 9
Glutamo rūgštis	Glu	148	148 → 84 148 → 130	70	14 4
Glutaminas	Gln	147	147 → 84 147 → 130	70	16 5
Glicinas	Gly	76	76 → 30 76 → 48	70	4 3
Histidinas	His	156	156 → 110 156 → 95	100	12 15
Izoleucinas	Iso	132	132 → 69 132 → 86	90	16 5
Leucinas	Leu	132	132 → 86 132 → 69	90	6 18
Lizinas	Lys	147	147 → 84 147 → 130	90	16 5
Metioninas	Met	150	150 → 104 150 → 133	80	6 4
Fenilalaninas	Phe	166	166 → 120 166 → 103	90	10 22
Prolinas	Pro	116	116 → 70	60	14
Serinas	Ser	106	106 → 60 106 → 42	70	8 18
Treoninas	Thr	120	120 → 74 120 → 102	70	7 3
Triptofanas	Trp	205	205 → 188 205 → 146	75	2 2
Tirozinas	Tyr	182	182 → 136 182 → 165	60	8 3
Valinas	Val	118	118 → 72 118 → 55	50	7 23

a – skilimas kiekybinei analizei pateiktas storesniu šriftu.

2.2. Hidrofilinės sąveikos chromatografija

Aminorūgščių atskyrimui HILIC metodu buvo palygintos trys stacionariosios fazės: Atlantis HILIC, Acquity BEH HILIC ir Acquity BEH Amide. Iliustracijai 4 pav. palygintos glutamo rūgšties, arginino ir prolino ekstrahuotos

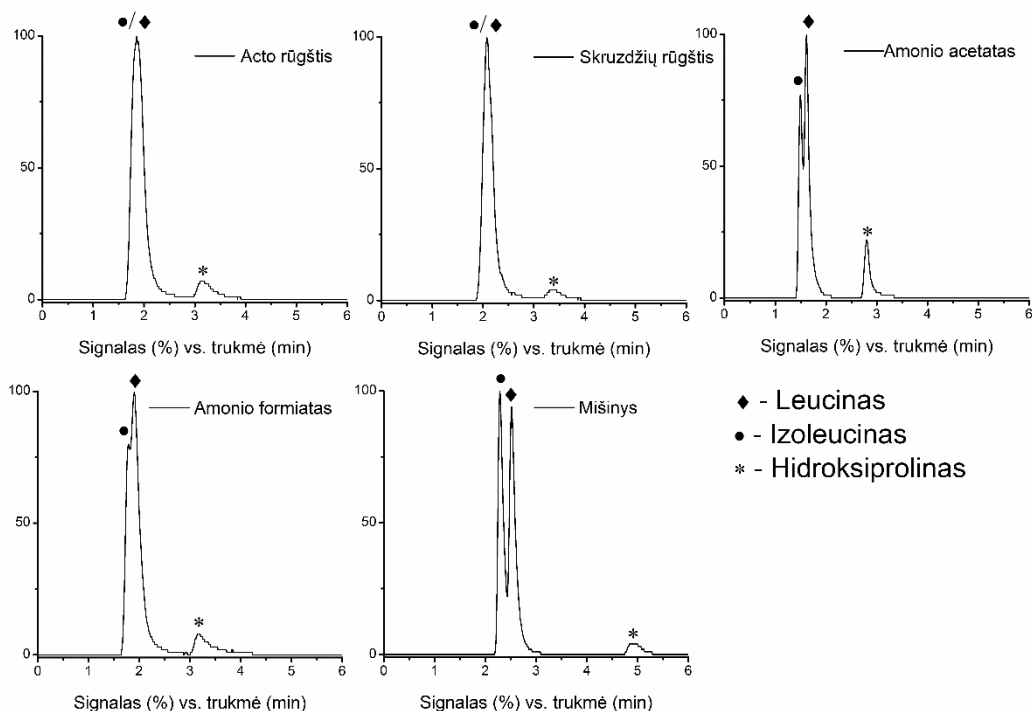
jonų chromatogramos, išmatuotos trijose kolonėlėse. Geresnis daugelio aminorūgščių smailių efektyvumas buvo nustatytas atskiriant ant Acquity BEH HILIC ir Acquity BEH Amide sorbentų. Visų pirma tai susiję su beveik dvigubai mažesniu šių sorbentų dalelių dydžiu ($1,7\ \mu\text{m}$). Be to, šiuose sorbentuose dalis silikagelio silanolinių grupių yra užblokuotos tiltelinėmis etileno grupėmis. Taip susilpninama mažinanti efektyvumą antrinė sąveika tarp disocijavusių silanolinių grupių ir aminorūgščių protonizuotų amino grupių. Dėl truputį geresnės smailių formos ir stipresnio sulaikymo tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta Acquity BEH Amide kolonėlė.



4 pav. Glutamo rūgšties, arginino ir prolino ekstrahuotos jonų chromatogramos išmatuotos su BEH HILIC, BEH Amide ir Atlantis HILIC kolonėlėmis.

Optimizuojant atskyrimo sąlygas buvo išbandyti skirtingi judrios fazės priedai: acto rūgštis, skruzdžių rūgštis, amonio acetatas, amonio formiatas ir amonio acetato/formiato ir skruzdžių rūgšties mišinys. 5 pav. pavaizduotos leucino, izoleucino ir hidroksiprolino ekstrahuotos jonų ($m/z = 132$) chromatogramos.

Naudojant pavienes rūgštis ar jų amonio druskas (10 mmol/l) izobarinės amino rūgštys (leucinas ir izoleucinas) yra neatskiriamos. Tuo tarpu pridėjus į judrią fazę skruzdžių rūgštimi parūgštintą amonio acetato ir amonio formiato mišinį (0,15 % skruzdžių rūgšties, 5 mmol/l amonio acetato ir 5 mmol/l amonio formiato) izobarinių analičių atskyrimas ženkliai pagerėjo.



5 pav. Izobarinių aminorūgščių atskyrimas naudojant skirtingus judrios fazės priedus. Judri fazė - 1:4 (v/v) H₂O/CH₃CN su atitinkamu priedu.

Aminorūgščių atskyrimui pasirinkus parūgštintą amonio druskų mišinį, įvertinta šių priedų koncentracijos įtaka smailių formai ir detektavimo jautriui. Nustatyta, kad ESI jonizacija daugeliui analičių yra efektyviausia, kai skruzdžių rūgšties koncentracija yra 10 mmol/l, o bendra amonio acetato ir formiato koncentracija lygi 10 mmol/l.

Siekiant įvertinti aminorūgščių sulaikymo mechanizmą HILIC sąlygomis, buvo ištirta tirpiklių sudėties judrioje fazėje įtaka rūgščių sulaikymui. Sulaikymas pasiskirstymo mechanizmu aprašomas lygtimi:

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi \quad (1)$$

k – analitės sulaikymo faktorius su binarine judria faze; k_w – analitės sulaikymo faktorius, kai judria faze naudojamas grynas silpnesne eliucine geba pasižymintis tirpiklis (acetonitrilas); φ – stipresnės eliucinės gebos tirpiklio (vandens) tūrio dalis binarinėje judrioje fazėje; S – tiesinės priklausomybės $\log k - \varphi$ polinkis.

Sulaikymas adsorbcijos mechanizmu aprašomas lygtimi:

$$\log k = \log k_B - \frac{A_s}{n_b} \cdot \log \varphi \quad (2)$$

k – analitės sulaikymo faktorius su binarine judria faze; k_B – sulaikymo faktorius, kai judria faze naudojamas grynas stipresne eliucine geba pasižymintis tirpiklis (vanduo); φ – stipresnės eliucinės gebos tirpiklio (vandens) tūrio dalis binarinėje judrioje fazėje; A_s ir n_b – atitinkamai analitės ir stipresnio tirpiklio sorbento paviršiuje užimami skerspjūvio plotai.

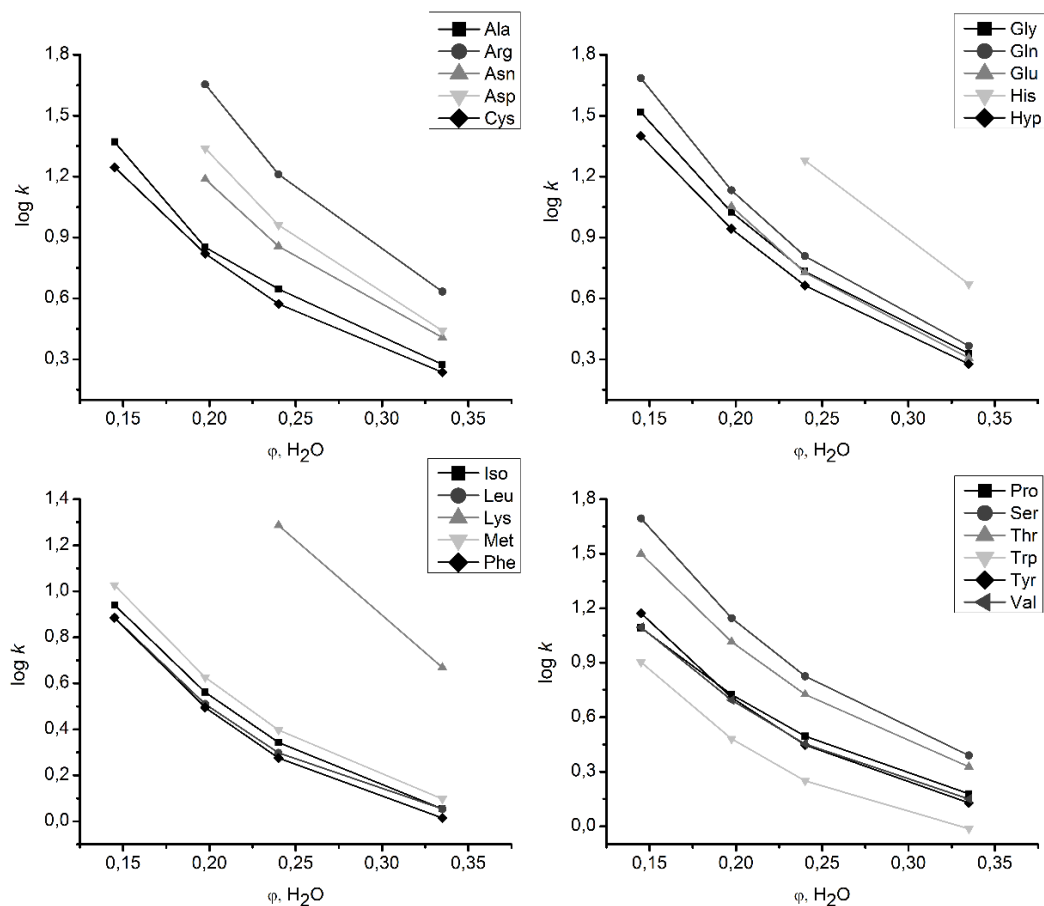
Taigi, jei analitės sulaikymas aprašomas tiesine $\log k$ priklausomybe nuo φ , ji sulaikoma pasiskirstymo mechanizmu, o jei tiesinė $\log k$ priklausomybė nuo $\log \varphi$ – adsorbcijos. Analitės sulaikymo faktoriai buvo išmatuoti keičiant vandens tūrio dalį judrioje fazėje intervale nuo 14,5 % iki 33,5 %. Abiem sulaikymo modeliams gautos priklausomybės pavaizduotos 6 ir 7 pav. Nei vienu modeliu aminorūgščių sulaikymas neaprašomas gerai: pasiskirstymo modelio priklausomybių koreliacijos koeficientai siekė 0,962-0,992, o adsorbcijos modelio – 0,990-0,998. Tokie rezultatai liudija, kad aminorūgštys HILIC režime ant BEH Amide sorbento yra sulaikomos mišriu pasiskirstymo-adsorbciniu mechanizmu. Be to, artimesnės vienetui adsorbcijos modelio priklausomybių koreliacijos koeficientų vertės rodo didesnę adsorbcijos mechanizmo įtaką.

Neseniai analitės sulaikymui mišriu mechanizmu HILIC sąlygomis aprašyti buvo pasiūlytas naujas sulaikymo modelis. Šis modelis įvertina analitės molekulės tūrį bei analitės sąveiką ne tik su sorbentu, bet ir su judrios fazės tirpikliais. Sulaikymas šiuo modeliu aprašomas lygtimi:

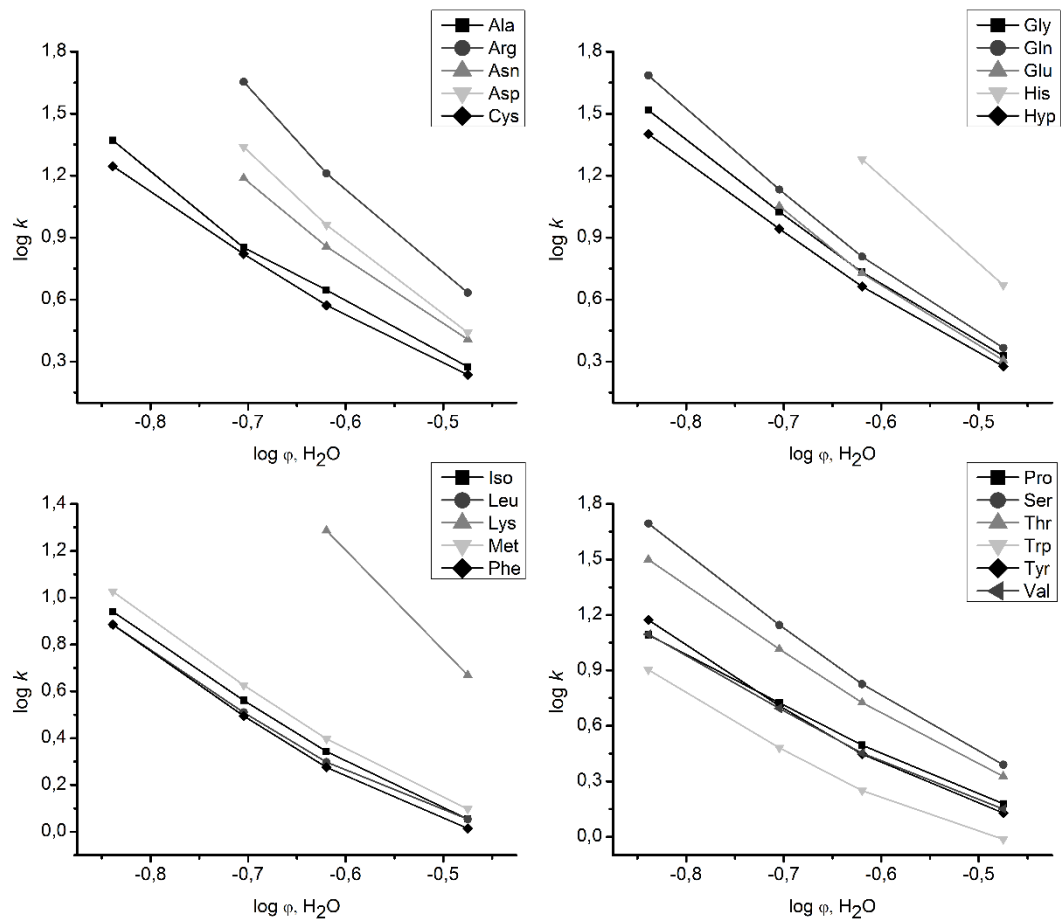
$$\ln k = a + b \cdot \ln \varphi + c \cdot \varphi \quad (3)$$

k – analizės sulaikymo faktorius, φ – stipresnės eliucinės gebos tirpiklio (vandens) tūrio dalis binarinėje judrioje fazėje; a – konstanta, įvertinanti analizės molekulės tūrį; b – koeficientas, įvertinantis tiesioginę analizės ir sorbento sąveiką; c – koeficientas, įvertinantis sąveikos tarp analizės ir judrios fazės tirpiklių energiją.

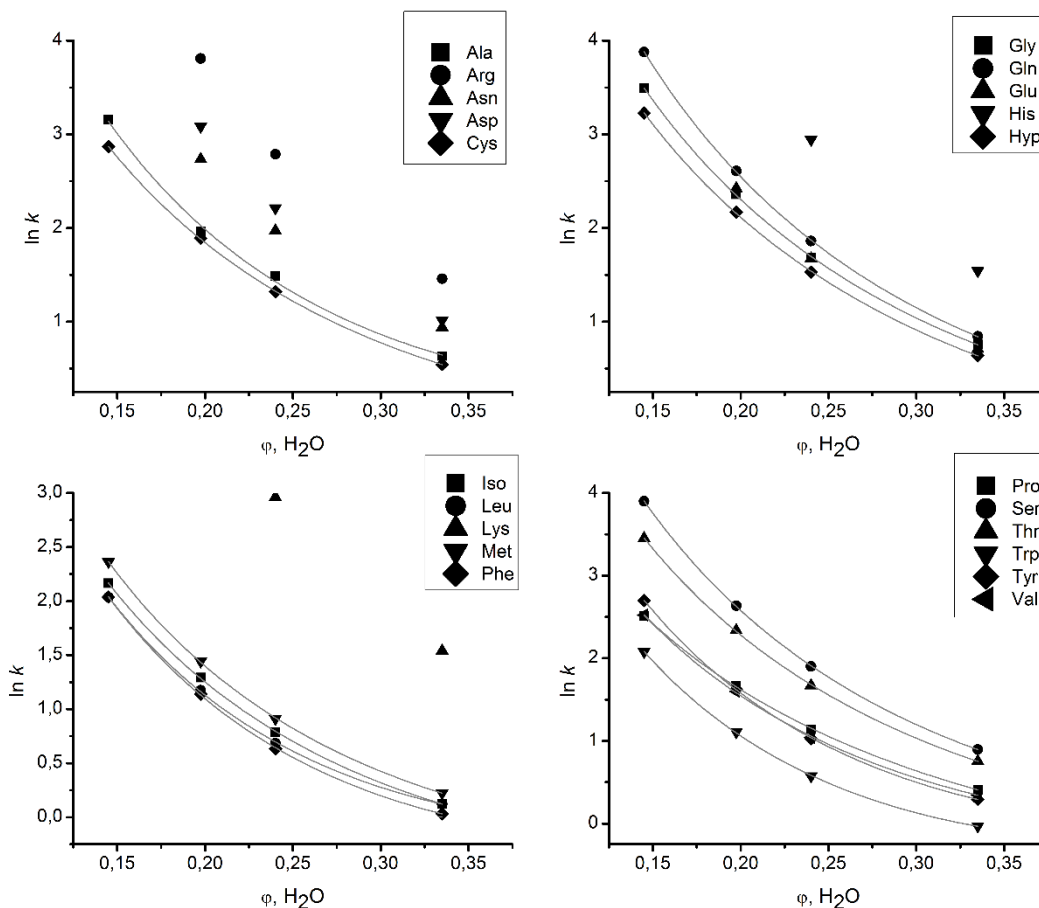
Visoms aminorūgštims, išskyrus alaniną, $\ln k$ priklausomybių nuo vandens tūrio dalies φ judrioje fazėje koreliacijos koeficientų vertės buvo didesnės nei 0,9990 (8 pav.). Apibendrinant galime konstatuoti, kad aminorūgščių sulaikymas HILIC sąlygomis vyksta mišriu sulaikymo mechanizmu, kuriame adsorbcija turi šiek tiek didesnę įtaką, nei pasiskirstymas tarp judrios ir stacionarios fazių.



6 pav. Log k priklausomybės nuo vandens tūrio dalies φ judrioje fazėje (pasiskirstymo sulaikymo modelis).



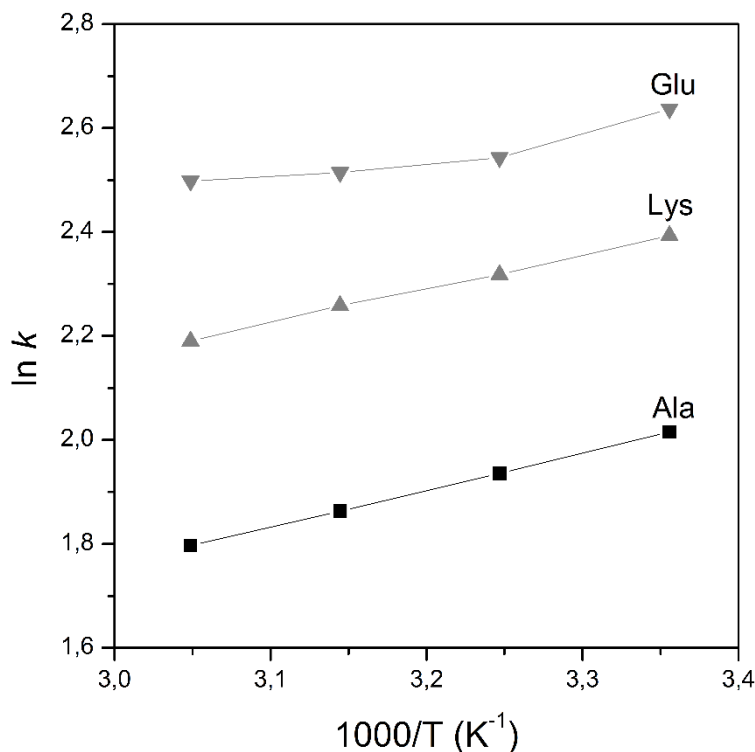
7 pav. Log k priklausomybės nuo $\log \varphi$ (adsorbcijos sulaikymo modelis).



8 pav. $\ln k$ priklausomybės nuo vandens tūrio dalies ϕ judrioje fazėje (mišrus sulaikymo modelis).

Galiausiai buvo įvertinta kolonėlės temperatūros (15-55 °C) įtaka aminorūgščių sulaikymui. Kaip ir tikėtasi, visos analizės pasižymėjo taip vadinama „normaliaja chromatografine elgsena“, t.y. keliant temperatūrą jų sulaikymas silpnėjo. Tai iliustruoja trims aminorūgštims 9 pav. pateiktos temperatūrinės (Van` t Hoff` o) priklausomybės. Visoms rūgštims, išskyrus asparto ir glutamo, gautos tiesinės Van` t Hoff` o priklausomybės. Netiesines asparto ir glutamo rūgščių temperatūrinės priklausomybės galima paaiškinti tuo, kad šių analičių antrosios karboksi grupės pK_a vertės (3,65 ir 4,25 atitinkamai asparto ir glutamo rūgščiai) yra artimos judrios fazės pH vertei. Todėl didėjant temperatūrai ir keičiantis jų disociacijos konstantų vertėms, pasikeičia ir šių rūgščių efektyvusis krūvis, o tuo pačiu ir elektrostatiinių sąveikų su sorbentu indėlis. Visos kitos rūgštys turi tik po vieną karboksi

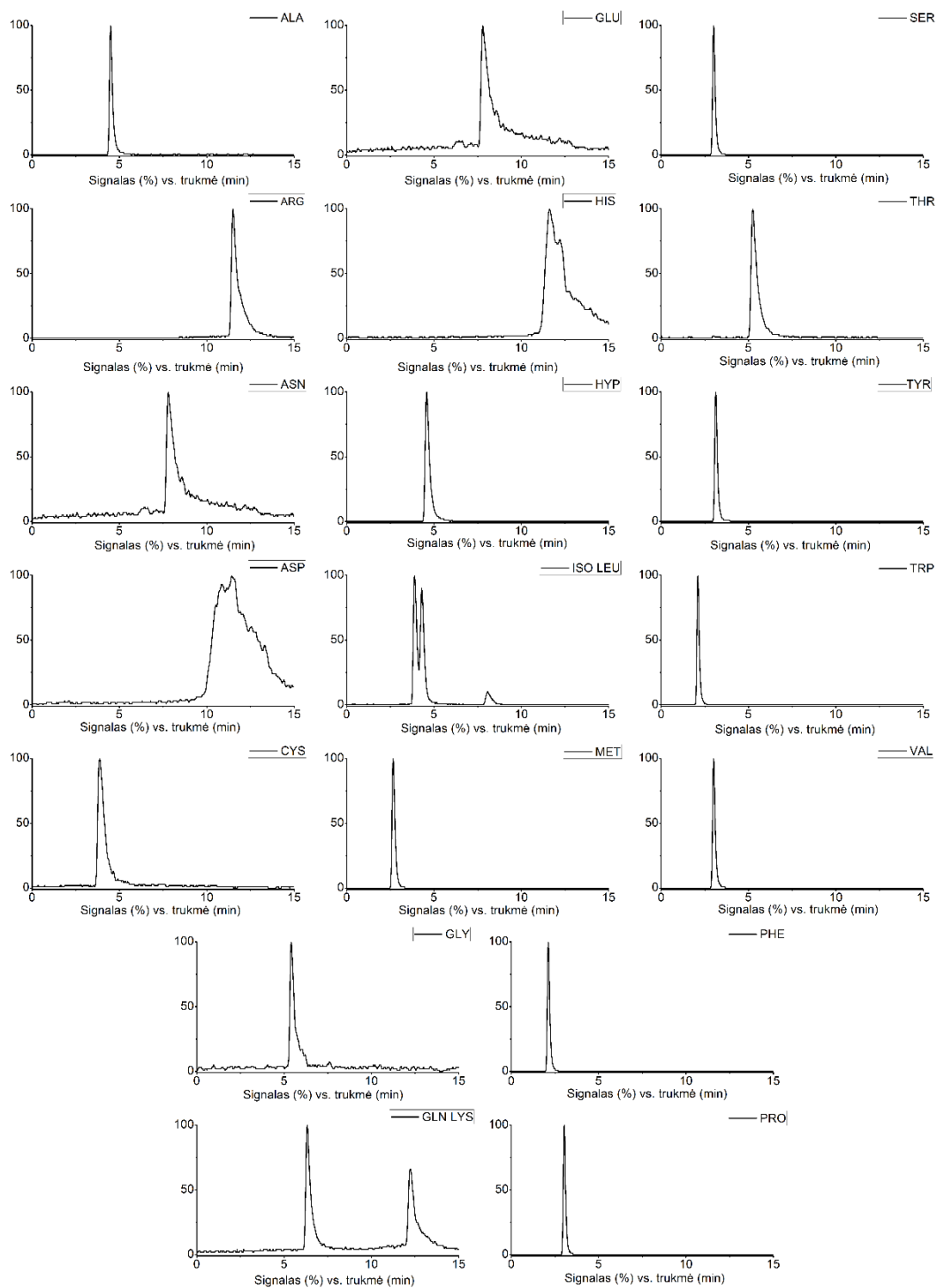
grupe, kurių pK_a vertės žymiai mažesnės (1,82-2,36), todėl jų krūvis didinant temperatūrą nekinta.



9 pav. Kolonėlės temperatūros įtaka aminorūgščių sulaikymui.

Remiantis atliktų tyrimų rezultatais aminorūgščių atskyrimui HILIC metodu buvo pasirinktos tokios gradientinės eliucijos sąlygos: judri fazė A – vandeninis 20 mmol/l HCOOH, 3 mmol/l HCOONH₄, ir 3 mmol/l CH₃COONH₄ tirpalas; judri fazė B – 20 mmol/l HCOOH, 3 mmol/l HCOONH₄, 3 mmol/l CH₃COONH₄ vandens acetonitrilo (tūrių santykiu 1:9) mišinyje. Gradientinės eliucijos programa: 0–7 min 95% B iki 90% B; 7–15 min 90% B iki 70%; po to per minutę grąžinama pirminė judrios fazės sudėtis ir kolonėlė kondicionuojama 4 min iki kito mėginio įleidimo.

Aminorūgščių standartų mišinio ekstrahuotos jonų chromatogramos (EIC) pateiktos 10 pav. Nors asparto rūgšties ir histidino smailės išplitusios, tačiau amino rūgščių identifikavimo patikimumui tai neturi didelės įtakos.

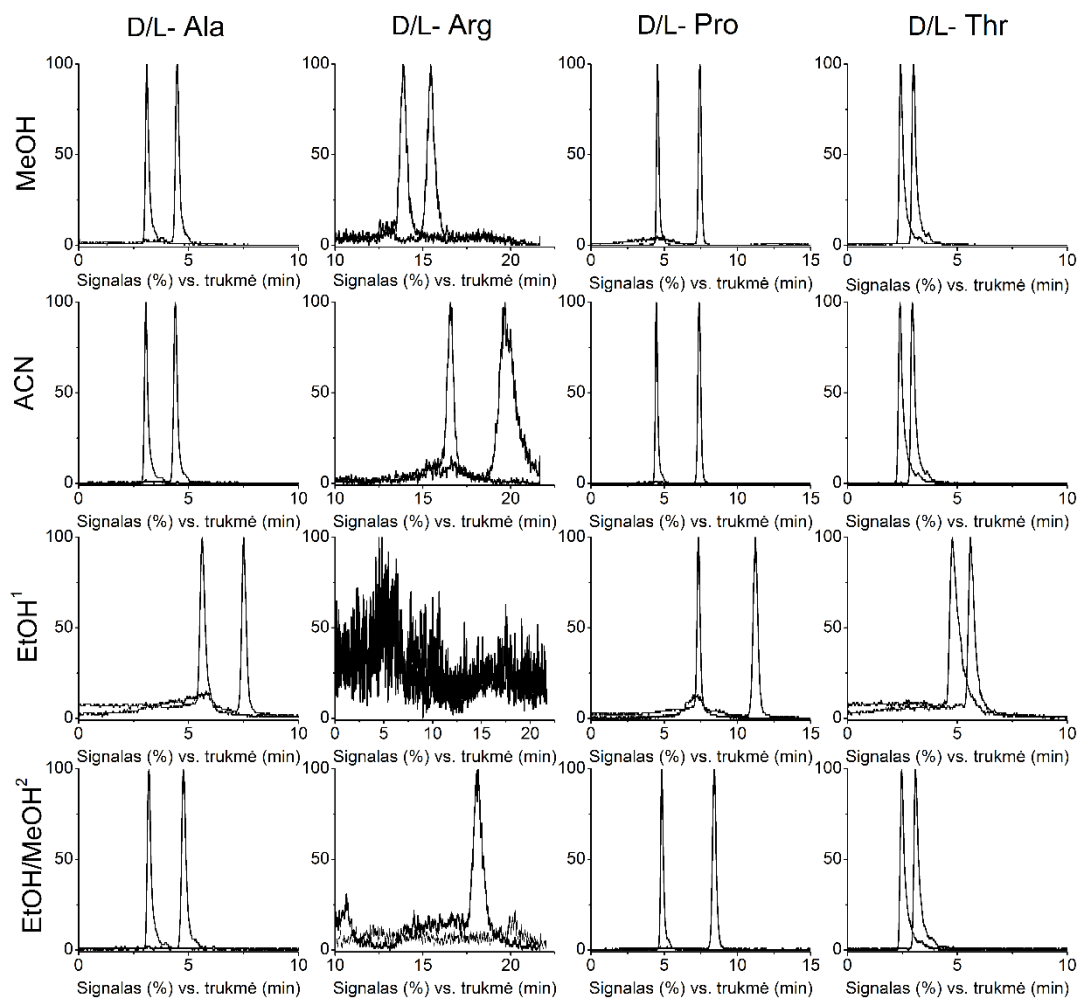


10 pav. Amino rūgščių standartų mišinio EIC chromatogramos optimizuotomis HILIC sąlygomis.

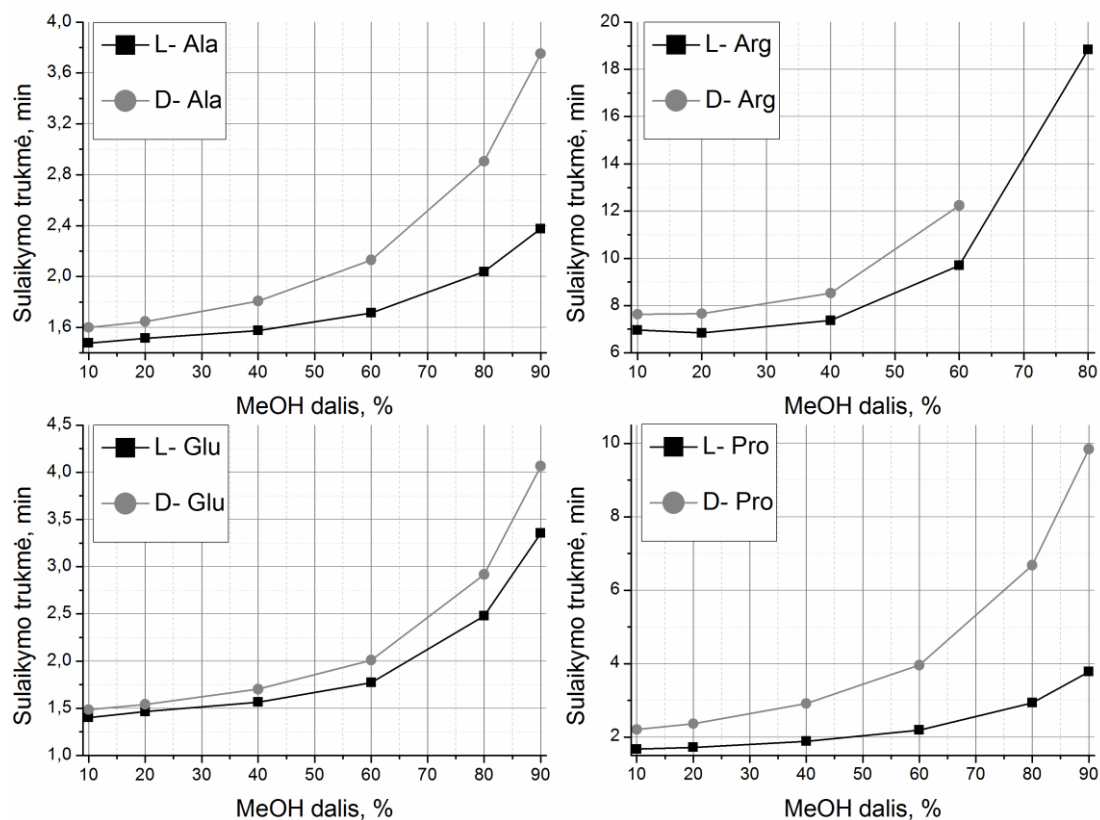
2.3. Chiralinė skysčių chromatografija

Chiralinėi skysčių chromatografijai pasirinkta makrocikliniu antibiotiku – teikoplaninu - modifikuota stacionarioji fazė Chirobiotic T2. Mažų, chiralinių molekulių atskyrimui didelę įtaką turi judrios fazės organinio tirpiklio prigimtis. Buvo išbandyti trys organiniai tirpikliai: acetonitrilas, metanolis, etanolis bei metanolio ir etanolio mišiniai (11 pav.). Nors naudojant etanolį enantiomerų skiriamoji geba truputį pagerėjo, tačiau dėl padidėjusios judrios fazės klampos ženkliai padidėjo sistemos slėgis. Organiniu judrios fazės priedu naudojant acetonitrilą, geriausiai atskiriamos izobarinių amino rūgščių poros, tačiau kitų aminorūgščių enantiomerų atskyrimas nežymiai pablogėjo. Taigi, tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas metanolis.

Teikoplanino struktūra suteikia daugialypės sąveikos tarp sorbento ir analičių galimybes. Kitų autorių darbuose buvo nustatyta, kad kai kurių polinių junginių sulaikymo trukmių priklausomybės nuo organinio tirpiklio tūrio dalies judrioje fazėje yra U-formos. Stiprėjanti analičių sorbcija didinant organinio tirpiklio dalį didesnių organinio tirpiklio koncentracijų judrioje fazėje srityje rodo dominuojančią hidrofilinės sąveikos įtaką sulaikymui. Tuo tarpu stiprėjanti sorbcija mažinant organinio tirpiklio tūrio dalį mažesnių organinio tirpiklio koncentracijų srityje liudija apie dominuojančią hidrofobinės sąveikos įtaką. Išmatuotos aminorūgščių sulaikymo priklausomybės nuo organinio tirpiklio tūrio dalies judrioje fazėje (12 pav.) parodė, kad hidrofobinės sąveikos įtaka aminorūgščių atskyrimui ant teikoplanino stacionariosios fazės yra nereikšminga.

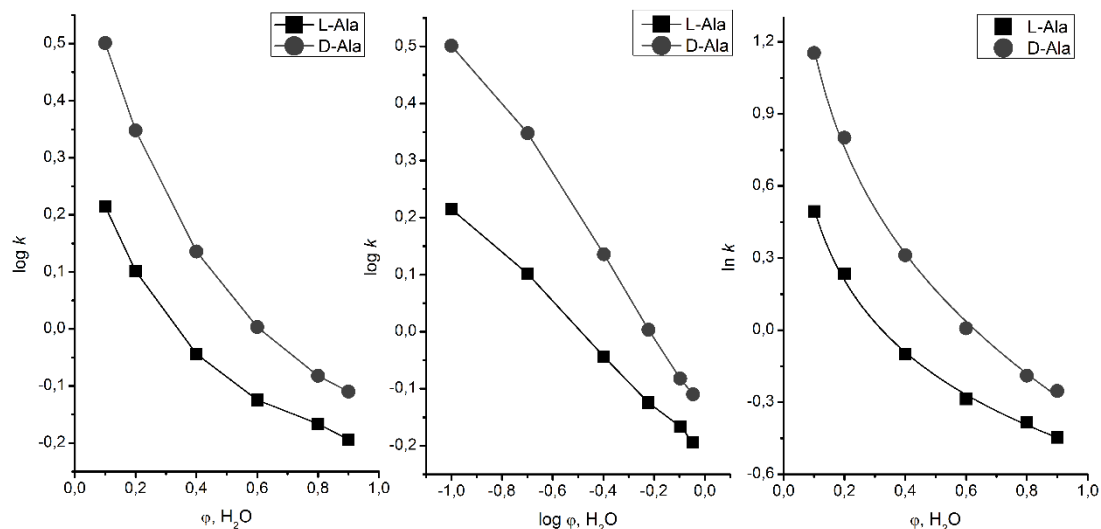


11 pav. D-/L-Ala, D-/L-Arg, D-/L-Pro ir D-/L-Thr enantiomerų atskyrimas naudojant skirtingus organinius tirpiklius. Judri fazė A – vandeninis 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tirpalas, B – 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ atitinkamame organiniame tirpiklyje. Judrios fazės greitis 0,3 mL/min. ¹Judrios fazės greitis 0,2 mL/min. ²Judri fazė: A – 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ vandens ir etanolio mišinyje (75/25, v/v); B - 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ metanolyje. Judrių fazių pH 4.



12 pav. D/L-Ala, D/L-Arg, D/L-Glu ir D/L-Pro sulaikymo trukmių priklausomybės nuo metanolio tūrio dalies judrioje fazėje.

Tokios aminorūgščių sulaikymo priklausomybės nuo organinio tirpiklio tūrio dalies judrioje fazėje yra identiškos analogiškomis priklausomybėms, gaunamoms polinėms analitėms HILIC sąlygomis. Taigi, galima daryti prielaidą, kad ant chiralinio teikoplanino sorbento aminorūgštys sulaikomos HILIC mechanizmu. Siekiant tai patvirtinti, tiriamai chromatografinėi sistemai taip pat buvo pritaikyti pasiskirstymo, adsorbcijos ir HILIC modeliai. Ilustracijai 13 pav. pavaizduotos alanino enantiomerams trims sulaikymo modeliams išmatuotos priklausomybės. 3 lentelėje surašyti koreliacijos aminorūgščių sulaikymo modeliams parametrai. Gauti rezultatai rodo, kad aminorūgštys ant chiralinio teikoplanino sorbento yra sulaikomos mišriu HILIC mechanizmu, kuriame adsorbcijos įtaka stipresnė už pasiskirstymo.



13 pav. D- ir L-alanino sulaikymo faktoriaus priklausomybės nuo vandens tūrio dalies judioje fazėje.

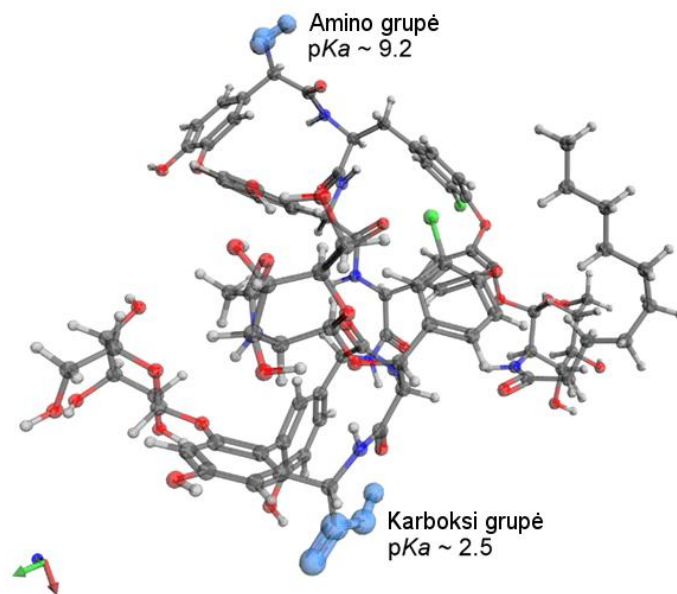
3 lentelė. Koreliacijos aminorūgščių sulaikymo modeliams parametrai.

Analitė	Pasiskirstymo modelis (1 lygtis)	Adsorbcijos modelis (2 lygtis)	HILIC modelis (3 lygtis)
	R^2	R^2	R^2
L-Ala	0,9090	0,9976	0,9968
D-Ala	0,9329	0,9948	0,9964
L-Arg	0,7556	0,9268	0,9982
D-Arg	0,7986	0,8961	0,9999
L-Asn	0,8800	0,9965	0,9979
D-Asn	0,8926	0,9973	0,9971
L-Asp	0,9074	0,9910	0,9919
D-Asp	0,9440	0,9967	0,9952
L-Cys	0,9082	0,9991	0,9988
D-Cys	0,9421	0,9936	0,9975
L-Gln	0,8603	0,9929	0,9975
D-Gln	0,8748	0,9953	0,9971
Gly	-	-	-
L-His	0,8850	0,9870	0,9959

D-His	0,8818	0,9861	0,9961
L-Iso/Leu	0,9457	0,9927	0,9978
D-Iso/Leu	0,9698	0,9809	0,9986
L-Lys	0,7910	0,9463	0,9973
D-Lys	0,8528	0,9347	0,9984
L-Met	0,9194	0,9463	0,9998
D-Met	0,9673	0,9347	0,9997
L-Phe	0,4462	0,7465	0,9542
D-Phe	0,8714	0,9930	0,9944
L-Pro	0,9255	0,9968	0,9973
D-Pro	0,9557	0,9887	0,9978
L-Ser	0,8558	0,9921	0,9978
D-Ser	0,8828	0,9965	0,9973
L-Thr	0,8493	0,9893	0,9956
D-Thr	0,8909	0,9975	0,9976
L-Trp	-	-	-
D-Trp	-	-	-
L-Tyr	-	-	-
D-Tyr	-	-	-
L-Val	0,9347	0,9965	0,9987
D-Val	0,9443	0,9930	0,9976

¹ – išmatuoti priklausomybę nepakako eksperimentinių taškų.

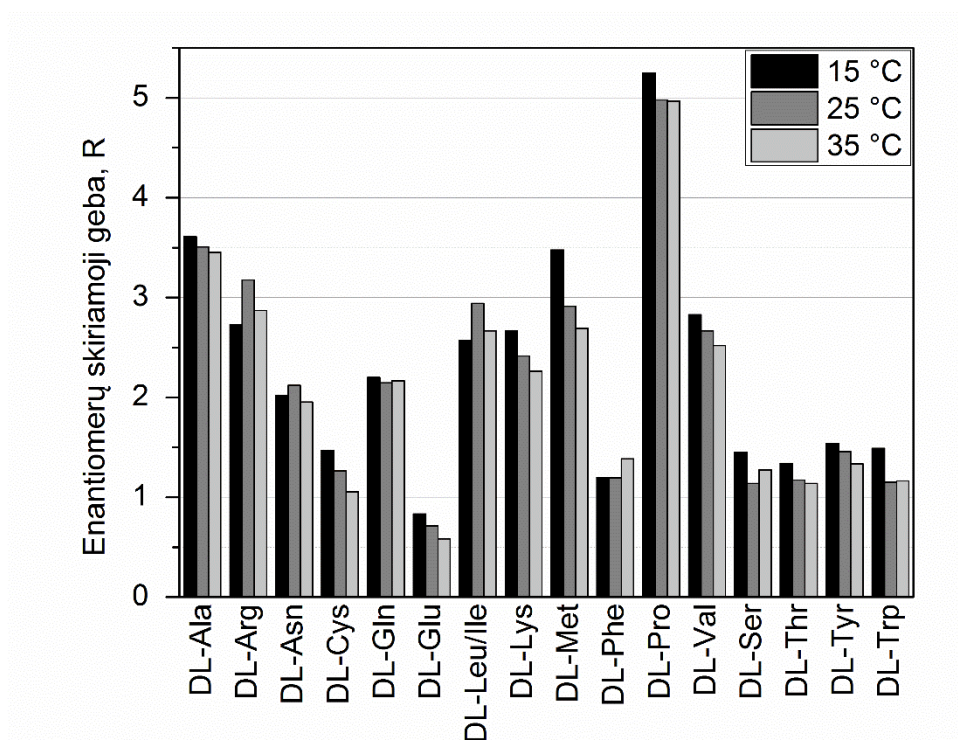
Enantio skiriamoji geba priklauso nuo chiralinio selektoriaus (teikoplanino) konformacijos, kuri gali būti veikiama judrios fazės pH ir temperatūros. Teikoplanino molekulėje yra karboksi ($pK_a = 2,5$) ir amino ($pK_a = 9,2$) funkcinės grupės, dalyvaujančios chiraliniame atskyrimo. Svarbu paminėti, kad cviterjoninės amino rūgšties elektrostatinė sąveika su abiem sorbento funkcinėmis grupėmis nėra galima, kadangi šios grupės teikoplanino molekulėje yra toli viena nuo kitos (14 pav.).



14 pav. Molekulinės dinamikos programa Avogadro 1.1.1 simuliuota teikoplanino geometrija.

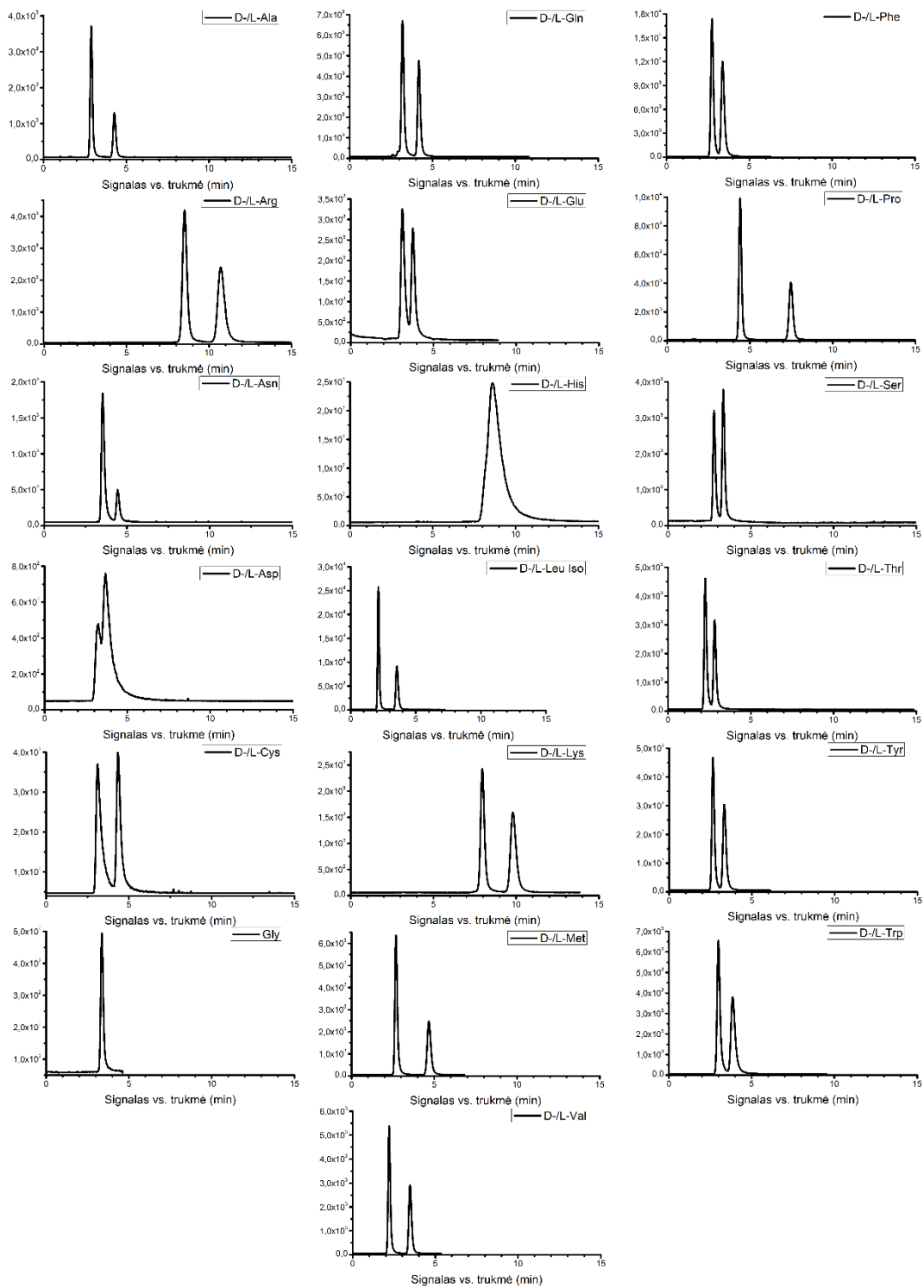
Judrios fazės pH įtaka aminorūgščių sulaikymui ir chiraliniam atrankumui buvo įvertinta sorbento darbinėje pH srityje (4,0-6,0). Nors šioje pH srityje teikoplanino jonogeninių grupių krūvis nesikeičia, truputį geresnis enantiomerų atskyrimas pasiektas rūgštesnėje judrioje fazėje esant $\text{pH} \sim 4,2$. Vis dėlto aminorūgščių, kurių $\text{pI} < 4$ (asparto $\text{pI} = 2,98$; glutamo $\text{pI} = 3,08$), enantiomerai šiose sąlygose buvo nepilnai atskiriami. Deja, dėl ribotos sorbento darbinės pH srities nebuvo galimybės pagerinti šių aminorūgščių enantiomerų atskyrimą pilnai jas protonizavus.

Kitas svarbus veiksnys, lemiantis teikoplanino konformaciją, yra kolonėlės temperatūra. Analičių masių mainų tarp judrios fazės ir sorbento Gibbs'o laisvoji energija sieja sistemos temperatūrą su enantiomeriniu atrankumu. Temperatūros įtaka enantiomerų skiriamajai gebai R buvo įvertinta 15-35°C temperatūrų intervale (15 pav.). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad daugeliui rūgščių geresnis chralinis atskyrimas pasiekiamas esant mažesnei kolonėlės temperatūrai.



15 pav. Aminorūgščių enantiomerų skiriamosios gebos priklausomybė nuo kolonėlės temperatūros.

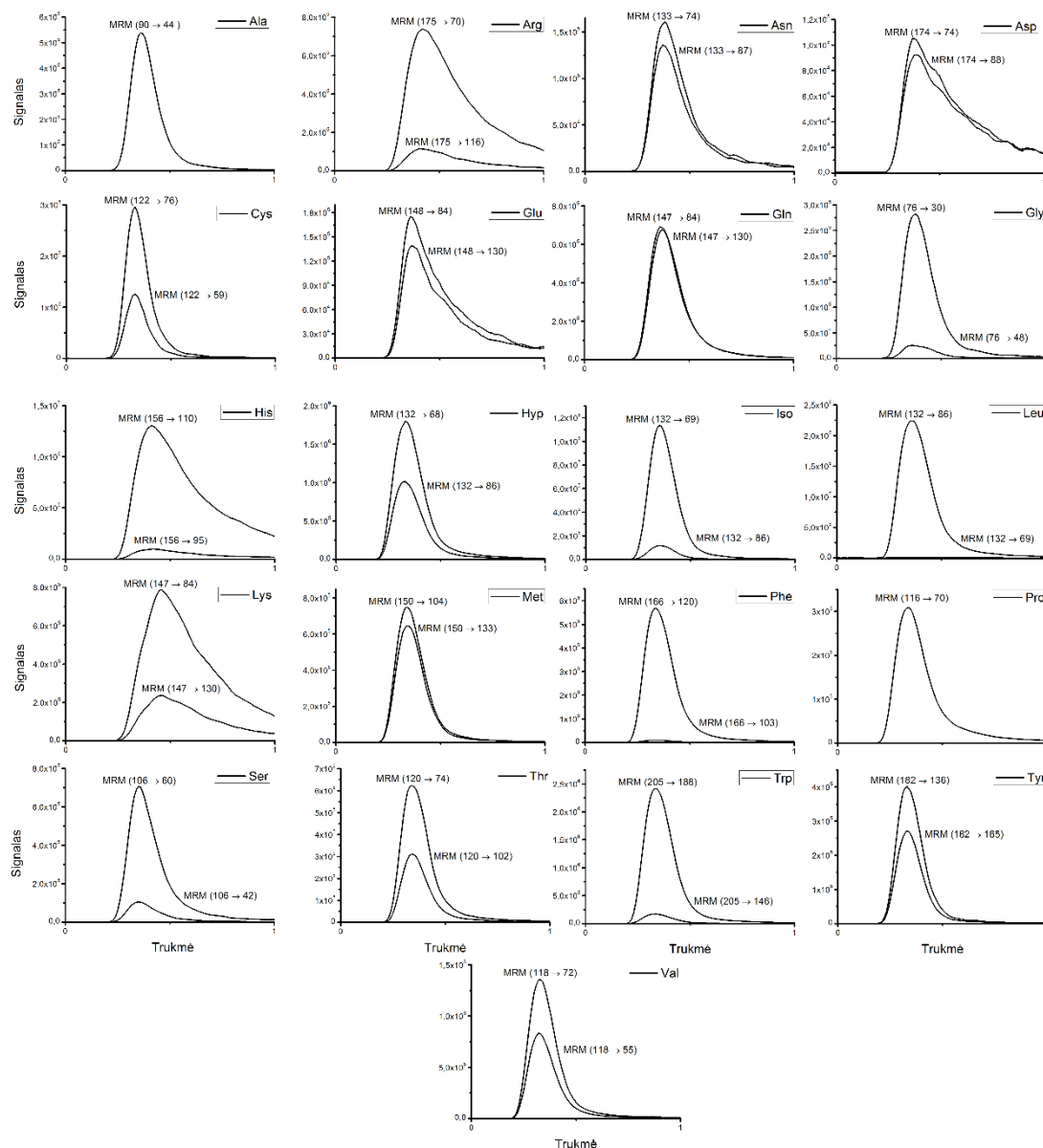
Optimizuotomis gradientinės eliucijos sąlygomis per 15 min pasiektas pilnas 15-os aminorūgščių enantiomerų atskyrimas. Aminorūgščių D-izomeras yra sulaikomas silpniau nei L-izomeras. D-/L-asparto ir D-/L-glutamato rūgštys yra atskiriamos tik dalinai, o D-/L-histidino izomerų atskirti nepavyko. Visų chiralinių aminorūgščių ir nechiralinio glicino MRM chromatogramos pateiktos 16 pav.



16 pav. D-/L-aminorūgščių ir glicino MRM chromatogramos optimizuotomis chiralinės skysčių chromatografijos sąlygomis.

2.4. Metodų įteisinimas

HILIC metodo specifiškumo įvertinimas. HILIC metodas buvo ruošiamas aminorūgščių identifikavimui. Tokio metodo įteisinimui būtina įvertinti tik jo specifiškumą. Kvadrupolinis masių analizatorius nepasižymi aukšta skiriamąja geba, tačiau tandeminis jo variantas daugialypių reakcijų stebėjimo režime reikšmingai padidina analizės specifiškumą bei sumažina fono triukšmus.



17 pav. Aminorūgščių centruotos dviejų MRM perėjimų chromatogramos.

Identifikavimo specifiškumas užtikrinamas registruojant kiekvienai rūgščiai (išskyrus alaniną ir proliną) dviejų MRM perėjimų fragmentus. Centruotos aminorūgščių dviejų MRM perėjimų chromatogramos pateiktos 17 pav.

4 lentelė. Analizių sulaikymo trukmių pasikartojamumas analizuojant trąšų mėginius su rūgščių standartų priedu.

Analitė	Sulaikymo trukmė, min				SSN, %
	Aminocat30™ (Mėginys 1)	Razormin™ (Mėginys 2)	Zytron™ (Mėginys 3)	Canelys™ (Mėginys 4)	
Ala	3,71	3,71	3,68	3,70	0,38
Arg	9,83	9,78	9,64	9,75	0,82
Asn	5,85	5,77	5,74	5,82	0,85
Asp	10,34	10,3	10,4	10,38	0,43
Cys	3,67	3,64	3,65	3,67	0,41
Gly	4,47	4,47	4,45	4,46	0,21
Gln	2,03	2,03	2,02	2,03	0,25
Glu	5,65	5,62	5,64	5,60	0,39
His	12,59	12,09	12,34	12,34	1,64
Hyp	3,79	3,78	3,80	3,79	0,22
Ile	1,80	1,80	1,79	1,78	0,53
Leu	1,97	1,96	1,96	1,95	0,42
Lys	10,46	10,47	10,48	10,4	0,34
Met	2,22	2,21	2,2	2,22	0,43
Phe	1,74	1,75	1,75	1,74	0,33
Pro	2,50	2,50	2,48	2,49	0,38
Ser	5,38	5,38	5,37	5,37	0,11
Thr	4,35	4,33	4,36	4,34	0,30
Tyr	2,57	2,55	2,57	2,56	0,37
Trp	1,74	1,74	1,73	1,72	0,55
Val	2,46	2,47	2,46	2,46	0,20

Taip pat buvo įvertintas aminorūgščių sulaikymo trukmių pasikartojamumas analizuojant realius trąšų mėginius su analičių standartų priedu (4 lentelė). Visų aminorūgščių, išskyrus histidino, sulaikymo trukmių santykinis standartinis nuokrypis neviršijo 1%.

Chiralinės chromatografijos-MS/MS metodo įteisinimas. Kiekybinio nustatymo metodas buvo įteisintas vadovaujantis ICH suderintomis gairėmis. Nustatytos metodo aptikimo ir nustatymo ribos, įvertintas metodo teisingumas ir tikslumas. Visų tirtų mėginių konsistencija iš pažiūros atrodė vienodai, gamintojų pateiktose specifikacijose skyrėsi deklaruojamas aminorūgščių kiekis. Pirminiai tyrimai parodė, kad didžiausiais aminorūgščių kiekis mėginyje A (Aminocat 30 %), tad metodo įteisinimui ir buvo pasirinktas šis mėginys.

Didelis ESI jonų šaltinio trūkumas yra tai, kad pašaliniai mėginio matricos komponentai dažnai stipriai slopina, o kartais netgi sustiprina analičių jonizacijos efektyvumą. Mėginio matricos įtaka įvertinta palyginus signalo intensyvumus, registruojamus gryname tirpiklyje paruoštam analitės standartui ir tos pačios koncentracijos standartui mėginio matricoje (prieš tai atėmus mėginyje be priedo registruojamą analitės signalą). Nustatyta, kad matricos įtaka nėra kritinė ir svyruoja nuo 92,0 iki 112,6%, (100% reikštų, kad mėginio matrica visiškai neįtakoja signalo; <100 % - signalas yra slopinamas; >100 % – signalas sustiprinamas).

Aptikimo (LOD) ir nustatymo (LOQ) ribos apskaičiuotos iš standartinių priedų eksperimentų naudojantis pateiktomis formulėmis:

$$\text{LOD} = 3,3 \sigma/S \quad (4) \quad \text{ir} \quad \text{LOQ} = 10 \sigma/S \quad (5)$$

Dėl didelio analičių skaičiaus masių spektrometro MRM režimai nebuvo suskirstyti į laiko segmentus. Todėl, siekiant neprarasti efektyvumo, kiekvieno MRM perėjimo trukmė buvo sutrumpinta iki 20 ms. Natūralu, kad tai sumažino metodo jautrį bei susiaurino tiesinį signalo intensyvumo priklausomybės nuo koncentracijos intervalą. Tačiau ir tokiose sąlygose

išmatuotos nustatymo ribos buvo pakankamos aminorūgštis trąšose nustatyti. Aminorūgščių nustatymo chiralinės HPLC-MS/MS metodu charakteristikos pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė. Aminorūgščių nustatymo chiralinės HPLC-MS/MS metodu charakteristikos

Analitė	Enantiomeras	Regresijos lygtis	Koreliacijos koeficientas, R^2	LOD, $\mu\text{g/mL}$	LOQ, $\mu\text{g/mL}$	Signalo slopinimas, %
ALA	L-	$y = 2916,5x + 9066,3$	0,9990	0,21	0,72	100,5
	D-	$y = 2800,5x + 256$	0,9997	0,08	0,26	99,1
ARG	L-	$y = 2599,8x + 6724,8$	0,9999	0,24	0,79	98,3
	D-	$y = 3414,4x - 85,1$	0,9999	0,13	0,43	100,9
ASN	L-	$y = 1254,2 + 745,7$	0,9999	0,17	0,56	92,0
	D-	$y = 1298,3x + 504,9$	0,9998	0,11	0,37	102,5
ASP	D/L-	$y = 1902,2x + 5913,6$	0,9998	0,13	0,44	96,6
CYS	L-	$y = 209,9 + 236,8$	0,9996	0,05	0,17	92,6
	D-	$y = 281,1x + 358,5$	0,9991	0,08	0,23	99,2
GLY	-	$y = 664,7 + 2797,3$	0,9995	0,12	0,42	100,3
GLN	L-	$y = 2427,9x + 2749$	0,9998	0,13	0,45	111,2
	D-	$y = 1752,1x + 191,37$	0,9999	0,13	0,44	102,0
GLU	D/L-	$y = 2285,7x + 79245$	0,9981	0,08	0,30	112,6
HIS	D/L-	$y = 1318,5x + 1951,1$	0,9993	0,08	0,27	97,1
LEU	L-	$y = 8807,1x + 15376$	0,9991	0,11	0,36	98,7
	D-	$y = 8651,7x + 710,4$	0,9998	0,11	0,35	100,8
LYS	L-	$y = 4284,1x + 15702$	0,9997	0,19	0,64	95,9
	D-	$y = 5030,3x - 616,7$	0,9999	0,15	0,48	99,7
MET	L-	$y = 2046,8x + 545,5$	0,9997	0,04	0,13	99,3
	D-	$y = 2768,9x + 465,7$	0,9999	0,15	0,50	100,2
PHE	L-	$y = 8735,2x + 11981$	0,9993	0,09	0,31	99,9
	D-	$y = 9126,9x + 614,7$	0,9999	0,05	0,16	100,9
PRO	L-	$y = 6556,2x + 12410$	0,9998	0,14	0,46	99,9
	D-	$y = 6956,1x + 3040$	0,9998	0,10	0,34	98,6
SER	L-	$y = 2243,7x + 6410$	0,9988	0,20	0,67	96,2
	D-	$y = 2411,4x + 2279$	0,9996	0,08	0,25	100,4
THR	L-	$y = 2257,7x + 5372,4$	0,9990	0,12	0,39	102,1
	D-	$y = 2226,8x + 213,6$	0,9996	0,16	0,53	99,7
TYR	L-	$y = 1712,6x + 1122,6$	0,9997	0,08	0,27	98,7
	D-	$y = 1677,3x - 9,7$	0,9999	0,11	0,36	99,1
TRP	L-	$y = 6235x + 1188,5$	0,9999	0,07	0,24	112,5
	D-	$y = 6139,9x + 233,0$	0,9999	0,04	0,13	97,8
VAL	L-	$y = 6187x + 16434$	0,9989	0,17	0,58	99,7
	D-	$y = 6926,4x + 138,2$	0,9994	0,15	0,51	99,5

6 lentelė. Aminorūgščių nustatymo teisingumo ir tikslumo įvertinimas.

Analitė	Enantiomeras	Išgava,% (SSN%)	Tą pačią dieną, SSN%			4 dienas paeiliui, SSN%		
			Mėginys A	Priedas 0,5 µg/mL	Priedas 5,0 µg/mL	Mėginys A	Priedas 0,5 µg/mL	Priedas 5,0 µg/mL
Ala	D-	88,7 (18,7)	ND ^a	5,9	2,3	ND	3,0	8,8
	L-	93,5 (3,8)	4,2	5,5	1,6	6,8	4,8	7,0
Arg	D-	95,0 (13,2)	ND	3,9	2,1	ND	13,9	5,6
	L-	92,7 (11,9)	7,4	2,0	2,6	6,2	1,9	7,3
Asn	D-	89,2 (19,6)	ND	6,7	0,4	ND	3,5	18,0
	L-	115,3 (16,7)	3,9	4,6	1,3	7,4	3,4	7,1
Asp	D-/L-	108,4 (23,1)	2,8	8,5	2,2	11,9	1,3	8,9
Cys	D-	114,8 (3,3)	ND	6,2	4,0	ND	3,4	11,7
	L-	80,5 (20,2)	ND	6,3	1,1	ND	3,6	6,4
Glu	D-/L-	92,3 (6,0)	3,9	7,1	6,5	8,4	1,5	0,8
Gln	D-	80,3 (15,9)	ND	5,9	2,0	ND	1,7	13,4
	L-	85,2 (3,8)	0,9	10,5	1,3	13,8	19,7	11,6
Gly	-	99,0 (19,1)	2,9	5,4	3,2	0,7	0,5	2,7
His	D-/L-	97,2 (11,0)	3,4	4,5	2,3	21,7	7,6	1,8
Leu/Iso	D-	95,1 (13,0)	ND	6,1	1,2	ND	1,3	5,1
	L-	98,8 (6,6)	5,9	5,8	1,5	8,9	1,8	8,8
Lys	D-	78,4 (7,2)	ND	5,6	2,1	ND	7,8	15,6
	L-	101,3 (8,9)	8,0	1,6	0,7	11,7	12,7	2,7
Met	D-	86,6 (10,9)	ND	8,6	2,8	ND	8,6	7,7
	L-	93,4 (21,7)	4,3	10,1	3,0	12,4	1,1	12,3
Phe	D-	79,8 (15,1)	ND	3,9	1,4	ND	4,6	6,4
	L-	81,0 (6,5)	7,3	7,6	2,8	0,6	6,7	9,4
Pro	D-	98,7 (6,0)	8,3	10,9	2,7	6,7	13,4	14
	L-	96,6 (15,5)	6,9	5,7	1,2	13,8	1,0	9,8
Ser	D-	95,4 (7,1)	ND	2,6	1,7	ND	5,2	18,1
	L-	97,6 (19,0)	7,4	7,0	2,4	10	0,0	2,7
Thr	D-	73,4 (11,4)	ND	4,9	1,7	ND	5,7	15,5
	L-	102,0 (13,5)	8,1	6,6	1,7	6,4	0,5	8,8
Trp	D-	106,2 (16,0)	ND	4,1	2,2	ND	5,6	9,8
	L-	116 (6,0)	7,6	7,9	6,6	8,1	8,7	5,0
Tyr	D-	98,7 (21,9)	ND	16,4	3,8	ND	2,7	14
	L-	97,0 (15,5)	3,7	7,7	4,6	19,5	3,0	14,6
Val	D-	91,1 (13,4)	ND	5,4	0,9	ND	4,3	5,0
	L-	99,4 (1,8)	4,7	7,4	1,8	5,5	0,5	10,5

^aND = nenustatytas

Metodo teisingumas buvo įvertintas priedų/išgavos metodu. Eksperimentas buvo atliktas su dviem skirtingų koncentracijų analičių priedais. Metodo

tikslumas įvertintas atliekant 4 pakartojimus tą pačią dieną ir per 4 dienas paeiliui. Metodo teisingumo ir tikslumo įvertinimo rezultatai pateikti 6 lentelėje.

2.5. Realių mėginių analizė

HILIC-MS/MS metodas buvo pritaikytas laisvų aminorūgščių identifikavimui hidrolizuotų trąšų ir augalinių ekstraktų mėginiuose. Optimizuota mėginių paruošimo procedūra: 0,500 g mėginio skiedžiama 10 ml 1 mol/l acto rūgšties tirpalo vandenyje ir acetonitrilo mišiniu (tūrių santykiu 1:5) ir 10 min veikiama ultragarsu.

7 lentelė. Identifikuotos aminorūgštys keturiuose komerciniuose trąšų ir dirvos papildų produktuose.

Aminorūgštis	Aminocat30 TM Mėginys 1	Razormin TM Mėginys 2	Zytron TM Mėginys 3	Canleys TM Mėginys 4
Ala	+ ^a	+	+	+
Arg	+	+	+	+
Asn	+	ND	+	ND
Asp	+	+	ND	ND
Cys	ND ^b	ND	ND	ND
Gly	+	+	+	ND
Gln	+	ND	ND	ND
Glu	+	+	ND	ND
His	+	+	+	+
Hyp	+	+	ND	ND
Ile	+	+	+	+
Leu	+	+	+	+
Lys	+	+	+	+
Met	+	+	ND	ND
Phe	+	+	+	+
Pro	+	+	+	+
Ser	+	+	+	+
Thr	+	+	+	+
Tyr	+	+	+	+
Trp	+	+	+	+
Val	+	+	+	+

^a+ = analizė identifikuota.

^bND = nenustatyta.

Po ekstrakcijos mėginys skiedžiamas acetonitrilu santykiu 1:1, 2 min centrifuguojamas (10 000 aps/min) ir supernatantas filtruojamas per 0,2 μm nailono filtrą. Gautas ekstraktas skiedžiamas pradine judria faze ir analizuojamas. 7 lentelėje pateikti aminorūgščių identifikavimo rezultatai keturiuose komerciniuose produktuose.

Kiekybiniam aminorūgščių nustatymui pasirinkta tokia ekstrakcijos procedūra: 0,100 g mėginio 1 min ekstrahuojamas intensyviai maišant su 10 ml heptafluorsviesto rūgštimi parūgštinto (pH 1,5) vandeninio tirpalo. Po to, mėginys 15 min centrifuguojamas 3000 aps/min greičiu ir filtruojamas 0,2 μm nailono filtru. Filtratas skiedžiamas pradine judria faze ir analizuojamas. Papildomai buvo įvertinta aminorūgščių racemizacijos ekstrakcijos metu galimybė ir nustatyta, kad ekstrakcijos metu racemizacija nevyksta. Dėl nepakankamos skiriamosios gebos buvo nustatytas tik bendras asparto rūgšties, glutamo rūgšties ir histidino enantiomerų kiekis. Tuo tarpu leucino ir izoleucino kiekiai nustatyti kaip D-Leu/Ile ir L-Leu/Ile kiekių suma. Penkių komercinių hidrolizuotų baltymų trąšų analizės rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. Aminorūgščių nustatymo komerciniuose trąšų mėginiuose rezultatai (n = 3).

Analitė	Enantiomeras	Nustatytas kiekis, mg/g (±SN)				
		Mėginys A	Mėginys B	Mėginys C	Mėginys D	Mėginys E
Ala	D-	ND ^a	0,3 (0,1)	1,7 (0,2)	14,0 (0,3)	2,1 (0,3)
	L-	9,2 (0,2)	7,8 (0,7)	2,7 (0,3)	15,9 (0,4)	3,9 (0,3)
Arg	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	7,1 (1,4)	9,5 (1,7)	0,82 (0,01)	1,1 (0,1)	1,2 (0,3)
Asn	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	1,9 (0,5)	1,8 (0,4)	0,07 (0,02)	ND	ND
Asp	D-/L-	10,9 (0,8)	14,9 (0,5)	0,25 (0,05)	12,5 (1,5)	ND
Cys	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	ND	ND	ND	ND	ND
Glu	D-/L-	151,6 (5,5)	34,4 (5,0)	0,50 (0,1)	11,5 (0,6)	31,9 (1,5)
Gln	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	0,6 (0,1)	2,8 (0,5)	0,05 (0,02)	ND	1,72 (0,5)
Gly	-	18,8 (0,6)	38,0 (5,0)	5,3 (0,2)	68,2 (5,0)	11,2 (1,5)

His	D-/L-	5,7 (0,3)	9,3 (2,0)	0,30 (0,05)	2,6 (0,1)	1,49 (0,2)
Leu/Iso	D-	ND	ND	ND	5,5 (0,5)	0,55 (0,1)
	L-	3,4 (0,7)	2,7 (0,2)	0,63 (0,04)	2,0 (0,1)	0,49 (0,05)
Lys	D-	ND	ND	ND	5,8 (0,5)	ND
	L-	27,7 (0,9)	24,8 (1,3)	0,52 (0,01)	6,1 (1,0)	2,4 (0,4)
Met	D-	ND	ND	ND	0,62 (0,1)	ND
	L-	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,25 (0,1)	0,63 (0,1)	0,4 (0,2)
Phe	D-	ND	0,6 (0,1)	0,03 (0,01)	1,5 (0,1)	0,35 (0,1)
	L-	4,3 (0,4)	4,6 (0,1)	0,37 (0,1)	1,7 (0,1)	0,68 (0,2)
Pro	D-	1,0 (0,2)	2,1 (0,3)	0,18 (0,03)	10,8 (0,3)	1,6 (0,3)
	L-	5,9 (1,0)	6,6 (1,0)	0,18 (0,04)	11,4 (0,2)	1,9 (0,3)
Ser	D-	ND	ND	ND	1,5 (0,2)	ND
	L-	8,6 (0,1)	7,3 (1,6)	0,24 (0,1)	0,56 (0,05)	2,0 (0,2)
Thr	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	7,7 (0,1)	7,9 (0,4)	0,8 (0,3)	ND	0,6 (0,1)
Trp	D-	ND	ND	ND	ND	ND
	L-	1,4 (0,4)	1,4 (0,5)	0,07 (0,01)	ND	0,25 (0,03)
Tyr	D-	ND	ND	ND	0,80 (0,1)	ND
	L-	3,0 (0,4)	3,0 (0,4)	0,20 (0,03)	1,7 (0,1)	0,70 (0,1)
Val	D-	ND	ND	0,02 (0,01)	1,1 (0,1)	0,03 (0,01)
	L-	2,0 (0,3)	7,7 (0,4)	0,61 (0,1)	1,6 (0,2)	0,42 (0,01)

^aND = nenustatyta.

9 lentelė. Deklaruojamų ir nustatytų aminorūgščių kiekių trąšose palyginimas
(n = 3).

Mėginys	Produkto pavadinimas	Deklaruojamas aminorūgščių kiekis	Nustatytas L-aminorūgščių kiekis, % (±SN)	Nustatytas D-aminorūgščių kiekis, % (±SN)
A	Aminocat30 TM	30% laisvų L-a.r.	27,0 (1,4)	<0,1
B	Terra Sorb Complex TM	20% laisvų L-a.r.	18,5 (2,2)	0,3
C	ILSA Drip Forte TM	Bendras a.r. kiekis > 50%. Yra laisvų L-formos a.r.	1,4 (0,2)	0,2
D	Protifert LMW8 TM	Bendras a.r. kiekis 50%, laisvų a.r. 15 %. Nėra informacijos apie a.r. poliarizaciją.	12,3 (0,2)	4,2 (0,2)
E	Rutter TM	Informacijos nepateikia.	6,1 (0,6)	0,5 (0,1)

^aEnantiomeriškai neatskirtų aminorūgščių ir glicino kiekis pridėtas prie bendro L-aminorūgščių kiekio.

Nustatyti bendri laisvų aminorūgščių kiekiai buvo palyginti su gamintojų deklaruojamais jų kiekiais (9 lentelė). Analizės rezultatai rodo, kad daugiausiai laisvųjų L-aminorūgščių yra mėginiuose A ir B. Tuo tarpu mėginys D yra enantiomeriškai „nešvariausias“.

IŠVADOS

1. Iš trijų tirtų HILIC stacionariųjų fazių (Atlantis HILIC, BEH HILIC ir BEH Amide) BEH Amide sorbentas pasižymi geriausiu aminorūgščių atskyrimu. Dėl mažesnio laisvų silanolinių grupių skaičiaus BEH Amide sorbento paviršiuje silpniau pasireiškia antrinė jonų mainų sąveika.
2. Aminorūgščių sulaikymas HILIC sąlygomis negali būti apibūdintas vien tik adsorbcijos ar pasiskirstymo mechanizmais. Geriausiai analičių sulaikymas ($R^2 \geq 0,993$) aprašomas mišriu adsorbcijos/pasiskirstymo modeliu, įvertinančiu analitės-judrios fazės-sorbento sąveikas.
3. Aminorūgštys ant teikoplaninu modifikuoto chiralinio sorbento yra sulaikomos HILIC mechanizmu. Sulaikymas geriausiai aprašomas mišriu adsorbcijos/pasiskirstymo modeliu, kuriame adsorbcija dominuoja prieš pasiskirstymą.
4. Dėl neigiamo daugelio aminorūgščių enantiomerų pernašos iš judrios į stacionariąją fazę entalpijos pokyčio, enantio-skiriamoji geba didėja mažinant kolonėlės temperatūrą.
5. Teigiamos elektropurkštuvinės jonizacijos tandeminė masių spektrometrija daugialypių reakcijų stebėjimo režime yra jautrus ir atrankus metodas aminorūgštims detektuoti.
6. HILIC-MS/MS metodas pasižymi puikiu specifiškumu aminorūgštims identifikuoti biologinėse matricose. Analčių sulaikymo trukmių pasikartojamumas trąšų mėginiuose neviršija 1%. Metodas sėkmingai pritaikytas aminorūgštims identifikuoti komerciniuose trąšų produktuose.
7. Chiralinės HPLC-MS/MS metodas nejautrus trąšų matricos įtakai: matricos įtaka aminorūgščių signalui – 92,0-112,6%. Aminorūgščių išgavos iš trąšų siekia 73,4-115,3%, o rezultatų SSN \leq 21,9%. Aminorūgščių enantiomerai nustatyti penkiuose komerciniuose trąšų produktuose. Trąšose išmatuotas

bendras aminorūgščių kiekis ir enantio grynumas koreliuoja su gamintojų deklaruojamomis vertėmis.

AUTORIAUS MOKSLINIŲ DARBŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS

Straipsniai recenzuojamuose žurnaluose:

1. **Taujenis L.**, Valasinavičiūtė I., Olšauskaitė V., Padarauskas A. Identification of α -amino acids by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry in fertilizers. *Chemija*, 2014, Vol. 25, No. 2, 101-106.
2. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Enantioselective determination of protein amino acids in fertilizers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry on chiral teicoplanin stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62, 11099-11108.

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

1. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Enantioselective determination of essential α -amino acids in fertilizers by HPLC-MS/MS. In: 8th International Scientific Conference, „The Vital Nature Sign“, Kaunas, Lithuania, 2014 May 15-17, L-13, p. 24, oral presentation.
2. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Amino acid identification by HILIC-MS/MS and enantioselective determination by chiral chromatography-MS/MS in hydrolyzed protein fertilizes samples. In: International Conference of Lithuanian Chemical Society, Chemistry and Chemical Technology 2015, Vilnius, Lithuania, 2015 January 23, PP-72, p. 219-222.

MOKSLINIAI DARBAI, NEĮTRAUKTI Į DAKTARO DISERTACIJĄ

Straipsniai recenzuojamuose žurnaluose:

1. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V. Identification of main constituents of historical textile dyes by ultra performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Chemija*, 2012, Vol. 23, No. 3, p. 210-215.

2. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Determination of nicotine and three minor alkaloids in tobacco by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, 2015, Vol. 27, p. 373-385.
3. **Taujenis L.**, Padarauskas A., Mikaliūnienė J., Cesevičienė J., Lemežienė N., Butkutė B. Identification of isoflavones and their conjugates in red clover by liquid chromatography coupled with DAD and MS detectors. *Chemija*, 2015, Vol. 26, p. 107-111.
4. N. Lemežienė, A. Padarauskas, B. Butkutė, J. Cesevičienė, **L. Taujenis**, E. Norkevičienė, J. Mikaliūnienė. The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage. *Žemdirbystė-Agriculture*, 2015, Vol. 102, p. 443-448.
5. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Comparison of RPLC and HILIC coupled with tandem mass spectrometry for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits. *Chemija*, 2016, Vol. 27, p. 52-59.
6. **Taujenis L.**, Padarauskas A., Cesevičienė J., Lemežienė N., Butkutė B. Determination of coumestrol in lucerne by ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemija*, 2016, Vol. 27, p. 60-64.

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

1. **Taujenis L.** Analysis of phosphorothioates by UPLC-MS. In: 8th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Dubrovnik, Croatia, July 6-12, (2014) OP26.
2. **Taujenis L.**, Sobott F. Priemaišinių junginių įtaka baltymų nanoESI jonizacijos efektyvumui, konferencijos „Doktorantų stažuotės užsienio centruose“ medžiaga, Vilnius, 2013, P-07, p. 74-75.
3. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Determination of Tobacco Alkaloids by Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass

- Spectrometry. In: 11th International Conference of Lithuania`s Chemists, Vilnius, Lithuania, 2013 September 27, P.53.
4. **Taujenis L.**, Olšauskaitė V., Padarauskas A. Determination of Ascorbic and Dehydroascorbic Acids by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In: 29th International Symposium on Chromatography, Torun, Poland, 2012, September 9-14, S2-P99, p. 375.
 5. Žilinskas A., Sereikaitė J., **Taujenis L.**, Bilinska A. The enantioselective reduction of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione with some vegetables of the family *Apiaceae*. In: Balticum Organicum Syntheticum, *International conference on Organic Synthesis*, Program and Abstracts Book, Tallinn, Estonia, 2012, July 1-4, PO 161, p. 208.

SUMMARY

Hydrolyzed protein fertilizers (HPF) are alternative nitrogen source for plants used in agriculture. The aim of the doctoral dissertation was to develop fast, reliable and effective liquid chromatography-tandem mass spectrometry techniques for the identification and enantioselective determination of protein amino acids in hydrolyzed protein fertilizers.

Direct assay of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) detection was developed for the separation and identification of amino acids. Among three HILIC stationary phases (Atlantis HILIC, BEH HILIC and BEH Amide) investigated, BEH Amide provides the best performance for the separation of amino acids. The results suggest that neither adsorption nor partition dominates the retention processes of amino acids in HILIC separation mode. The retention is caused by the mixed partition/adsorption retention mechanism and can be best described ($R^2 \geq 0.993$) by the model which considers analyte-mobile phase-stationary phase interactions. HILIC-MS/MS method exhibits excellent specificity for the identification of amino acids in biological matrices. The retention time RSD values in spiked samples were less than 1%. The method was successfully applied for the identification of the amino acids in commercial fertilizers.

Chiral high performance liquid chromatography (HPLC) on a glycopeptide antibiotic teicoplanin-based stationary phase coupled to tandem mass spectrometry was developed for fast and reliable enantioseparation and determination of protein amino acids. It was showed that amino acids on teicoplanin based chiral stationary phase exhibit typical HILIC retention behavior. For most amino acids the resolution of enantiomers increases as the column temperature decreases. Under optimized conditions, the majority (15 of 19) of D/L-amino acid pairs were resolved with a resolution factor higher than 1.5 with a run time of 15 min. The method was validated in terms of linearity, limits of detection, limits of quantitation, precision, and accuracy. Chiral HPLC-MS/MS method is robust against sample matrix: signal suppression was in the range 92.0–112.6%. The recoveries ranged from 73.4% to 115.3% with acceptable reproducibility ($RSD \leq 21.9\%$). Individual amino acid enantiomers were quantified in five commercial fertilizer samples. For most samples the determined values agreed well with the declared amounts.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Vardas ir Pavardė	Lukas Taujenis
Gimimo data	1986-06-11
Gyvenamasis adresas	Volungės g. 12 – 22, Vilnius
El. paštas	lukastaujenis@gmail.com
Telefonas	8-698-07976
Šeimyninė padėtis	Vedęs

AUKŠTASIS IŠSILAVINIMAS		
Aukštoji mokykla	Baigimo metai	Igyta kvalifikacija
Vilniaus universitetas	2009	Chemijos magistro kvalifikacijos laipsnis

DARBO PATIRITS		
Metai	Darbovietė	Pareigos
2015 - dabar	Thermo Fisher Scientific Baltics	Mokslo darbuotojas
2012 - 2015	Chemijos fakultetas, Vilniaus universitetas	Jaunesnysis mokslo darbuotojas
2011 - 2015	Chemijos fakultetas, Vilniaus universitetas	Vyresnysis specialistas
2009 - 2012	Šiaulių Didždvario gimnazija	Chemijos mokytojas
2009 - 2011	Gamtos mokslų fakultetas, Šiaulių universitetas	Laboratorijos vedėjas
2007 - 2009	Medžiagotyros ir taikomųjų mokslų institutas, Vilniaus universitetas	Technikas

Mokamos užsienio kalbos (nurodant jų mokėjimo lygį – puikiai, gerai, silpnai)					
Kalba	Anglų	Prancūzų	Vokiečių	Rusų	Kitos
	Puikiai	-	-	Gerai	-

MOKSLINĖS STAŽUOTĖS UŽSIENYJE		
Vieta	Trukmė	Metai
Antverpeno universitetas, Belgija	4 mėn	2013