PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
1999 - 770

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
G 01 N 30/06
G 01 N 33/48

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.03.1999**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(71) Přihlašovatel:
HUŠEK Petr Ing. DrSc., Praha, CZ;

(72) Původce:
Hušek Petr Ing. DrSc., Praha, CZ;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin a souprava pro tuto přípravu

(57) Anotace:

Způsob přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin v přírodních materiálech, zejména v tělních tekutinách, plynovou chromatografií, při kterém se výchozí materiál, popřípadě se standardem, nanese na sloupec iontoměniče stálého v alkalickém prostředí, sloupec se promyje směsí vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou, zachycené aminokyseliny se vytěsní promytím sloupce směsí vody nebo až 6% vodného roztoku chloridu sodného, s obsahem 0,1 až 3 % hmotn. hydroxydu nebo uhličitanu alkalického kovu, alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku a pyridinové báze, aminokyseliny obsažené v eluátu se derivatizují přidáním alkyl-chlorformiátu s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylové skupině, reakční směs se vytřepe organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou a použije se k nástřiku do chromatografického přístroje. Souprava obsahuje nádobku s hustou suspenzí iontoměniče, špičku s filtrem, aplikátor s pístem, aplikační, promývací a eluční medium, derivatizační činidlo a extrakční rozpouštědlo.

CZ 1999 - 770 A3

Způsob přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin a souprava pro tuto přípravu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu velmi rychlé přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin v přírodních materiálech, zejména v tělních tekutinách, plynovou chromatografií a soupravy činidel a pomůcek vhodných pro tuto přípravu.

Dosavadní stav techniky

Stanovení jednotlivých členů řady dvaceti proteinových aminokyselin stálo v popředí zájmu analytiků druhé poloviny dvacátého století a zájem o stále lepší, rychlou a účinnou metodu nepolevuje ani v současnosti.

Používané metody tohoto stanovení souvisejí s chronologií dostupných technik. Na počátku padesátých let to byla chromatografie nativních aminokyselin na iontoměničích, kdy byly aminokyseliny po separaci vystaveny působení ninhydrinu a detekovány fotometricky. Tento postup byl brzy automatizován a automatizované analyzátory aminokyselin (AAA) jsou na trhu nabízeny již téměř půl století. Pro zvýšení citlivosti stanovení je možno použít namísto ninhydrinu například fluorescein nebo o-ftalaldehyd a detekovat fluorometrií, což zvyšuje dolní mez stanovitelnosti o 2 až 3 řády. Toto použití jednoúčelových analyzátorů aminokyselin je ještě i dnes časté a populární, protože je dostatečně robustní a vhodné zejména pro stanovení fyziologických aminokyselin (pochopitelně po deproteinaci séra či plasmy). Podstatnou nevýhodou této metody je doba trvání jedné analýzy, která se pohybuje okolo 3 hodin.

Jako alternativní přístup dominovala v šedesátých a sedmdesátých letech rychle se rozvíjející technika plynové

chromatografie a od osmdesátých let až dodnes pak její separačně účinnější varianta, kapilární plynová chromatografie, která umožňuje analyzovat profil aminokyselin v řádu minut, zpravidla do 20 minut. Výraznou předností této metody je i její vysoká citlivost, která se při použití universálního detektoru pohybuje v oblasti pikomolů, při použití selektivních detektorů pak v oblasti ještě o 2 až 3 řády nižší. Analýza pomocí plynové chromatografie vyžaduje vždy provedení derivatizace, tj. přeměny molekuly na neiontovou těkavou formu odpařitelnou v horkém nástřiku přístroje. V průběhu tří dekád byly publikovány stovky postupů, jak směs proteinových aminokyselin účinně chemicky modifikovat. Vesměs se vždy vycházelo z bezvodého prostředí (suchého odparku), používala se kombinace více reaktivních činidel v oddělených krocích a reakční směs bylo nutno zahřívat, často dokonce nad 100 °C. Dnes nejpopulárnější universální silylační činidla se pro chemickou modifikaci tohoto druhu příliš neosvědčila a proto byla opuštěna. Pracné a zdlouhavé derivatizace aminokyselin byly největší nevýhodou stanovení aminokyselin pomocí plynové chromatografie.

Před deseti lety objevil původce tohoto vynálezu reakční podmínky, za kterých je možno použít jako univerzální derivatizační činidla estery kyseliny chlormravenčí, které jsou současně s alkylací aminoskupin a fenolických skupin schopny esterifikovat i karboxyl. Reakce nevyžadovala bezvodé prostředí, nutná však byla přítomnost pyridinu a alkoholu odpovídajícího alkoholickému zbytku shora uvedeného esteru. Vlastní derivatizace se pak z časového hlediska stala časově zanedbatelnou záležitostí.

Problémem ovšem stále zůstává pokud možno jednoduchá a časově nenáročná deproteinizace výchozího materiálu, bez které nelze úspěšné stanovení chromatografickými technikami uskutečnit.

S nástupem vysoceúčinné kapalinové chromatografie

(HPLC) v sedmdesátých létech se zájem analytiků přesunul do této oblasti. Zjednodušené představy o snadné separaci a UV-detekci nativních aminokyselin se však nenaplnily. Pro detekci se po čase osvědčil zejména detektor fluorimetrický a elektrochemický a protože aminokyseliny v nativní formě nefluoreskují (s výjimkou tryptofanu) ani nejsou elektropozitivní, je třeba jejich molekuly rovněž chemicky modifikovat, tj. vhodným činidlem (reakcí) vnést do jejich molekuly příslušný fluoro- či elektrofor. V zásadě je možno chemickou modifikaci provést před separací aminokyselin nebo po separaci. V prvém případě se separují již derivatizované formy, ve druhém případě pak nativní aminokyseliny, které se pak na výstupu z kolony derivatizují rychle reagujícími činidly. Z technických důvodů se používá zejména předseparační modifikace a separace se provádí na náplňových kolonách s oktadecyl-modifikovaným silikagelem za použití gradientové eluce. V takovýchto případech trvá analýza profilu proteinových aminokyselin ve většině případů kolem 60 minut, což je doba značně delší než při stanovení plynovou chromatografií. Pro tento způsob stanovení jsou k dispozici i komerčně dostupné plně automatizované systémy od předních světových výrobců (Waters, HP, Varian, Merck apod.).

Určité přednosti techniky HPLC zmíněné výše se ovšem mohou projevit pouze v případě nefyziologických vzorků, protože při stanoveních fyziologických aminokyselin v tělních tekutinách (například v plazmě) je naprosto nezbytná deproteinizace vzorku. Jakékoli zbytkové proteiny totiž mohou způsobit ucpání analytické kolony v separačním procesu, který probíhá za vysokých tlaků.

Další problémy souvisejí s volbou derivatizačních činidel při použití techniky HPLC. K dispozici je řada různých derivatizačních činidel a desítky derivatizačních postupů. Většinu derivatizací je sice možno provádět ve vodném prostředí a i vlastní derivatizace je velmi rychlá a

04.03.99

pohybuje se obvykle v řádu několika minut, nevýhodou je ovšem značná labilita derivatizovaných forem při použití některých činidel, skutečnost, že některá činidla nereagují se všemi aminokyselinami, technické problémy spojené s nutností odstranit v některých případech všechny stopy použitého činidla před vlastním stanovením apod. Toto vše je popsáno v desítkách publikací a bližší diskuse o tomto problému se vymyká z rámce popisu dosavadního stavu techniky.

Pro úplnost je třeba se ještě zmínit o technice elektroforézy v kapiláře, na níž se soustředil zájem v devadesátých letech. V oblasti analýzy celého spektra proteinových aminokyselin je to však spíše módní záležitost a publikované postupy dosud zpravidla nejdou za rámec pokusů separace chemických standardů. Své uplatnění a atraktivitu nachází tato metoda v současné době zejména v oblasti analýzy biopolymerů, proteinů a oligo-nukleotidů, její další rozvoj, a to i v oblasti stanovení profilu aminokyselin v různých druzích materiálu, je však možno očekávat.

Jak vyplývá z předchozího popisu dosavadního stavu techniky, nejsou nevýhody spojené s aplikací modernějších analytických metod, konkrétně plynové chromatografie a vysokotlaké kapalinové chromatografie, spojeny s vlastním stanovením, ale spíše s přípravou vzorku pro toto stanovení. Výsledkem je, že derivatizačně náročné postupy, které až dosud vesměs vyžadovala plynová chromatografie, a naopak separačně a detekčně problematická stanovení pomocí HPLC nepředstavují žádoucí alternativy, takže mnohá pracoviště si ponechávají v záloze a někdy dávají i předost zastaralé a pomalé metodě AAA.

Podstata vynálezu

Shora zmíněné nevýhody řeší způsob podle vynálezu, konkrétně způsob přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin v

přírodních materiálech, zejména v tělních tekutinách, plynovou chromatografií, spočívající v tom, že se výchozí materiál aplikuje na sloupec iontoměniče stálého v alkalickém prostředí, sloupec se promyje směsí vody a rozpouštědla mísitelného s vodou, zachycené aminokyseliny se vytěsní promytím sloupce níže definovanou eluční/reakční směsí, aminokyseliny obsažené v eluátu se derivatizují přidáním alkyl-chlorformiátu s 1 - 4 atomy uhlíku v alkylové skupině, reakční směs se vytřepe rozpouštědlem nemísitelným s vodou a organická fáze se, po případném promytí zředěnou kyselinou, s výhodou kyselinou chlorovodíkovou, používá k nástřiku do chromatografického přístroje.

Podstatným znakem způsobu podle vynálezu je možnost vyhnout se nutnosti provádění deproteinace a odpařování eluátu před vlastní derivatizací, tedy bez dvou kroků, které stanovení podstatně prodlužovaly a prakticky znemožňovaly jeho automatizaci. Při práci způsobem podle vynálezu totiž proteiny obsažené ve výchozím materiálu sloupečkem iontoměniče z větší části buď přímo protečou při nanášení materiálu na iontoměnič nebo jsou ze sloupečku vymyty při následujícím promývání. Odpařování eluátu není nutno provádět vůbec.

Při prověřování jinak standardně prováděné deproteinace bylo zjištěno, že nejlepších výsledků při současně nejjednodušším provedení se dosahuje v případě, že se materiál, například plazma, aplikuje na sloupec iontoměniče při zachování původního neutrálního pH, tj. bez jakékoli úpravy, a to buď bez ředění nebo po naředění v objemovém poměru až 1 : 1 vodným roztokem redukčního činidla, například $Na_2S_2O_5$, dithiothreitolu nebo dithioerythtritolu. Posledně zmíněná dvě činidla se používají vždy, pokud se stanovuje homocystein. Tento vodný roztok může dále obsahovat interní standard, s výhodou norvalin. Pro porovnání lze uvést, že při analýzách prováděných technikou HPLC se jako

deproteinační činidla používají obvykle kyselina sulfosalicylová, kyselina trichloroctová a acetonitril. Výsledky dosažené při práci způsobem podle vynálezu, tedy bez deproteinace, se shodují s výsledky dosahovanými při deproteinaci pomocí kyseliny sulfosalicylové. Výsledky dosahované při použití kyseliny trichloroctové vykazují značnou variabilitu, zejména při vyšších finálních koncentracích (10 %) a acetonitril vykazuje nižší hodnoty pro lysin a ornithin.

Vzhledem k alkalitě elučního a reakčního média, jak bude ještě diskutováno dále, jsou materiály na bázi silikagelu méně vhodné pro limitovaný rozsah jejich použití v oblasti pH 2 - 8. Jako vhodná matrice pro navázané sulfhydrylové skupiny, které jsou vlastním měničovým agens, se ukázala být klasická styren-divinylbenzenová matrice s příčným sítěním 2, 4 nebo 8 %. Jde tedy o klasické měniče typu Dowex nebo AG 50W. Vyšší sítění je prospěšné, protože snižuje objem nabobtnání materiálu (typ x2 zvyšuje objem téměř desetinásobně, typ x8 pouze trojnásobně). Vyšší inkorporace divinylbenzenu však zvyšuje aromaticitu materiálu což má za následek, že zpětný výtěžek aromatických aminokyselin (fenylalaninu, tyrosinu, tryptophanu) klesá u typu x8 až na cca 60 %. Tento nedostatek se dá při práci způsobem podle vynálezu odstranit tím, že následná derivatizace se provádí v přímnosti ionexového lože (po jeho vytěsnění do reakční nádoby, kde se derivatizace provádí), přičemž výtěžky derivatizace tím nejsou nepříznivě ovlivněny. Z materiálů x2 a x4 je možno všechny aminokyseliny získat klasickou elucí, nicméně i v jejich případě lze derivatizaci provádět v přítomnosti ionexového lože.

Kapacita iontoměniče typu 50W je značná, přibližně 5,2 μekv/mg. Experimentálně bylo ověřeno, že pro 100 μl séra (obsah kompetitivně působících Na^+ kationtů je 15 μmol) postačuje přibližně 1,5násobek kapacity měniče, tedy 4 - 5

mg, což objemově (po nabobtnání) odpovídá přibližně 12, 20 a 35 µl ionexového lože typů x8, x4 resp. x2 (zrnění buď 100/200 nebo 200/400 mesh).

Po nanesení vzorku výchozího materiálu na sloupec iontoměniče dojde k zachycení aminokyselin a částečně i proteinů, přičemž zachycená část proteinů, jak již bylo zmíněno výše, se odstraní následným promytím sloupce iontoměniče. Toto promývání se může v podstatě provádět jakýmkoli rozpouštědlem mísitelným s vodou, například isopropanolem, acetonitrilem či acetonem, s výhodou se však k tomuto účelu používá kombinace svým složením co nejbližší elučnímu/reakčnímu prostředí popisovanému dále. Proto se s výhodou používá směs vody a přímého či rozvětveného alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylové skupině, zejména směs vody a ethanolu v objemovém poměru 2 : 1, nebo vody a propanolu v objemovém poměru 3 : 1.

Zachycené aminokyseliny se ze sloupce vymývají vhodným elučním činidlem, které s výhodou může sloužit i jako reakční prostředí pro následující derivatizační reakci s esterem kyseliny chlormravenčí. Jako toto reakční prostředí se obvykle používá směs vody nebo až 6% vodného roztoku chloridu sodného, přímého nebo rozvětveného alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku a pyridinové báze. Objemový poměr vodné složky k alkanolu se pohybuje od 1 : 1 do 5 : 1, výhodně od 1,5 : 1 do 4 : 1, a koncentrace pyridinové báze v tomto vodně-alkoholickém prostředí se pohybuje mezi 5 a 15 % obj. Výhodnými pyridinovými bázemi jsou zejména samotný pyridin a jeho methylderiváty (pikoliny), nejvýhodněji samotný pyridin.

Zmíněné eluční/reakční protředí není schopno vytěsnit z lože iontoměniče bázické aminokyseliny, tj. lysin, ornithin, histidin a arginin. S překvapením bylo zjištěno a experimentálně ověřeno, že přidáním 0,1 až 3 % hmot. hydroxidu nebo uhličitanu alkalického kovu, s výhodou přibližně 1 % hmot. hydroxidu sodného, do vodné složky je

možno tyto aminokyseliny z lože iontoměniče vytěsnit, přičemž tento přídavek zásady nejenže reakci s chlormravenčanem nebrání, ale poskytuje vyšší výtěžek bázických aminokyselin a také kyseliny glutamové. V případě kyseliny glutamové jako shora uvedená zásada lépe vyhovuje hydroxid alkalického kovu.

Derivatizace se provádí buď v eluátu získaném vymytím sloupce výše uvedeným elučním činidlem, nebo přímo ve směsi elučního/reakčního činidla s ionexem, po vytěsnění této směsi do reakční nádoby pro derivatizaci.

Derivatizace se provádí ve shora uvedeném prostředí přidáním alkylesteru kyseliny chlormravenčí s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylové skupině. Výtečných výsledků se dosahuje při použití ethyl-chlorformiátu nebo propyl-chlorformiátu, který se přidává ve dvou podílech s odstupem asi 1 minuty. Reakční činidlo se obvykle přidává ve směsi s organickým rozpouštědlem, například s acetonitrilem, nebo se směsí rozpouštědel, přičemž s výhodou je jedním z těchto rozpouštědel rozpouštědlo používané k následující extrakci. Zvlášť výhodných výsledků se dosahuje se směsí acetonitril - dichlormethan - ethyl-chlorformiát v poměru 3 : 3 : 2 nebo směsí acetonitril - dichlormethan - propyl-chlorformiát v poměru 1 : 1 : 1. Derivatizace se obvykle provádí při teplotě místnosti.

Derivatizované aminokyseliny se z vodného reakčního prostředí vytřepou do rozpouštědla nemísitelného s vodou, zejména do chlorovaného uhlovodíku, s výhodou do dichlormethanu nebo chloroformu, nebo terc.butylmethyletheru, popřípadě ve směs s dichlormethanem v poměru 2 : 1, které může obsahovat malé množství chlormravenčanu používaného k derivatizaci. Osvědčuje se zejména dichlormethan s obsahem cca 2 % ethyl-chlorformiátu nebo propyl-chlorformiátu. Po protřepání vodné a organické vrstvy se organická vrstva oddělí, pyridin a zbytek alkoholu se z ní popřípadě odstraní vytřepáním vodným roztokem kyseliny, s výhodou kyseliny

chlorovodíkové a organická fáze se aplikuje do chromatografického přístroje, zpravidla po přidání malého množství bezvodého síranu sodného, který slouží k odstranění zbytků vody přítomných v organickém rozpouštědle.

Jako analytických kolon je možno použít kapilár z taveného křemene o průměru 0,18 až 0,32 mm a délce 5 až 15 m, nejlépe se středně polární fází typu 1701. Rychlost teplotní programace 25 až 40 °C/min. umožňuje získat profil aminokyselin v tělních tekutinách v době kratší než 8 minut. Pro stanovení profilu aminokyselin v moči je možno použít kolony s běžnými druhy silikonových fází (typ 1, 5, 35 apod.), kdy připojením krátké předkolony s polární fází se dosáhne optimální separace.

Jak již bylo uvedeno výše, je kapacita používaných iontoměničů typu Dowex vysoká. Komerčně dostupné kolonky plněné iontoměničovými materiály jiného typu mívají množství náplně 30 a více mg, přičemž pro přípravu vzorku podle vynálezu by postačovalo 4 - 5 mg iontoměniče typu Dowex.

V souladu s vynálezem byl nalezen způsob, který řeší vytvoření sloupečku žádaného iontoměniče *in situ*, a to v několika sekundách. K tomuto účelu lze použít špičky laboratorních pipet s filtry, které se dodávají s různě velkými objemy prostoru pod filtrem, obvykle od 12 do 50 mikrolitrů a více. Pomocí špičky a aplikátoru s pístem (tzv. setter) se provede nasátí mokré kaše iontoměniče do prostoru pod filtrem, jímž je tedy přesně určen objem vzniklého lože iontoměniče. Stejným postupem se přes vzniklé lože on-line nasaje analyzovaná tělní tekutina (obvykle 50 až 100 µl plazmy nebo séra nebo 100 až 200 µl moče, s norvalinem jako standardem), promývací roztok (například 200 µl směsi vody a alkoholu v poměru 2 : 1) a dalším povytažením pístu se lože měniče prosuší nasávaným vzduchem. Obsah setteru se vylije a poté se přes lože měniče nasaje eluční/reakční medium (cca 200 až 300 µl podle druhu a objemu měniče). Po vytlačení

04.03.98

eluátu do reakční nádobky se pak provede shora popsaná derivatizace chlormravenčanem.

I v případě, že by se z lože měniče nepodařilo vytěsnit veškeré množství zachycených aminokyselin, což se může stát v případě aromatických aminokyselin, zejména při použití styren-divinylbenzenových měničů s 8% příčným zesítěním, jak je zmiňováno výše, lze snadno postupovat tak, že se do reakční nádobky vytlačí i lože měniče a derivatizace se provede v jeho přítomnosti, přičemž výtěžky derivatizace nejsou nijak podstatně ovlivněny. Z hlediska zpětného výtěžku aromatických aminokyselin může být derivatizace za přítomnosti lože měniče výhodná.

Z výše uvedeného popisu je zřejmé, že příprava vzorků způsobem podle vynálezu je nesmírně jednoduchá, probíhá on-line systémem, umožňuje i zcela novou a dosud nepoužívanou přípravu lože iontoměniče o přesně definovaném objemu a co do rychlosti zpracování vzorku, rychlosti analýzy a materiálových nákladů nemá v současné době konkurenci. Celý profil aminokyselin je od okamžiku obdržení vzorku možno získat za 15 až 20 minut. Reprodukovatelnost popisovaného stanovení a dobrá shoda s výsledky stanovení aminokyselin klasickým AAA systémem potvrzují mimořádnou výhodnost tohoto nového způsobu stanovení profilu aminokyselin, zejména v tělních tekutinách.

Je pochopitelné, že vzhledem k jednoduchosti celé přípravy vzorku, včetně používaného zařízení, nebudou zřejmě problémy s automatizací celého procesu.

Předmětem vynálezu je rovněž souprava pro přípravu vzorků k stanovení aminokyselin, která sestává z nádobky obsahující kaši iontoměniče, špičku s filtrem, aplikátor s pístem, aplikační, promývací a eluční medium, derivatizační činidlo, extrakční rozpouštědlo a popřípadě i chromatografickou kolonu s náplní vhodnou pro toto stanovení.

Podle charakteru analyzovaného vzorku může tato souprava s výhodou obsahovat i roztoky příslušných standardů. Vhodné jsou například následující standardy pracovně označované I, II a III:

I: 17 základních proteinových aminokyselin běžně obsažených v proteinových hydrolyzátech.

II: Asparagin, glutamin a tryptophan.

III: Doplňkové aminokyseliny vyskytující se v moči, které nepatří mezi základní proteinové aminokyseliny.

Obvyklou součástí soupravy je rovněž návod k použití.

Je pochopitelné, že namísto nádobky s kaší iontoměniče a špičky s filtrem může souprava obsahovat špičku s již předem vyvořeným ložem iontoměniče, nejlépe vhodně uzavřenou tak, aby se zabránilo vysychání lože iontoměniče nebo/a jeho vysypání. Tato souprava může být sestavena pro stanovení různého počtu vzorků, popřípadě pro různé druhy vzorků.

Vynález ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje. Všechna potřebná rozpouštědla a činidla používaná v příkladech byla získána od firmy Sigma-Aldrich-Fluka, Praha.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Vzorek krevního séra (plasmy) byl smísen v poměru 5 : 1 s roztokem interního standardu. (Jako interní standard byl použit norvalin (NVAL) ve formě roztoku o koncentraci 1 µmol/l v 0,1M kyselině chlorovodíkové s přídavkem 0,5 % dithiosiřičitanu sodného.)

Vytvoření sloupce sorbentu ve špičce s filtrem a izolace analytů ze séra byly provedeny on-line způsobem

následovně:

Špička s filtrem, o objemu prostoru pod filtrem 50 µl, byla nasazena na hubici špičky s pístem (setteru) o objemu 1,25 ml. Ponořením špičky do suspenze iontoměniče v 0,1M kyselině chlorovodíkové a posunutím pístu o několik milimetrů byla špička naplněna sorbentem. Jako sorbent byl použit měnič kationtů na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen s příčným sítěním 2 % (AG 50Wx2 v BioTech-kvalitě od firmy BioRad (USA)). Do polyethylenové zkumavky o objemu 1,5 ml bylo vneseno 150 µl výše popsané směsi séra s interním standardem a tato tekutina byla jemným a postupným posunem pístu protažena ložem sorbentu (tento proces vyžaduje cca 1 - 3 minuty). Po penetraci ložem byl z jiné zkumavky nasát stejný objem promývacího roztoku. (Jako promývací roztok byla použita směs vody a ethanolu v objemovém poměru 2 : 1.) Dalším posunutím pístu bylo lože iontoměniče prosušeno nasátým vzduchem. Setter byl poté vyprázdněn.

Do jiné zkumavky bylo odměřeno 250 µl elučního/reakčního prostředí. (Jako eluční/reakční prostředí byla použita směs 1% hydroxidu sodného ve fyziologickém roztoku, ethanolu a pyridinu v poměru 7 : 4 : 1.) Nasátím bylo toto prostředí protaženo ložem sorbentu směrem vzhůru, takže proniklo přes filtr do prostoru setteru pod pístem. Po penetraci elučního/reakčního prostředí ložem byl ještě přisát vzduch, který uvolnil poslední zbytky tohoto prostředí do setteru.

Eluční/reakční prostředí bylo ze setteru přeneseno do polypropylenové zkumavky o objemu 2 ml a byla k němu, pro provedení derivatizace, přidána směs ethyl-chlorformiát - dichlormethan - acetonitril (v poměru 2 : 3 : 3), ve dvou dávkách, z nichž každá měla objem 25 µl, s odstupem asi 1 minuty. Po každém přidání byla zkumavka třepána po dobu 3 až 5 sekund na vortexové třepačce. Po druhém přidání činidla a minutové prodlevě bylo přidáno 150 µl extrakčního prostředí. (Jako extrakční prostředí byl použit dichlormethan

s obsahem 2 % ethyl-chlorformiátu.) Fáze byly promíseny opět vortexovou třepačkou po dobu 3 - 5 sekund. Po oddělení spodní organické fáze byla pomocí laboratorní pipety se špičkou odsáta horní vodně-alkoholická fáze a po přidání 150 µl 1M vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (sloužícího k odstranění pyridinu a zbytků alkoholu z organického rozpouštědla) a protřepání byla horní vodná fáze, vykazující pH nižší než 1, odtažena. Organická fáze byla vyčeřena přidáním malého množství bezvodého síranu sodného a 2 - 3 µl vyčeřeného roztoku byly aplikovány do plynového chromatografu.

Pro analýzu derivatizovaných forem aminokyselin byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC 14A s plamenoionizačním detektorem a vodíkem jako nosným plynem kapilární kolony. Analýza byla prováděna v teplotním rozmezí 90 až 290 °C s poměrně rychlou teplotní programací 25 °C/min, takže analýza trvala celkem asi 9 minut. Tlak nosného plynu (vodík) na vstupu byl 30 kPa. Pro separaci byla použita fáze typu BPX5 v koloně o délce 12 m a vnitřním průměru 0,32 mm. Připojením předkolony s fází BPX70 (1,2m x 0,32 mm) bylo dosaženo optimální separace analytů. Oby typy kolon byly dodány firmou SGE (Austrálie)

Byly získány následující výsledky (jedná se o průměrné hodnoty z 8 měření sérových aminokyselin zdravých osob; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna (J. Horn; J. Amer. Statistic Assoc., sv. 78 (1983), str. 930)):

	P_L (nmol/ml)	C.V.		P_L (nmol/ml)	C.V.
GLY	402	2,8	SER	205	8,2
ALA	545	3,7	HYP	11	15,7
ABA	17	5,0	ASN	71	4,3
VAL	251	3,7	GLN	599	4,3
LEU	141	6,3	CYS	4	12,2

	P_L (nmol/ml)	C.V.		P_L (nmol/ml)	C.V.
ILE	66	4,5	PHE	79	5,3
MET	37	7,9	TYR	60	6,9
PRO	206	3,2	TRP	49	6,8
ASP	53	5,0	ORN	138	7,8
GLU	181	9,2	LYS	214	6,1
THR	170	5,0	HIS	84	11,4

Legenda k tabulce: P_L = Pivotova polosuma (střední hodnota)
C.V. = variační koeficient

Příklad 2

Na vzorku stejné plasmy jako v příkladu 1 byl opakován postup podle příkladu 1, s tím rozdílem, že pro stanovení zpětného výtěžku aminokyselin byly do výchozí směsi vzorku plasmy a interního standardu přidány standardy jednotlivých aminokyselin v množství 200 nmol na ml.

Byly získány následující výsledky (jedná se o průměrné hodnoty z 8 měření; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna):

	P_L (nmol/ml)	C.V.	zpětný výtěžek (%)		P_L (nmol/ml)	C.V.	zpětný výtěžek (%)
GLY	611	1,5	105 (101-108)	SER	451	8,7	122 (104-140)
ALA	752	1,9	102 (91-113)	HYP	212	4,3	101 (95-107)
ABA	219	4,2	101 (94-108)	ASN	270	5,3	99 (92-106)
VAL	464	5,5	106 (80-131)	GLN	808	4,2	103 (84-122)
LEU	335	4,5	97 (78-115)	CYS	221	5,8	108 (102-114)
ILE	254	4,6	94 (84-104)	PHE	282	6,4	101 (86-117)
MET	238	2,7	100 (95-106)	TYR	248	4,3	93 (84-103)

	P_L (nmol/ /ml)	C.V.	zpětný výtěžek (%)		P_L (nmol/ /ml)	C.V.	zpětný výtěžek (%)
PRO	421	7,0	109 (82-136)	TRP	250	8,3	101 (88-114)
ASP	247	5,9	97 (90-104)	ORN	339	5,1	97 (94-99)
GLU	368	6,7	96 (81-111)	LYS	404	4,4	94 (85-103)
THR	397	8,9	111 (87-135)	HIS	282	4,0	100 (86-113)

Legenda k tabulce: P_L = Pivotova polosuma (střední hodnota)
C.V. = variační koeficient

Jak vyplývá z výsledků, kvantita stanovení je potvrzena hodnotami zpětného výtěžku a metoda tedy poskytuje reprodukovatelné hodnoty.

Příklad 3

Bylo provedeno srovnání přípravy vzorku prováděné způsobem podle vynálezu a přípravy vzorku využívající klasické eluce aminokyselin amoniakem.

Jako vzorek byla použita moč, která byla smísena s roztokem interního standardu, popsaným v příkladu 1, v poměru 10 : 1. Další postup byl při práci způsobem podle vynálezu stejný jako v příkladu 1.

Při způsobu využívajícím eluci amoniakem bylo vytvoření sloupce iontoměniče, nanesení vzorku a promytí provedeno stejně jako v příkladu 1. Jako eluční prostředí bylo poté použito 200 µl 2M vodného roztoku amoniaku. Toto množství elučního prostředí bylo nasátím protaženo ložem sorbentu směrem vzhůru, takže proniklo do prostoru setteru pod pístem. Po penetraci elučního prostředí ložem byl ještě přisát vzduch, který uvolnil poslední zbytky tohoto prostředí do setteru. Eluát byl poté odpařen do sucha při 80 °C pod proudem dusíku. Odparek byl derivatizován jako v příkladu 1 a další postup pak již byl stejný jako v příkladu 1.

Při analýze derivatizovaných forem aminokyselin na plynovém chromatografu byly použity tytéž analytické podmínky jako v příkladu 1.

Byly získány následující výsledky (jedná se o průměrné hodnoty z 10 měření; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna):

	eluce amoniakem (nmol/ml)				způsob podle vynálezu (nmol/ml)			
	P_L	L_D	L_H	C.V.	P_L	L_D	L_H	C.V.
GLY	743	711	775	3,1	765	751	780	3,3
ALA	152	148	157	3,5	145	142	148	2,8
ABA	6	5	6	4,1	5	5	6	5,6
VAL	28	27	29	3,5	26	25	27	5,4
BAIB	140	138	143	4,7	128	125	131	4,7
LEU	26	24	28	7,4	24	23	25	6,3
ILE	22	16	27	27,7	17	15	19	14,7
MET	17	16	19	8,2	14	13	15	9
PRO	4	3	5	18	4	3	5	31,8
ASP	9	7	12	28	5	4	6	24,6
GLU	39	37	41	5,4	32	30	33	13,8
THR	82	78	85	6,4	77	74	79	7,4
SER	210	194	226	5,7	221	203	238	9,9
HYP	---	---	---	---	11	10	12	17,4
ASN	32	29	35	8,5	32	30	34	7,1
GLN	253	227	280	10	303	277	328	10,2
CYS	18	16	20	12,4	33	31	35	7,1
CYS_2	21	18	24	10,6	12	10	13	13,2
PHE	37	35	38	4,1	40	38	42	6,9
TYR	74	70	79	5,7	73	70	77	7,3
TRP	44	41	47	6,6	42	39	45	8
ORN	23	20	26	11,7	23	21	25	14,5

	eluce amoniakem (nmol/ml)				způsob podle vynálezu (nmol/ml)			
	P_L	L_D	L_H	C.V.	P_L	L_D	L_H	C.V.
LYS	103	98	109	6,1	96	93	98	6,1
HIS	504	479	532	5,8	514	506	522	3,7

Legenda k tabulce: P_L = Pivotova polosuma (střední hodnota)
L_D = dolní mez
L_H = horní mez
C.V. = variační koeficient

Z výsledků vyplývá, že eluce elučním/reakčním prostředím podle vynálezu je stejně účinná jako eluce amoniakem, přitom však při práci způsobem podle vynálezu není potřeba provádět odpaření eluátu.

Příklad 4

Na vzorku moči bylo provedeno srovnání, jakého zpětného výtěžku se dosáhne při přidání standardů aminokyselin v množství 200 nmol/ml do výchozí směsi vzorku moči a interního standardu, při přípravě vzorku prováděné způsobem podle vynálezu a přípravě vzorku využívající klasické eluce aminokyselin amoniakem.

Příprava vzorků způsobem podle vynálezu a způsobem využívajícím eluce amoniakem byla prováděna jak je popsáno v příkladu 3.

Byly získány následující výsledky (jedná se o průměrné hodnoty z 10 měření; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna):

	eluce amoniakem (nmol/ml)			způsob podle vynálezu (nmol/ml)		
	P_L	C.V.	zpětný výtěžek (%)	P_L	C.V.	zpětný výtěžek (%)
GLY	963	2,6	96 (75-118)	939	5,6	101 (87-116)
ALA	352	3,5	100 (98-103)	346	3,7	100 (97-103)
ABA	200	3,1	97 (95-99)	204	2,9	99 (97-101)
VAL	209	2	91 (88-93)	222	3,2	97 (95-99)
BAIB	327	4,8	98 (94-102)	337	4,4	105 (94-116)
LEU	213	4,3	95 (86-103)	227	4,6	101 (97-105)
ILE	211	5,4	94 (89-99)	220	4,4	100 (97-104)
MET	212	4,1	98 (95-101)	220	3,8	104 (100-107)
PRO	197	2	97 (94-99)	195	4,7	96 (93-98)
ASP	217	6,3	105 (99-110)	209	3,6	101 (99-103)
GLU	243	5,3	105 (97-112)	245	7,6	105 (100-110)
THR	294	4,9	106 (98-115)	275	6	100 (92-108)
SER	431	4,3	110 (106-114)	427	5,4	107 (99-114)
HYP	166	12,7	83 (63-103)	201	6,6	95 (91-99)
ASN	229	9,4	99 (94-104)	224	10,6	96 (86-105)
GLN	483	7,1	104 (96-111)	491	8,3	96 (85-107)
CYS	203	9,3	94 (82-106)	251	5,8	109 (101-117)
CYS_2	213	5,7	97 (89-105)	209	7,8	98 (92-104)
PHE	229	5	97 (91-102)	249	5,9	105 (96-113)
TYR	265	5,1	98 (90-105)	290	6,2	110 (102-118)
TRP	236	7,5	98 (94-102)	248	5,6	102 (97-107)
ORN	242	6,7	109 (102-116)	237	7	107 (103-112)
LYS	325	3,2	112 (103-121)	296	6,1	101 (96-105)
HIS	724	3,4	106 (97-115)	718	3,7	101 (88-114)

Legenda k tabulce: P_L = Pivotova polosuma (střední hodnota)
C.V. = variační koeficient

Jak vyplývá z výsledů, při práci způsobem podle

vynálezu je zpětný výtěžek srovnatelný, a často i lepší, než při použití eluce amoniakem.

Příklad 5

Na vzorku krevní plasmy bylo provedeno srovnání přípravy vzorku prováděné způsobem podle vynálezu bez deproteinace a přípravy vzorku prováděné stejným způsobem, ale s chemickou deproteinací.

Při práci způsobem podle vynálezu byl použit stejný postup jako v příkladu 1.

Pro srovnání byly použity tři způsoby deproteinace, a to pomocí kyseliny sulfosalicylové (SSA), pomocí kyseliny trichloroctové (TCA) a pomocí směsi acetonitrilu a ethanolu v poměru 2 : 1 (ORG). Vzorek plasmy byl nejprve smísen s roztokem interního standardu, popsaným v příkladu 1, v poměru 5 : 1. Podle typu použitého deproteinačního činidla byl poté vzorek smísen s 6% SSA v poměru 1 : 1, s 6% TCA v poměru 1 : 1 nebo s výše uvedenou směsí acetonitrilu a ethanolu v poměru 1 : 3. Po promísení byla směs centrifugována a supernatant byl dále zpracováván stejně jako vzorek, u kterého deproteinace prováděna nebyla, postupem popsaným v příkladu 1.

Byly získány následující výsledky (jedná se o průměrné hodnoty z 12 měření; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna):

	bez deproteinace	SSA	TCA	ORG
GLY	290 (286-293)	288 (282-293)	259 (238-280)	261 (251-270)
ALA	421 (415-427)	422 (417-427)	380 (357-402)	393 (365-421)
ABA	23 (22-24)	23 (20-26)	22 (21-22)	22 (21-23)
LEU	165 (162-168)	164 (162-166)	162 (158-165)	163 (155-170)
ILE	74 (72-75)	70 (67-72)	71 (69-72)	73 (72-73)

	bez deproteinace	SSA	TCA	ORG
MET	30 (29-30)	32 (31-33)	31 (30-31)	30 (29-30)
PRO	209 (207-211)	207 (204-210)	212 (208-215)	206 (197-214)
ASP	18 (17-19)	16 (15-17)	16 (14-17)	19 (18-20)
GLU	40 (38-41)	35 (25-44)	35 (29-40)	35 (30-39)
THR	176 (170-181)	166 (161-171)	153 (145-161)	177 (168-186)
SER	142 (136-147)	133 (129-136)	129 (121-137)	136 (122-150)
HYP	14 (13-14)	12 (11-12)	13 (12-13)	---
ASN	34 (32-35)	34 (33-35)	31 (27-34)	31 (28-33)
GLN	540 (495-584)	588 (561-615)	553 (514-592)	569 (554-584)
CYS_2	41 (39-42)	41 (39-42)	45 (41-49)	30 (21-39)
PHE	58 (56-60)	58 (56-59)	63 (59-66)	60 (57-63)
TYR	62 (59-64)	62 (58-66)	63 (59-67)	63 (59-67)
TRP	48 (46-49)	44 (41-47)	45 (42-48)	50 (43-56)
ORN	60 (58-61)	68 (62-73)	64 (60-67)	46 (43-49)
LYS	179 (172-185)	200 (178-222)	184 (162-205)	118 (108-127)
HIS	84 (78-89)	89 (82-96)	90 (85-95)	82 (73-91)

Legenda k tabulce:

SSA: deproteinace pomocí kyseliny sulfosalicylové

TCA: deproteinace pomocí kyseliny trichloroctové

ORG: deproteinace pomocí směsi acetonitrilu a ethanolu v poměru 2 : 1

Jak vyplývá z výsledků, způsob podle vynálezu zamezuje rozdílům ve výsledcích způsobeným použitím různých deproteinačních činidel. Vynecháním stupně deproteinace se přitom však pochopitelně zjednodušuje postup a zkracuje čas analýzy.

Příklad 6

Na vzorku krevní plasmy byla analýza aminokyselin způsobem podle vynálezu za použití plynové chromatografie, prováděná jak je popsáno v příkladu 1, srovnána s analýzou

prováděnou na automatizovaném analyzátoru aminokyselin s detekcí ninhydrinem (IEC, byl použit analyzátor tuzemské provenience MIKROTECHNA za použití postupu, který popsali Hans J. Bremer a kol.: Disturbances of amino acid metabolism: clinical chemistry and diagnosis; Urgan & Schwarzenberg, Baltimore-Mnichov, 1981).

Byly získány následující výsledky (výsledky jsou uvedeny v nmol/ml; statistické zpracování bylo provedeno podle Horna):

PL	270,0	230,5	530,5	471,5	29,0	20,0	316,5	281,5
LD	265,8	194,9	515,8	406,6	24,8	7,4	272,5	254,3
LH	274,2	266,1	545,2	536,4	33,2	32,6	360,5	308,7

	GLY		ALA		ABA		VAL	
	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC
	297	222	645	453	28	17	330	275
	270	264	529	487	32	16	307	315
	271	218	534	456	25	23	327	288
	257	239	511	505	30	19	288	280
	269	235	527	468	30	23	306	270

PL	167,5	152,5	77,5	75,5	44,5	39,0	197,0	165,0
LD	119,3	104,3	54,5	44,1	38,2	30,6	37,9	160,8
LH	215,7	200,7	100,5	106,9	50,8	47,4	356,1	169,2

	LEU		ILE		MET		PRO	
	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC
	156	132	62	67	41	37	235	164
	224	173	72	87	46	43	241	186
	159	164	81	83	47	39	159	166
	151	141	83	70	43	41	151	164
	179	143	90	68	44	31	228	165

PL	**175,0**	**163,5**	**117,5**	**91,0**	**33,5**	**17,0**	**147,5**	**142,0**
LD	145,7	136,3	94,5	70,1	10,5	4,4	91,0	116,9
LH	204,3	190,7	140,5	111,9	56,5	29,6	204,0	167,1

THR		SER		ASP		GLU	
IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC
209	146	123	81	43	14	114	136
179	165	119	107	35	14	163	128
182	170	123	96	39	24	161	148
168	157	112	86	28	18	152	137
159	179	99	94	19	20	134	157

PL	**622,5**	**575,0**	**28,0**	**23,5**	**76,5**	**74,0**	**104,0**	**97,5**
LD	566,0	453,5	23,8	17,2	61,8	69,8	91,4	82,8
LH	679,0	696,5	32,2	29,8	91,2	78,2	116,6	112,2

GLN		(CYS)2		PHE		TYR	
IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC
739	493	44	23	84	83	82	94
636	563	29	25	73	74	107	101
636	604	21	31	76	73	106	107
609	546	27	22	80	66	108	91
596	624	27	20	66	75	101	96

PL	-	**57,5**	**87,0**	**58,0**	**185,0**	**153,5**	**118,0**	**106,0**
LD	-	34,5	74,4	37,1	159,9	130,5	101,2	59,9
LH	-	80,5	99,6	78,9	210,1	176,5	134,8	152,1

TRP		ORN		LYS		HIS	
IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC	IEC	GC
	63	81	53	198	159	114	92
	52	89	78	182	167	122	118
	57	100	57	191	158	127	112
	67	84	51	170	144	114	95
	41	90	63	179	148	115	117

Legenda k tabulkám:

PL: Pivotova polosuma (střední hodnota)

LD: dolní mez

LH: horní mez

IEC: stanovení na automatizovaném analyzátoru aminokyselin

GC: stanovení způsobem podle vynálezu za použití plynové chromatografie

Srovnání způsobu podle vynálezu s klasickým stanovením na automatizovaném analyzátoru aminokyselin prokázalo, že nový postup poskytuje stejně validní (hodnověrné) výsledky, přičemž však nový postup podstatně zrychluje a zlevňuje stanovení.

Příklad 7

Vzorek krevní plasmy byl zpracován jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že jako sorbent byl použit měnič kationtů na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen s příčným sítěním 8 % (AG 50Wx8 v BioTech-kvalitě od firmy BioRad (USA)), byla použita špička s filtrem o objemu prostoru pod filtrem 12 µl a po eluci elučním/reakčním prostředí bylo toto prostředí i s iontoměničem vytlačeno do zkumavky, kde byla poté provedena derivatizace přímo za přítomnosti iontoměniče.

Množství jednotlivých použitých prostředí a činidel byla následující:

objem směsi séra s interním standardem: 100 µl
objem promývacího roztoku: 100 µl
objem elučního/reakčního prostředí: 200 µl
objem derivatizačního činidla: 2 x 20 µl
objem extrakčního prostředí: 120 µl
objem 1M vodného roztoku HCl sloužícího k odstranění pyridinu a zbytků alkoholu z organického rozpouštědla: 100 µl.

Získané výsledky se od výsledků získaných v příkladu 1 statisticky významně nelišily.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy vzorků pro analýzu aminokyselin v přírodních materiálech, zejména v tělních tekutinách, plynovou chromatografií, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se výchozí materiál, popřípadě spolu se standardem, nanese na sloupec iontoměniče stálého v alkalickém prostředí, sloupec se promyje směsí vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou, zachycené aminokyseliny se vytěsní promytím sloupce směsí vody nebo až 6% vodného roztoku chloridu sodného, s obsahem 0,1 až 3 % hmot. hydroxidu nebo uhličitanu alkalického kovu, alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku a pyridinové báze, aminokyseliny obsažené v eluátu se derivatizují přidáním alkyl-chlorformiátu s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylové skupině, reakční směs se vytřepe organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou a použije se k nástřiku do chromatografického přístroje.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako iontoměnič použije styren-divinylbenzenový měnič typu Dowex nebo AG 50W.

3. Způsob podle nároků 1 a 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako rozpouštědlo mísitelné s vodou k promývání sloupce iontoměniče použije přímý nebo rozvětvený alkanol s 1 až 4 atomy uhlíku, s výhodou ethanol či propanol.

4. Způsob podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako hydroxid nebo uhličitan alkalického kovu použije hydroxid nebo uhličitan sodný, s výhodou hydroxid sodný.

5. Způsob podle nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako alkyl-chlorformiát použije ethyl-chlorformiát nebo propyl-chlorformiát.

6. Způsob podle nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou použije chlorované uhlovodíkové rozpouštědlo, s výhodou dichlormethan nebo chloroform, nebo tec.butylmethylether.

7. Způsob podle nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se fáze organického rozpouštědla nemísitelného s vodou před nástřikem do chromatografické kolony promyje zředěnou anorganickou kyselinou, s výhodou kyselinou chlorovodíkovou.

8. Způsob podle nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se derivatizace provádí ve směsi eluátu a iontoměniče.

9. Souprava k přípravě vzorků podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nádobku s hustou suspenzí iontoměniče, špičku s filtrem, aplikátor s pístem, aplikační, promývací a eluční medium, derivatizační činidlo a extrakční rozpouštědlo.

10. Souprava podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že namísto nádobky s hustou suspenzí iontoměniče a špičky s filtrem obsahuje špičku s filtrem s již vytvořeným ložem iontoměniče.

11. Souprava podle nároků 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje standard nebo standardy podle charakteru analyzovaného vzorku.

12. Souprava podle nároků 9 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje kapilární křemennou chromatografickou kolonu s chemicky vázanou fází vhodnou pro stanovení aminokyselin.