Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου HPLC για τον Προσδιορισμό Αμινοξέων σε Φαρμακευτικό Σκεύασμα Βασισμένης σε Προ-Στήλη Παραγωγοποίηση και Ανίχνευση στο Ορατό

Δ.-Χρ. Τσίκνα, Μ. Κουππάρης, Ν. Μέγκουλας, Αικ. Γκρεμηλογιάννη, Δ. Σταυροπούλου
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα, 157 71,
Email: koupparis@chem.uoa.gr

Περίληψη

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μία ταχεία μέθοδος υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό δεκαπέντε αμινοξέων που αποτελούν ένα από τα τρία κύρια συστατικά των φαρμακευτικών σκευασμάτων παρεντερικής διατροφής. Ο διαχωρισμός τους πραγματοποιήθηκε με μια στήλη C18 και η ανίχνευσή τους βασίστηκε στην προ-στήλη παραγωγοποίηση με αντιδραστήριο παραγωγοποίησης το 4-διμεθυλαμινοαζωβενζολο-4'-σουλφονυλοχλωρίδιο (Dabsyl chloride) και φασματοφωτομετρική ανίχνευση στο ορατό. Διενεργήθηκε εκτενής βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων παραγωγοποίησης (pH, χρόνος, συγκέντρωση αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης) και για το διαχωρισμό (στήλη, κινητή φάση).

Λέξεις-κλειδιά: Φαρμακευτική ανάλυση, Αμινοξέα, dabsyl chloride, προ-στήλη παραγωγοποίηση, επικύρωση, HPLC

Abstract

The objective of the present study was to develop a rapid Reversed phase HPLC (RP-HPLC) method for the simultaneous separation and quantitation of fifteen amino acids that consist one of the three main compartments of parenteral nutrition formulations. Their separation was carried out using a C18 column and their detection was based on precolumn derivatization with 4-dimethylaminoazobenzene-4′-sulfonylchloride (Dabsyl chloride) and spectrophotometric detection in the visible region. An extensive optimization of derivatization parameters (pH, duration, concentration of derivatizating reagent) and separation (column, mobile phase) was conducted.

Keywords: Pharmaceutical analysis, Amino acids, dabsyl chloride, Pre-column derivatization, validation, HPLC

1. Εισαγωγή

Τα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο ως δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών, όσο και ως ενδιάμεσες ενώσεις στο μεταβολισμό. Η ανίχνευσή και η ακριβής ποσοτικοποίηση τους σε σύνθετους ανθρώπινους ιστούς, βιολογικά υγρά, τα φυτά, τα φάρμακα και τα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, αλλά συχνά παρουσιάζονται αρκετές δυσκολίες. (Jenny M. et al., 2010).

Δ.-Χρ. Τσίκνα[1], Μ. Κουππάρης[1], Ν. Μέγκουλας[1], Αικ. Γκρεμηλογιάννη[1], Δ. Σταυροπούλου[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα, 157 71,

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την ανάλυση αμινοξέων, αλλά τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) λόγω της δυνατότητας εφαρμογής της σε διαφορετικούς τύπους αναλύσεων, του μικρού χρόνου ανάλυσης και του χαμηλότερου κόστους (Jui-Yoa Chang et al, 1983). Το γεγονός αυτό και ο μεγάλος αριθμός των αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης που χρησιμοποιούνται στην προ-στήλη παραγωγοποίηση ώθησαν την ανάπτυξη της υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης για την ανάλυση αμινοξέων σε όλα τα είδη των μητρών (τρόφιμα, φυτά, βιολογικά υγρά, ιστούς και φάρμακα). Μεταξύ των αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης που χρησιμοποιούνται στην προ-στήλη παραγωγοποίηση, το 4-διμεθυλαμινοαζωβενζολο-4'-σουλφονυλοχλωρίδιο (Dabsyl Chloride) είναι ευρέως γνωστό, επειδή αντιδρά εύκολα με τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αμινοξέα, είναι εύκολο στο χειρισμό, εξασφαλίζει καλή ακρίβεια, υψηλή ευαισθησία και προσφέρει υψηλότερη σταθερότητα των παραγώγων σε σύγκριση με άλλα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης. (Jen-Kun Lin and Jul-Yoa Chang, 1975).

Η κύρια πρόκληση και δυσκολία αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση όλων των αμινοξέων, καθώς περιέχονται σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων στο φαρμακευτικό σκεύασμα (0,4-20,7 mg/ml) και η επίτευξη της κατάλληλης αναλογίας μεταξύ του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης και των αμινοξέων ώστε να είναι πλήρης η παραγωγοποίηση.

2. Μεθοδολογία

2.1 Χημικές ενώσεις και αντιδραστήρια

Τα αμινοξέα προμηθεύτηκαν από τη Sigma-Aldrich. Το ακετονιτρίλιο ήταν από τη Fisher Scientific (HPLC Gradient), το οξικό νάτριο ήταν από την Carlo Erba (for analysis), το όξινο ανθρακικό νάτριο από την Mallinckrodt Chemical Works (Analytical reagent), το μονόξινο φωσφορικό νάτριο από την Carlo Erba (for analysis-ACS-Reag. Ph. Eur. Reag. USP), η αιθανόλη 96% από τη Fisher Scientific, το HCl S.G. 1,18 από τη Fisher Scientific (35,9%) και το dabsyl chloride από τη Sigma-Aldrich (Fluka, ≥97,5%).

2.2 Οργανολογία

Η υγροχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφικό σύστημα Prominence Series HPLC-DAD της εταιρείας Shimadzu, εξοπλισμένο με έναν αυτόματο δειγματολήπτη (SIL-20ACHT), φούρνο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης (CTO-20AC), απαερωτή κινητής φάσης (DGU-20A5), αντλία δύο πιστονιών (LC-20 AD) και έναν ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (SPD-M20). Ο έλεγχος του συστήματος και η συλλογή/επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solutions V.1.11 SP1 της Shimadzu. Ως χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιήθηκε η BDS-Hypersil, C18, από την Thermo Scientific (100 mm x 4,6 mm, 3 μm) και ως προστήλη η BDS Hypersil, C18 από την Thermo Scientific (10 mm x 4 mm, 3 μm).

2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Χρησιμοποιήθηκαν δύο κινητές φάσεις: οξικό νάτριο 10 mM, pH=6 (κινητή φάση A) και ακετονιτρίλιο (κινητή φάση B). Η έκλουση των αμινοξέων έγινε βαθμιδωτά με το παρακάτω πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης: 0-3 min (22% B), 3-25 min (30% B), 25-40 min (50% B), 40-50 min (50% A), 50,1 - 65 min (22% B). Ο φούρνος της στήλης ρυθμίστηκε στους 45 ° C και η θερμοκρασία του δειγματολήπτη στους 5 °C. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1,0 ml / min και ο όγκος ένεσης ήταν 10 μl. Ο ανιχνευτης PDA τέθηκε στα 465 nm.

2.4 Παρασκευή διαλυμάτων

Υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης των αμινοξέων παρασκευάστηκαν στις παρακάτω συγκεντρώσεις (mg/ml): σερίνη: 5,0, θρεονίνη: 4,2, γλυκίνη: 10,3, αλανίνη: 20,7, αργινίνη: 11,5, προλίνη: 6,8, βαλίνη: 5,8, μεθειονίνη: 4,0, ισολευκίνη: 6,0, λευκίνη: 7,3, θρυπτοφάνη: 1,8, φαινυλαλανίνη: 5,6, υδροχλωρική λυσίνη: 7,2, ιστιδίνη: 4,8 και τυροσίνη: 0,4, και αποθηκεύονταν στο ψυγείο (2-8 ^{o}C) για μια εβδομάδα. Η διάλυση της τυροσίνης επιτεύχθηκε με τη βοήθεια υδροχλωρικού οξέος με θέρμανση (70 ^{o}C) και τελική αραίωση με νερό. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης των αμινοξέων παρασκευάσθηκε το πρότυπο μείγμα (1 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης και αραίωση στα 100 ml με νερό). Ομοίως το φαρμακευτικό σκεύασμα αραιώθηκε σε αναλογία 1:100 με νερό. Το dabsyl chloride διαλυόταν σε ακετονιτρίλιο με τη βοήθεια υπερήχων σε συγκέντρωση 2,3 mg/ml. Πριν τη χρήση του στη διαδικασία της παραγωγοποίησης επαναδιαλυόταν με τη βοήθεια υπερήχων λόγω της καταβύθισης ιζήματος με την πάροδο του χρόνου. Προστατευόταν από το φως και αποθηκευόταν στην κατάψυξη για μια εβδομάδα.

2.5 Διαδικασία παραγωγοποίησης

Σε ογκομετρική φιάλη 10,0 ml μεταφέρονται 250 μL προτύπου μείγματος αμινοξέων ή φαρμακευτικού σκευάσματος, 250 μL νερού, 500 μL ρυθμιστικού ανθρακικών 100 mM, pH=10 και 2,0 mL διαλύματος 4-διμεθυλαμινοαζωβενζολο-4'-σουλφονυλοχλωριδίο. Στη συνέχεια γινόταν ανακίνηση και τοποθετούνταν στο φούρνο στους 70 ^{0}C για 12 min. Στη συνέχεια αφηνόταν να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τέλος, αραιωνόταν μέχρι τη χαραγή με μίγμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου 50 mM, pH=7,0 και αιθανόλης 96% σε αναλογία 1:1.

3.Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Ανάπτυξη μεθόδου

3.1.1 Βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών

Αρκετές στήλες (Πίνακας 1) δοκιμάστηκαν για την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού των αμινοξέων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της βιβλιογραφίας (http://www.jascoinc.com/hplc/analysis-of-dabsyl-amino-acids-using-hplc),

χρησιμοποιώντας κινητή φάση Α (οξικό νάτριο 20 mM) και κινητή φάση Β (ακετονιτρίλιο) με όγκο ένεσης 20 μL. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης: 0-3 min (22% B), 3-25 min (30% B), 25-40 min (60% B), 40,1-45 min (80% A), 45,1 - 60 min (22% B). Η στήλη BDS-Hypersil αποδείχθηκε ως η πλέον κατάλληλη σε σχέση με τις υπόλοιπες στήλες για να διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές βελτίωσης. Έγιναν τροποποιήσεις στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης και δοκιμάσθηκαν και άλλες κινητές φάσεις, όπως δισόξινο φωσφορικό νάτριο, μυρμηκικό αμμώνιο και μεθανόλη, αλλαγή της συγκέντρωσης και του pH του οξικού νατρίου και τέλος αλλάζοντας τον όγκο ένεσης. Ο βέλτιστος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τις συνθήκες του εδαφίου 2.3. Στο σχήμα 1 παρατίθεται τυπικό χρωματογράφημα με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες της μεθόδου.

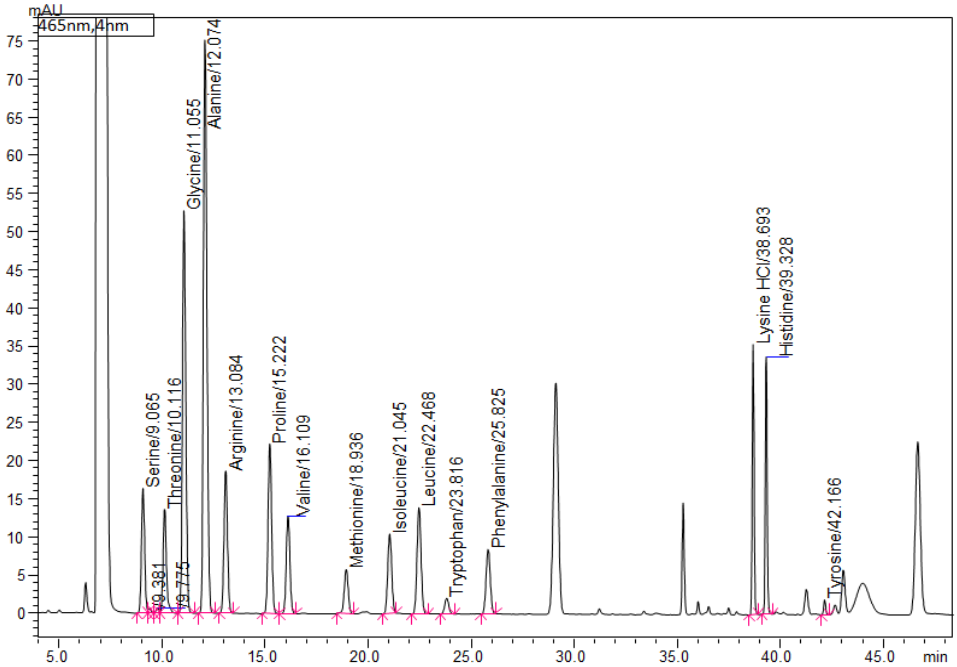
Πίνακας 1: Είδη χρωματογραφικών στηλών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη

Είδος χρωματογραφικής στήλης	Στατική φάση	Μήκος (mm)	Εσωτερική διάμετρος (mm)	Σωματίδια (μm)	Κατασκευαστής
X-Terra MS	C18	100	4,6	3,5	Waters
Spherisorb ODS-2	C18	150	4,6	3	Waters
YMC-Triart	C18	100	4,6	5	YMC
Inertsil ODS-3V	C18	250	4,6	5	GL Sciences Inc
BDS-Hypersil	C18	100	4,6	3,5	Thermo
Purosphere RP-18 endcapped	C18	125	3	5	Merck
Purosphere RP-18	C18	250	4	5	Merck

3.1.2 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραγωγοποίησης για την πλήρη ανάκτηση των αμινοξέων

Αρχικά έγιναν δοκιμές χρησιμοποιώντας συνθήκες της βιβλιογραφίας (H.J. Schneider, 1989): συγκέντρωση αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 1,3 mg/ml, pH ρυθμιστικού ανθρακικών 8,5.

Από τη μελέτη της βελτιστοποίησης των παραμέτρων παραγωγοποίησης διαπιστώθηκε ότι ο ατελής διαχωρισμός σε συγκεκριμένες περιοχές του χρωματογραφήματος οφείλεται στα μονο-υποκατεστημένα παράγωγα της λυσίνης, ιστιδίνης και τυροσίνης που παράγονται σύμφωνα με την βιβλιογραφία όταν είναι ανεπαρκής η ποσότητα του dabsyl chloride (Jen-Kun Lin et al. 1987). Μετά τη βελτιστοποίηση της τελικής διαδικασίας παραγωγοποίησης, το εμβαδό των μονο-υπακατεστημένων παραγώγων μειώθηκε στο ελάχιστο δυνατό.

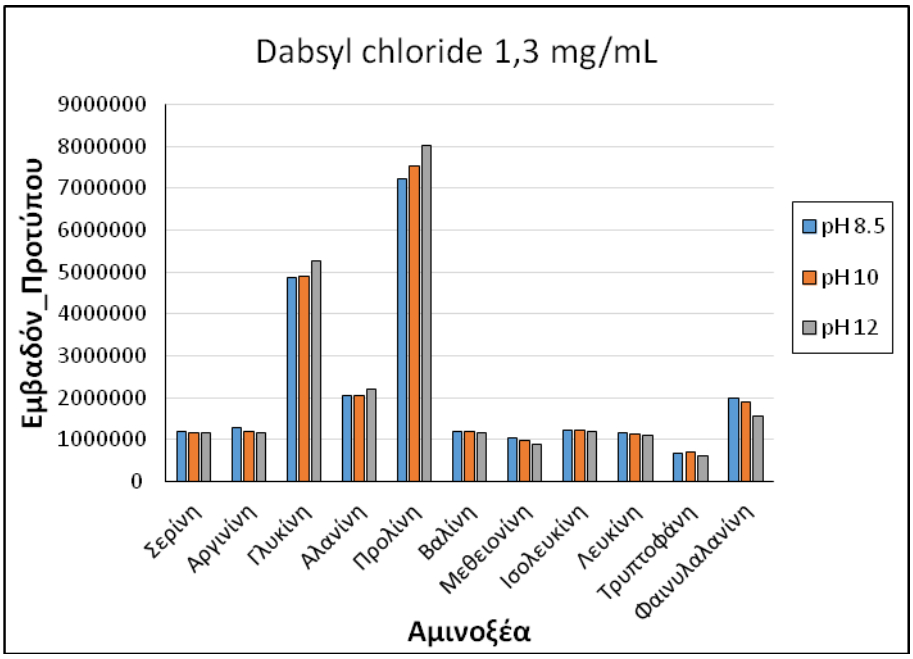


Σχήμα 1: Χρωματογράφημα σκευάσματος των αμινοξέων με τις τελικές βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες και συνθήκες παραγωγοποίησης και χρωματογραφική στήλη την BDS-Hypersil, C18, 100 mm x 4,6mm, 3,5 μm.

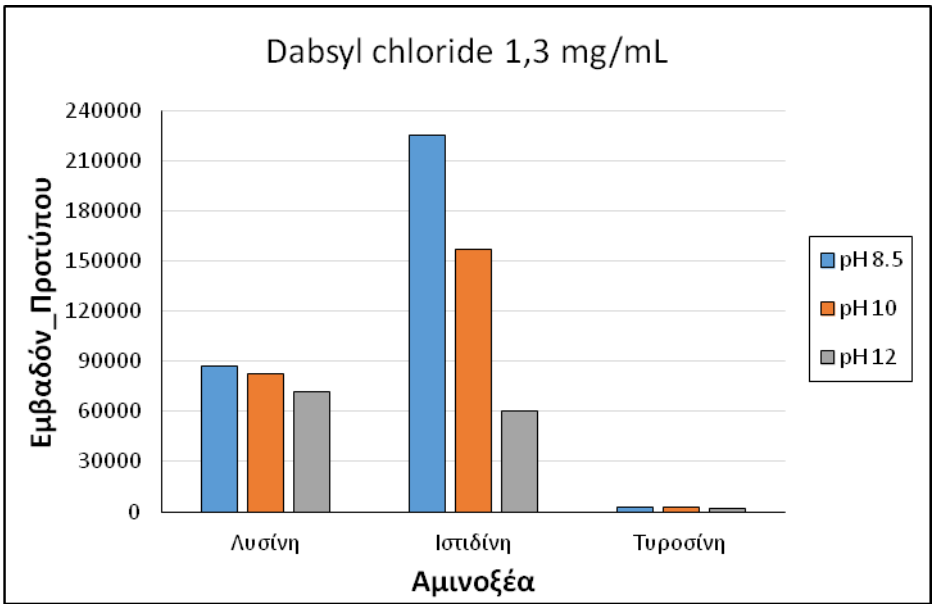
Υπολογίστηκε η % ανάκτηση του συνθετικού σκευάσματος με βάση τις κορυφές του προτύπου μείγματος των αμινοξέων και παρατηρήθηκε ότι η απόδοση της παραγωγοποίησης δεν ήταν ικανοποιητική. Μελετήθηκαν οι παράμετροι: α) συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (Dabsyl chloride), β) το pH και γ) ο χρόνος της αντίδρασης. Για την αξιολόγηση της επίδρασης κάθε παραμέτρου χρησιμοποιήθηκε %ανάκτηση των αμινοξέων στο σκεύασμα με βάσει τα εμβαδά του προτύπου μείγματος των αμινοξέων, το μέγεθος των εμβαδών των κορυφών των αμινοξέων, καθώς και η ποιότητα των λαμβανομένων χρωματογραφημάτων (στενότητα και διαχωρισμός κορυφών και παρεμποδίσεις από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης).

α) Επίδραση pH και συγκέντρωσης αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης.

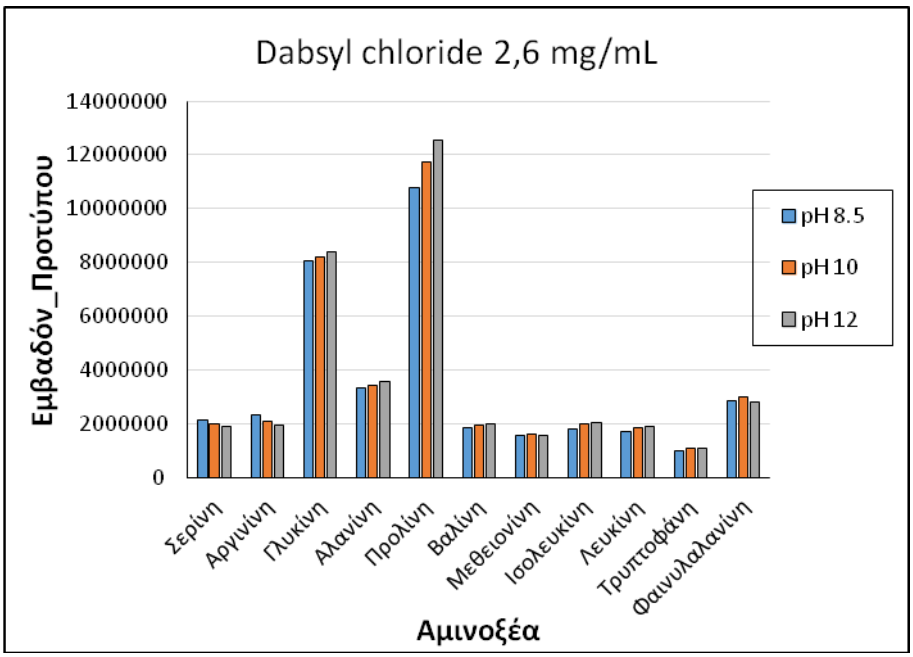
Μελετήθηκε σε 2 επίπεδα συγκεντρώσεων: 1,3 και 2,6 mg/mL σε τρεις τιμές pH: 8,5, 10 και 12. Η συγκέντρωση 2,6 mg/mL δεν ήταν εντελώς διαλυτή, αλλά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των εμβαδών των κορυφών. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι 3-10% του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης χάνεται λόγω της υδρόλυσης του στο αντίστοιχο σουλφονικό οξύ (Jen-Kun Lin and Jul-Yoa Chang 1975, Jui-Yoa Chang et al, 1983, Graham J. Hughes, et al. 1987). Για την καλύτερη μελέτη παρασκευάσθηκαν 2 μείγματα προτύπων αμινοξέων, ένα με 11 αμινοξέα και ένα με τα 3 προβληματικά αμινοξέα (λυσίνη, ιστιδίνη και τυροσίνη) που σχηματίζουν και μονο-υποκατεστημένα παράγωγα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα σχήματα 2-5 (για τα 3 προβληματικά αμινοξέα λυσίνη, ιστιδίνη και τυροσίνη τα αποτελέσματα δίνονται σε χωριστό σχήμα).



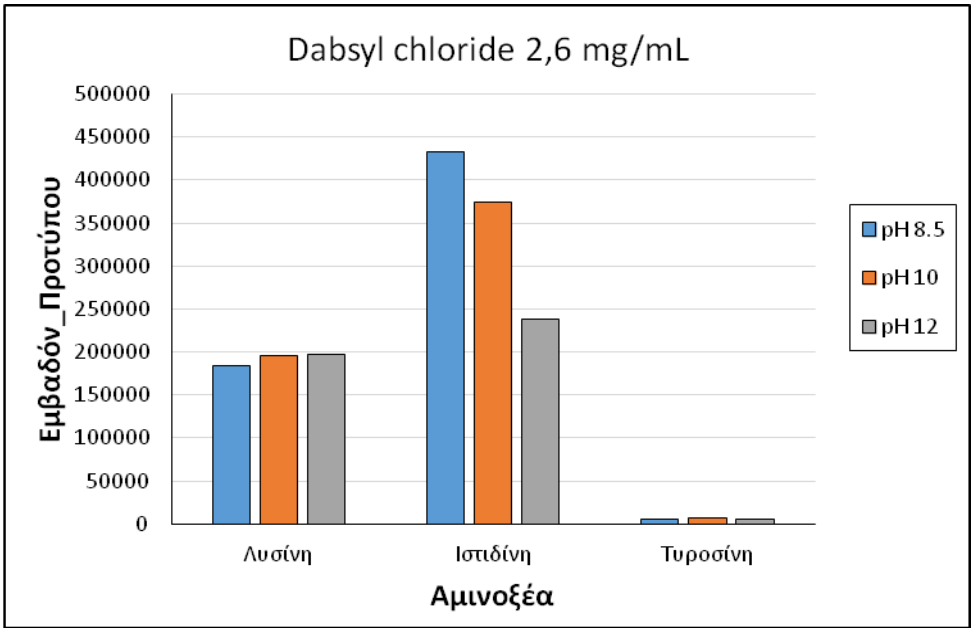
Σχήμα 2: Εμβαδά προτύπων αμινοξέων με συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 1,3 mg/ml και σε 3 pH ρυθμιστικού ανθρακικών 100 mM.



Σχήμα 3: Εμβαδά 3 προτύπων αμινοξέων σε συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 1,3 mg/mL και σε 3 διαφορετικά pH του όξινου ανθρακικού νατρίου, 100 mM.



Σχήμα 4: Εμβαδά προτύπων αμινοξέων σε συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 2,6 mg/mL σε 3 διαφορετικά pH ρυθμιστικού ανθρακικών 100 mM.



Σχήμα 5: Εμβαδά 3 προτύπων αμινοξέων σε συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 2,6 mg/mL σε 3 διαφορετικά pH ρυθμιστικού ανθρακικών 100 mM.

Η μέγιστη διαλυτότητα του dabsyl chloride που επιτεύχθηκε σε ακετονιτρίλιο ήταν 2,3 mg/ml. Το πρόβλημα της μη πλήρους παραγωγοποίησης δεν εξαλείφθηκε πλήρως. Ακολούθως, δοκιμάστηκε να επιτευχθεί υψηλότερη συγκέντρωση του dabsyl chloride με ακετόνη ως διαλύτη, αλλά χωρίς επιτυχία. Ως λύση αποφασίσθηκε η αραίωση του δείγματος, όσο το δυνατόν περισσότερο, αλλά παράλληλα να είναι εφικτή η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των παραγώγων με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως η τυροσίνη. Ως βέλτιστη βρέθηκε η αραίωση 1:100 και συγκέντρωση του dabsyl chloride 2,3 mg/ml σε ακετονιτρίλιο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 2.

β) Επίδραση του χρόνου της αντίδρασης παραγωγοποίησης

Μελετήθηκε η διάρκεια της αντίδρασης με συγκέντρωση αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης 1,3 mg/mL και pH=10 του ρυθμιστικού ανθρακικών σε χρόνους: 12, 15 και 20 min. Δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στο εμβαδό των αμινοξέων και γι' αυτό επιλέχθηκαν τα 12 min ως ο χρόνος αντίδρασης.

Πίνακας 2: % Ανακτήσεις μεταξύ του επιμέρους μικτού προτύπου διαλύματος και του συνολικού μικτού προτύπου διαλύματος σε διαφορετικές συνθήκες

DABS	1300 ppm	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm	2300 ppm
μL DABS	200 μl	200 μl	200 μl	400 μl	200 μl	200 μl
μL δείγματος	25 μl	25 μl	12,5 μl	25 μl	25 μl	25 μl
Ογκος ένεσης	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
Αραίωση	x10	όχι	Όχι	Όχι	x10	x100
Τελικός όγκος	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1200 μl	1000 μL	1000 μL
Συστατικό	**%Ανάκτηση**	**%Ανάκτηση**	**%Ανάκτη-ση**	**%Ανάκτη-ση**	**%Ανάκτηση**	**%Ανάκτηση**
Λυσίνη	22,09	1,50	2,27	0,90	38,39	102,76
Ιστιδίνη	14,54	5,82	6,58	5,45	17,20	99,35
Τυροσίνη	4,68	2,93	1,21	5,25	8,30	103,92

Δ.-Χρ. Τσίκνα[1], Μ. Κουππάρης[1], Ν. Μέγκουλας[1], Αικ. Γκρεμηλογιάννη[1], Δ. Σταυροπούλου[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα, 157 71,

3.2 Επικύρωση μεθόδου

Α) Εκλεκτικότητα

- Αποδεικνύεται από την επιτυγχανόμενη διαχωριστικότητα (Rs) μεταξύ των πλέον δύσκολων προς διαχωρισμό ζευγών κορυφών. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι προδιαγραφές που αποτελούν το λεγόμενο «Έλεγχο καταλληλότητας συστήματος»:

	Σερίνη-Άγνωστη κορυφή	Θρεονίνη-Άγνωστη κορυφή	Τυροσίνη-Άγνωστη κορυφή
Rs	≥1,0	≥1,0	≥1,2

- Κάθε αμινοξύ δεν παρεμοδίζει με τα υπόλοιπα αμινοξέα.

Β) Γραμμικότητα

Κατασκευάσθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αμινοξύ και αξιολογήθηκε η γραμμικότητα τους από τον υπολογισμό της γραμμής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Όλοι οι συντελεστές συσχέτισης ήταν μεγαλύτεροι από 0,99.

Γ) Πιστότητα

Η αξιολόγηση της επαναληψιμότητας έδωσε $\%RSD_r < 2,0\%$ για όλα τα αμινοξέα και της ενδιάμεσης πιστότητας (ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας) $\%RSD_{ip} < 5\%$ για όλα τα αμινοξέα.

Δ) Ακρίβεια

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό της ανάκτησης των αμινοξέων στο φαρμακευτικό σκεύασμα με χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης. Η ανάκτηση βρέθηκε μεταξύ 95-105%.

Ε) Σταθερότητα

Η σταθερότητα των διαλυμάτων των παραγώγων των αμινοξέων αξιολογήθηκε με την αποθήκευση τους στο δειγματολήπτη σε θερμοκρασία 5° C για 24 ώρες. Οι %ανακτήσεις ήταν μεταξύ 95-105% για όλα τα αμινοξέα εκτός από τη μεθειονίνη που ήταν 90,2%. Επομένως εάν το δείγμα περιέχει μεθειονίνη θα πρέπει η ανάλυση να εκτελείται άμεσα.

4. Συμπεράσματα

Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια ταχεία, ακριβής, εκλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό δεκαπέντε αμινοξέων που περιέχονται σε φαρμακευτικά σκευάσματα παρεντερικής διατροφής. Το dabsyl chloride παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα των παραγώγων σε σύγκριση με άλλα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης και απλούστερη διαδικασία, καθώς δεν απαιτείται η απομάκρυνση της περίσσειας του αφού τα παραπροϊόντα του δεν παρεμποδίζουν τα παράγωγα των αμινοξέων.

5. Βιβλιογραφία

1. Jenny M. Armenta, Diego F. Cortes, John M. Pisciotta, Joe L.Shuman, Keneth J. Sullivan Jr and Vladimir Shulaev, *A sensitive and rapid method for amino acid quantitation in malaria biological samples using AccQ.Tag UPLC-ESI-MS/MS with multiple reaction monitoring*, Analytical Chemistry, p. 548-558, 2010
2. Jui-Yoa Chang, René Knecht and Dietmar G. Braun, *Amino acid analysis in the picomole range by precolumn derivatization and High-Performance-Liquid Chromatography*, Methods in Enzymology, volume 91, pages 41-48, 1983
3. Jen-Kun Lin and Jul-Yoa Chang, *Chromophoric Labelling of amino acids with 4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride*, Analytical Chemistry, volume 47, pages 1634-1638, 1975
4. Graham J. Hughes, Séverine Frutiger and Christian Fonck, *Quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of Dabsyl-amino acids within 14 min*, Journal of Chromatography, volume 389, pages 327-333, 1987
5. http://www.jascoinc.com/hplc/analysis-of-dabsyl-amino-acids-using-hplc
6. H.J. Schneider, *Amino acid analysis using DABS-Cl*, Chromatographia volume 28, 1989