
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Dezvoltarea și validarea de metode electroforetice și cromatografice cuplate cu spectrometrie de masă în cadrul analizelor metabolomice

Doctorand: **Radu-Cristian MOLDOVAN**

Conducători științifici: **Prof. dr. Radu OPREAN**
Prof. dr. Marianne FILLET



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL CUNOAȘTERII	3
Capitolul 1: Implicațiile D-aminoacizilor în bolile neurologice și neurodegenerative	5
1.1 Surse de D-aminoacizi	5
1.2 Metabolismul D-aminoacizilor	6
1.3 Rolurile D-aminoacizilor în sistemul nervos și cel endocrin	7
1.3.1 D-Ser	7
1.3.2 D-Asp	8
1.3.3 Alți D-aminoacizi	9
1.4 D-aminoacizi utilizați în terapie	10
Capitolul 2: (+) or (-)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate ca agent de derivatizare chiral	11
2.1 Introducere	11
2.2 Aspecte generale ale derivatizării cu FLEC	12
2.2.1 Sinteza și puritatea FLEC	12
2.2.2 Principiul derivatizării și mecanismul reacției	13
2.2.3 Automatizarea procesului de derivatizare	13
2.2.4 Aspecte practice	15
2.2.4.1 Raportul molar analit:FLEC	15
2.2.4.2 Sistemele tampon și pH-ul	15
2.2.4.3 Mediul de dizolvare a FLEC	16
2.2.4.4 Cinetica de reacție	17
2.2.4.5 Înlăturarea excesului de FLEC și a produsului FLEC-OH	17
2.2.4.6 Derivatizarea în fază solidă	18
2.2.4.7 Îngrijirea coloanelor și sfaturi practice	18
2.2.5 Compararea selectivității și a sensibilității cu alți agenți de derivatizare chirali	19
2.2.6 Pregătirea probelor	21
2.3 Stadiul cunoașterii în separarea derivaților de FLEC	21
2.3.1 Separări cromatografice și electroforetice	21
2.3.1.1 Separări cromatografice	21
2.3.1.2 Separări electroforetice	22
2.3.1.3 Ordinea de eluție/migrare	23
2.3.1.4 Moduri de detecție	24
2.3.2 Derivatizarea cu FLEC pentru analiza chirală de aminoacizi și peptide	25

2.3.3 Derivatizarea cu FLEC pentru analiza chirală a produselor farmaceutice	29
2.3.4 Alte aplicații	32
2.4 Concluzii	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
Ipoteze și obiective	37
Capitolul 3: O abordare prin cromatografie electrocinetică micelară cuplată cu spectrometrie de masa utilizând derivatizarea diastereoizomerică în-capilară pentru analiza chirală automatizată de aminoacizi	39
3.1 Introducere	39
3.2 Materiale și metode	41
3.2.1 Chimicale și reactivi	41
3.2.2 Instrumente	41
3.2.3 Prepararea soluțiilor	41
3.2.4 Metoda electroforetică	42
3.2.5 Procedura de derivatizare	42
3.2.6 Parametrii MS	42
3.2.7 DoE și analiza datelor	43
3.3 Rezultate și discuții	43
3.3.1 MEKC-UV și ajustarea metodei pentru detecția MS	43
3.3.2 Studii CE-MS	44
3.3.2.1 Observații tehnice legate de ESI	44
3.3.2.2 Optimizarea BGE pentru separarea chirală	45
3.3.2.3 Optimizarea procedurii de derivatizare în-capilară	47
3.3.2.4 Derivatizarea pre-capilară vs. în-capilară	50
3.3.2.5 Analiza probelor de LCR artificial	52
3.4 Concluzii și perspective	54
Chapter 4: Analiza prin electroforeză capilară cuplată cu spectrometrie de masă a unor amino acizi derivați pentru studii neurometabolice țintite – inversiunea ordinii de migrare mediată de pH	55
4.1 Introducere	55
4.2 Materiale și metode	56
4.2.1 Chimicale și reactivi	56
4.2.2 Instrumente	57
4.2.3 Metoda electroforetică	57
4.2.4 Parametrii MS	58
4.2.5 Procedura de derivatizare și SPE	58

4.3	Rezultate și discuții	60
4.3.1	Analize preliminare prin CE-UV	60
4.3.2	Transferul metodei pe MS și optimizarea BGE	60
4.3.3	Testarea metodei pe probe biologice	64
4.3.3.1	Teste inițiale	64
4.3.3.2	Optimizarea extracției	65
4.3.3.3	Evaluarea eficienței extracției și a efectului de matrice	65
4.4	Concluzii	69
Chapter 5: Evaluarea selectivității unor faze staționare pe bază de derivați de fenil pentru analiza FLEC-DL-aminoacizilor prin UHPLC-MS		71
5.1	Introducere	71
5.2	Materiale și metode	72
5.2.1	Chimicale și reactivi	72
5.2.2	Instrumente	72
5.2.3	Metoda cromatografică	73
5.2.4	Parametrii MS	73
5.2.5	Procedura de derivatizare și prepararea probelor	73
5.3	Rezultate și discuții	73
5.3.1	Studii preliminare	73
5.3.1.1	pH-ul componentei apoase a fazei mobile	74
5.3.1.2	Faza organică și gradientul	75
5.3.1.3	Selectivitatea coloanelor difenil și bifenil	75
5.3.2	Optimizarea separării FLEC-DL-AA	78
5.3.2.1	Condiții de separare optimizate folosind R_s ca răspuns	80
5.3.2.2	Condiții de separare optimizate folosind R_s și R_t ca răspunsuri	82
5.3.2.3	Compararea selectivității fazelor staționare	85
5.4	Concluzii	89
6. Discuții generale		91
7. Concluzii generale		95
8. Originalitatea și contribuțiile inovative		97
BIBLIOGRAFIE		99
ANEXE		115

Cuvinte cheie: aminoacizi, metabolomică, derivatizare chirală, inversiunea ordinii de migrare, FLEC, separare chirală

INTRODUCERE

Proteinele sunt cel mai mare grup de macromoleculă conținute de toate celulele vii. Toate proteinele, pornind de la bacterii până la cele mai complexe organisme, sunt formate din 20 de aminoacizi. Acești aminoacizi sunt legați covalent în nenumărate combinații pentru a forma secvențe unice corespunzând diferitelor proteine. Toți acești 20 de aminoacizi proteinogenici sunt α -aminoacizi, așadar structura lor generală include o grupare aminică și una carboxil legate de același atom de carbon.

O trăsătură comună pentru aproape toți α -aminoacizii (exceptând Gly) este că păședă cel puțin un centru chiral. De-a lungul anilor, multe studii s-au axat pe semnificațiile D-aminoacizilor din diverse probe. Aceștia au fost detectați în diverse țesuturi de vertebrate și nevertebrate, în formă liberă sau formând legături peptidice. Printre ei, D-Ser, D-Asp, D-Ala, D-Glu și D-Gln sunt aminoacizii liberi care se găsesc în cantități semnificative în țesuturile mamiferelor.

Ipoteză și obiective

Analiza chirală a aminoacizilor devine din ce în ce mai necesară, fiind necesară dezvoltarea de noi metode de analiză sensibile și eficiente pentru a obține maximul de informație dintr-o probă, în cel mai scurt timp.

Obiectivul principal al acestui proiect a fost dezvoltarea unor metode noi și eficiente pentru analiza D- și L-aminoacizilor din probe biologice. Drept urmare, s-au realizat trei studii (cuprinse în capitolele 3, 4 și 5), prin implementarea câtorva strategii utilizând diverse tehnici separative (CE și LC). O componentă comună a acestor metode a fost derivatizarea aminoacizilor cu (+) sau (-)-FLEC. Producții de reacție sunt perechi de diastereoizomeri, care pot fi separați folosind medii achirale.

Ținta primului studiu a fost dezvoltarea unui sistem automatizat de analiză pentru separarea și cuantificarea de D- și L-aminoacizi. Pentru aceasta, o abordare CE-MS a fost folosită, și mai exact MEKC-MS.

A doua metodă care a fost dezvoltată a presupus o abordare țintită pentru analiza D-aminoacizilor relevanți în contextul neotometabolomicii.

Obiectivul celui de-al treilea studiu a fost de a oferi o separare LC îmbunătățită pentru derivații FLEC. Până acum, toate metodele LC dezvoltate pentru analiza FLEC-DL-AA presupuneau utilizarea unei faze staționare în fază inversă (C4, C8 sau C18) și faze mobile cu conținut de tetrahidrofuran.

STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul 1:

Multe roluri importante din organismul uman au fost atribuite în ultimii 20 de ani D-aminoacizilor, un rezumat al literaturii relevante fiind descris în capitolul 1. De exemplu, unii D-aminoacizi (D-Ser, D-Ala, Gly) au fost identificați drept co-agoniști ai receptorului excitator *N*-metil-D-aspartat. Dezechilibrele acestor D-aminoacizi au fost legate de numeroase boli neurologice și neurodegenerative, cum ar fi schizofrenia, depresia, epilepsia, scleroza amiotrofică laterală, maladia Parkinson etc. Unii D-aminoacizi au fost de asemenea introduși în terapie, cum ar fi D-Ser (împreună cu antipsihotice) în tratamentul simptomelor pozitive, negative și cognitive ale schizofreniei.

Analiza chirală a aminoacizilor întotdeauna reprezintă o provocare. Având în vedere masa lor moleculară mică și lipsa cromoforilor sau fluoroforilor din structură, separarea și detecția acestora este dificilă. Pentru a depăși aceste neajunsuri, derivatizarea chirală a devenit o practică comună, crescând detectabilitatea aminoacizilor și, în același timp, oferind oportunitatea reglării selectivității.

Capitolul 2

În decursul ultimilor 30 de ani, (\pm)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate ((\pm)-FLEC) (Fig. 1) a fost folosit drept agent de derivatizare chiral în numeroase aplicații analitice implicând o gamă largă de molecule endogene, farmaceutice sau relevante pentru mediu. O revizuire cuprinzătoare a literaturii de specialitate despre utilizarea FLEC ca agent de derivatizare chiral este prezentată în capitolul 2. Obiectivul a fost prezentarea tuturor aspectelor semnificative legate de stadiul cunoașterii în derivatizarea cu FLEC și separarea chirală a derivaților rezultați folosind LC, SFC și CE, o atenție specială căzând pe aspectele practice ale procedurii de derivatizare.

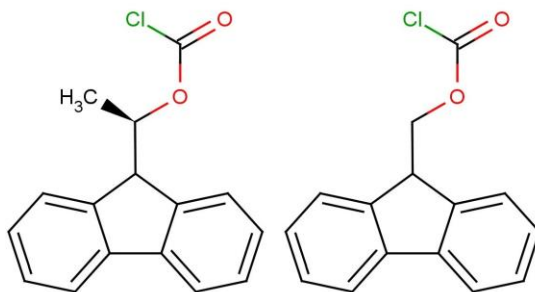


Fig. 1. Structurile (-)-FLEC (stânga) și FMOC (dreapta).

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 3

În contextul dezvoltării de metode bioanalitice, automatizarea proceselor este o necesitate pentru economisirea timpului, reducerea costurilor și creșterea fiabilității metodelor. Al treilea capitol prezintă, pentru prima dată, dezvoltarea unui sistem MEKC-MS complet automatizat pentru analiza chirală de D- și L-aminoacizi folosind FLEC drept agent de derivatizare chiral.

Procedura de derivatizare a fost optimizată folosind un plan experimental care a dus la obținerea următoarelor condiții optime: proba și FLEC injectate în raport 2:1 (15s, 30 mbar:7.5 s, 30 mbar) urmate de amestecarea timp de 15 min folosind un voltaj de 0,1 kV. Diastereoizomerii formați au fost apoi separați folosind un electrolit conținând 150 mM perfluorooctanoat de amoniu (APFO) (pH=9,5) și detectați prin spectrometrie de masă. Separare la linia de bază s-a obținut pentru 8 perechi de diastereoizomeri și separare parțială pentru 6. Metoda a dovedit o bună repetabilitate și liniaritate în zona de concentrații micromolar. Aplicabilitatea acestei metode a fost dovedită folosind probe de LCR artificial.

Capitolul 4

Considerând că până acum doar câțiva D-aminoacizi s-au dovedit a fi relevanți din punct de vedere biologic, o metodă CE-MS de analiză țintită este prezentată în capitolul 4. Aceasta este destinată analizei chirale a cinci aminoacizi relevanți din punct de vedere biologic (Ser, Asn, Asp, Gln, Glu) din LCR. Pentru a obține separarea chirală, aminoacizii au fost derivatizați cu (+)-FLEC, selectivitatea chirală fiind în strâns dependentă de pH pentru toți analiții. BGE-ul optim a fost format din 150 mM acid acetic, ajustat la pH 3,7 cu NH₄OH. Mai mult, o inversare a ordinii de migrare a derivaților de Asp a fost observată. Acest fenomen pare a fi cauzat de interacțiuni intramoleculare care afectează pK_a-ul celei de-a doua grupări ionizabile (carboxilul de pe catena laterală).

Aplicabilitatea metodei a fost evaluată folosind LCR artificial. O metodă de extracție pe fază solidă a fost dezvoltată pentru extracția selectivă a derivaților de FLEC. A fost realizată o evaluare a efectului de matrice și a randamentului de extracție, concluzionând că efectul de matrice este neglijabil iar regăsirile sunt între 46-92%. Metoda oferă o sensibilitate adecvată pentru studiile metabolice (limite de detecție sub 1 μM).

Capitolul 5

Studiul cuprins în capitolul 5 este menit să îmbunătățească cunoștințele despre separarea cromatografică a FLEC-DL-AA, toate metodele LC de analiză descrise în trecut având câteva neajunsuri importante. De exemplu, în toate studiile s-au folosit faze staționare în fază inversă de tip C4, C8 sau C18 în combinație cu faze mobile ce conțineau THF în diferite concentrații. Este binecunoscut faptul că THF este dăunător instrumentelor LC, deteriorând sau scurtând durata de viață a diverselor componente din plastic sau cauciuc. Scopul acestui studiu a fost evaluarea selectivității a două faze staționare pe bază de derivați de fenil pentru separarea FLEC-DL-AA. În acest scop, a fost utilizată eluția în gradient a unei faze mobile formate din acetat de amoniu în combinație cu diverși solvenți organici. S-a observat că diastereorezoluția este strâns influențată de pH-ul componentei apoase, în același timp fiind mai puțin influențată de alte variabile cum ar fi natura solventului organic, durata gradientului sau procentul de faza organică de la începutul gradientului. Pentru o înțelegere mai bună a acestor fenomene s-a utilizat un plan experimental, stabilindu-se câteva corelații pentru explicarea comportamentului cromatografic.

CONCLUZII

Au fost dezvoltate trei metode de analiză moderne și eficiente pentru analiza chirală a aminoacizilor proteinoagenici. Separarea acestora s-a realizat folosind tehnici separative (CE și LC) cuplate cu spectrometrie de masă. În primul studiu (capitolul 3) este descrisă dezvoltarea unui sistem de analiză complet automatizat. Automatizarea s-a realizat folosind derivatizarea în-capilară. Cel de-al doilea studiu (capitolul 4) este centrat pe dezvoltarea unei metode de analiză pentru analiza țintită a cinci aminoacizi relevanți din punct de vedere biologic și extracția acestora din probe biologice. Ultimul studiu (capitolul 5) s-a axat pe evaluarea selectivității a două faze staționare bazate pe derivați de fenil, având FLEC-DL-AA ca molecule țintă. Planificarea experimentală și analiza multivariată au fost folosite pentru a înțelege mai bine comportamentul cromatografic.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE

Cele trei studii de cercetare reprezintă metode de analiză noi și eficiente care au fost dezvoltate pentru analiza chirală de aminoacizi.

Primul studiu este format din dezvoltarea unei tehnici automatizate inovative pentru analiza chirală de aminoacizi prin MEKC-MS. Pentru prima dată, analiza chirală a acestora a fost realizată printr-o metodă MEKC-MS și, mai mult decât atât, o nouă abordare de derivatizare în-capilară a fost dezvoltată și optimizată. Variabilele care afectează derivatizarea au fost optimizate utilizând planificarea experimentală.

Al doilea studiu reprezintă o metodă CE-MS pentru studii neurometabolomice țintite. Este cunoscut faptul că doar unii D-amino acizi sunt relevanți biologic, așadar accentul a căzut pe analiza chirală a Ser, Asp, Asn, Glu și Gln, aceștia jucând un rol

semnificativ în corpul uman. Separarea la linia de bază s-a obținut pentru toți aminoacizii, iar sensibilitatea este adecvată pentru analiza acestora în lichide biologice. O descoperire interesantă din punct de vedere analitic a fost făcută atunci când inversarea ordinii de migrare a enantiomerilor acidului aspartic a fost observată. Pentru prima dată, o inversare a ordinii de migrare a diastereoizomerilor a putut fi documentată, iar mecanismul explicat. Prin măsurarea mobilității electroforetice a celor doi diastereoizomeri s-a putut observa clar că inversarea ordinii de migrare a fost cauzată de diferențe discrete ale valorilor pK_a ale celei de-a doua grupări ionizabile (carboxilul distal) acelor doi diastereoizomeri.

Ultimul studiu, cuprins în capitolul 5, reprezintă o nouă alternativă pentru separarea FLEC-DL-AA prin cromatografie de lichide. Două faze staționare fenil au fost evaluate, în combinație cu faze mobile convenționale, în termeni de selectivitate și performanța separării diastereoizomerilor. Comparativ cu studii anterioare, această abordare oferă importante avantaje, cum ar fi timpul de analiză rapid, selectivitate excelentă și folosirea de faze mobile convenționale (evitând THF). Mai mult, unele detalii privind mecanismele de separare au putut fi observate prin corelații realizate de analiza multivariată a datelor experimentale și a parametrilor fizico-chimici ai aminoacizilor.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Development and validation of electrophoretic and chromatographic methods coupled with mass spectrometry for metabolomic analyses

PhD candidate: **Radu-Cristian MOLDOVAN**

PhD supervisors: **Prof. dr. Radu OPREAN**
Prof. dr. Marianne FILLET



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION	1
LITERATURE REVIEW	3
Chapter 1: D-amino acids implications in neurological and neurodegenerative diseases	5
1.1 Origins of D-amino acids	5
1.2 D-amino acids' metabolism	6
1.3 Roles of D-amino acids in the nervous and endocrine systems	7
1.3.1 D-Ser	7
1.3.2 D-Asp	8
1.3.3 Other D-amino acids	9
1.4 D-amino acids used in therapy	10
Chapter 2: (+) or (-)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate as chiral derivatizing agent	11
2.1 Introduction	11
2.2 General aspects of FLEC derivatization reaction	12
2.2.1 FLEC synthesis and purity	12
2.2.2 Derivatization principle and reaction mechanism	13
2.2.3 Automatization of the derivatization process	13
2.2.4 Practical aspects	15
2.2.4.1 Analyte:FLEC molar ratio	15
2.2.4.2 Buffers and pH range	15
2.2.4.3 FLEC dissolution medium	16
2.2.4.4 Reaction kinetics	17
2.2.4.5 Removal of excess FLEC and produced FLEC-OH	17
2.2.4.6 Solid-phase derivatization	18
2.2.4.7 Column care and practical advice	18
2.2.5 Selectivity and sensitivity compared to other derivatization agents	19
2.2.6 Sample preparation	21
2.3 State of the art in the separation of FLEC derivatives	21
2.3.1 Chromatographic and electrophoretic separations	21
2.3.1.1 Chromatographic separations	21
2.3.1.2 Electrophoretic separations	22
2.3.1.3 Elution/migration order	23
2.3.1.4 Detection modes	24

2.3.2 FLEC derivatization for the chiral analysis of amino acids and peptides	25
2.3.3 FLEC derivatization for the chiral analysis of pharmaceuticals	29
2.3.4 Other applications	32
2.4 Conclusion	33
PERSONAL CONTRIBUTION	35
Hypothesis and objectives	37
Chapter 3: A micellar electrokinetic chromatography–mass spectrometry approach using in-capillary diastereomeric derivatization for fully automatized chiral analysis of amino acids	39
3.1 Introduction	39
3.2 Material and methods	41
3.2.1 Chemicals and reagents	41
3.2.2 Instrumentation	41
3.2.3 Solution preparation	41
3.2.4 Electrophoretic method	42
3.2.5 Derivatization procedure	42
3.2.6 MS parameters	42
3.2.7 DoE and data analysis	43
3.3 Results and discussion	43
3.3.1 MEKC-UV and method adjustment for MS detection	43
3.3.2 CE-MS studies	44
3.3.2.1 ESI related technical observations	44
3.3.2.2 BGE optimization for chiral separation	45
3.3.2.3 Optimization of the in-capillary derivatization procedure	47
3.3.2.4 Pre-capillary versus in-capillary derivatization	50
3.3.2.5 aCSF samples	52
3.4 Conclusions and perspectives	54
Chapter 4: Capillary electrophoresis-mass spectrometry of derivatized amino acids for targeted neurometabolomics – pH mediated reversal of diastereomer migration order	55
4.1 Introduction	55
4.2 Materials and method	56
4.2.1 Chemicals and reagents	56
4.2.2 Instrumentation	57
4.2.3 Electrophoretic separation	57
4.2.4 MS parameters	58
4.2.5 Derivatization and SPE	58
4.3 Results and discussion	60

4.3.1 Preliminary investigation by CE-UV	60
4.3.2 Method transfer to MS and BGE optimization	60
4.3.3 Method suitability for biological samples	64
4.3.3.1 Initial tests	64
4.3.3.2 Extraction optimization	65
4.3.3.3 Extraction efficiency and matrix effect evaluation	65
4.4 Conclusion	69
Chapter 5: Selectivity evaluation of phenyl based stationary phases for the analysis of FLEC-DL-amino acids by UHPLC-MS	71
5.1 Introduction	71
5.2 Materials and method	72
5.2.1 Chemicals and reagents	72
5.2.2 Instrumentation	72
5.2.3 LC method	73
5.2.4 MS parameters	73
5.2.5 Derivatization and sample preparation	73
5.3 Results and discussion	73
5.3.1 Preliminary studies	73
5.3.1.1 pH of the aqueous mobile phase component	74
5.3.1.2 Organic phase and gradient	75
5.3.1.3 Selectivity of diphenyl and biphenyl columns	75
5.3.2 Optimization of FLEC-DL-AA separation	78
5.3.2.1 Optimized separation conditions using R_s as response	80
5.3.2.2 Optimized separation conditions using R_s and R_t as responses	82
5.3.2.3 Comparison of stationary phase selectivity	85
5.4 Conclusion	89
6. General discussion	91
7. General conclusions	95
8. Originality and innovative contributions	97
BIBLIOGRAPHY	99
ANEXES	115

Keywords: amino acids, metabolomics, chiral derivatization, reversal of migration order, FLEC, chiral separation

INTRODUCTION

Proteins are the largest group of macromolecules found in all living cells. All proteins, starting from bacteria up to the most complex living organisms, are formed by 20 amino acids. These amino acids are covalently bound in countless combinations to form unique sequences corresponding to all different proteins. All these 20 proteinogenic amino acids are α -amino acids, therefore the general structure includes an amino group and a carboxyl group linked to the same carbon atom.

A common feature of almost all α -amino acids (except Gly) is that they have at least one chiral center. Over the years, numerous studies dealt with the significance of D-amino acids in various samples. D-AAAs were detected in numerous tissues of vertebrates and invertebrates, either in free form or peptide-bound. Among them, D-Ser, D-Asp, D-Ala, D-Glu and D-Gln are the free D-AAAs occurring in significant levels in mammalian tissues.

Hypothesis and objectives

The chiral analysis of amino acids is becoming more and more necessary. Therefore, new sensitive and efficient tools need to be developed in order to get the maximum of information out of a sample in the shortest time possible.

The main objective of this research was to design new and efficient methods for the analysis of D- and L-amino acids in biological fluids. Therefore, three studies were performed (comprised in chapters 3, 4 and 5) on both CE and LC. The objective was reached by implementing several strategies using different separative techniques. A common feature of all the developed methods was the derivatization of amino acids with (+) or (-)-FLEC. The reaction products are pairs of diastereomers, which can be separated using achiral separation media.

The aim of the first study was to develop an automatized analysis setup for the separation and quantification of D- and L-AAAs. For this, a CE-MS approach was used, and more specifically MEKC-MS.

The second method that was developed was a targeted approach for the analysis of relevant D-AAAs in the context of neurometabolomics.

The third study was meant to provide better LC separation tools for FLEC derivatives. Until now, all of the previously developed LC methods for the analysis of FLEC-DL-AAAs used reversed phase C4, C8 or C18 stationary phases and THF based mobile phases.

LITERATURE REVIEW

Chapter 1:

In the last 20 years many important roles in the human organism have been attributed to D-amino acids. A summary of the relevant literature is described in **Chapter 1**. For instance, some AAs (D-Ser, D-Ala, Gly) have been identified to be as co-agonists of the *N*-methyl-D-aspartate excitatory receptor of glutamate. Their misregulation has been linked to numerous neurological and neurodegenerative diseases, such as schizophrenia, depression, epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease etc. Some D-AAs have also been introduced in therapy, such as D-Ser (together with antipsychotics) in the treatment of positive, negative and cognitive symptoms of schizophrenia.

The chiral analysis of amino acids usually proves to be challenging. Considering the small molecular mass of the amino acids and their lack of chromophore or fluorophore moieties in the structure, their separation and detection proved to be difficult. In order to overcome this, chiral derivatization is a common practice, increasing the detectability of the amino acids and, at the same time, offering the opportunity to tune the selectivity.

Chapter 2

Over the last 30 years, (\pm)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate ((\pm)-FLEC) (Fig. 1) was used as a chiral derivatizing agent (CDA) in various analytical applications involving a wide range of endogenous, pharmaceutical and environmentally relevant molecules. A comprehensive literature review on the use of FLEC as a CDA is presented in **Chapter 2**. The aim was to present all the significant aspects related to the state of the art in FLEC labeling and subsequent chiral separation of the resulting diastereomers using LC, SFC and CE techniques, with a special focus on some of the practical aspects of the derivatization procedure.

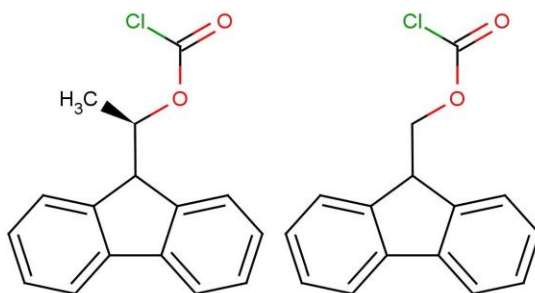


Fig. 1. (-)-FLEC (left) and Fmoc (right) structures.

PERSONAL CONTRIBUTION

Chapter 3

In the context of bioanalytical method development, process automatization is nowadays a necessity in order to save time, improve method reliability and reduce costs. The **3rd Chapter** presents, for the first time, the development of a fully automatized MEKC-MS method with in-capillary derivatization for the chiral analysis of D- and L- amino acids using FLEC as labeling reagent. The derivatization procedure was optimized using an experimental design approach leading to the following conditions: sample and FLEC plugs in a 2:1 ratio (15s, 30mbar: 7.5s, 30mbar) followed by 15 min of mixing using a voltage of 0.1 kV. The formed diastereomers were then separated using a background electrolyte (BGE) consisting of 150 mM ammonium perfluorooctanoate (APFO) (pH=9.5) and detected by mass spectrometry (MS). Complete chiral resolution was obtained for 8 amino acids, while partial separation was achieved for 6 other amino acid pairs. The method showed good reproducibility and linearity in the low micromolar concentration range. The applicability of the method to biological samples was tested by analyzing artificial cerebrospinal fluid (aCSF) samples.

Chapter 4

Given the fact that until now only some D-AAs have been found to be biologically relevant, the development of a targeted CE-MS approach is presented in **Chapter 4**. The method is intended to be used for the chiral analysis of five biologically relevant amino acids (Ser, Asn, Asp, Gln and Glu) in CSF. In order to achieve chiral resolution, the amino acids were derivatized with (+)-FLEC and the chiral selectivity was found to be highly dependent on pH for all analytes and the optimized BGE consisted of 150 mM acetic acid, adjusted to pH 3.7 with NH₄OH. Furthermore, a reversal of the migration order of Asp derivatives was observed. This phenomenon seems to be caused by intra-molecular interactions affecting the pK_a of the second ionizable group (the side chain carboxyl).

The applicability of this method was evaluated using aCSF. A solid phase extraction (SPE) protocol was developed for the selective extraction of the FLEC derivatives. A full evaluation of the matrix effect and extraction yield was performed concluding that the matrix effect is marginal and the recoveries are between 46 and 92%. The method offers adequate sensitivity (limits of detection below 1 μM).

Chapter 5

The study comprised in **Chapter 5** is meant to progress the knowledge in the liquid chromatographic separations of FLEC-DL-AAAs. All the methods described before for their diastereomeric separation had some important drawbacks. For example, all studies

employed C4, C8 or C18 stationary phases in combination with THF in various ratios as mobile phases. It is well known that THF use is detrimental to the liquid chromatographic instruments, which cause damage and/or shorten the life of different plastic or rubber components. The aim of this study was to evaluate the selectivity of two phenyl stationary phases for the separation of FLEC-DL-AAs. For this, gradient elution of ammonium acetate in combination with different organic solvents was employed. The diastereoresolution was observed to be closely influenced by the pH of the mobile phase; at the same time, the resolution was less influenced by other variables such as the nature of organic solvent, length of the gradient or the starting percentage of organic solvent. For a better understanding of these phenomena, an experimental design was employed, several correlations being established explaining the chromatographic behavior.

CONCLUSIONS

Three novel and efficient analysis methods were developed for the chiral analysis of proteinogenic amino acids. Their separation was achieved using separative techniques (CE and LC) coupled with mass spectrometry. In the first study, comprised in chapter 3, the development of a completely automatized analysis system is described. The automatization was successfully achieved using in-capillary derivatization. The second study (chapter 4) is focused on the development of a targeted analysis method for the enantiomers of 5 biologically relevant amino acids and their extraction from biological samples. The last study (chapter 5) deals with the selectivity evaluation of two phenyl based stationary phases, having FLEC-AA derivatives as target analytes. Experimental design and multivariate data analysis were used in order to better understand the chromatographic behavior.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

The three research studies which were carried represent new and efficient analysis methods that have been developed for the chiral analysis of amino acids.

The first study is comprised of the development of an innovative automated technique for the chiral analysis of amino acids by MEKC-MS. For the first time, the chiral analysis of amino acids was achieved on a MEKC-MS setup and, moreover, a new in-capillary labeling approach was developed and optimized. The variables affecting the derivatization were optimized using an experimental design procedure.

The second study represents a CE-MS method for targeted neurometabolomics. It is known that only some D-amino acids have a biological value, therefore the focus was on the chiral analysis of D- and L- enantiomers of Ser, Asp, Asn, Glu and Gln, as these amino acids play significant roles within the human body. Baseline separation was achieved for all amino acids and the sensitivity is adequate for the analysis of these D-AAAs in biological

fluids. An interesting discovery was made from an analytical point of view, when the reversal of migration order was observed for Asp enantiomers. For the first time, a reversal of migration order of diastereomers could be documented and the mechanism explained. By measuring the electrophoretic mobilities of the two diastereomers, it could be clearly observed that the reversal of migration order was caused by a discrete difference in the pK_a values of the second ionizable group (distal carboxyl) of the two diastereomers.

The last study, comprised in chapter five, represents a new alternative for the separation of FLEC-DL-AAs by liquid chromatography. Two phenyl stationary phases were evaluated, in combination with common mobile phases, in terms of their selectivity and performance for separating the diastereomers. Compared to the previous studies, this approach offers important advantages such as fast analysis times, excellent selectivity and use of common mobile phases (as compared to the THF based mobile phases reported in literature). Moreover, insights in the separation mechanisms were gained through correlations by multivariate analysis of the experimental data and physicochemical parameters of the amino acids.