



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Luka Ozdanovac

**STANDARDIZIRANE METODE ZA
ANALIZU AMINOKISELINA U HRANI**

Kemijski seminar I

D. E. Otter, *British Journal of Nutrition* **108** (2012) 230–237.

Zagreb, 2020.

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	3
§ 2. METODE KVALIFIKACIJE I KVANTIFIKACIJE AMINOKISELINA	4
2.1. Hidroliza proteina	4
2.2. Usporedba metoda tekućinske kromatografije visoke i ultravisoke učinkovitosti za analizu aminokiselina	6
2.3. Vezani sustav Tekućinska kromatografija – spektrometrija masa u analizi aminokiselina.	8
2.3.1 2,7-dimetil-3,8-dinitropirazolo [1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion (DDP).....	9
2.3.2 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid (DPD)	9
2.3.3 Vezani sustav kromatografije ionskih parova i tandemne spektrometrije masa u analizi aminokiselina	12
2.4. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa u analizi aminokiselina	13
2.5. Vezani sustav kapilarna elektroforeza – spektrometrija masa u analizi aminokiselina.....	18
2.5.1 Analiza taurina kapilarnom elektroforezom	18
§ 3. ZAKLJUČAK	22
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	23

§ 1. UVOD

Aminokiseline su osnovne jedinice proteina što se ujedno smatra njihovom primarnom biološkom ulogom. U ljudskom organizmu prisutno je dvadeset osnovnih aminokiselina od kojih se točno polovina može u organizmu i sintetizirati, dok je drugih deset aminokiselina u organizam potrebno unijeti putem hrane (esencijalne aminokiseline). Unatoč činjenici, što je prva aminokiselina otkrivena davne 1806. godine¹ interes za njihovim proučavanjem ne jenjava ni danas, naprotiv u posljednje vrijeme razvija se pojam individualne prehrane temeljen upravo na optimalnom unosu proteina. Uspješna hidroliza peptidne veze, veze između karboksilne skupine jedne aminokiseline i amino skupine druge aminokiseline, predstavlja osnovni preduvjet za uspješnu analizu aminokiselina (AAA). Ako govorimo o analizi aminokiselina u biološkim uzorcima tada navedenom koraku prethodi izolacija proteina iz matrice. Nakon izolacije, kromatografski je potrebno odijeliti aminokiseline kako bi ih uspješno mogli kvantificirati. Zbog različite kemijske prirode aminokiselina, potrebno je uvjete hidrolize prilagoditi uzorku. Kromatografske metode i vezani sustavi koji se koriste za AAA su tekućinska kromatografija (LC), vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa, (LC-MS) te vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Kada govorimo o tekućinskoj kromatografiji, naglasak se stavlja na LC metode kod kojih se posebno ističu kromatografija obrnutih faza i kromatografija ionske izmjene (*engl. Reverse phase i Ion Exchange* (RP i IE)), a kao važnu tehniku valja spomenuti i vezani sustav kapilarna elektroforeza – spektrometrija masa (CE-MS). Također konvencionalni pristup analizi podrazumijeva upotrebu derivatizacijskih reagensa uz kromatografsko razdvajanje s UV ili fluorescencijskim detektorom. Tako se postiže veća osjetljivost metode i povećanje hidrofobnosti aminokiselina koje se duže zadržavaju na kolonama RP. Neki od često korištenih derivatizacijskih reagensa su: fenil izotiocijanat (PITC), 4-nitrobenzoil klorid, *o*-ftaldialdehid (OPA), 9-fluorenilmetil klorformijat (FMOC-Cl) itd.³

§ 2. METODE KVALIFIKACIJE I KVANTIFIKACIJE AMINOKISELINA

2.1. Hidroliza proteina

Kombinacija faktora kao što su temperatura, vrijeme i reagens koji su korišteni za hidrolizu ključni su za njenu uspješnost. Rezultati analiza standarda ili kratkih peptida u pravilu su pouzdani i točni, problemi se javljaju s kompleksnijim (stvarnim) uzorcima koji zahtijevaju dodatnu pripremu.

Unatoč snažnom razvoju analitičkih metoda u području proteomike, metoda za hidrolizu proteina razvijena 1954. i dalje je zlatni standard.⁴ Metoda podrazumijeva kiselo kataliziranu hidrolizu peptidne veze 6 molarnom otopinom klorovodične kiseline (HCl) u uvjetima vakuuma pri temperaturi od 100 -165 °C u trajanju do 72 sata. Prednosti standardne metode su mogućnost primjene i u tekućoj i u plinskoj fazi. Također, HCl se nakon hidrolize lako otparava što omogućava direktnu analizu hidrolizata iz pufera. Zbog različite kemijske prirode aminokiselina, kiseli uvjeti, visoka temperatura i dugotrajna hidroliza ne predstavljaju optimalne uvjete za sve aminokiseline, naročito za aminokiseline koje sadrže sumpor u svojoj strukturi (cistein i metionin). U navedenim uvjetima asparagin i glutamin u potpunosti hidroliziraju do asparaginske i glutaminske kiseline. Triptofan se u potpunosti raspada dok se cistein u uvjetima kisele hidrolize ne može u potpunosti kvantificirati. Nadalje, po prisutnosti onečišćenja iz matrice tirozin se djelomično raspada, a serin i treonin se pod određenim uvjetima, nepotpuno dovršenog procesa hidrolize djelomično hidroliziraju (npr. vlaga u uzorcima ili hidroliza iz vodenih otopina).

Način na koji će se odrediti parametri hidrolize proteina određen je karakteristikama biološkog uzorka, njegovom složenosti i stabilnosti. Usporedbom šest različitih metoda hidrolize kod kojih su korištene HCl i metansulfonska kiselina ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) pri različitim temperaturama i vremenu hidrolize uz visoku preciznost, točnost i ponovljivost te visoki postotak poklapanja standarada (98.4%) za sve kvantificirane aminokiseline, metode nisu pokazale statistički značajnu razliku u usporedbi s referentnom metodom.⁵

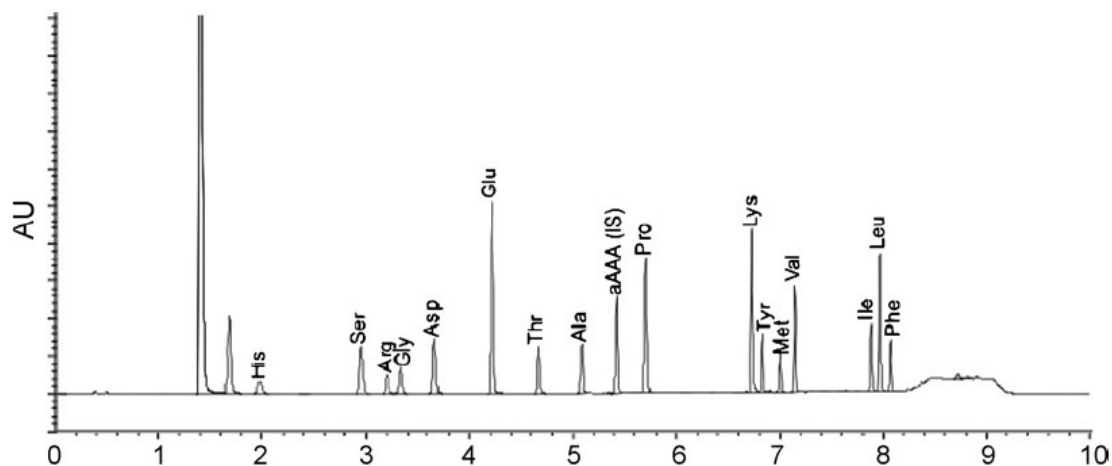
U literaturi se navode i pokusi u kojima su se kao reagensi za hidrolizu koristile sulfonske kiseline koje spadaju u skupinu jakih kiselina s vrlo niskom pKa vrijednošću.⁶ Sulfonske kiseline za razliku od HCl-a omogućavaju određivanje triptofana i metionin sulfoksida. Dok se triptofan kod hidrolize HCl-om raspada, metionin sulfoksid, koji nastaje oksidacijom djelomično se reducira povratno u metionin. Nedostatak analize sa sulfonskim kiselinama može biti njihovo kasnije eliminiranje iz uzorka, jer su neke od njih (metansulfonska kiselina) nehlapive.

2.2. Usporedba metoda tekućinske kromatografije visoke i ultravisoke učinkovitosti za analizu aminokiselina

Usporedba metoda Pico Tag•HPLC i AccQ•Tag_{ultra} UPLC za analizu aminokiselina u hidrolizatima kazeina te u goveđem serumskom albuminu ipak pokazuju napredak po pitanju automatizacije postupaka i usavršavanju instrumentnih alata za provođenje analiza. Kontroliranom hidrolizom dvjema endoproteazama s različitim mjestima cijepanja te ultrafiltracijom, pripremljeni su hidrolizati oba proteina u otopini internog standarda (α -amino adipinska kiselina). Usporedba metoda HPLC i UPLC provedena je na osnovu usporednih referentnih otopina derivatiziranih fenil izotiocijanatom i 6-aminokinolil-*N*-hidroksisukcinimidil karbamatom (AQC). Metoda UPLC, očekivano je pokazala sposobnost detekcije manjih koncentracija od HPLC metode (Tablica 1.). Tehnika HPLC u trajanju od 11 minuta ne razdvaja sve aminokiseline, pa tako koeluiraju leucin i izoleucin te klaster arginina, triptofana, alanina i prolina. Po završetku kromatografije potreban je dodatni korak ispiranja mobilnim otopinama prije analize narednog uzorka, što produžuje ukupno trajanje kromatografije na 23.5 minuta. Derivatizacijom hidrolizata kazeina s (AQC) Metodom UPLC sve aminokiseline su odvojene unutar 8 minuta (Slika 1.). Metoda UPLC zahtijeva dodatno ispiranje kolone u trajanju od 2 minute, što produžuje trajanje ciklusa na ukupnih 10 minuta.

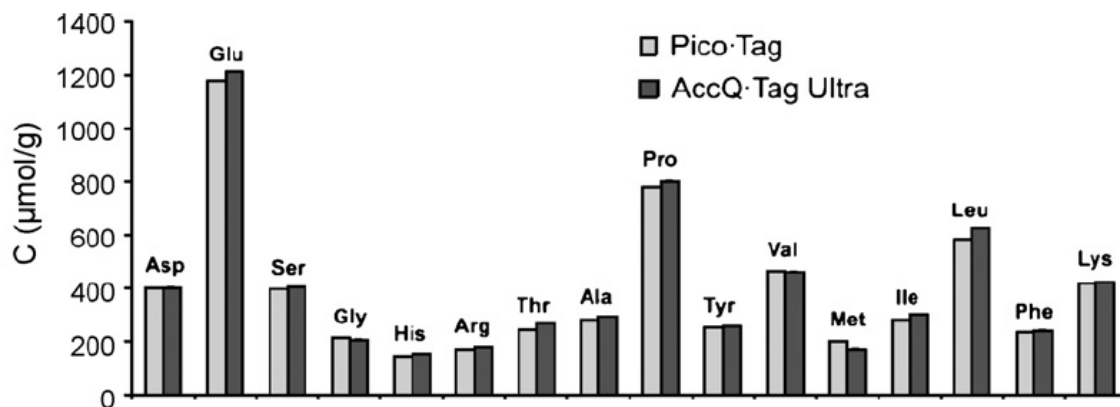
Tablica 1. Usporedba Pico Tag•HPLC i AccQ•Tag_{ultra}.

	HPLC	UPLC
Instrument	Alliance 2695	Acquity (Waters)
Detektor	2487 Apsorbancijski detektor	2996 DAD
Kolona	PicoTag AAA kolona 150•3.9 mm, 4 μ m	BEH C18, 100•2.1mm, 1.7 μ m
Brzina protoka (ml/min)	1.5	0.7
Temperatura kolone (°C)	36	55
Volumen injektiranja (μl)	10	1
Valna duljina detekcije (nm)	254	260
Vrijeme kromatografije (min)	23.5	10
LOD (μM)	1.3-2.5	0.4-1.6
LOQ (μM)	4.3-8.4	1.3-5.3



Slika 1. Kromatogram dobiven metodom UPLC, AQC derivatiziranih aminokiselina iz uzorka hidrolizata kazeina ⁷

Na Slici 2. nalazi se grafikon na kojem su uspoređene koncentracije aminokiselina dobivenih starom Pico Tag•HPLC i novom AccQ•Tag_{ultra} metodom, prihvatljivi RSD za obje metode iznosio je 3%. Na osnovu statističkih podataka razlika između Pico Tag•HPLC i AccQ•Tag_{ultra}, pokazuje kako su obje metode prihvatljive uz nekoliko prednosti UPLC metode. Ukupno vrijeme analize skraćeno je 2.4 puta, a UPLC metoda uključuje automatizaciju derivatizacije.⁷

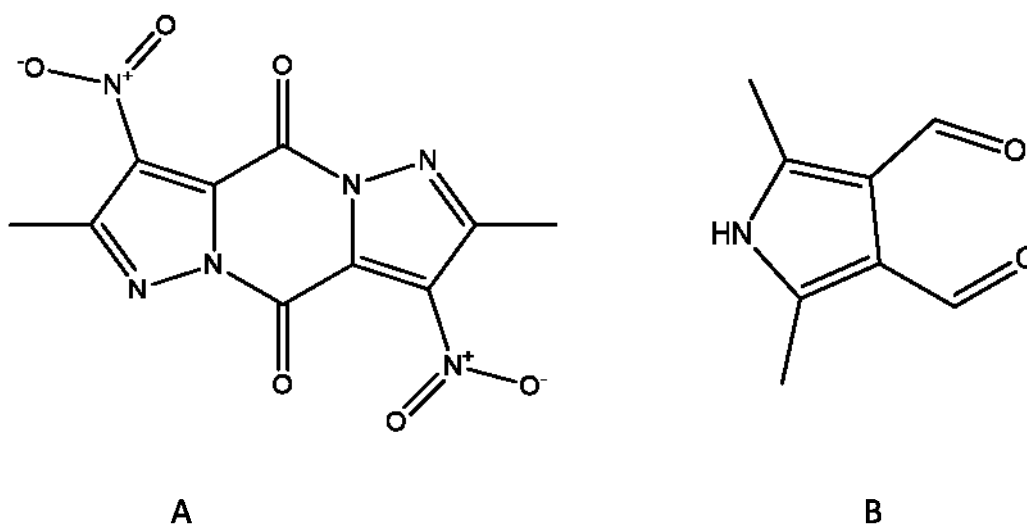


Slika 2. Koncentracija aminokiselina u hidrolizatu kazeina analiziranih Pico Tag•HPLC i AccQ•Tag_{ultra} ⁷

2.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa u analizi aminokiselina

Razvoj analitičke instrumentacije naročito tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti HPLC ili UPLC, spektrometrije masa i novih derivatizacijskih reagensa te novih kromatografskih kolona doveo je do značajnog pomaka po pitanju AAA. Paralelno se razvijaju metode kod kojih se primjenjuje direktno injektiranje uzorka na MS pri čemu se optimizacija metoda okreće prema povećanju broja aminokiselina koje se analiziraju, smanjenju vremena koje je potrebno za pripremu, analizu i kvantifikaciju aminokiselina u uzorcima te boljoj rezoluciji između aminokiselina.

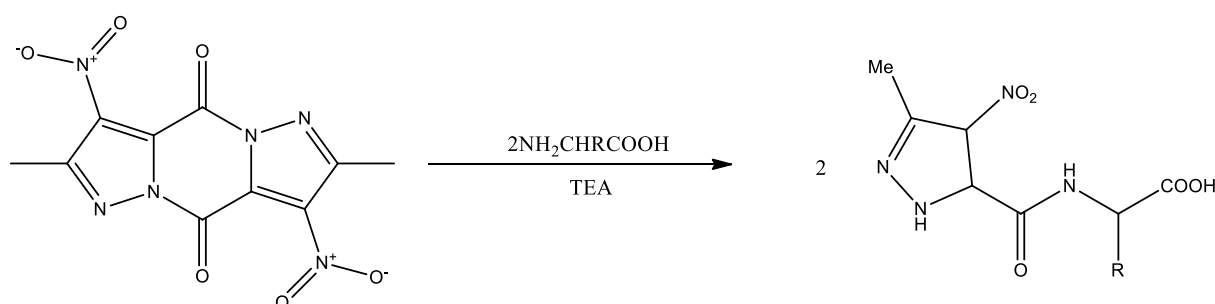
Kako je ranije spomenuto fenil izotiocijanat i *o*-ftalaldehid se koriste dugi niz godina kao derivatizacijski reagensi, u posljednje vrijeme organskom sintezom radi se na razvoju novih poboljšanih reagensa koji će biti učinkovitiji, stabilniji i osjetljiviji na sobnoj temperaturi. Takva dva derivatizacijska reagensa su i 2,7-dimetil-3,8-dinitrodipirazolo[1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion i 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid.



Slika 3. 2,7-dimetil-3,8-dinitrodipirazolo[1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion (A) i 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid (B)

2.3.1 2,7-dimetil-3,8-dinitropirazolo [1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion (DDP)

Spoj 2,7-dimetil-3,8-dinitrodipirazolo[1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion (DDP) derivatizacijski je reagens za čiju sintezu je potrebno 30 minuta u prisutnosti 0.04 M trietilamina u smjesi dimetil sulfoksida i vode. Reagira s primarnim i sekundarnim amino skupinama te daje stabilne adukte koji se mogu analizirati RP-HPLC metodom na valnoj duljini od $\lambda = 280$ nm.

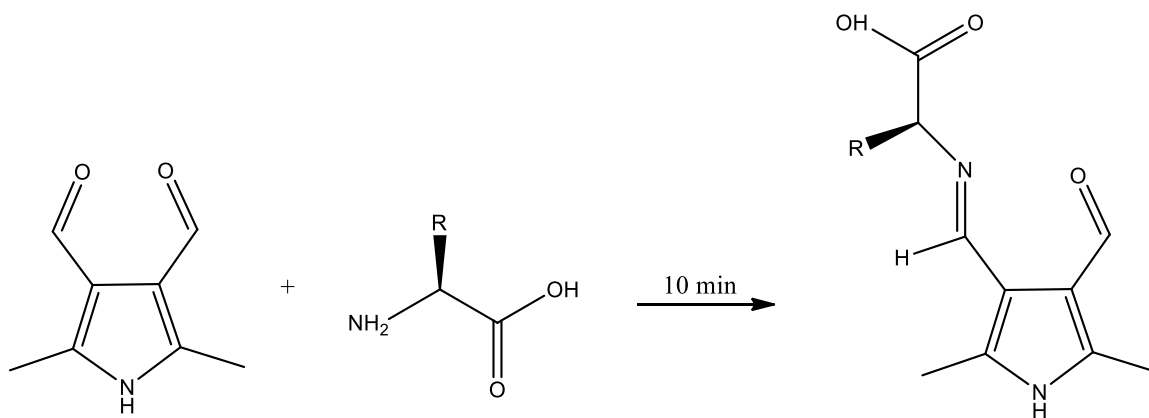


Slika 4. Reakcijska shema DDP-a i aminokiselina

Parametri HPLC metode uključivali su Phenomenex Gemini 5 μm ODS (250 mm \times 3.0 mm) kolonu s pretkolonom koja je punjena istom stacionarnom fazom. Kromatografija se provodi gradijentnom elucijom, kombinacijom mobilnih otopina A (fosfatni pufer $c=0.05$ M pH = 3.0); i B (metanol) pri brzini protoka 0.5 ml/min. Optimalno razdvajanje postignuto je pri temperaturi 33 ± 2 °C. Derivatizacijski reagens ne interferira s pikovima aminokiselina, što je olakšalo analizu gdje je limit kvantifikacije iznosio 20-80 pmol. Derivatizacijska reakcija izvedena je u smjesi vode i DMSO-a što je dodatno olakšalo postupak jer nema potrebe za ekstrakcijom otapala prije analize.⁸

2.3.2 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid (DPD)

Spoj 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid (DPD), prikazan je na Slici 5. na kojoj je vidljiva shema reakcije s aminokiselinama. DPD je korišten kao derivatizacijski reagens koji je reagirao s primarnom amino skupinom u reakciji koja traje 10 minuta. Optimizacijom temperature, pH te koncentracijom reagensa dobiveni su optimalni reakcijski uvjeti za sintezu DPD-a.



Slika 5. Reakcijska shema DPD-a i aminokiselina

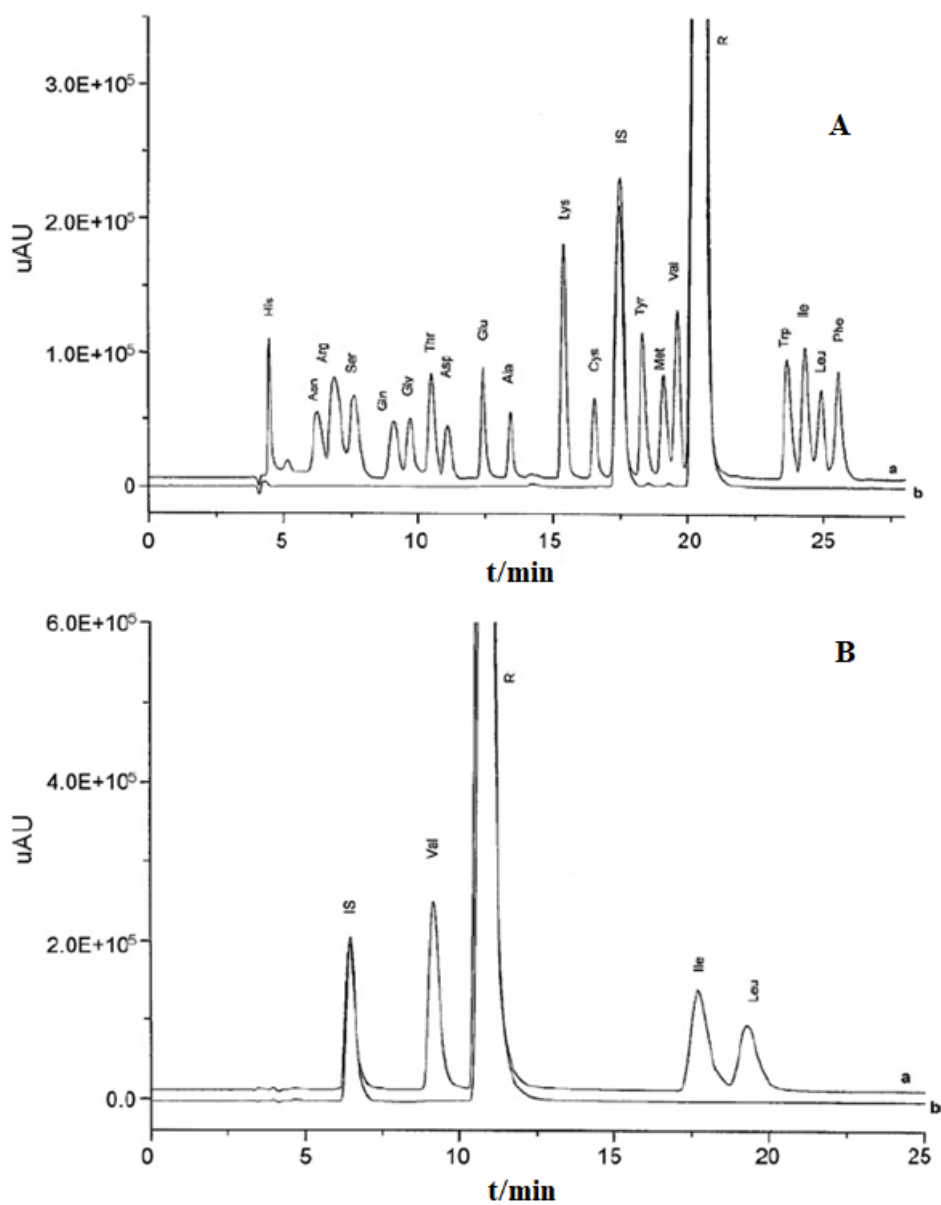
Na Slici 6. (A) vidljiv je kromatogram dobiven gradijntnom metodom (Tablica 2.) gdje je mobilna otopina A metanol i B trietilamonijev fosfatni pufer ; $c=0.05$ M, $pH=2.5$ a brzina protoka iznosila je 0.32 ml/min. Vidljivo je kako višak reagensa DPD ne interferira s uzorkom, kromatogrami (A) predstavljaju uzorke u kojima se nalazi derivatizacijski reagens bez aminokiselina, dok kromatogrami (B) predstavljaju uzorke koji uz DPD sadrže i derivatizirane aminokiseline. Izokratna metoda pokazala se kao bolja opcija za analizu aminokiselina koje imaju razgranatiji bočni ogranak (valin, izoleucin, leucin). Valna duljina analize iznosila je $\lambda=320$ nm, a granica detekcije $3.80-10.9$ pmol/injektiranju. Na Slici 6. (B) nalazi se kromatogram dobiven izokratnom metodom kod koje je mobilna otopina bila smjesa mobilnih otopina A i B, $26/74$ (v/v) gdje je mobilna otopina A mješavina metanola i acetonitrila $75:25$ (v/v), a mobilna otopina B trietilamonijev fosfatni pufer; $c=0.05$ M, $pH=2.5$. Brzina protoka iznosila je 0.4 ml/min.

Tablica 2. Podaci o gradijntnom eluiranju metoda (A).

t/min	% (A)	% (B)
0	8	92
10	32	68
25	50	50
30	8	92

Parametri HPLC metode uključivali su Phenomenex Gemini $5 \mu\text{m ODS}$ ($250 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$) kolonu s pretkolonom koja je također punjena istom stacionarnom fazom. Pik reagensa DPD ne interferira s pikovima aminokiselina. Usporedbom s preostalim derivatizacijskim reagensima (Dns-Cl, Fmoc-Cl, NBD-F), DPD je reagirao brže u blažim reakcijskim uvjetima

te je pokazao veću selektivnost. Laka sinteza derivatizacijskog reagensa, stabilnost adukta koje DPD tvori s aminokiselinama te izostanak merkapto-spojeva kao koreagensa ima praktičnu važnost pri analizi aminokiselina.⁹



Slika 6. Kromatogrami derivatiziranih aminokiselina s DPD-om, dobivenih gradijentnom (A) i izokratnom (B) metodom⁹

2.3.3 Vezani sustav kromatografije ionskih parova i tandemne spektrometrije masa u analizi aminokiselina

Kromatografija ionskih parova ili *engl. Ion pair kromatografija (IPC)* učinkovita je kromatografija obrnutih faza (RP-LC) za razdvajanje organskih ili anorganskih analita koji sadrže snažno polarnu skupinu. Glavna karakteristika ove vrste kromatografije je dodavanje reagensa ionskog para u mobilnu otopinu. Najčešće se radi o alkilsulfonatu – alkilsulfatu ili alkilamonijevoj soli. Svrha dodavanja reagensa ionskog para ($c=10\text{--}100\text{ mM/l}$) u mobilnu otopinu je promjena retencijskog vremena ionskog analita. Drugim riječima promjenom koncentracije reagensa koji se dodaje u mobilnu otopinu, retencijski faktor (R_f) za suprotno nabijeni analit može biti povećan za faktor 10-20 u usporedbi s vrijednosti R_f u kojoj nije prisutan reagens ionskog para.

Kao parametar koji je vrlo važan za dobro razdvajanje analita, svakako treba razmotriti koncentraciju reagensa ionskog para u mobilnoj otopini te pH vrijednost mobilne otopine.^{10, 11} Dodavanjem heptafluoromaslačne kiseline (*engl. Heptafluorobutyric acid*, HFBA) u mobilnu otopinu pri čemu dolazi do nastanka butilnog estera s aminokiselinama, postiže se bolja oštrina pika i rezolucija među pikovima. U kombinaciji sa spektrometrom masa koji ima izrazitu selektivnost i mogućnost odvajanja iona na osnovu omjera mase i naboja (m/z), moguće je kvantificirati kompleksne uzorke.¹² Tako se skraćuje vrijeme koje uzorak provodi na ionskom izvoru te smanjuje kontaminacija spektrometra masa.

U literaturi je opisan primjer u kojem se u mobilnu otopinu dodaje anionski HFBA reagens ionskog para kako bi se poboljšala interakcija između analita i stacionarne faze. Kao mobilna otopina A korištena je 0.5 M vodena otopina HFBA, a kao mobilna otopina B 0.5 M vodena otopina HFBA u metanolu. U gradijentnoj metodi koja je trajala 13.3 minute korištena je kolona Zorbax SB-C18, 2.1 mm × 50 mm 1.8 μm, pri protoku od 0.5 ml/min. 3 od 10 najintenzivnijih prijelaza u MRM (*engl. Multiple Reaction Monitoring*) načinu snimanja odabrana su za svaki analit. Metoda je omogućila kvantifikaciju 22 aminokiseline od čega 20 proteogenih aminokiselina te citrulin i ornitin. Sama metoda kompatibilna je s elektrosprej načinom ionizacije (*engl. Electro Spray Ionization*) kao i s kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku (*engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).¹³

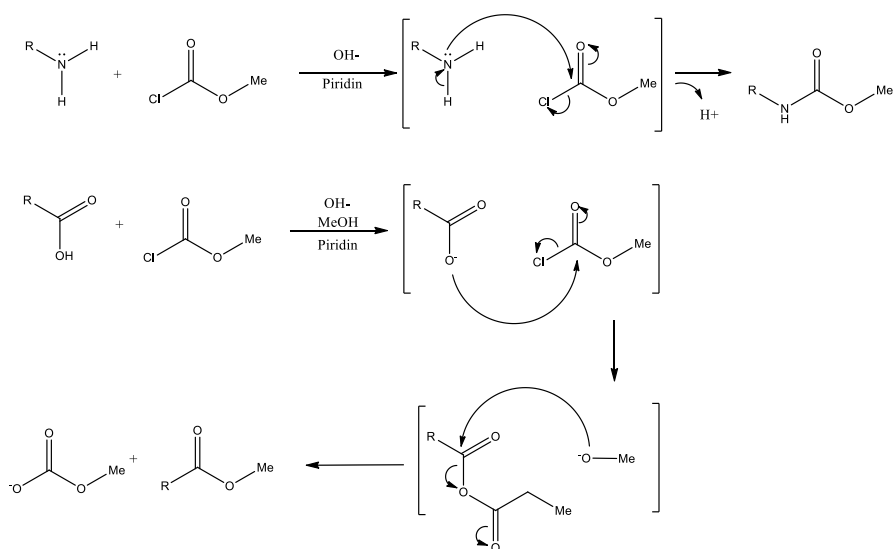
Prednost ove metode svakako je i mala količina potrebnog uzorka (10 μ l) krvne plazme za razliku od ranije razvijenih metoda kod kojih je za isti tip uzorka ta količina bila i do deset puta veća.¹⁴

2.4. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa u analizi aminokiselina

Plinska kromatografija (GC) podrazumijeva kromatografsku analitičku metodu za razdvajanje uzoraka koji mogu biti upareni ili koji se takvima mogu učiniti derivatizacijom s određenim reagensom pri čemu njihova struktura neće biti narušena. Čestu primjenu nalazi kod analize čistoće uzoraka te izolacije željenog analita iz smjese.¹⁵

Vezani sustav spektrometrije masa spregnut s plinskom kromatografijom korišten je za određivanje aminokiselina. Uzorci, najčešće šećeri i njihovi derivati, derivatiziraju se postupkom sililiranja. Kod bioloških uzoraka (krv i urin), koji u sebi sadrže izvanstanične metabolite korišten je postupak derivatizacije s metilklorformijatom (MCF), a radi se o reakciji alkiliranja. Reakcija alkiliranja odvija se na primarnim i sekundarnim amino skupinama. Derivatizacija s metilklorformijatom prevodi organske kiseline, bez obzira sadrže li amino skupinu u estere i karbamate (Slika 7.).¹⁶ Sama reakcija je vrlo brza i odvija se u roku od jedne minute pri sobnoj temperaturi od 25 °C u vodenoj fazi.

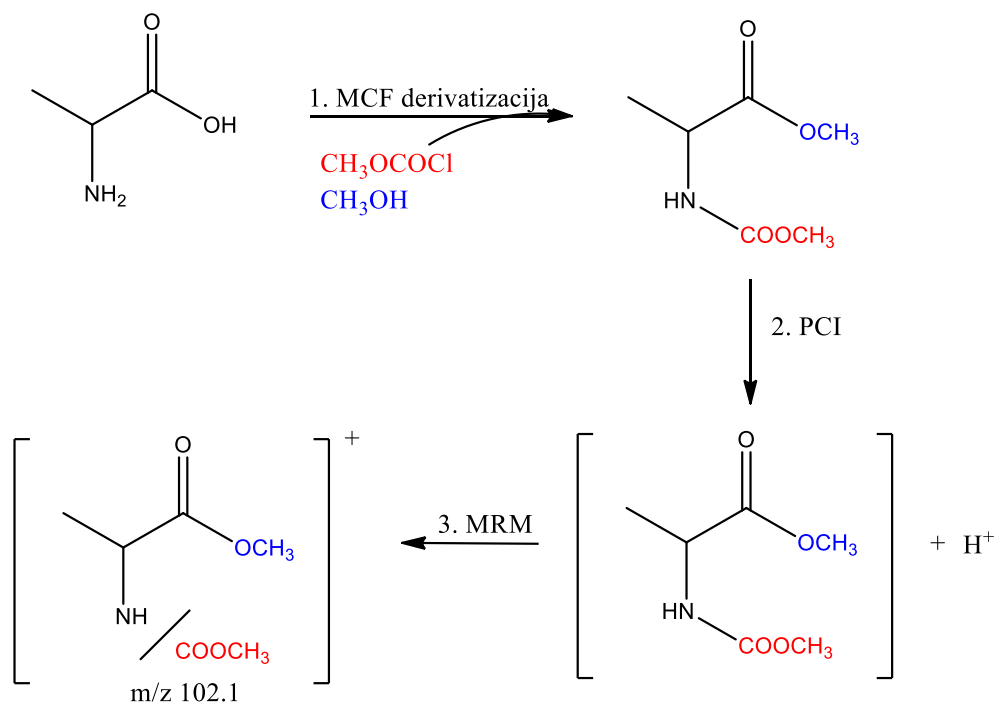
Ovom metodom derivatizacije moguće je odrediti preko 100 organskih kiselina koje istodobno mogu sadržavati i amino skupinu.



Slika 7. Mehanizam MCF reakcije u kojem se aminokiseline prevode u estere i karbamate koji se mogu analizirati vezanim sustavom GC-MS¹⁶

Kromatogrami dobiveni metodom GC-MS razlikuju se ovisno o tipu, kvaliteti i načinu na koji su uzorci pripremljeni. Uzorci ekstracelularnih metabolita koji su rasli na hranjivim podlogama s dostatnom količinom hranjivih tvari pokazuju velik broj te visok intenzitet MCF derivatiziranih pikova, za razliku od uzoraka koji su se razvijali s nedovoljnom količinom hranjivih tvari. S obzirom na količinu biomase iz koje su dobiveni uzorci intracelularnog matriksa kromatogrami se razlikuju u intenzitetu i broju dobivenih pikova. Za zaključiti je kako su uzorci koji su dobiveni iz manje količine biomase rezultirali nižim intenzitetima i rjeđim pikovima derivatiziranih uzoraka. Uzorci kod kojih je reakcija zaustavljena uz pomoć hladne otopine glicerola, pokazuju nešto niži broj i intenzitet derivatiziranih pikova, dok je kod uzoraka koji su pripremljeni metodom brze filtracije uz ispiranje hladnom otopinom metanola i vode intenzitet i broj pikova nešto veći. Pri izvođenju ovih pokusa javljaju se problemi koji rezultiraju lošom kromatografijom, niskim intenzitetom pikova i velikim šumom. Razlog tomu, može biti neuspješna derivatizacija uzorka kao i neispravna kolona te neke druge tehničke poteškoće.¹⁷

Razvoj instrumentacije, a time i metabolomičkih metoda kojima se analiziraju mikrobiološki sustavi može se direktno primijeniti na kvantifikaciju aminokiselina u hrani. Prilikom analize metabolita najčešća su dva problema, prvi od njih jest gubitak metabolita tijekom pripreme (zaustavljanje reakcije (*engl.* quenching) ekstrakcija i koncentracija), a drugi problem je instrumentalne prirode (pomicanje retencijskog vremena, i osjetljivost instrumenta). Problem gubitka metabolita odnosi se na dodavanje internog standarda u otopinu za zaustavljanje reakcije te stvaranje pretpostavke da se svi spojevi koji imaju istu funkcionalnu skupinu raspadaju u jednakoj mjeri. Dodavanje internog standarda za svaki metabolit nije praktično zbog cijene i potreba za sintezom. Kako bi se riješio problem s internim standardom, razvijena je metoda izotopnog otapanja s ^{13}C označenim internim standardima.¹⁸ Na osnovu ranije opisane metode MCF derivatizacije, razvijena je metoda s izotopno označenim reagensom MCF na uzorcima urina i krvnog seruma. Metoda omogućava apsolutnu kvantifikaciju 67 metabolita. Derivatizacija i detekcija se odvijaju u tri koraka. U prvom koraku vidljiva je različita označenost amino i karboksilne skupine: karboksilna skupina iz metanola, a amino skupina iz reagensa MCF. U drugom koraku generiran je protonirani ion alanina, dok u trećem koraku nastaje stabilan prijelaz koji omogućava vrlo osjetljivu i selektivnu detekciju alanina na osnovu omjera m/z pri 102.1



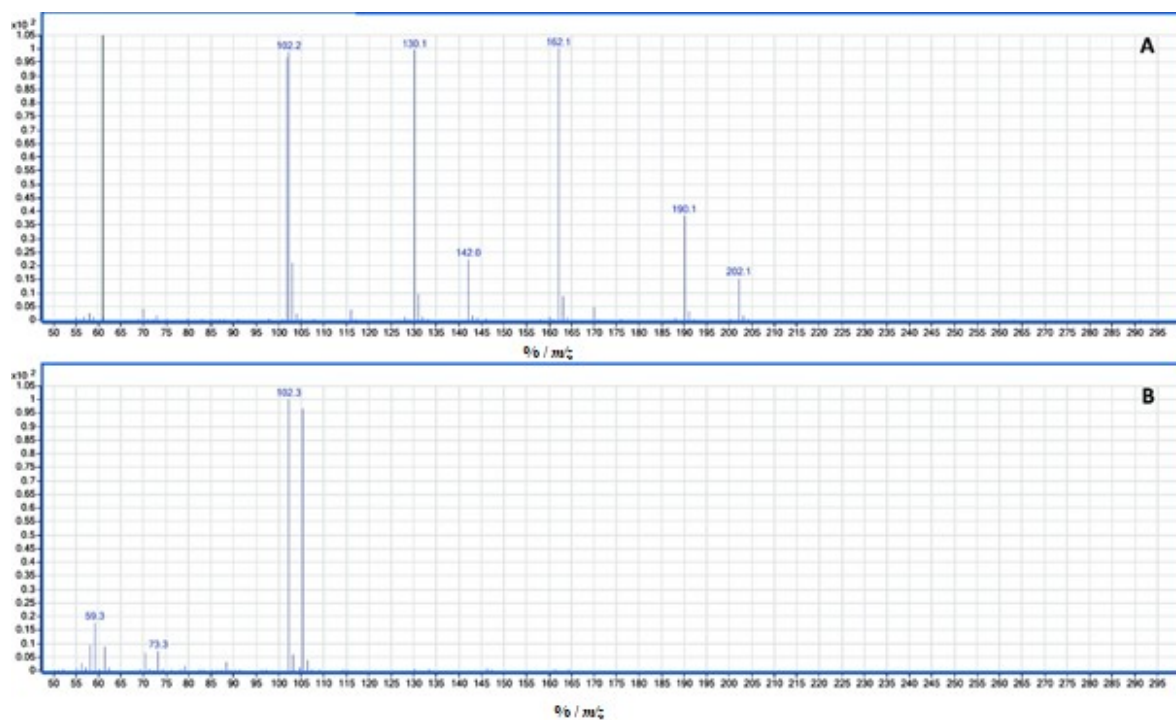
Slika 8. Shema MCF derivatizacije alanina uz pozitivnu kemijsku ionizaciju i MS/MS detekciju¹⁹

U ovom slučaju kao detektor korišten je trostruki kvadrupol (QqQ) koji je u usporedbi s jednostrukim kvadrupolom puno selektivniji i osjetljiviji. Trostruki kvadrupol korišten je zbog velikog broja deuteriranih internih standarda. Uz pozitivnu kemijsku ionizaciju uspješno je zadržan molekularni ion kao i molekularni fragmenti viših masa u odnosu na klasičnu elektronsku ionizaciju (*engl.* Electron Ionization). Kvantifikacijski MRM prijelazi za alanin prikazani su u Tablici 2. MRM prijelaz MCF-alanina (162,2→102,2) lako se razlikuje od MRM prijelaza standarda MCF-*d*₃-alanina (MRM 165,2→105,2) i internog standarda *d*₃MCF/*d*₃MeOH-alanina (MRM 168,2→105,2). Dva prijelaza *d*₃MCF-MeOH-alanin i MCF-*d*₃MeOH-alanin imaju isti ion prekursor (165,2), ali različite ione produkta razgradnje pri 102,2 i 105,2.¹⁹

Tablica 2. PCI MRM prijelazi alanina i deuteriranog alanina otopljenih ili u metanolu ili u deturiranom metanolu te derivatizirani s MCF-om ili deuteriranim MCF-om

Prekursori	Mw	CI	MRM prijelaz
MCF-alanin	161,1	162,1	162,1→102,1
MCF- <i>d</i> ₃ alanin	164,1	165,1	165,1→105,1
<i>d</i> ₃ MCF-alanin	164,1	165,1	165,1→102,1
MCF- <i>d</i> ₃ MeOH-alanin	164,1	165,1	165,1→105,1
<i>d</i> ₃ MCF- <i>d</i> ₃ MeOH-alanin	167,1	168,1	168,1→105,1

Iz Slike 9. usporedbom tehnika PCI (*engl.* Positive Chemical Ionization) i EI, vidljivo je kako PCI način generira MRM prijelaze odnosno veći broj potencijalnih iona prekursora, što direktno utječe na selektivnost. Protonirani molekularni ion $[M+H]^+$ identificiran je za preko 50 metabolita te je za 16 metabolita izabran kao ion prekursor. Kratko vrijeme analize (16 minuta), jednostavnost pripreme i pouzdana kvantifikacija amino kiselina i metabolita koji sadrže karboksilnu skupinu glavne su karakteristike metode. ¹⁹



Slika 9. PCI (A) i EI (B) spektar derivatiziranog alanina ¹⁹

2.5. Vezani sustav kapilarna elektroforeza – spektrometrija masa u analizi aminokiselina

Kako je ranije navedeno osim 20 standardnih aminokiselina koji se nalaze u sastavu proteina, postoji i mnoštvo drugih neproteogenih aminokiselina koje se nalaze u hrani. Takve aminokiseline odnosno njihova prisutnost u uzorcima hrane može biti pokazatelj kvalitete i sigurnosti iste. Definiciju neproteogenih kiselina dao je Hunt 1985.²⁰, ona obuhvaća sve aminokiseline koje se ne nalaze u glavnom proteinskom lancu, zbog nedostatka odgovarajuće tRNA. Takve aminokiseline nastaju kao produkti metaboličkih procesa u životinjskim organizmima ili tijekom proizvodnog procesa hrane.^{21,22}

Kapilarna elektroforeza (*engl.* Capillary Electrophoresis) – analitička tehnika koju karakterizira kratko vrijeme analize, male količine uzorka, visoka učinkovitost, jednostavnost i ekološka prihvatljivost. Svoju primjenu osim u analizi neproteogenih aminokiselina nalazi i u analizi hormona, biljnih metabolita i malih organskih molekula. Komplementarna je tehnika HPLC tehnici te se odlikuje boljom rezolucijom, što je korisno kod određivanja niskih koncentracija aminokiselina u kompleksnim uzorcima.²³⁻²⁵

Neproteogene aminokiseline najčešće se odvajaju na dva načina, prvi od njih jest CZE (*engl.* Capillary Zone Electrophoresis) gdje se koristi separacijski pufer koji može, a i ne mora sadržavati aditive, pri čemu se odvajanje temelji na različitoj elektroforetskoj pokretljivosti analita pri određenoj pH vrijednosti. Drugi način jest EKC (*engl.* Electrokinetic chromatography), gdje se tzv. pseudofaza (surfaktant u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije) najčešće natrijev dodecil sulfat dodaje u elektrolitsku otopinu kako bi se uspješno separirale neproteogene aminokiseline iz složenih matrica. U preglednom članku naveden je cijeli niz metoda za analizu neproteogenih aminokiselina, koje su razvrstane s obzirom na strukturu.²⁶

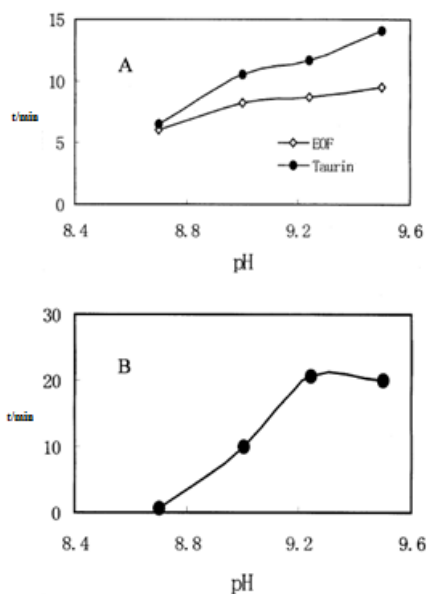
2.5.1 Analiza taurina kapilarnom elektroforezom

Taurin je neesencijalna aminokiselina koja se u tkivu najčešće pojavljuje kao slobodna aminokiselina, u svojoj strukturi sadrži atom sumpora, a u metaboličkom smislu sudjeluje u sintezi soli žučnih kiselina. Odgovorna je za mnoštvo funkcija; antioksidativni učinak i osmotska regulacija volumena stanice, a koristi se u liječenju retinopatije, bolesti bubrega i problema sa zastojem srca.²⁷⁻³⁰

Razvijena je CE–ED (*engl.* Capillary Electrophoresis – Electrochemical detection) metoda ³¹ za analizu taurina u *Lycium Barbarum L.* (*Obični vučac*), poznatiji pod nazivom Goji bobice; mlijeku u prahu i napitku koji se koristi kao dodatak prehrani.

Napon od 30 kV primijenjen je na krajeve kvarcne kapilare koja je imala dužinu od 70 cm s unutarnjim promjerom od 25 μm . Ugljična elektroda promjera 300 μm korištena je kao radna elektroda, koja je prije upotrebe polirana s brusnim papirom, sonicirana u deioniziranoj vodi te je postavljena na kraj kapilare. Preostale dvije elektrode bile su platinasta pomoćna elektroda te SCE (*engl.* Saturated Calomel Electrode) referentna elektroda. Kao detektor korišten je BAS LC-4C amperometrijski detektor. Mobilna otopina bila je $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $c=25\text{-}150$ mmol / l, $\text{pH}=8.7\text{-}9.5$. Svi uzorci profiltrirani su kroz 0.22 μm najlonski filter.

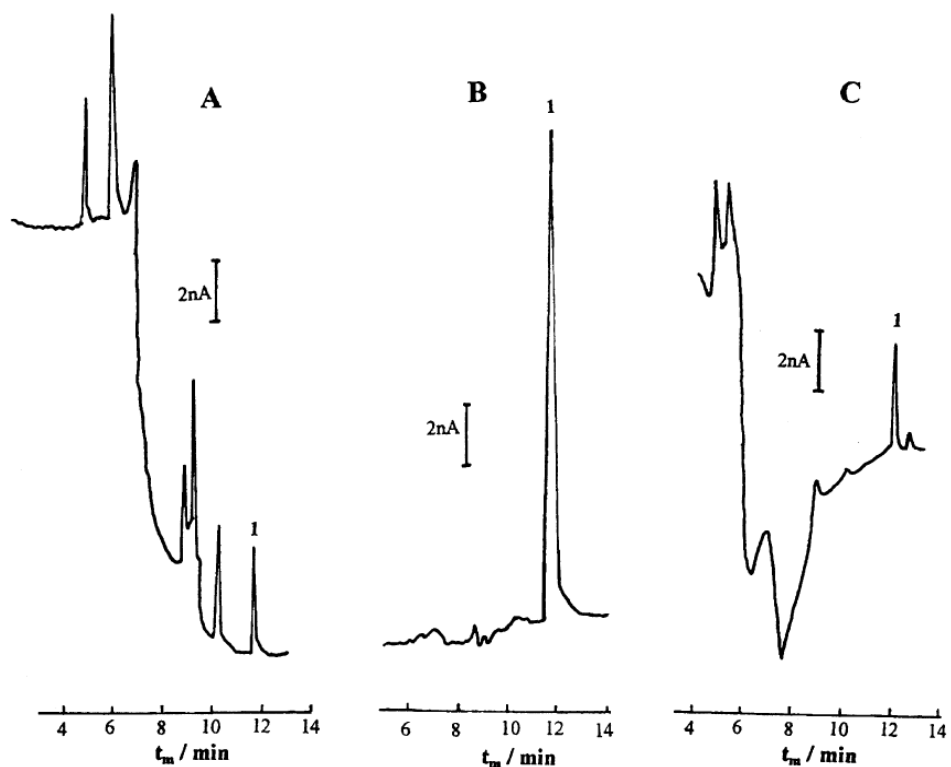
Kao optimalni napon na radnu elektrodu primijenjena je vrijednost od 1.05 V gdje je pozadinska struja najmanja, a omjer S/N najveći. Utvrđeno je kako vrijednost pH mobilne otopine u ovom slučaju pufera utječe direktno na migraciju analita. Ispitano je područje vrijednosti pH od 8.7-9.5 pri čemu se povećanjem pH vrijednosti povećava i migracijsko vrijeme taurina. Iz Slike 10. vidljivo je kako pH vrijednost veća od 9.0 omogućava razdvajanje analita i elektroosmotski protok.



Slika 10. Utjecaj pH na vrijeme migracije (A) i vršna struja (B) ³¹

Nadalje, koncentracija pufera važan je parametar zbog zeta potencijala na unutarnjima stijenka kapilare, gdje je optimalna koncentracija iznosila 25-50 mmol/l. Promatran je i utjecaj napona na migracijsko vrijeme analita, pri većem naponu postignuto je kraće vrijeme migracije, no s druge strane to je dovelo do povećanja šuma bazne linije. Optimalni separacijski

napon iznosio je 20 kV. Parametar koji je ispitan u svrhu postizanja pouzdanijih rezultata je i vrijeme injektiranja pri naponu od 20 kV, a maksimum je postignut kada je trajanje injektiranja iznosilo 8 s. Na Slici 11. vidljivi su elektroferogrami analiziranih uzoraka pri gore navedenim uvjetima.



Slika 11. Elektroferogrami *Lycium Barbarum L.* kapsule (A), LIPOVITAN (B), mlijeko u prahu (C); pik pod brojem 1 označava taurin ³¹

U Tablici 3. nalaze se rezultati sadržaja taurina u analiziranim uzorcima uz podatke o deklariranoj vrijednosti komercijalno dostupnih uzoraka te RSD (%) vrijednostima. RSD vrijednost za reproducibilnost na 7 injektiranja otopine standarda iznosila je 4.2%, linearnost metode izražena je preko kalibracijskog pravca, gdje je $r=0.9995$, a LOD pri $S/N=3$ iznosio je $1.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$.³¹

Tablica 3. Rezultati sadržaja taurina u uzorcima kapsula i biljke *Lycium Barbarum L.*, LIPOVITAN napitku te mlijeku u prahu.

Uzorak	Deklarirana vrijednost	Koncentracija	RSD (%)
<i>Lycium Barbarum</i> L. kapsule	/	2.82 mg/g	4.9
<i>Lycium Barbarum</i> L. biljka	/	3.63 mg/g	3.5
LIPOVITAN napitak	10 mg/ml	9.86 mg/ml	4.4
Mlijeko u prahu	40 mg/100g	41.7 mg/100 g	2.8

§ 3. ZAKLJUČAK

Opisane tehnike za kvalifikaciju i kvantifikaciju aminokiselina u biološkim uzorcima predstavljaju presjek dosadašnjih spoznaja u ovom području. Smjer daljnjeg razvoja analize aminokiselina podrazumijeva određivanje sve nižih koncentracija aminokiselina u uzorku kao i postizanje sve bolje rezolucije između aminokiselina te u konačnici što jednostavnija provedba metoda. U tehnikama LC-MS razvoj se odnosi na sintezu novih derivatizacijskih reagensa koji će biti jeftiniji, stabilniji i ekološki prihvatljiviji. Prilikom razvoja metoda za analizu aminokiselina važno je obratiti pozornost na nekoliko parametara među kojima su robusnost, repetibilnost, osjetljivost i selektivnost.

Područje analize realnih uzoraka predstavlja izazov iz više razloga: raznolikost uzoraka obzirom na relativnu zastupljenost aminokiselina i njihova kemijska stabilnost, izolacija proteina odnosno aminokiselina iz matrice uzorka te postizanje uvjeta analize, koji će očuvati kemijsku strukturu, a time i količinu svake aminokiseline u uzorku. Iz navedenih razloga, tehničkim usavršavanjem analitičkih instrumenata te njihove preciznosti i osjetljivosti kao i razvojem novih kromatografskih metoda osigurava se pouzdan način kontrole realnih uzoraka. Navedeno je, potrebno posebno istaknuti u uzorcima hrane čiji je glavni parametar kvaliteta, a on je u direktnoj korelaciji s aminokiselinskim sastavom. Također, od ključnog interesa je razvoj metode koja može selektivno odrediti peptide, (njihov aminokiselinski sastav), koji se koriste kao aktivna farmaceutska komponenta u mnogim lijekovima te eventualne proteinske metabolite, koji se danas koriste kao dijagnostički alat kod cijelog niza poremećaja i bolesti.

Zbog navedene složenosti i raznovrsnosti samih uzoraka koje je potrebno analizirati, nužno je istodobno koristiti više analitičkih metoda, njihovom kombinacijom, usporedbom te kritičkim osvrtom dobiti najpouzdanije i najtočnije rezultate uz postavljanje strogih kriterija prihvatljivosti.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. L. N. Vauquelin, P. J. Robiquet, *Annales de Chimie*. **57** (1806) 88–93.
2. M. Bašić, D. Zrnec, A. Butorac, I. Landeka Jurčević, D. Đikić, V. Bačun-Družina, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **6** (2011) 37–44.
3. R. Gatti, M. G. Gioia, A. Leoni, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 207–211.
4. C. H. W. Hirs, W. H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.* **211** (1954) 941–950.
5. M. Fountoulakis, H. W. Lahm, *J. Chromatogr. A* **826** (1998) 109–134.
6. J. Ozols, *Methods in Enzymology*. **182** (1990) 587–601.
7. I. Boogers, W. Plugge, Y. Q. Stokkermans, A. L. L. Ducehateau, *J. Chromatogr. A* **1189** (2008) 406–409.
8. M. G. Gioia, B. Cacciari, A. Leoni, *Anal. Chim. Acta*. **579** (2006) 152–157.
9. R. Gatti, M. G. Gioia A. Leoni, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 207–211.
10. J. Ståhlberg, *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 2000, str. 676–684.
11. S. C. Moldoveanu, V. David, *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, Waltham, 2013, 145–190.
12. H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 445–452.
13. U. Harder, B. Koletzko, W. Peissner, *J. Chromatogr. B* **879** (2011) 495–504.
14. D.J. Dietzen, A.L. Weindel, M.O. Carayannopoulos, M. Landt, E.T. Normansell, T.E. Reimschisel, C.H. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008) 3481–3488
15. M. A. Jwailli, *Open J. of Applied Sciences* **9** (2019) 683–690.
16. S. G. Villas-Bôas, D. G. Delicado, M. Akesson, J. Nielsen, *Anal. Biochem.* **322** (2003) 134–138.
17. K. F. Smart, R. B. M. Aggio, J. R. Van Houtte, *Nat. Protoc.* **5** (2010) 1709–1729.
18. L. Wu, M. R. Mashego, J. C. van Dam, A. M. Proell, J. L. Vinke, C. Ras, W. A. van Winden, W. M. van Gulik, J. J. Heijnen, *Anal. Biochem.* **336** (2005) 164–171.
19. H. F. N. Kvitvang, T. Andreassen, T. Adam, *Anal. Chem.* **83** (2011) 2705–2711.
20. S. Hunt, *The Non-Protein Amino Acids*, in: Barret, G. C. (Ed.), *Chemistry and biotechnology of amino acids*, 1985, 55–183.
21. M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 3457–3479.
22. F. Kvasnic`ka, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 813–825.

23. <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A645/datastream/FILE0/view> (datum pristupa 11.04.2020.)
24. European Pharmacopoeia 5th ed., Council of Europe, Strasbourg 2004.
25. M. Damić, B. Nigović, *Farmaceutski glasnik* **66** (2010), 195–207.
26. M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M. L. Marina *Electrophoresis* **28** (2007) 4031–4045.
27. R. J. Huxtable, *Physiol. Rev.* **72** (1992) 101–163.
28. J. G. Jacobsen, L. H. Smith, *Physiol. Rev.* **48** (1968) 424–511.
29. R. W. Chesney, *Adv. Pediatr.* **32** (1985) 1–42.
30. J. H. Thurston, R. E. Hauhart, J. A. Dirgo, *Life Sci.* **26** (1980) 1561–1568.
31. Y. Cao, X. Zhang, Q. Chu Y. Fang, J. Ye,), *Electroanalysis* **15** (2003) 898–902.