



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

- Uvod
- Metode kvalifikacije i kvantifikacije proteina
 - Hidroliza proteina
- LC
 - Usporedba HPLC i UPLC metode
- LC-MS
 - Derivatizacijski reagensi (DDP i DPD)
- GC-MS
- CE-MS
 - Analiza taurina kapilarnom elektroforezom
- Zaključak
- Literaturni izvori

Uvod

- Aminokiseline osnovne gradivne jedinice svih živih organizama
- Određivanje i kvantifikacija aminokiselina – kvaliteta hrane
- Kromatografske metode i vezani sustavi
 - LC (RP i IE)
 - LC-MS
 - GC-MS
 - CE-MS
- Važnost: prehrambena i farmaceutska industrija
- Razvoj i validacija standardnih metoda koji se koriste za analizu aminokiselina (AAA)

Metode kvalifikacije i kvantifikacije proteina

Hidroliza proteina:

- Temperatura, vrijeme i reagens
- Standardna metoda hidrolize proteina klorovodičnom kiselinom (6M)
- Uporaba metansulfonske kiseline ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$)
- Karakteristike uzorka određuju parametre hidrolize
- Problem narušavanja strukture aminokiselina prilikom hidrolize

Tekućinska kromatografija

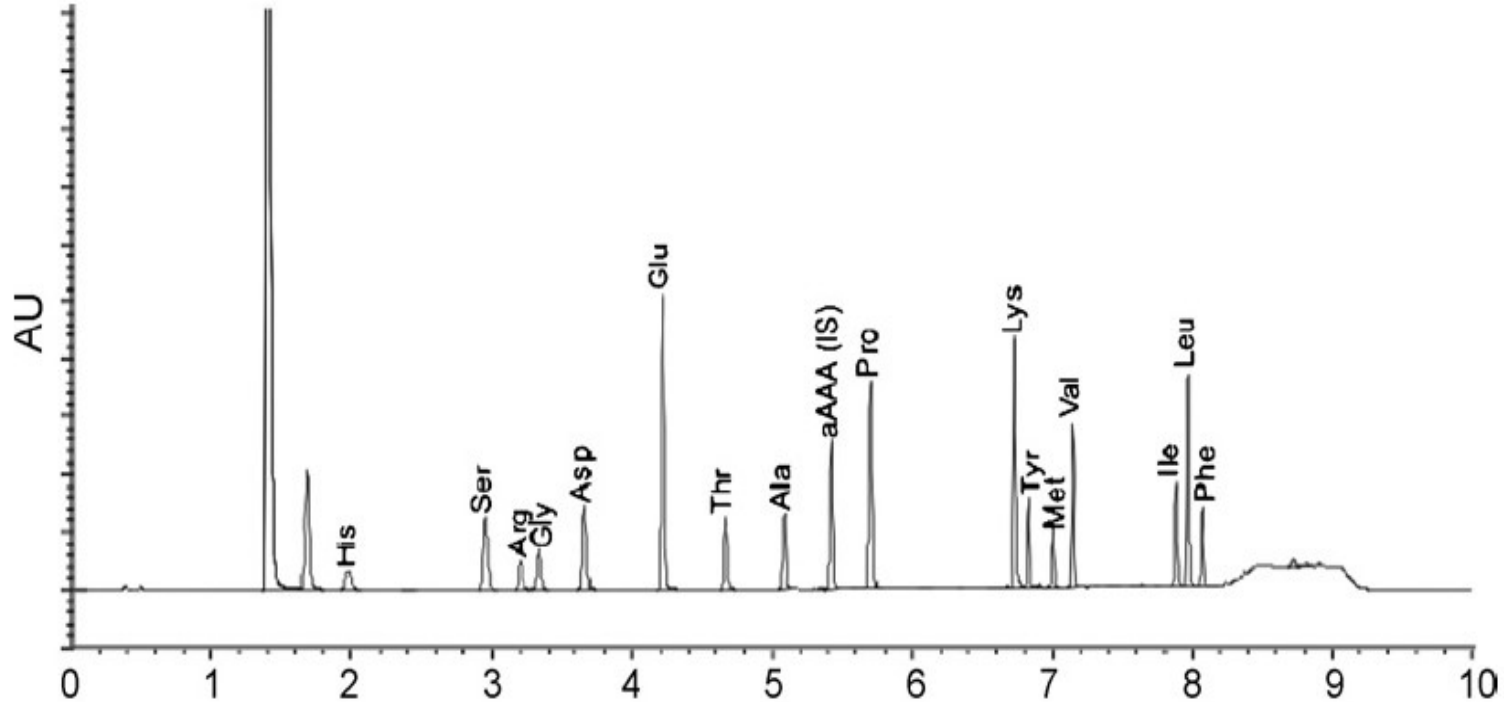
- usporedba metoda HPLC i UPLC za analizu aminokiselina
- Derivatizacija aminokiselina omogućava njihovu pouzdanu kvantifikaciju

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 µm	BEH C18, 100•2.1mm, 1.7 µm
Brzina protoka ml/min	1.5	0.7
Temperatura kolone	36	55
Volumen injektiranja µl	10	1
valna duljina detekcije	254	260
Vrijeme kromatografije	23.5	10
LOD µM	1.3-2.5	0.4-1.6
LOQ µM	4.3-8.4	1.3-5.3

Tekućinska kromatografija

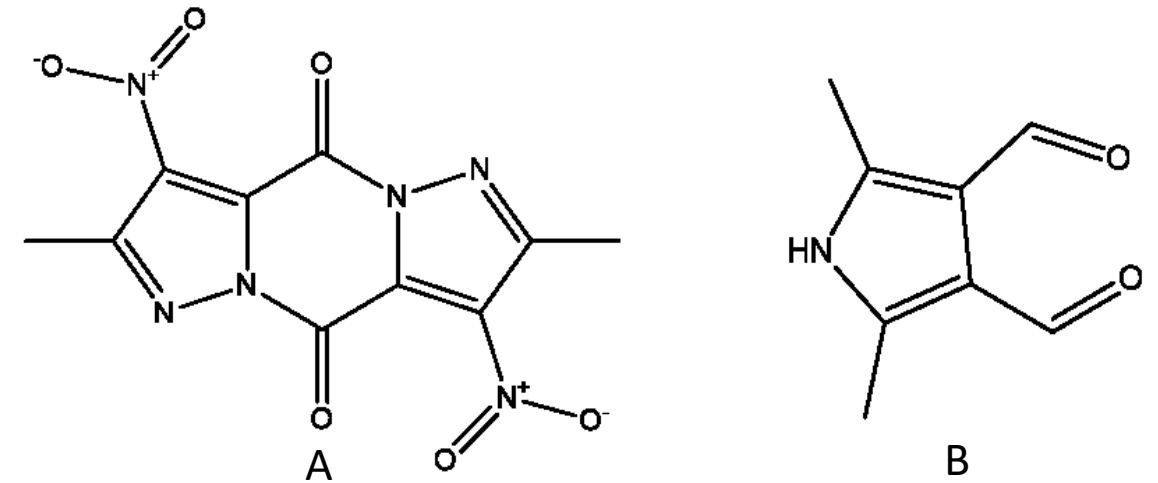
- HPLC/UPLC usporedba metoda za analizu aminokiselina
- Derivatizacija aminokiselina-omogućava pouzdanu kvantifikaciju



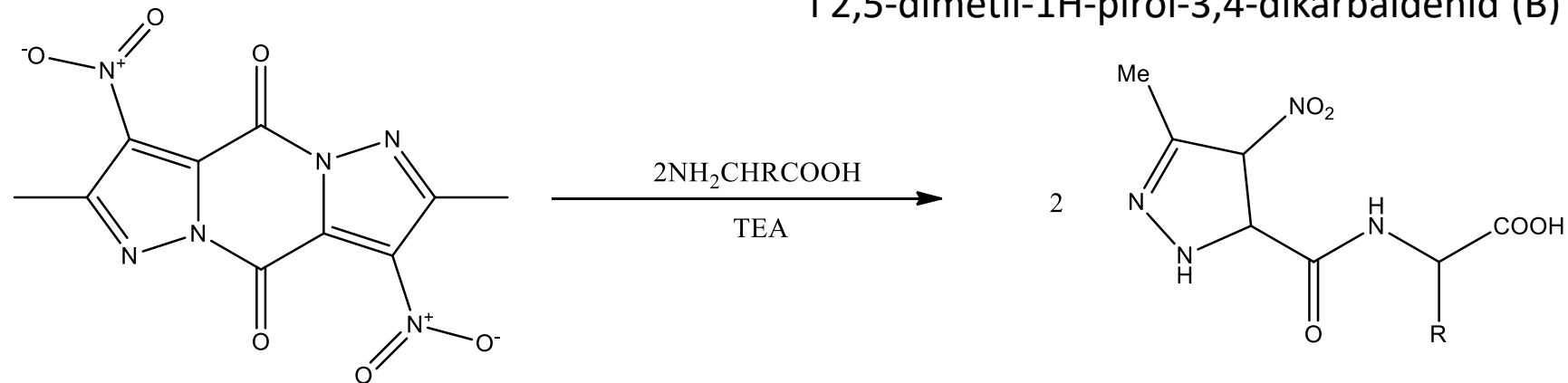
Slika 1. UPLC kromatogram AQC derivatiziranih aminokiselina iz uzorka hidrolizata kazeina.

Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

- Razvoj instrumentalnih metoda
 - HPLC -> UPLC
 - Povećanje osjetljivosti (LOD i LOQ)
- Razvoj derivatizacijskih reagensa
 - Fenil izotiocijanat i *o*-ftalaldehid



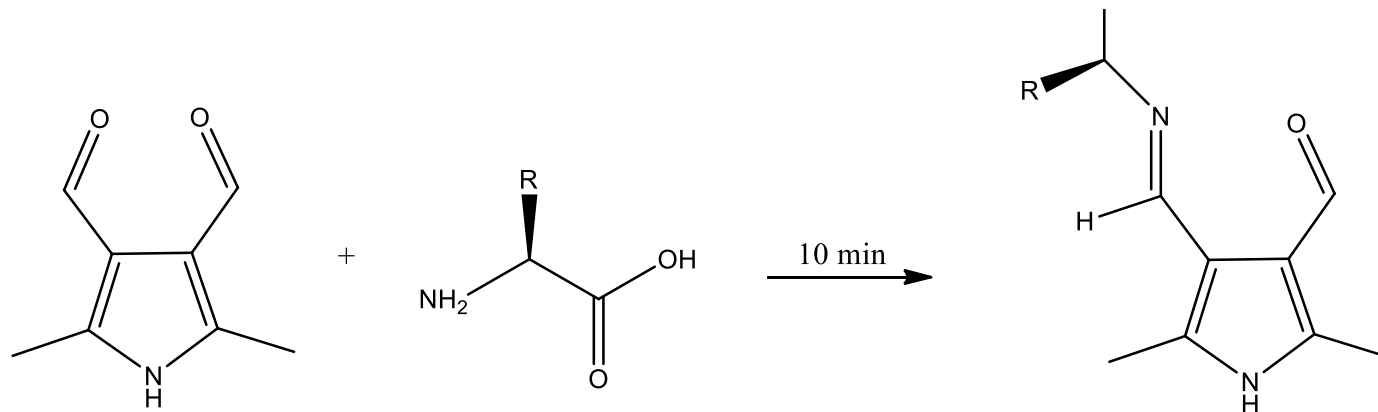
Slika 2. 2,7-dimetil-3,8-dinitrodipirazolo[1,5-a:1',5'-d]pirazin-4,9-dion (A) i 2,5-dimetil-1H-pirol-3,4-dikarbaldehid (B)



Slika 3. Reakcijska shema DDP-a i aminokiselina

Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

- Razvoj instrumentalnih metoda
 - HPLC -> UPLC
 - Povećanje osjetljivosti (LOD i LOQ)
- Razvoj derivatizacijskih reagensa
 - Fenil izotiocijanat i *o*-ftalaldehid

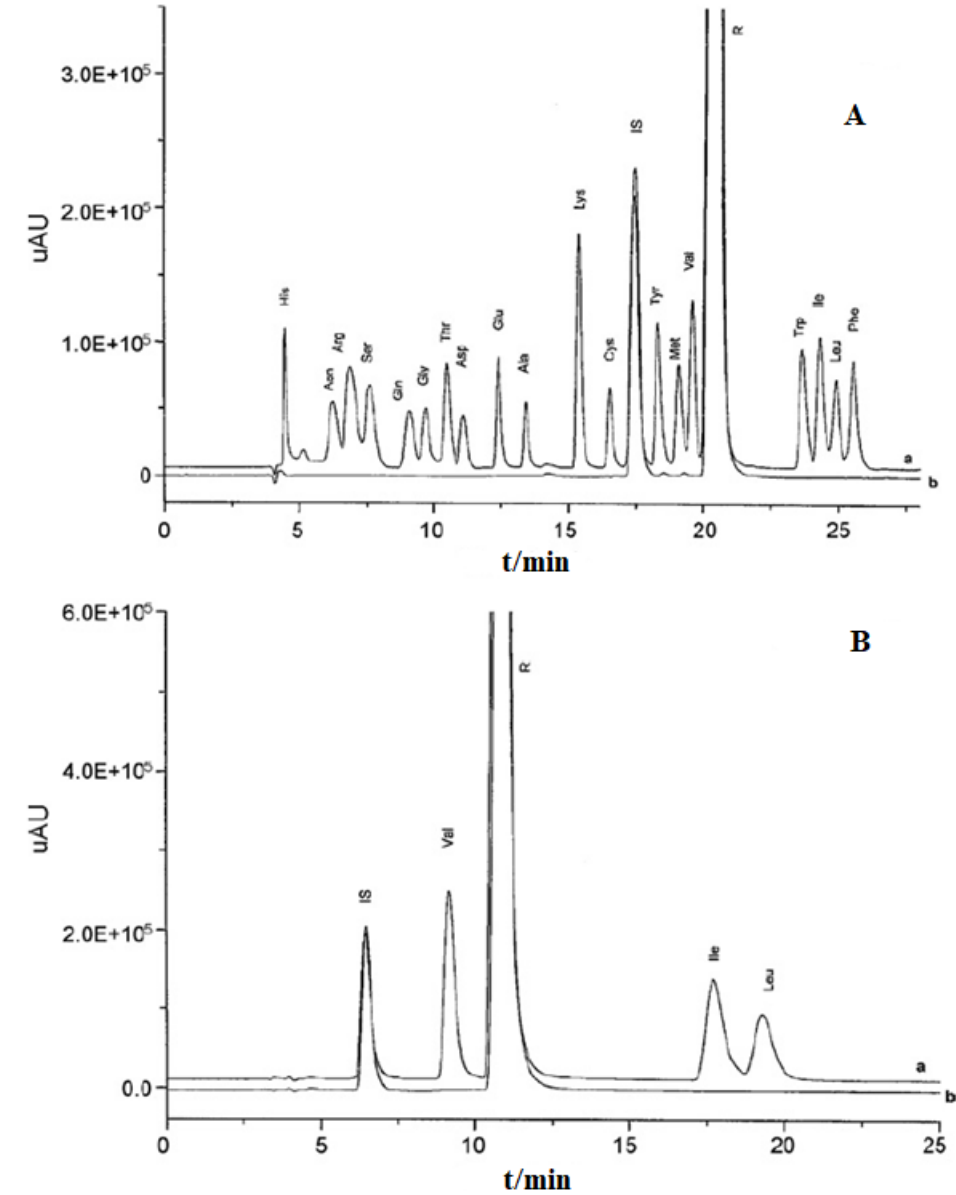


Slika 4. Reakcijska shema DPD-a i aminokiselina

Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

Tablica 2. Podaci o gradijntnom eluiranju metoda (A)

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



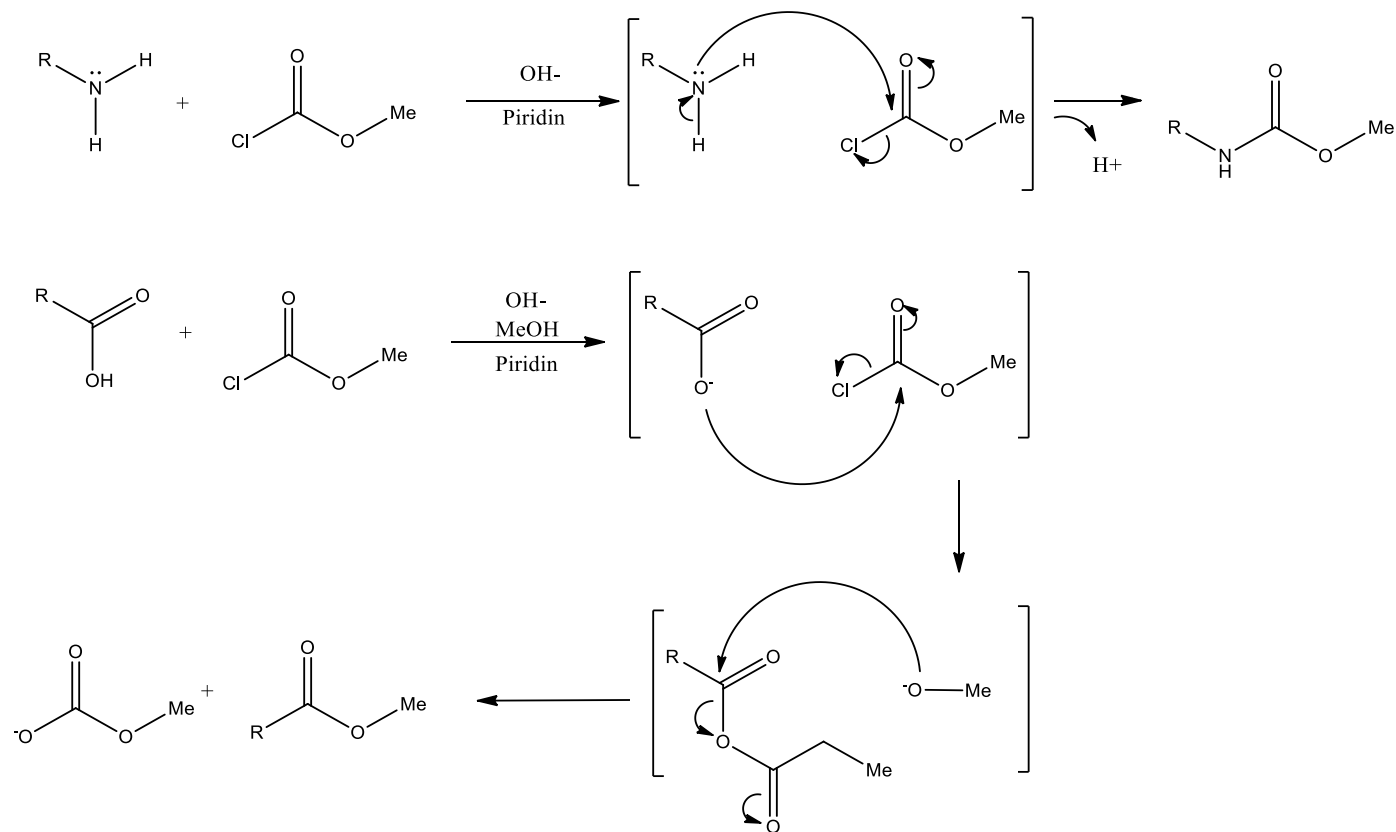
Slika 5. Kromatogrami derivatiziranih aminokiselina s DPD-om, dobivenih gradijntnom (A) i izokratnom (B) metodom

Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

- Kromatografija ionskih parova *LC-MS/MS*
- RP-LC
- Ion-pair (HFBA) – alkilsulfat/alkilamonijeva sol.
- ESI-MS
- APCI-MS

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

- Analiza hlapivih uzoraka
- Derivatizacija (sililiranje, metilklorformijat(MCF)) uz očuvanje strukture – prevođenje u estere i karbamate
- Čistoća uzorka i izolacija željenog analita

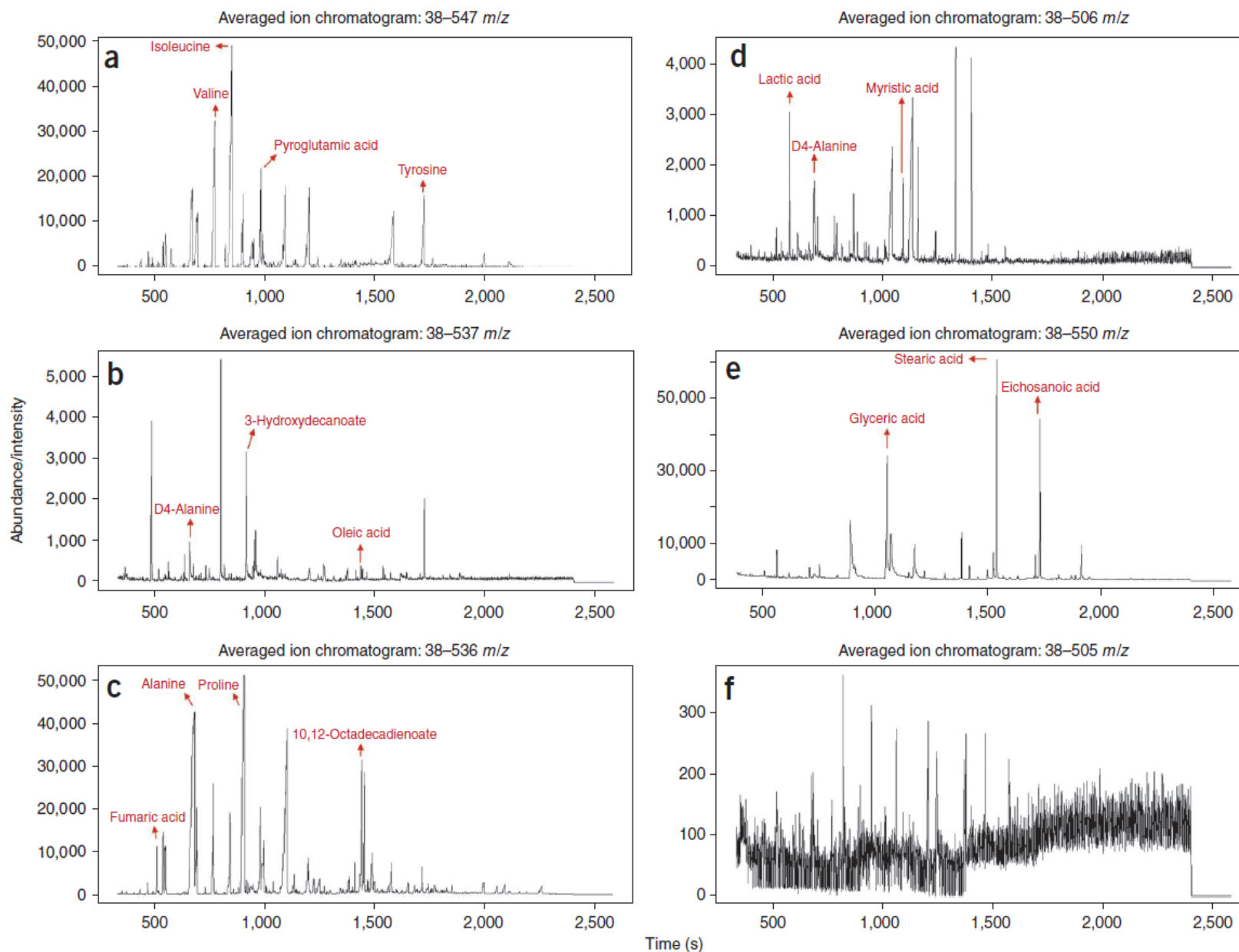


Slika 6. Mehanizam MCF reakcije u kojem se aminokiseline prevode u estere i karbamate koji se mogu analizirati vezanim sustavom GC-MS

5.751	2-Oxopentanoic acid	13.786	Leucine	18.590	Methionine
6.041	Pyruvic acid	13.863	Isoleucine	18.756	L-β-Methyl-amino-alanine
6.150	Malonic acid	13.874	Tert-leucine	19.422	N-Acetyl-L-glutamic acid
6.354	3-Methyl-2-oxopentanoic acid	14.025	3-Oxoadipic acid	19.887	3-(2-Thienyl)-D-alanine
7.3169	3-Hydroxyisovaleric acid	14.156	Norvaline	19.968	D-2-Aminoadipic acid
7.533	Fumaric acid	14.193	2-Oxoadipic acid	20.228	10,13-Dimethyltetradecanoic acid
7.7937	Methylthioacetic acid	14.234	5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	20.676	Phenylalanine
8.041	Succinic acid	14.372	Citraconic acid	20.886	Cysteine
8.180	Lactic acid	14.394	4-Amino-N-butyric acid (GABA)	22.082	Cumaric acid
8.207	Malic acid	14.669	3-Hydroxydecanoic acid	22.517	Vanillic acid
8.857	Caprylic acid	14.705	Proline	22.959	2,4-Diaminobutyric acid
9.282	Itaconic acid	15.192	Oxaloacetic acid	23.0816	Hexadecanoic acid (palmitic acid)
9.312	2-Hydroxybutyric acid	15.390	Norleucine	23.285	4-Aminobenzoic acid
9.690	Nicotinic acid	15.390	cis-Aconitic acid	24.857	Ornithine
9.722	Oxaloacetic acid	15.415	Phthalic acid	24.995	2-Oxobutyric acid
9.7319	Levulinic acid	15.530	Cinnamic acid	25.074	Oxaloacetic acid
9.913	Citramalic acid	15.584	Threonine	25.4227	(E)-9-Octadecenoic acid (oleic acid)
9.928	Glutaric acid	15.603	Serine-main peak 1	25.427	Glutamine
10.147	NADP/NADPH	15.747	O-Acetyl-L-serine	25.6608	Octadecanoic acid (stearic acid)
10.266	Glycerol	16.009	Adenosyl-L-methionine	26.000	Coumarin-1-carboxylic acid
10.380	Benzoic acid	16.284	Pyroglutamic acid	26.590	Histidine
10.414	Alanine	16.370	Citric acid	27.283	Lysine
10.466	Glyoxylic acid	16.450	Aspartic acid	27.430	Dehydroabiestic acid
10.836	Glycine	16.639	Asparagine	28.165	EDTA
11.372	NADH/NAD+	16.658	S-Adenosyl-L-homocysteine	28.304	Guanine
11.404	2-Aminobutyric acid	16.661	Creatinine	28.378	Ferulic acid
11.665	D ₄ -Alanine (internal standard)	16.882	2-Phosphoglyceric acid	29.581	Tyrosine
11.827	3-Hydroxyoctanoic acid	17.414	Serine-main peak 2	29.688	2,6-Diaminopimelic acid
11.859	Adipic acid	17.596	Myristic acid	30.358	β-Citryl-L-glutamic acid
11.904	Caprinic acid	17.788	trans-4-Hydroxyproline	31.467	Sinapic acid
11.988	2-Isopropylmalic acid	17.811	L-2-Aminoadipic acid	32.003	δ-Hydroxylysine
12.349	Valine	18.702	2-Hydroxyisobutyric acid	33.461	Thiamine
12.369	2-Phosphoenolpyruvic acid	18.155	2-Phenylaminoacetic acid	35.334	Tryptophan
12.930	Glyceric acid	18.186	Hydroxybenzoic acid	35.677	Cystathionine
13.194	Pimelic acid	18.402	Glutamic acid	41.980	Methoxytryptophan
13.461	β-Alanine	18.452	Isocitric acid		
13.664	2-Oxoglutaric acid	18.476	Pentadecanoic acid		

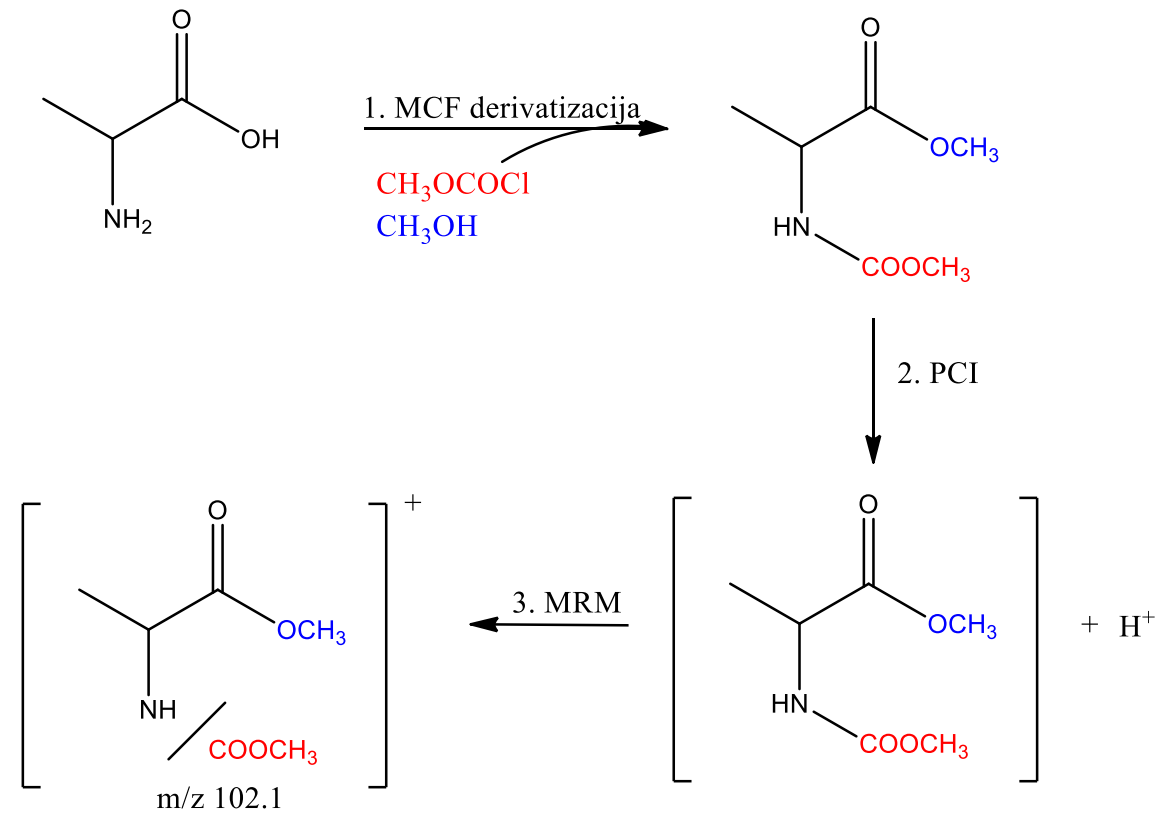
Slika 7. Najčešće GC-MS određivani spojevi MCF derivatizacijskom metodom.

Vežani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa



Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

- Razvoj metabolomičkih metoda
- Eventualni problemi: „zaustavljanje reakcije”, pomicanje retencijskog vremena, osjetljivost metode.
- Interni standard – cijena i potreba za sintezom
- Metoda s izotopno označenim MCF-om
 - Uzoci urina i krvnog seruma
 - Derivatizacija u 3 koraka



Slika 9. Shema MCF derivatizacije alanina uz pozitivnu kemijsku ionizaciju i MS/MS detekciju

Vežani sustavi plinska kromatografija-spektrometrija masa

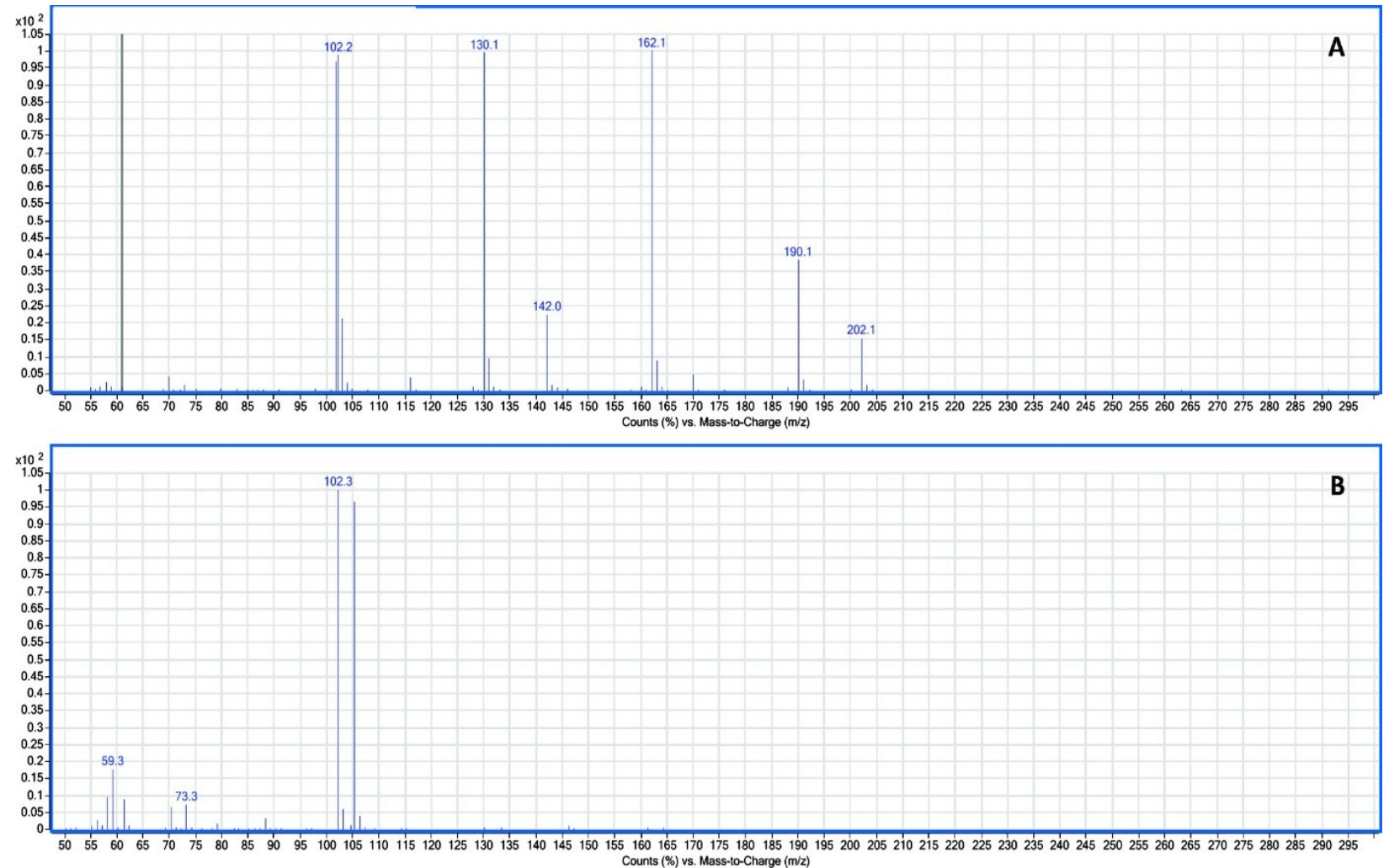
- Detekcija trostrukim kvadrupolom (QqQ)
- PCI
- Molekulski ioni i molekulski fragmenti viših masa
- Usporedba PCI i EI

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

Vežani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

- Detekcija trostrukim kvadrupolom (QqQ)
- PCI
- Molekulski ioni i molekulski fragmenti viših masa
- Usporedba PCI i EI



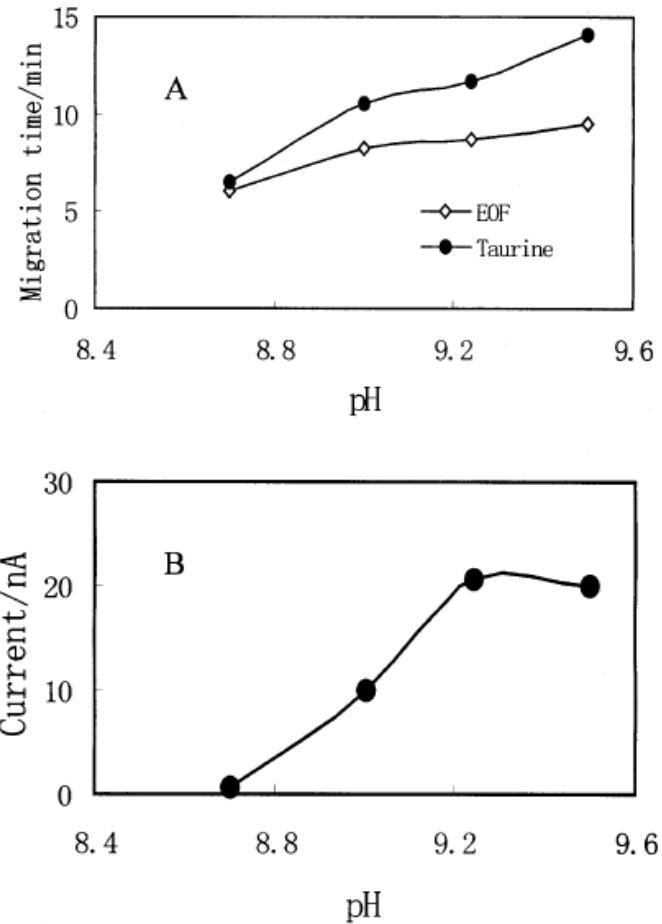
Slika 10. PCI (A) i EI (B) spektar derivatiziranog alanina

Vezani sustav kapilarna elektroforeza-spektrometrija masa

- Nепroteinske aminokiseline-pokazatelj kvalitete hrane
- Kratko vrijeme analize, mala količina uzorka, jednostavnost i ekološka prihvatljivost
- Veća rezolucija u odnosu na metodu HPLC
- CZE- (engl. Capillary Zone Electrophoresis) – separacijski pufer
 - Princip odvajanja- različita elektroforetska pokretljivost
- i EKC načini određivanja
 - Prisutnost surfaktanta u koncentraciji većoj od CMC (npr. SDS)
 - Učinkovita separacija neproteinskih aminokiselina iz uzorka

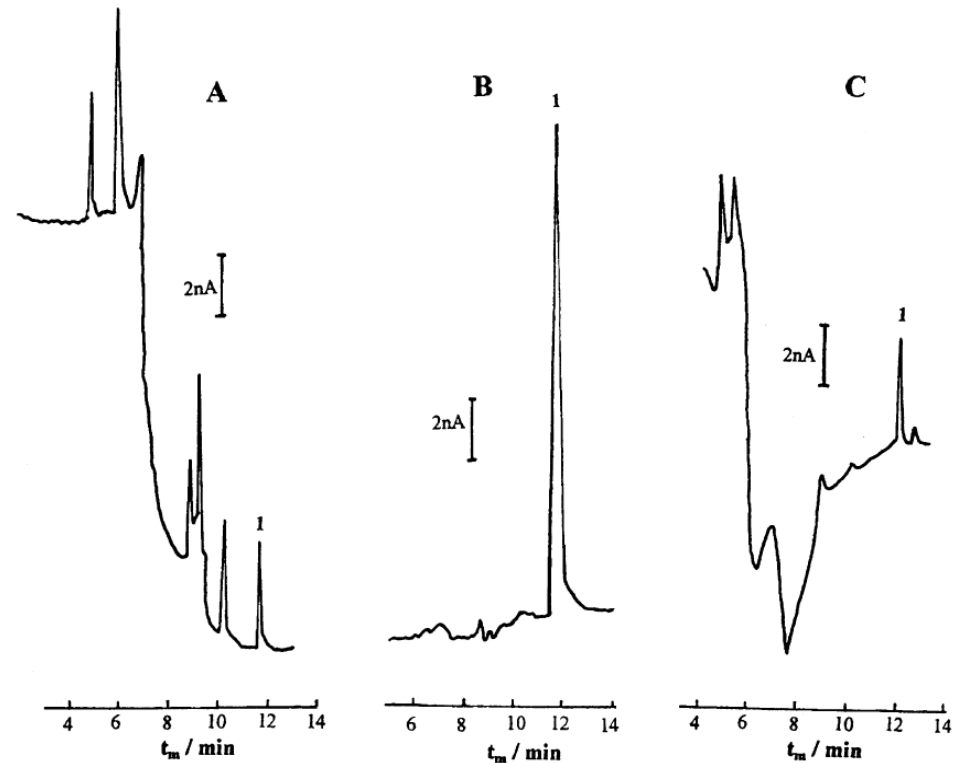
Kapilarna elektroforeza-analiza taurina

- Nesencijalna aminokiselina koja se najčešće pojavljuje kao „slobodna aminokiselina”
- CE–ED (kapilarna elektroforeza–elektrokemijska detekcija)
- Primjena napona za optimalni omjer S/N
- Važnost pH vrijednosti
- Koncentracija pufera
- Utjecaj napona na razdvajanje (20 kV)



Slika 11. Utjecaj pH na vrijeme migracije (A) i „peak current“ (B)

Kapilarna elektroforeza-analiza taurina



Slika 12. Elektroferogrami Lycium Barbarum L. kapsule (A), LIPOVITAN (B), mlijeko u prahu (C); pik pod brojem 1 označava taurin

Kapilarna elektroforeza-analiza taurina

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 L.</i> kapsule	/	2.82 mg/g	4.9
<i>Lycium Barbarum L.</i> 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

Zaključak

- Razvoj u smjeru povećanja osjetljivosti metoda, bolje rezolucije između aminokiselina, pojednostavljenje izvođenja metoda
- Razvoj derivatizacijskih reagensa – jeftiniji, stabilniji, ekološki prihvatljiviji
- Robusnost, repetibilnost, osjetljivost i selektivnost
- Izazov- raznolikost uzoraka kao predmeta analize
 - Izolacija
 - Očuvanje strukture i koncentracije aminokiselina u uzorku
- Razvoj novih kromatografskih metoda (predmet istraživanja – sinteza novog derivatizacijskog reagensa)
- Pouzdan način kontrole realnih uzoraka (kontrola kvalitete hrane)
- Omogućavanje razvoja novih farmakoloških formulacija u svrhu liječenja
- Određivanje metabolita u vidu aminokiselina kao dijagnostički alat
- Kombinacija navedenih analitičkih metoda, rezultat su pouzdane i točne analize uz stroge kriterije prihvatljivosti

Hvala na pažnji!

Literaturni izvodi

1. L. N. Vauquelin, P. J. Robiquet, *Annales de Chimie*. **57** (1806) 88–93.
2. M. Bašić, D. Zrnc, 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.

Literaturni izvodi

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. Kvasnic̃ka, *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.