

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje aminokiselina

Ostojić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:739885>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA
HPLC METODE ZA
ODREĐIVANJE AMINOKISELINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i uz pomoć asistentice Saše Drakule, mag. ing.

Najprije, želim se zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mirjani Hruškar na vremenu i trudu unesenom u izradu ovog rada i prenesenom znanju kako tijekom izrade rada tako i tijekom studija.

Hvala doc. dr. sc. Marini Krpan na uloženom trudu te pomoći i brojnim savjetima prilikom izrade rada te na prenesenom znanju tijekom studija.

Hvala Saši Drakuli, mag. ing. na pomoći prilikom izrade rada, trudu i strpljenju.

Također, veliko hvala Diani Gluhak, mag. nutr. na podršci, strpljenju, pozitivnom stavu, brojnom znanju te vrijednim životnim lekcijama koje sam stekla.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE AMINOKISELINA

Jelena Ostojić, 839/USH

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati i validirati metodu za određivanje asparagina, glutaminske kiseline, serina, arginina, prolina, treonina, metionina i izoleucina pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Optimizacija metode obuhvaćala je optimizaciju uvjeta derivatizacije aminokiselina te uvjeta kromatografske analize. Validacija metode provedena je uz derivatizaciju u trajanju od 20 minuta, pri utvrđenom optimalnom gradijentnom eluiranju te pri temperaturi kolone od 50 °C. Ključni parametri validacije bili su selektivnost, linearnost i radno područje, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost. Budući da su rezultati provedenih validacijskih ispitivanja u skladu s postavljenim kriterijima prihvatljivosti, može se zaključiti da je metoda selektivna, linearna unutar radnog područja te precizna u određivanju ciljanih analita. Utvrđena je stabilnost derivata aminokiselina u vremenu od dva sata pri +4 °C.

Ključne riječi: aminokiseline, derivatizacija, HPLC, optimizacija, validacija

Rad sadrži: 51 stranicu, 15 slika, 8 tablica, 69 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Mirjana Hruškar*

Pomoć pri izradi: *Saša Drakula, mag. ing., asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. prof. dr. sc. *Mirjana Hruškar*
3. doc. dr. sc. *Marina Krpan*
4. izv. prof. dr. sc. *Sanja Vidaček (zamjena)*

Datum obrane: 19. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMINO ACIDS

Jelena Ostojić, 839/USH

Abstract: The aim of this study was to optimize and validate a method for determination of asparagine, glutamic acid, serine, arginine, proline, threonine, methionine, and isoleucine using high performance liquid chromatography (HPLC). Method optimization included optimization of derivatization conditions and conditions of chromatographic analysis. Method was validated under optimal conditions including 20 minute derivatization time, optimal gradient elution and column temperature of 50 °C. Key validation parameters were selectivity, linearity and working range, precision, limit of detection, limit of quantification, and robustness. The results of the validation experiments were in accordance with defined criteria and can be concluded that the method is selective, linear under working range and precise in determination of target analytes. Stability of the amino acid derivatives was determined for two hours at +4 °C.

Keywords: *amino acids, derivatization, HPLC, optimization, validation*

Thesis contains: 51 pages, 15 figures, 8 tables, 69 references

Original in: Croatian

Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Mirjana Hruškar, Full Professor*

Technical support and assistance: *Saša Drakula BSc., Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full Professor
2. PhD. *Mirjana Hruškar*, Full Professor
3. PhD. *Marina Krpan*, Assistant Professor
4. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Struktura i uloga aminokiselina	3
2.2. Analitičke metode za određivanje aminokiselina	5
2.2.1. Nekromatografske metode određivanja aminokiselina	5
2.2.1.1 Kapilarna elektroforeza	5
2.2.1.2. NMR spektroskopija	6
2.2.2. Kromatografske metode određivanja aminokiselina	6
2.2.2.1. Ionska kromatografija	7
2.2.2.2. Plinska kromatografija	8
2.2.2.3. Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija, HPLC	8
2.3. Derivatizacijski reagensi	10
2.3.1. OPA	10
2.3.2. FMOC	11
2.3.3. PITC	12
2.3.4. AQC	13
2.4 Razvoj i validacija analitičke metode	13
2.4.1. Selektivnost/specifičnost	16
2.4.2. Linearnost i radno područje	17
2.4.3. Preciznost	17
2.4.4. Točnost	17
2.4.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije	18
2.4.6. Robusnost	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Uređaji	20
3.1.2. Oprema	20
3.1.3. Kemikalije i standardi	20
3.2. Metode rada	22
3.2.1. Razvoj metode i optimizacija	22
3.2.2. Priprema kalij-boratnog pufera	22
3.2.3. Priprema natrij-acetatnog pufera (mobilna faza A)	23
3.2.4. Priprema smjese ACN/H ₂ O (mobilna faza B)	23
3.2.5. Priprema standardnih otopina pojedinačnih aminokiselina i internog standarda	23
3.2.6. Priprema otopine FMOC reagensa	23
3.2.7. Priprema otopine ADAM-a	23
3.2.8. Priprema otopine odabranih aminokiselina za analizu	23
3.2.9. Priprema otopine svih aminokiselina za analizu	24

3.2.10. Kromatografski uvjeti	24
3.3. Identifikacija ciljanih aminokiselina	24
3.4. Validacija metode za određivanje aminokiselina	25
3.4.1. Selektivnost.....	25
3.4.2. Linearnost.....	25
3.4.3. Preciznost.....	25
3.4.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	26
3.4.5. Robusnost.....	26
3.4.6. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Odabir i optimizacija uvjeta derivatizacije.....	28
4.2. Odabir i optimizacija kromatografskih uvjeta za određivanje aminokiselina	31
4.3. Validacija metode za određivanje aminokiselina	32
4.3.1. Selektivnost.....	32
4.3.2. Linearnost.....	34
4.3.3. Preciznost.....	39
4.3.4. Granice detekcije i kvantifikacije.....	43
4.3.5. Robusnost.....	43
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Aminokiseline su organske molekule i nezaobilazne komponente svih živih bića, a veliki značaj imaju i u prehrambenim proizvodima, dodacima prehrani te ishrani životinja (Hermann, 2003). Osnovne su gradivne jedinice proteina, a svaka aminokiselina sadrži dvije karakteristične funkcionalne skupine – amino skupinu i karboksilnu skupinu te sve aminokiseline osim glicina sadrže i bočne skupine prema kojima se međusobno razlikuju.

Osim gradivne uloge u proteinima, suvišak esencijalnih aminokiselina služi kao prekursor ostalih vitalnih metabolita i po potrebi kao izvor energije (Cabarello i sur., 2013). Nadalje, aminokiseline imaju ulogu neurotransmitera, a to su glutamin, glutaminska kiselina, asparagin i glicin (Cabarello i sur., 2003; Wu, 2009), zatim, tirozin je prekursor hormona štitnjače, tiroksina i trijodtironina. Također, aminokiseline imaju ulogu u imunom odgovoru organizma, regulaciji ekspresije gena te kao signalne molekule u staničnoj komunikaciji (Wu, 2009).

Prehrambeni izvori najbogatiji proteinima su meso, mlijeko, riba i jaja. Mahunarke su bogat izvor lizina, međutim oskudne na metioninu. Riža i kukuruz su oskudni u lizinu i triptofanu, međutim nisu oskudni na metioninu. Pseudožitarice kao amarant i kvinoja se prema aminokiselinskom sastavu mogu smatrati mješavinom žitarica i mahunarki (Cabarello i sur., 2003).

Neosporivo važna uloga aminokiselina u funkcioniranju živog organizma, hrani, medicini te i kozmetičkoj industriji (Hermann, 2003) uvjetuje potrebu za sofisticiranim i pouzdanim analitičkim metodama za njihovo istraživanje. Do sada su za kvalitativno i kvantitativno određivanje korištene razne metode, kao kapilarna elektroforeza, kromatografske metode kao što su plinska kromatografija, visoko djelotvorna tekućinska kromatografija, masena spektrometrija u kombinaciji s navedenim kromatografskim metodama, nuklearna magnetska rezonanca i druge. Kako bi metoda dala točne, precizne i pouzdane podatke, nužno je validirati metodu. Validacija metoda vrlo je važan, a i nužan sastavni dio svakog istraživanja. Brojne institucije kao što su Association of Official Analytical Chemists (AOAC), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Food and Drug Administration (FDA), International Conference on Harmonisation (ICH) i druge izdaju priručnike u kojima

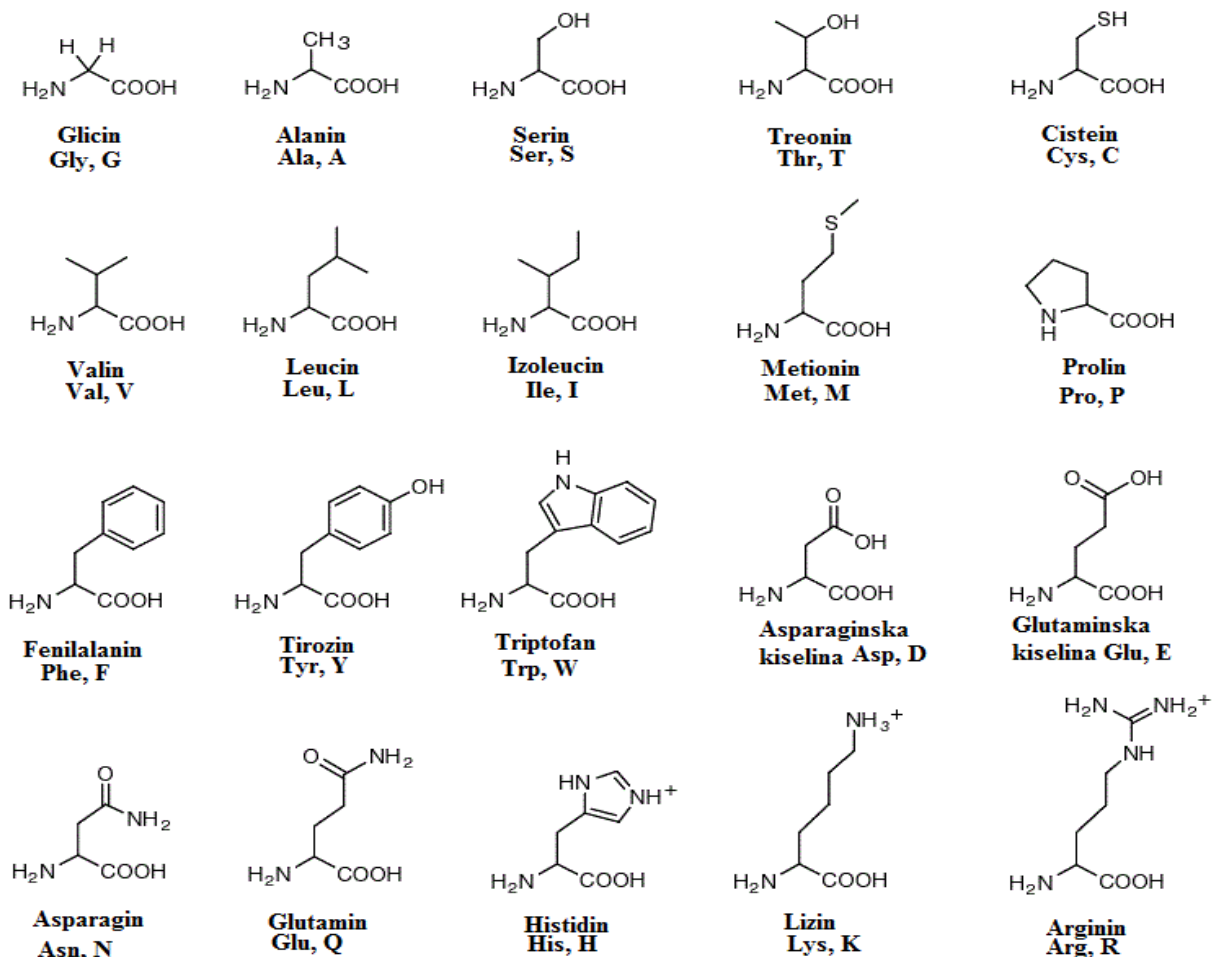
iznose smjernice za validaciju analitičkih metoda kako bi se osiguralo da je razvijena metoda služi namijenjenoj svrsi. Pri tome se parametri validacije koje je potrebno ispitati razlikuju ovisno o samoj metodi.

Cilj i svrha ovog diplomskog rada je optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje aminokiselina. Nakon optimiranih uvjeta metode provedeno je ispitivanje validacijskih parametara za asparagin, glutaminsku kiselinu, serin, arginin, prolin, treonin, metionin i izoleucin, a parametri validacije koji su ispitani jesu selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robunost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Struktura i uloga aminokiselina

Stanica se najvećim dijelom sastoji od proteina. Oni daju strukturnu cjelovitost svim živim organizmima, a enzimi, koji su također proteini, upravljaju životnim funkcijama. Građevne jedinice peptida i proteina su aminokiseline. Aminokiselina koje grade proteine ima 20 i prikazane su na slici 1 zajedno s troslovnim i jednoslovnim kraticama koje su najčešće u upotrebi.



Slika 1. Struktura 20 aminokiselina koje grade proteine (Anonymus, 2017)

Aminokiseline su definirane kao organski spojevi koji sadrže dvije funkcionalne skupine, amino i karboksilnu skupinu (Wu, 2009). Amino skupina uvijek je smještena u α -položaju u odnosu na karboksilnu skupinu (Wu, 2009). Najjednostavniji predstavnik aminokiselina je glicin. Ostale aminokiseline sadrže još i aromatski ili alifatski ostatak R, odnosno bočne skupine (Karlson, 1993). Izuzev glicina, aminokiseline imaju najmanje jedan kiralni centar, α -ugljikov atom i pokazuju optičku aktivnost (Wu, 2009). Dva zrcalna oblika molekule zovu se L- i D- izomer (Stryer, 1991). Glicin je jedina aminokiselina koja se ne pojavljuje kao izomer. Za prikazivanje konfiguracije aminokiselina obično se koriste Fischerove projekcijske formule. Pripisuje im se oblik D-izomera ili L-izomera, a osnova za označavanje je α -amino skupina. Ako je amino skupina na Fischerovoj projekcijskoj formuli usmjerena udesno, riječ je o D-aminokiselini. U L-aminokiselinama, amino skupina usmjerena je ulijevo. Aminokiseline iz proteina koji su prisutni u živim organizmima su L-izomeri (Pine, 1994). Dvije učestale podjele aminokiselina baziraju se na njihovoj nutritivnoj esencijalnosti i na osnovi kemijskih svojstava njihovih bočnih skupina. Prema kriteriju kemijskih svojstava njihovih bočnih skupina one se dijele na: aminokiseline s hidrofobnim bočnim skupinama, a to su glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin, prolin s alifatskim bočnim skupinama te fenilalanin i triptofan s aromatskim bočnim skupinama; polarne aminokiseline čije bočne skupine nisu nabijene, to su serin, treonin, asparagin, glutamin; pozitivno nabijene aminokiseline lizin, arginin, histidin i negativno nabijene aminokiseline u koje spadaju asparaginska kiselina i glutaminska kiselina (Karlson, 1993; Stryer, 1991; Wu, 2013). Prema kriteriju nutritivne esencijalnosti, aminokiseline dijele se na esencijalne i neesencijalne. Esencijalne aminokiseline su one koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati te se moraju unijeti prehranom kako bi se održalo zdravlje i vitalnost. Esencijalne aminokiseline su valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, triptofan, metionin, treonin i lizin (Karlson, 1993). Neesencijalne aminokiseline se mogu sintetizirati u ljudskom organizmu ovisno o njegovim potrebama (Cabarello i su., 2003). Aminokiseline mogu biti međusobno povezane peptidnom vezom u peptid, odnosno protein, ali mogu biti i slobodne. Slobodne aminokiseline i njihovi metaboliti široko su rasprostranjeni u živom svijetu. Nalaze se kako u životinjama, tako i biljkama i mikroorganizmima (primjerice citrulin, ornitin, putrescin, itd.). Neke aminokiseline koje se nalaze u biljkama, kao što je citrulin u lubenici, su povoljne za zdravlje životinja, dok je recimo mimosin toksičan za sisavce. U većini sastojaka hrane biljnog ili životinjskog podrijetla se 98 % aminokiselina nalazi u vezanom obliku, dakle kao peptidi, odnosno

proteini. Svega 2 % aminokiselina se nalazi u slobodnom obliku. Tako na primjer, koncentracija slobodnog taurina u humanom mlijeku može biti koncentracije do 1 mM (Wu, 2013). Slobodni taurin je aminokiselina koja se u humanom mlijeku nalazi u izobilju. Podaci dobiveni istraživanjima ukazuju na pojavu dugoročnih štetnih učinaka na neurološki sustav nedonoščadi ukoliko postoji manjak taurina. Stoga je taurin jedan od sastojaka koji se koristi pri proizvodnji hrane za dojenčad (Verner i sur., 2006). Osim navedenih 20 aminokiselina koje grade proteine, postoji još velik broj njih koji je nađen u živim organizmima. Primjerice, hidropsiprolin je hidropsilirani derivat prolina koji se nalazi u kolagenu i stabilizira kolagensko vlakno. Nadalje, tu su homocistein, homoserin, ornitin, citrulin, S-adenozilmetionin (SAM), itd. i svaka od njih ima važnu ulogu u funkcioniranju živog organizma (Wu, 2013).

2.2. Analitičke metode za određivanje aminokiselina

Kvantitativna analiza aminokiselina je danas sve češće korištena metoda koja pronalazi vrlo široku primjenu – u kliničkoj dijagnostici (Mangge i sur., 2016), medicinskim i biomedicinskim istraživanjima (Sousa i sur., 2017), biotehnologiji (Dickinson i sur., 2000) te prehrambenom inženjerstvu (Hernández-Orte i sur., 2002). Aminokiseline se mogu odrediti kromatografskim i nekromatografskim metodama, dok su kromatografske metode češće korištene u odnosu na nekromatografske.

2.2.1. Nekromatografske metode određivanja aminokiselina

2.2.1.1 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je mikro-analitička tehnika za razdvajanje aminokiselina. Prednost nad metodom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je u brzini provedbe te nije potrebno koristiti gradijentnu eluaciju, kao što je to potrebno kod HPLC metode (Issaq i Chan, 1995). Također, nema otpadnih otapala. Sustav za provođenje kapilarne elektroforeze sastoji se od poliamidne šuplje kapilare (unutarnji promjer od 10 do 200 μm i vanjski promjer 370 μm) spojene na dva spremnika pufera pri čemu je razdvajanje potaknuto primjenom visokog napona, a rezultate bilježi detektor. Molekule se međusobno razlikuju u pokretljivosti u električnom polju, a razdvajanje se provodi u diskretno odvojene trake (zone) pojedinačnih molekula. Detekcija se odvija na

samoj koloni, na onom dijelu koji ima „prozor“, mjesto gdje je uklonjen dio poliamidnog materijala. Najčešće je u upotrebi kapilarna zonska elektroforeza, a razdvajanje se temelji na razlici veličina otopljenih čestica i naboju pri danom pH (McAndless i sur., 1996). Proteini, odnosno aminokiseline su dakle pogodni za analizu na takvom sustavu radi toga što su nabijene čestice i kreću se u električnom polju. Često se primjenjuju i metode koje podrazumijevaju derivatizaciju aminokiselina s fluorescentnim reagensom (Novotny i sur., 1990). Međutim, razdvajanje aminokiselina na ovaj način nije jednostavan postupak obzirom na to da se radi o smjesi bazičnih, neutralnih i kiselih komponenata te je bez obzira i na gradijent pH moguće preklapanje. Osim toga, aminokiseline (osim Phe, Trp, Tyr) nemaju kromofor i stoga direktna fluorescencijska detekcija nije moguća. Ipak, razvijena je HPLC metoda pri kojoj se dodaju reagensi te nastaju derivati aminokiselina i reagensa te kao takvi imaju kromofor što rezultira mogućnošću detekcije (Novotny i sur., 1990).

2.2.1.2. NMR spektroskopija

NMR spektroskopija koristi magnetna svojstva jezgre atoma za analizu i jedna je od najmoćnijih analitičkih metoda za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva. ^1H NMR spektroskopija je uspješno primijenjena te je dokazan sadržaj karboksilnih kiselina, aminokiselina (Ala, Phe, Pro, Tyr), ugljikohidrata, etanola i metilhidroksifurfurala bez prethodne pripreme uzorka. Kvantifikacija navedenih analita provedena je usporedbom površine svakog analita s površinom vanjskog standarda (del Campo i sur., 2016).

2.2.2. Kromatografske metode određivanja aminokiselina

Kromatografija je široko primjenjivana metoda koja omogućuje separaciju, identifikaciju i određivanje kemijskih komponenti u kompleksnim smjesama spojeva. Sustav za kromatografsko razdvajanje sastoji se od dvije faze: mobilne faze i stacionarne faze. Mobilna faza s individualnim sastojcima iz uzorka prolazi kroz stacionarnu fazu, a sastojci iz uzorka se raspodjeljuju na stacionarnoj fazi uslijed različitih interakcija, a ovisno o svojim fizikalno-kemijskim svojstvima. Kromatografski sustavi mogu biti razni, a generalno su obzirom na vrstu stacionarne faze podijeljeni na kromatografiju na koloni i plošnu kromatografiju. Plošna kromatografija se dijeli na kromatografiju na papiru i tankoslojnu kromatografiju (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC). Kolonska kromatografija se dijeli na plinsku, tekućinsku i superkritičnu fluidnu kromatografiju. Plinska kromatografija se na osnovi fizikalnih stanja

dijeli na plinsku kromatografiju plinovito-tekuće (engl. *Gas-Liquid Chromatography*, GLC) i na kromatografiju plinovito-čvrsto (engl. *Gas-Solid Chromatography*, GSC). Tekućinska kromatografija se na osnovi fizikalnog stanja uključenog u razdvajanje dijeli na kromatografiju tekuće-čvrsto, kromatografiju tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Chromatography*, LLC) i micelarnu elektrokinetičku kromatografiju (engl. *Micellar Electrokinetic Chromatography*, MEKC), a razvijena je i visoko djelotvorna tekućinska kromatografija koja ima mogućnost razdvajanja najsloženijih smjesa, HPLC (Skoog i sur., 1999).

2.2.2.1. Ionska kromatografija

Ionska kromatografija je tradicionalno korištena metoda za odvajanje i analizu aminokiselina. Oko 1950.-ih godina javila se potreba za kvantitativnim određivanjem aminokiselina u proteinskim hidrolizatima i drugim uzorcima biološkog podrijetla. Znanstvenici Stein i Moore su tada razvili metodu za određivanje aminokiselina baziranu na kolorimetriji, a razdvajanje se provodilo na kolonama od škroba. Ninhidrin je korišten kao reagens za postkolonsku derivatizaciju aminokiselina. Ninhidrin reagira s $-NH_2$ skupinom, kako slobodnih aminokiselina, tako i sa slobodnim $-NH_2$ skupinama proteina i peptida, pri čemu se razvija boja. Međutim, tu se javio problem nereproducibilnosti metode obzirom na to da dolazi do promjene boje reakcijske smjese u prisustvu otopljenog kisika iz zraka. Eksperimenti su pokazali da je najjednostavnije rješenje tog problema dodatak kositrovog klorida kao reducensa u reakcijsku smjesu. Usto, ova metoda ima još jedan veliki nedostatak, a to je nejednak intenzitet boje svih aminokiselina po molu (Stein i Moore, 1948). Daljnje poboljšanje metode isti znanstvenici dali su dvije godine kasnije. Za kromatografsko određivanje aminokiselina korištena je sintetska kolona načinjena od sulfonirane polistirenske smole. Kolona je dimenzija 0,9 * 100 cm, uz gradaciju pH od 3,4 do 11. Razdvojene su sve aminokiseline osim bazičnih. Za određivanje bazičnih aminokiselina može se koristiti još jedna kolona u rasponu pH od 5 do 6,8. Ovakve kolone imaju veću razlučivost u odnosu na kolone od škroba (Stein i Moore, 1951). Dakle, stacionarna faza jednog takvog ionsko izmjenjivačkog sustava načinjena je od ionsko izmjenjivačke smole koja je ustvari sulfonirani polimer. Mehanizam razdvajanja temelji se na ionskim interakcijama aminokiselina u jako kiselom mediju. Elucija aminokiselina provodi se korištenjem pufera uz mijenjanje njegove kiselosti. Najprije se eluiraju kisele, zatim neutralne i na kraju bazične aminokiseline. Nakon

eluacije slijedi reakcija s ninhidrinom koji u reakciji s aminokiselinama daje obojene produkte koji se tada detektiraju i kvantificiraju pomoću spektrofotometra na dvije valne duljine (Stein i sur., 1958), 550 nm za sve aminokiseline osim prolina, a na 480 nm za prolin (Khan i Faiz, 2008). Takva metoda analize daje dobre rezultate u vidu razdvajanja aminokiselina, međutim ima i dosta nedostataka. Sustav u kojem derivatizacija slijedi nakon eluacije je teško održiv, osjetljivost je ograničena i sama analiza vremenski dugo traje (Callejón i sur., 2010), čak do 48 sati (Stein i sur., 1958).

2.2.2.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je jedna od metoda koja se koristi prilikom kvantitativnog određivanja aminokiselina. Kako bi bilo koji uzorak mogao biti analiziran putem plinske kromatografije prije ulaska u kolonu sustava mora biti u plinovitom stanju. Aminokiseline nisu hlapljivi spojevi te ih je prethodno potrebno prevesti u plinovite i manje polarne spojeve. 1991. Hušek i sur. su predložili metodu prevođenja slobodnih aminokiselina u hlapljive derivate koristeći propil-kloroformat kao derivatizacijski reagens. Reakcija se bazira na nastajanju estera funkcionalnih skupina aminokiselina. Kiralna stacionarna faza pokazala se kao dobar izbor kolone za analizu aminokiselina kada ih se nastoji analizirati u prehrambenim proizvodima (Casal i sur., 2000). 2007. godine Mustafa i suradnici odredili su aminokiseline u uzorcima tijesta i kruha te uzorcima brašna raži, zobi i pšenice. Nakon ekstrakcije etanolom uzorci su propušteni kroz sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. Solid Phase Extraction, SPE) te zatim derivatizirani koristeći Phenomenex kit (Phenomenex 2001, Ez-Faast easy-fast amino acid sample testing kit, Phenomenex USA). Analiza je provedena pri 320 °C uz helij kao plin nosioc. Dobiveni su zadovoljavajuće razdvojeni pikovi slobodnih aminokiselina te je utvrđeno da matriks uzorka ne stvara interferencije prilikom analize i da je metoda ponovljiva za većinu aminokiselina (Mustafa i sur., 2007).

2.2.2.3. Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija

HPLC je najšire korištena kromatografska metoda (Skoog i sur., 1999). Analitičari je koriste kako bi razdvojili organske, anorganske te biološke sastojke najkompleksnijih uzoraka. Uređaj za HPLC sastoji se od injektora za unošenje uzorka, pumpe koja omogućuje protok mobilne faze kroz sustav, kolone, pećnice koja omogućuje održavanje definirane temperature analize, spremnika otapala, različitih vrsta detektora te programa za obradu dobivenih

podataka. Protok mobilne faze kroz sustav može biti izokratan, što znači da je mobilna faza tijekom cijelog trajanja analize istog sastava ili gradijentan, što znači da se sastav mobilne faze mijenja tijekom analize. Pri gradijentnom eluiranju se miješaju otapala različitih svojstava i na taj način se postiže bolje razdvajanje sastojaka smjese. Najčešći detektori koje se koriste u kombinaciji s HPLC-om su spektrofotometrijski, fluorescentni i detektori koji mjere indeks loma svjetlosti. Princip rada spektrofotometrijskih detektora se zasniva na sposobnosti uzorka da apsorbira svjetlo na jednoj ili više valnih duljina u ultraljubičastom (engl. *Ultra Violet*, UV) ili vidljivom (engl. *Visible*, VIS) dijelu spektra, a rade na principu monokromatske i polikromatske detekcije. Primjer polikromatske detekcije je detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) koji omogućava da se valna duljina mijenja tijekom analize. Princip rada fluorescentnog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FD) zasniva se na sposobnosti fluorescentnih sastojaka da emitiraju dio svjetla apsorbiranog od strane izvora ekscitacije i takav detektor je selektivniji u odnosu na spektrofotometrijski. Princip rada detektora indeksa loma (engl. *Refractive Index Detector*, RID) temelji se na svojstvu molekula da lome svjetlost, a koriste se isključivo pri izokratnim analizama (Skoog i sur.,1999). Obzirom na mehanizam razdvajanja, kromatografija obrnutih faza (engl. *Reversed-Phase Chromatography*, RPC) je danas najčešće korištena separacijska tehnika u tekućinskoj kromatografiji. Kod RPC je stacionarna faza manje polarna nego mobilna faza. Nepolarna stacionarna faza kod RPC je najčešće na bazi kemijski modificiranog silika gela (C₁, C₃, C₄, C₁₈) (Skoog i sur., 1999).

Analiza aminokiselina pomoću HPLC-a u različitim uzorcima zaokuplja pažnju brojnim znanstvenicima u području medicine, biotehnologije, prehrambene industrije, biokemije, itd. i osim do sada navedenih metoda za određivanje aminokiselina, vrlo često se koristi visoko djelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza pri čemu je stacionarna faza uglavnom C₁₈ kolona. Mobilne faze su najčešće smjesa nekog organskog otapala i vode (metanol, acetonitril, tetrahidrofur) i pufer kako bi pH analize bio kontroliran. Smjesa aminokiselina je složen uzorak i gradijentna elucija prilikom analize je nužna. Prilagodba gradijenta elucije mobilnih faza je vrlo zahtjevan zadatak imajući u vidu međusobnu različitost pojedinih aminokiselina. Osim toga, protok mobilne faze i temperatura su parametri analize koje je također potrebno utvrditi. Analiza aminokiselina na ovaj način je brza, točna i precizna. Ovisno o uzorku i o tome želi li se analizirati ukupne ili slobodne aminokiseline, tekućinskoj kromatografiji može prethoditi hidroliza uzorka kako bi se pocijepale peptidne

veze. Nakon hidrolize moguće je odmah analizirati pripremljeni uzorak bez korištenja derivatizacijskog reagensa. Kuban i sur. u svom radu su opisali način na koji su razdvojili i detektirali nederivatizirane aminokiseline koristeći standarde aminokiselina i peptide te su ih za potrebe analize otopili u vodi. Kao mobilne faze su koristili smjese trifluoroctene kiseline i vode u različitim omjerima, smjesu metanola i vode, octene kiseline i acetonitrila. Detekcija aminokiselina provedena je putem kapacitivno spregnutog beskontaktnog detektora vodljivosti (engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection*, CCCCDD). Dobiveni rezultati ukazuju na zadovoljavajuću ponovljivost, osjetljivost te granicu detekcije 1-20 μM (Kuban i sur., 2006). Različitost u topljivosti aminokiselina u mediju, njihovoj polarnosti i kiselim odnosno bazičnim svojstvima direktno utječe na njihovo odvajanje. Navedene razlike u svojstvima, nepostojanost i nedostatak kromofora otežavaju njihovo određivanje. Iako aminokiseline mogu biti direktno detektirane od strane UV/VIS detektora obzirom na to da apsorbiraju zračenje pri valnoj duljini 190-210 nm, u tom području također zračenje apsorbiraju i drugi reagensi korišteni prilikom pripreme uzorka i analize (Callejón i sur., 2010) te je potrebna veća osjetljivost. Tu se javlja potreba za derivatizacijom (Petris i sur., 2002). Od derivatizacijskog reagensa se očekuje da daje stabilne derivate aminokiselina koje je tada lako detektirati, da vrijeme reakcije bude kratko te da se reakcija derivatizacije odvija u vodenom mediju pri sobnoj temperaturi. Derivatizacijski reagensi koji su do sada najčešće korišteni su: ortoftaldialdehid (OPA), 9-fluorenilmetil klorformat (FMOC), 6-aminokinolil-n-hidroksisukcinimidil karbamat (AQC) i fenilizotiocijanat (PITC).

2.3. Derivatizacijski reagensi

2.3.1. OPA

Ortoftaldialdehid reagens sam po sebi nije fluorescentan, ali u reakciji s aminokiselinama daje derivate koji su fluorescentni i tada ih je moguće detektirati putem FD detektora na valnim duljinama 340-455 nm (Roth, 1971). OPA reagens daje derivate aminokiselina (izoindole) u prisustvu reducensa, kao što su 2-merkaptoetanol (Roth, 1971) i 3-merkaptopropionska kiselina (Dai i sur., 2014). Uz to, potreban je vodeni bazični medij. Reakcija derivatizacije odvija se brzo, potrebno je oko 5 minuta kako bi nastali derivati OPA reagensa i aminokiselina. Nastali derivati su visoko fluorescentni, uz iznimku derivata cisteina, cistina, prolina i hidroksiprolina i trebali bi biti analizirani 5 do 25 minuta nakon derivatizacije radi nestabilnosti derivata (Roth, 1971). Nema potrebe za uklanjanjem viška OPA reagensa prije

injektiranja uzorka jer ne ometa niti odvajanje niti detektiranje aminokiselina (Callejón, 2010). Kao glavni nedostatak reagensa, uz relativno slabu stabilnost derivata, navodi se nemogućnost direktnog nastajanja derivata sekundarnih aminokiselina. Stoga je cistein moguće detektirati tek nakon njegove oksidacije u cisteinsku kiselinu koja tada daje derivate u reakciji s OPA reagensom. Također, OPA reagira s 4-amino-1-butanolom i 4-aminobutan-1,3-diolom, produktima reakcije oksidacije prolina i 4-hidroksiprolina, u prisutnosti kloramina-T i natrijevog borohidrida (NaBH_4) pri 60 °C (Wu, 1993).

2.3.2. FMOC

Korištenje 9-fluorenilmetil kloroformata kao derivatizacijskog reagensa predstavili su 1983. Einarsson i njegov tim suradnika kao jednu od metoda nastajanja derivata aminokiselina koji se zatim analiziraju HPLC metodom uz korištenje FD detektora pri valnim duljinama ekscitacije i emisije od 260 nm, odnosno 310 nm. FMOC je sam po sebi, za razliku od OPA reagensa, fluorescentan. To ne mora nužno predstavljati nedostatak obzirom da je suvišak reagensa moguće ukloniti bez gubitka nastalih derivata (Einarsson i sur., 1983). FMOC reagira direktno s primarnim i sekundarnim aminokiselinama i daje stabilne visoko fluorescentne derivate (Bauza i sur., 1995). Priprema FMOC reagensa uključuje njegovo otapanje u metanolu (Ho, 2005), tetrahidrofuranu (Schilb i sur., 1991), acetonu (Einarsson i sur., 1984; Einarsson i sur., 1986), acetonitrilu (Ou i sur., 1996; Haynes i sur., 1991; Näsholm i sur., 1987) ili smjesi acetona i acetonitrila (Fernandez-Trapiella, 1990). Acetonitril (ACN) je preferirani izbor obzirom na velik broj nečistoća u drugim otapalima koje interferiraju s ciljanim analitima (Jámbor i Molnár-Perl, 2009). Jámbor i Molnár-Perl su 2009. godine napravili opsežan pregled literature do tada objavljene na temu korištenja FMOC-a uz različite uvjete i zaključili kako su optimalni uvjeti: pH za reakciju derivatizacije 9, vrijeme derivatizacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta i ACN kao otapalo za FMOC. Također, smatraju da je optimalan molarni omjer FMOC-a i aminokiselina 5,5/1. Glavnim nedostatkom ovog reagensa smatra se potreba za uklanjanjem njegovog suviška budući da daje pikove koji interferiraju s aminokiselinama. Za uklanjanje suviška reagensa je prvo predložen pentan (Einarsson, 1986). Međutim, nakon upotrebe pentana se javlja problem gubitka nekih derivata. Stoga su predložene smjese pentana i etil acetata (Miller i sur., 1990a), heksana (Miller i sur., 1990b), heptana (Or-Rashid i sur., 2000), adamantamina (Gustavssoni Betnér, 1990) i heptilamina (Kirschbaum i sur., 1994). Prema navodima Jámbor i Molnár-

Perl, primjena organskih otapala nije prikladna jer se na taj način gubi dio derivata, dok se adamantamin, ADAM i heptilamin smatraju iznimno pogodnima za uklanjanje viška reagensa. Haynes i sur. su 1991. predložili metodu derivatizacije aminokiselina koristeći FMOC bez uklanjanja suviška reagensa s time da se i dalje dobiju stabilni i visoko fluorescentni derivati, čak i derivati Tyr i His koji prelaze iz svojih disupstuiranih oblika u stabilne monosupstituirane uz dodatak hidroksilamina. Osim korištenja FD detektora za detekciju derivata FMOC-a i aminokiselina, u literaturi je prikazano i korištenje DAD detektora. Horanni i Engelhardt su 2013. godine razvili metodu za određivanje 19 aminokiselina u čaju (bijelom, crnom, zelenom, oolong, pu-erh) i proizvodima od čaja koristeći derivatizaciju s FMOC reagensom. Za detekciju derivata korišten je DAD detektor pri valnoj duljini od 262 nm (Horanni i Engelhardt, 2013). Također, Fabiani i sur. su 2002 validirali metodu za određivanje 16 aminokiselina od interesa u sokovima od voća (kruške, naranče, ananasa, grejpa, breskve, marelice) uz korištenje FMOC-a kao derivatizacijskog reagensa čiji je suvišak nakon derivatizacije uklonjen dodatkom ADAM-a, a derivati su detektirani koristeći DAD detektor pri valnoj duljini od 263 nm (Fabiani i sur., 2002).

2.3.3. PITC

Fenilzotiocijanat je reagens čija je upotreba opisana 1984. godine na uzorcima dvaju enzima (lizosoma bjelanjka jajeta i ribonukleaze izolirane iz jetre goveda). PITC reagira i s primarnim i sekundarnim slobodnim aminokiselinama na principu Edmanove degradacije (PITC reagens se još naziva i Edmanov reagens) unutar 5-10 minuta pri sobnoj temperaturi i tvori stabilne feniltiokarbamil aminokiseline (PTC). Suvišak reagensa uzrokuje nastanak interferirajućih pikova i stoga ga je potrebno ukloniti. Suvišak PITC-a i ostalih kemikalija uklanja se pod vakuumom. Tako tretirani uzorci pokazali su stabilnost nakon mjesec dana skladištenja u zamrznutom obliku (Heinrikson, 1984). U usporedbi s OPA reagensom, PITC reagira jednako i s prolinom i hidroksiprolinom i nastaju prolin PTC i hidroksiprolin PTC koji imaju jednake kromofore kao i ostale aminokiseline (Callejón, 2010). PTC aminokiseline detektiraju se korištenjem UV detektora budući da apsorbiraju zračenje pri valnoj duljini od 254 nm. Sarwar i Botting su 1993. godine opisali korištenje PITC reagensa za analizu aminokiselina prisutnih u hrani i fiziološkim uzorcima. U 12 minuta detektirali su sve aminokiseline osim Trp u hidrolizatima hrane i u 20 minuta 27 aminokiselina u serumu te tkivima srca, jetre i bubrega (Sarwar i Botting, 1993).

2.3.4. AQC

6-aminokinolin-N-hidroksisukcinimidil karbamat reagira i s primarnim i sekundarnim aminokiselinama dajući asimetrične derivate uree u visokom prinosu pri pH 8,2-10. Maksimalni prinos dobiva se pri molarnom omjeru reagensa i aminokiselina 3/1. Dobiveni derivati su fluorescentni i detektiraju se pomoću FD detektora pri valnim duljinama ekscitacije i emisije od 250, odnosno 395 nm. Reakcija derivatizacije traje kratko, a suvišak reagensa se hidrolizira unutar dvije minute na 6-aminokinolin (AMQ), ugljični dioksid i N-hidroksisukcinimid (Cohen i Michaud, 1993). Prednost ovog reagensa je u visokoj osjetljivosti (granica detekcije 50 do 300 fmol za hidrolizate) i vrlo maloj količini uzorka potrebnog za analizu (50 ng hidrolizata proteina) (Shively, 1986). Hidrolizirani uzorci žitarica, hrane za ljude i hrane za životinje s visokim udjelom masti, ugljikohidrata, vitamina i ostalih komponenata su uspješno analizirani ovom metodom. Također, derivati aminokiselina i reagensa pokazali su se stabilnima i nakon tjedan dana skladištenja na sobnoj temperaturi (Cohen i de Antonis, 1994).

2.4. Razvoj i validacija analitičke metode

Analitičke metode koje se u današnje vrijeme koriste u laboratorijima doprinose napretku znanosti i industrije, neovisno o tome o kojoj je grani znanosti ili industriji riječ. Konačni rezultati dobiveni primjenom analitičkih metoda vrlo su vrijedan izvor informacija. Aristotel je analitiku definirao kao umijeće razlaganja, što ona doista i jest (Anonymus, 2009). Dobra analitička metoda daje rezultate koji su temelj planiranja sljedećeg koraka u istraživanju, razvoju nekog proizvoda, poboljšanja sustava. Analitičke metode neprestano se razvijaju kako bi što veći broj vrijednih informacija bio dostupan što u konačnici doprinosi boljoj budućnosti. Razvoj metode složen je postupak proučavanja svojstava uzorka, metode analize tog uzorka i velikog broja pokušaja kako bi konačna metoda bila prikladna predodređenoj namjeni te davala vjerodostojne rezultate u što kraćem vremenskom roku. Kako bi se dokazala vjerodostojnost rezultata analize, provodi se postupak validacije metode, a validirana metoda jedan je od najboljih pokazatelja profesionalnosti laboratorija. Validacija analitičke metode je potvrda, pružanjem objektivnih dokaza, da su zahtjevi za određenu namjeravanu upotrebu ili primjenu ispunjeni (ISO, 2015). Osim težnje prema što višem stupnju profesionalnosti, principi Dobre laboratorijske prakse, DLP (definirana Pravilnikom NN 73/2012), Dobre analitičke prakse, DAP i Dobre proizvođačke prakse, DPP uvjetuju

validaciju analitičkih metoda, a osim njih i ISO norme, konkretno norma HRN EN ISO/ICE 17025:2005 čije je uvođenje dobrovoljno. Ne postoji točan i univerzalno primjenjiv propis za validaciju metode, već su tijekom godina izdani različiti priručnici i vodiči od strane međunarodnih organizacija kao što su to Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC, 2002), The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (Eurachem, 1998), How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification (AOAC, 2007), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (FDA, 2002), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (ICH, 2005), itd. Validaciju metode treba provesti pri razvoju i uvođenju nove metode, ali i pri prenamjeni ili prilagodbi postojeće metode, pri prenošenju metode u drugi laboratorij ili na drugi instrument (Eurachem, 2008). Tijekom provedbe validacije potrebno je definirati svrhu metode, odrediti parametre validacije, postaviti kriterije prihvatljivosti, napraviti laboratorijske eksperimente, obraditi podatke te usporediti rezultate s postavljenim kriterijima (Eurachem, 2008). Parametri koji se određuju u postupku validacije su specifičnost/selektivnost, linearnost, radno područje, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost, reproducibilnost), točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost (ICH, 2005). Razlikujemo četiri tipa analitičkih metoda koje se validiraju. To su metode za identifikaciju, kvantitativne metode za određivanje onečišćenja, limit testovi za kontrolu onečišćenja i kvantitativne metode za određivanje sadržaja. Koji parametri se određuju u postupku validacije i s kojim kriterijima ovisi o namjeni metode i utvrđuje se posebno za svaki analitički postupak prema ICH smjernicama (ICH, 2005). Parametri validacije koji se utvrđuju ovisno o svakom pojedinu tipu analitičke metode nalaze se u tablici 1.

Tablica 1. Parametri validacije ovisno o vrsti analitičke metode (ICH, 2005)

Parametri validacije	Metode za identifikaciju	Metode za ispitivanje čistoće		Metode za određivanje sadržaja
		Kvantitativno	Limit test	
Točnost	-	+	-	+
Preciznost	-	+	-	+
Specifičnost/ selektivnost	+	+	+	+
Granica detekcije	-	-	+	-
Granica kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Područje	-	+	-	+

2.4.1. Selektivnost/specifičnost

Važna karakteristika kvalitativne analize je sposobnost pouzdane identifikacije analita na temelju odgovora tog analita (AOAC, 2008). Selektivnost metode je točnost mjerenja metode u prisutnosti interferencija kao što su neciljani mikroorganizmi, nečistoće i komponente matriksa. Pojam "specifičan" općenito se odnosi na metodu koja daje odgovor samo za jedan analit, dok se izraz "selektivan" odnosi na metodu koja daje odgovore za brojne analite koji se mogu razlikovati ili se ne razlikuju jedan od drugoga. Budući da vrlo malo analitičkih metoda služi za određivanje samo jednog analita, upotreba pojma selektivnosti je češća od specifičnosti (IUPAC, 2002). Specifičnost se kod kromatografskih metoda postiže optimalnim izborom kolona i postavljanjem kromatografskih uvjeta kao što su sastav mobilnih faza, temperatura, valna duljina detekcije itd. Kromatografske metode imaju težak zadatak obzirom na to da je teško pouzdano reći jesu li pikovi dobiveni analizom uzorka prikaz ciljanih analita ili su prisutne i nečistoće. Stoga, bilo bi dobro procijeniti čistoću pikova (Huber, 2011).

2.4.2. Linearnost i radno područje

Linearnost analitičke metode je njena sposobnost da se unutar definiranog raspona dobiju rezultati ispitivanja koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Radno područje analitičke metode je interval između najniže i najviše koncentracije analita u uzorku za koji je dokazano da metoda ima prikladnu razinu preciznosti, točnosti i linearnosti, uključujući i te koncentracije (ICH, 2005).

2.4.3. Preciznost

Rezultati primjene neke analitičke metode se mogu razlikovati kao posljedica promjene analitičara, instrumenta, korištenih standardnih materijala, kemikalija različitih proizvođača i drugih parametara. ISO 5725 opisuje preciznost kao stupanj slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih pod propisanim uvjetima (ISO, 1994). Preciznost se obično izražava numerički – standardnom devijacijom (manja preciznost se označava većom standardnom devijacijom i obrnuto). Da bi navedena preciznost izrazila učinak metode pri uobičajenim radnim uvjetima, mora se odrediti pod takvim uvjetima. Testni materijali bi trebali biti tipični za uzorke koji se uobičajeno analiziraju. Priprema uzorka treba biti u skladu s uobičajenim postupkom (IUPAC, 2002). Može biti iskazana kao ponovljivost, reproducibilnost i intermedijarna preciznost. Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu. Određuje se iz uzastopnih mjerenja određene koncentracije analita (uglavnom koncentracije u sredini radnog područja) uz referentne standardne otopine (Huber, 2011). Intermedijarna preciznost izražava varijacije unutar laboratorija kao primjerice različiti dani, različiti analitičari, druga oprema, itd., a ispitivanje se provodi kroz duže vremensko razdoblje. Također se računa relativna standardna devijacija (ICH, 2005). Reproducibilnost je parametar koji opisuje preciznost dobivenu u različitim laboratorijima pod propisanim uvjetima (ICH, 2005).

2.4.4. Točnost

Točnost je mjera pouzdanosti analitičke metode. Definira se kao slaganje između srednje vrijednosti dobivene iz rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti. Točnost se izražava uz navođenje sustavne pogreške, pri čemu manja sustavna pogreška znači veću točnost i obrnuto. Sustavne pogreške se određuju usporedbom odgovora metode na

certificirani referentni materijal (engl. *Certified Reference Material*, CRM), a one mogu biti laboratorijske pogreške i pogreške metode (IUPAC, 2002). Ukoliko referentni materijali nisu dostupni, uzorak se može cijepiti s poznatom koncentracijom analita. Nakon ekstrakcije analita iz matriksa uzorka i injektiranja u analitički instrument, može se odrediti analitički povrat, odnosno iskorištenje (engl. *recovery*) usporedbom odgovora analiziranog uzorka sa odgovorom standarda otopljenog u čistom otapalu. Iskorištenje analita određeno pri različitim koncentracijama može se iskoristiti za korekciju konačnih rezultata. Odabrane koncentracije trebaju pokriti širok raspon koncentracija. Točnost se određuje analizom najmanje devet otopina uzorka na tri koncentracijske razine koje pokrivaju radno područje. Izražava se kao postotak iskorištenja analita ili kao razlika između srednje i prihvaćene stvarne vrijednosti zajedno s intervalima pouzdanosti (Huber, 2011).

2.4.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Cilj određivanja granice detekcije je utvrditi najnižu koncentracija analita prisutnog u uzorku koji se može detektirati uz određenu točnost i preciznost koristeći određeni postupak mjerenja, ali ne mora nužno biti kvantificirana kao točna vrijednost (Eurachem, 2008; Huber, 2011). Treba uzeti u obzir da granica detekcije metode nije najniža granica odgovora instrumenta (IUPAC, 2002). Vizualno se određuje razrjeđivanjem otopine uzorka ili cijepljenjem otopine uzorka odgovarajućom količinom analita, a procjenjuje se najmanji signal koji se nedvojbeno može prepoznati. Omjer signala i šuma može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljiv je omjer 3/1. Statistički se granice detekcije (kao i kvantifikacije) mogu odrediti pomoću standardne devijacije signala i nagiba regresijskog pravca. Granica kvantifikacije odnosi se na najnižu koncentraciju analita koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se razrjeđivanjem otopine uzorka ili cijepljenjem uzorka s odgovarajućom koncentracijom analita. Granica kvantifikacije procjenjuje se pomoću omjera signala i šuma, a prihvatljiv omjer je 10/1. Jednako kao i granica detekcije, može se odrediti pomoću standardne devijacije signala i nagiba regresijskog pravca (Huber, 2011).

2.4.6. Robusnost

Robusnost analitičke metode mjera je njene sposobnosti da daje nepromijenjene rezultate unatoč malim, ali namjernim varijacijama parametara metode. Ona je pokazatelj pouzdanosti

metode tijekom uobičajene uporabe (ICH, 2005). Varijacije metode odnose se na stabilnost mjernih otopina, različitu opremu, različite analitičare, a kada je riječ o HPLC metodama istraživanja tada se varijacije odnose na protok mobilne faze, pH mobilne faze, promjenu temperature, promjenu kolone, promjene u sastavu mobilnih faza (ICH, 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uređaji

- analitička vaga (Shimadzu, AX 200)
- ultrazvučna kupelj (VWR Ultrasonic cleaner 4SC300T)
- vorteks (VWR VV3)
- pH metar (Jenway 3510)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC (Shimadzu) čiji su sastavni dijelovi:
 - pumpa (LC-10AD VP)
 - degazer (DGU-14A)
 - pećnica (CTO-10AS VP)
 - kontroler (SCL-10A VP)
 - DAD detektor (SPD-M10A)
 - fluorescentni detektor (RF-10A XL)
 - predkolona Supelco Guard Column, 2 cm Cartridge
 - kolona Supelco Supelcosil LC-18-T 15 cm x 4,6 mm, veličina čestica 3 μm .

3.1.2. Oprema

- epruvete
- odmjerne tikvice (10, 1000 mL)
- stakleni lijevak
- automatska pipeta (Eppendorf)
- laboratorijska čaša (50 mL)
- sustav za vakuum filtraciju (Phenomenex)

3.1.3. Kemikalije i standardi

Kemikalije:

- voda HPLC čistoće

- borna kiselina, H_3BO_3 (Lachner, p.a.)
- kalijev hidroksid, KOH (Kemika, p.a.)
- natrijev acetat trihidrat, $CH_3COONa \times 3H_2O$ (Lachner, p.a.)
- ledena octena kiselina, CH_3COOH (Macron, 99,5 %)
- acetonitril, ACN (J.T. Baker, HPLC Gradient Grade)
- trietilamin, TEA (Fischer chemical, Analytical reagent grade, 99,83 %)
- 9- fluorenilmetil kloroformat, Fmoc (Fluka, Biochemika, >99 %)
- natrijev hidroksid, NaOH (Lachner, p.a.)
- hidrosilamin hidroklorid, $NH_2OH \times HCl$ (Fluka, p.a., >98 %)
- 2-metil tioetanol, C_3H_8OS (Acros organics, 99 %)
- klorovodična kiselina, HCl (Carlo Erba, 37 %)
- adamantin hidroklorid, ADAM (Sigma Aldrich)

Standardi:

- kupovna smjesa aminokiselina (Pierce): L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Cistein, L-Glutaminska kiselina, Glicin, L-Histidin, L-Izoleucin, L-Leucin, L-Lizin, L-Metionin, L-Fenilalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Treonin, L-Tirozin, L-Valin
- L (+) Arginin (Fischer scientific, 98,5-101,0 %)
- L-Asparagin, ≥ 98 %, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Arginin monohidroklorid ≥ 98 %, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Alanin, ≥ 98 %, TLC (Sigma Aldrich)
- L-Asparaginska kiselina, ≥ 98 %, TLC(Sigma Aldrich)
- L-Cistein hidroklorid, ≥ 98 %, TLC(Sigma Aldrich)
- L-Cistin, ≥ 98 %, TLC (Sigma Aldrich)
- L-Glutaminska kiselina, ≥ 99 %, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Glutamin, ≥ 99 %, HPLC(Sigma Aldrich)
- Glicin, ≥ 99 %, HPLC (Sigma Aldrich)
- Trans-4-hidroksiprolin, $\geq 98,5$ %, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Histidin monohidroklorid monohidrat, ≥ 98 %, TLC (Sigma Aldrich)
- L-Izoleucin, ≥ 98 %, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Lizin monohidroklorid, ≥ 98 %, HPLC (Sigma Aldrich)

- L-Leucin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Metionin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Prolin, $\geq 99 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Fenilalanin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Serin, $\geq 98\%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Triptofan, $\geq 98\%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Tirozin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Treonin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Valin, $\geq 98 \%$, HPLC (Sigma Aldrich)
- L-Norleucin (Sigma Aldrich)

3.2. Metode rada

3.2.1. Razvoj metode i optimizacija

Razvoj i optimizacija metode za određivanje asparagina (Asp), glutaminske kiseline (Glu), serina (Ser), arginina (Arg), prolina (Pro), treonina (Thr), metionina (Met) i izoleucina (Ile) provedena je korištenjem standardnih otopina navedenih aminokiselina različitim koncentracijama. Ispitani su različiti uvjeti derivatizacije i različiti kromatografski uvjeti. U svrhu optimizacije derivatizacije ispitana su različita vremena trajanja derivatizacije od 10, 20 i 30 minuta. Ispitano je i korištenje FMOC-a pripremljenog na dan analize, pripremljenog dan ranije i pripremljenog 6 dana ranije. Također, ispitan je dodatak ADAM-a s ciljem uklanjanja suviška FMOC-a. Optimizacija kromatografskih uvjeta provedena je na način da su ispitane temperature kolone od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i različiti uvjeti gradijentnog eluiranja.

3.2.2. Priprema kalij-boratnog pufera

Kalij-boratni pufer koncentracije $0,5\text{ mol L}^{-1}$ pripremljen je na način da je $30,9067\text{ g H}_3\text{BO}_3$ dodano je u čašu te je pH prilagođen na $8,5$ pomoću KOH koncentracije 5 mol L^{-1} . Pufer je skladišten u hladnjaku te temperiran do sobne temperature prije dodavanja u otopinu za analizu.

3.2.3. Priprema natrij-acetatnog pufera (mobilna faza A)

Natrij-acetatni pufer koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pripremljen je na način da je $13,608 \text{ g}$ $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ odvagano u laboratorijsku čašu i zatim preneseno preko staklenog lijevka u odmjernu tikvicu od 1000 mL . Dodana je voda HPLC čistoće, $0,5 \text{ mL}$ TEA, pH je prilagođen do $5,8$ s ledenom octenom kiselinom te je tikvica dopunjena do oznake s vodom. Tako pripremljen pufer zatim je propušten kroz sustav za vakuum filtraciju te degaziran pola sata koristeći UZV kupelj prije nego što je pušten kroz HPLC.

3.2.4. Priprema smjese ACN/H₂O (mobilna faza B)

ACN i HPLC voda pomiješani su u omjeru $4:1$ koristeći menzuru kao odmjerno posuđe. Zatim je takva otopina propuštena kroz sustav za vakuum filtraciju te degazirana pola sata koristeći ultrazvučnu kupelj prije nego što je propuštena kroz HPLC sustav.

3.2.5. Priprema standardnih otopina pojedinačnih aminokiselina i internog standarda

Svaka pojedinačna aminokiselina odvagana je u odmjernu tikvicu od 10 mL te je do oznake dopunjeno HPLC vodom. Pripremljene su stock otopine aminokiselina koncentracije približno 5 mmol L^{-1} . Tako pripremljenim otopinama smanjivana je koncentracija do potrebne koncentracije prije dodatka u otopinu za analizu dodatkom HPLC vode. Na isti način pripremljena je otopina internog standarda, L-norleucina, te je koncentracija smanjivana na potrebnu koncentraciju prije dodatka u otopinu za analizu.

3.2.6. Priprema otopine Fmoc reagensa

Fmoc je pripremljen u koncentraciji 3 mmol L^{-1} . $3,19 \text{ mg}$ reagensa otopljeno je u 5 mL ACN-a.

3.2.7. Priprema otopine ADAM-a

ADAM je pripremljen u koncentraciji 80 mmol L^{-1} na način da je u staklenu bočicu odvagano $0,06 \text{ g}$ ADAM-a te dodano $2,5 \text{ mL}$ ACN-a i $2,5 \text{ mL}$ otopine HCl-a koncentracije $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.8. Priprema otopine odabranih aminokiselina za analizu

Otopina aminokiselina željene koncentracije i otopina internog standarda pripremljene su razrjeđivanjem njihovih stock otopina. U vijalicu je zatim otpipetirano $400 \mu\text{L}$ takve otopine

aminokiselina i internog standarda, 100 μL kalij-boratnog pufera te 500 μL FMOC-a. Reakcija derivatizacije trajala je 20 minuta te je nakon toga zaustavljena dodatkom 100 μL octene kiseline koncentracije 1 mol L^{-1} .

3.2.9. Priprema otopine svih aminokiselina za analizu

Otopina svih aminokiselina (osim cistina) približne koncentracije 0,05 mmol L^{-1} pripremljena je razrjeđivanjem stock otopina pojedinačnih aminokiselina. U vijalicu je zatim otpipetirano 400 μL takve otopine aminokiselina, 100 μL kalij-boratnog pufera te 500 μL FMOC-a. Reakcija derivatizacije trajala je 20 minuta te je nakon toga zaustavljena dodatkom 100 μL octene kiseline koncentracije 1 mol L^{-1} ili 50 μL ADAM-a ovisno o željenom ispitivanju.

3.2.10. Kromatografski uvjeti

Analiza smjese aminokiselina provedena je koristeći gradijentnu eluciju s dvije mobilne faze, a uvjeti eluiranja prikazani su u tablici 2. Protok je iznosio 1,0 mL min^{-1} , volumen injektiranja 20 μL , a temperatura kolone 50 $^{\circ}\text{C}$. Aminokiseline su detektirane koristeći DAD detektor, a analiza je trajala 30 minuta.

Tablica 2. Uvjeti gradijentnog eluiranja

Vrijeme (min)	ϕ A(%)	ϕ B(%)
0,01	80	20
15	50	50
18	20	80
20	0	100
26	0	100
30	80	20

3.3. Identifikacija ciljanih aminokiselina

Ciljane aminokiseline identificirane su tako da su pojedinačno pripremljene za analizu na isti način kao i smjesa svih aminokiselina te analizirane pod istim uvjetima. Usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom pojedinačnih aminokiselina i retencijskih

vremena pikova dobivenih analizom smjese navedenih aminokiselina utvrđeno je koji pik pripada kojoj aminokiselini.

3.4. Validacija metode za određivanje aminokiselina

U svrhu validacije metode za određivanje ciljanih aminokiselina ispitivani su sljedeći parametri validacije: selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost. Za validaciju metode, otopine aminokiselina za analizu su bile pripremane na način opisan pod točkom 3.2.7. te uz optimalne uvjete derivatizacije i optimalne kromatografske uvjete.

3.4.1. Selektivnost

Selektivnost metode određena je pregledom kromatograma dobivenih analizom smjese navedenih aminokiselina. Razdvojenost pikova pokazatelj je selektivnosti metode.

3.4.2. Linearnost

Linearnost metode određena je provođenjem ispitivanja na šest koncentracijskih razina uz tri ponavljanja na svakoj od koncentracijskih razina. Koncentracije su izražene u mg L^{-1} . Iz površina dobivenih pikova izračunata je srednja vrijednost površine za svaku koncentracijsku razinu. Linearnost metode je prikazana kao graf ovisnosti površine pika svake aminokiseline o masenoj koncentraciji aminokiseline. Prikazana je jednadžba regresijskog pravca, nagib pravca, odsječak na osi y, koeficijent determinacije (R^2) i koeficijent korelacije (r).

3.4.3. Preciznost

Ponovljivost i intermedijarna preciznost određene su računanjem relativnih standardnih devijacija površina pikova analiziranih aminokiselina. Ispitivanje ponovljivosti je provedeno na šest koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Rezultati su uspoređeni s kriterijima prihvatljivosti za ponovljivost iz Priručnika (AOAC, 2011) koji su prikazani u tablici 3. Intermedijarna preciznost je ispitivana u tri različita dana, na dvije koncentracijske razine u tri ponavljanja. Izračunata je relativna standardna devijacija.

Tablica 3. Prikaz kriterija prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost (AOAC, 2011)

Udio analita (%)	Omjer analita	Srednja vrijednost iskorištenja (%)	Ponovljivost, RSD (%)
100	1	98 - 102	1,3
10	10^{-1}	98 - 102	1,9
1	10^{-2}	97 - 103	2,7
0,1	10^{-3}	95 - 105	3,7
0,01	10^{-4}	90 - 107	5,3
0,001	10^{-5}	80 - 110	7,3
0,0001	10^{-6}	80 - 110	11
0,00001	10^{-7}	80 - 110	15
0,000001	10^{-8}	60 - 115	21
0,0000001	10^{-9}	40 - 120	30

3.4.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su iz omjera signala i šuma na baznoj liniji i jednadžbe regresijskog pravca koji pokazuje ovisnost masene koncentracije aminokiselina o visini pikova. Uvrštavanjem izračunatih omjera u jednadžbu regresijskog pravca svake od pojedinačnih aminokiselina izračunata je granica detekcije na način da je koncentracija dobivena uvrštavanjem omjera signala i šuma u jednadžbu pravca pomnožena s 3, a granica kvantifikacije je određena također uvrštavanjem omjera signala i šuma u jednadžbu pravca te je dobivena koncentracija tada pomnožena s 10.

3.4.5. Robusnost

Robusnost metode ispitana je kao svojstvo stabilnosti derivata. Ispitivanje je provedeno na otopinama aminokiselina za analizu na način opisan pod točkom 3.2.7. uz koncentraciju aminokiselina približno $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Pripremljene otopine zatim su skladištene na sobnoj temperaturi ($+25 \text{ }^\circ\text{C}$) i u hladnjaku ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$), a ista otopina ispitivana je nakon 0 h, 2 h, 4 h, 6 h i 24 h skladištenja na sobnoj temperaturi, odnosno u hladnjaku.

3.4.6. Obrada podataka

Svi dobiveni podaci obrađeni su korištenjem programa Microsoft Excel 2010, a kromatogrami su obrađeni korištenjem programa LabSolutions LCsolution.

4. REZULTATI I RASPRAVA

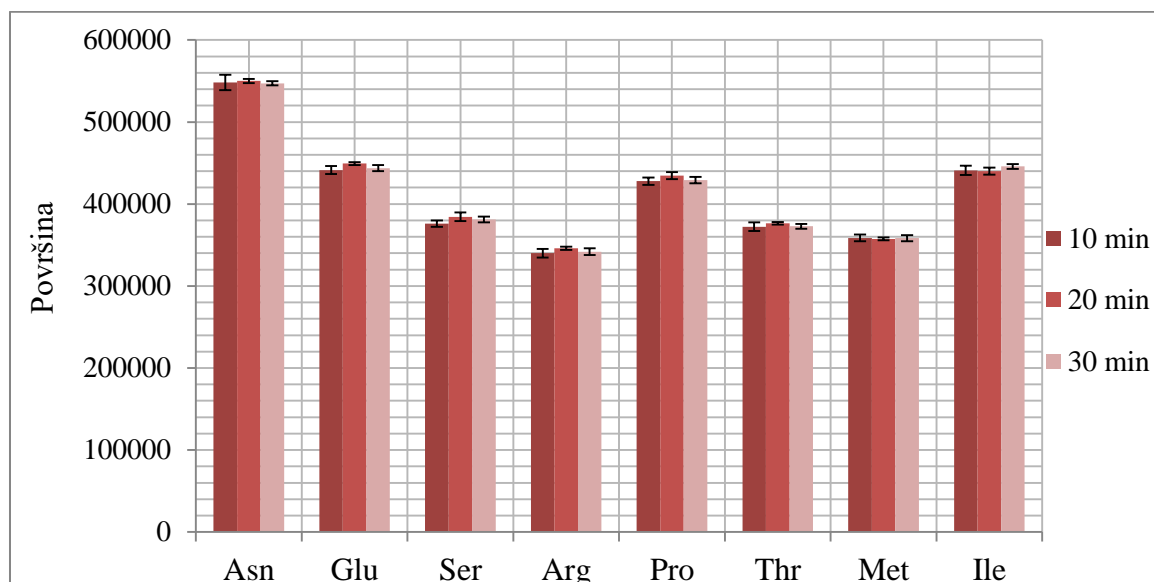
4.1. Odabir i optimizacija uvjeta derivatizacije

U svrhu provedbe optimalne derivatizacije aminokiselina uz FMOC kao derivatizacijski reagens bitno je definirati sljedeće parametre: pH vrijednost pri kojoj se odvija derivatizacija, vrijeme trajanja, otapalo za FMOC, koncentraciju FMOC-a te potrebu za uklanjanjem suviška FMOC-a. U ovom radu ispitana je stabilnost pripremljenog reagensa, vrijeme trajanja derivatizacije i korištenje ADAM-a kako bi se uklonio suvišak FMOC-a, a otapalo za FMOC, pH pufera i koncentracija FMOC-a su odabrani u skladu s literaturom (Horanni i Englehardt, 2013).

Ispitano je korištenje FMOC-a za derivatizaciju pripremljenog na dan analize, 1 dan i 6 dana prije analize. Izračunate su srednje vrijednosti površine pikova te je utvrđen raspon razlike u površinama pikova aminokiselina od 0,17 % do 2,37 % kada je FMOC pripremljen na dan analize, odnosno dan ranije te raspon razlika u površinama od 5,12 % do 37,40 % kada je korišten FMOC pripremljen 6 dana prije upotrebe. Iz navedenog može se utvrditi je da je FMOC potrebno prirediti na dan provođenja analize ili se eventualno može koristiti reagens pripremljen dan prije analize.

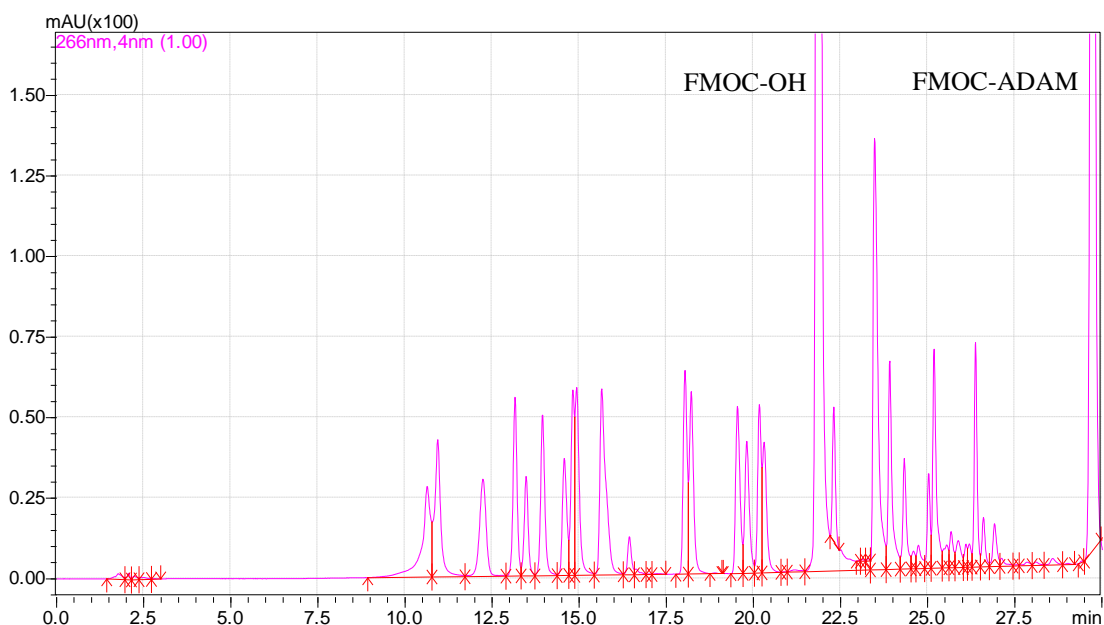
Vrijeme trajanja derivatizacije svakako je bitan čimbenik te se dosta razlikuje među objavljenim radovima. Fabiani i sur. naveli su vrijeme trajanje derivatizacije 5 minuta, Horanni i Engelhardt naveli su trajanje derivatizacije 10 minuta, a Jámbor i Molnár-Perl su naveli vrijeme derivatizacije od 20 minuta. Stoga su ispitana tri različita vremena trajanja derivatizacije. Slika 2 prikazuje srednje vrijednosti površina pikova dobivenih analizom otopina približne koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ nakon 10, 20, odnosno 30 minuta trajanja derivatizacije. Uspoređene su srednje vrijednosti površina pikova pojedinih aminokiselina dobivenih analizom nakon 10 i 30 minuta derivatizacije s površinama pikova pojedinih aminokiselina dobivenih analizom nakon 20 minuta derivatizacije. Izračunato je da se raspon razlika u površinama pikova nakon 10 minuta derivatizacije kreće između 0,19 % i 2,16 % u odnosu na površinu pikova dobivenih analizom nakon 20 minuta derivatizacije. Također, uspoređene su površine pikova nakon 30 minuta derivatizacije s površinama pikova nakon 20 minuta derivatizacije te se raspon razlika u površinama kreće između 0,51 % i 1,28. Iz

navedenoga se može zaključiti da je dovoljno vrijeme trajanja derivatizacije 10 minuta za sve ispitane aminokiseline. Jámbor i Mólnar-Perl navode 20 minuta kao optimalno vrijeme trajanja derivatizacije kako bi se derivatizacija kritičnih aminokiselina – Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr odvila kvantitativno (Jámbor i Molnár-Perl, 2009) stoga se u daljnjim istraživanjima namjerava koristiti vrijeme derivatizacije u trajanju od 20 minuta.



Slika 2. Grafički prikaz ispitivanja različitih vremena trajanja derivatizacije

Korištenje FMOC-a kao derivatizacijskog reagensa ima veliki nedostatak u vidu stvaranja interferirajućih pikova. Stoga su Jámbor i Molnár-Perl predložili korištenje ADAM-a kao reagensa za uklanjanje suvišak FMOC-a koji nije izreagirao s aminokiselinama, bez gubitka dijela nastalih derivata (Jámbor i Molnár-Perl, 2009). Pripremljena je otopina ADAM-a koncentracije 80 mmol L^{-1} te je ispitan dodatak $50 \mu\text{L}$ ADAM-a u zamjenu za $100 \mu\text{L}$ octene kiseline za zaustavljanje reakcije derivatizacije u kojoj je bila korištena otopina svih aminokiselina približne koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Na kromatogramu je dobiven pik FMOC-ADAM koji izlazi nakon pika FMOC-a što prikazuje slika 3. Površina pika FMOC-OH je 11,67% manja u slučaju kada je korišten ADAM. Budući da dodatak ADAM-a pri navedenim uvjetima derivatizacije ne utječe značajno na smanjenje površine pika FMOC-a, nije kasnije tijekom istraživanja dodavan u reakciju.



Slika 3. Kromatogram dobiven analizom smjese svih aminokiselina uz korištenje ADAM-a pri 266 nm

FMOC je otopljen u ACN-u radi toga što nema velikog broja nečistoća koje bi mogle interferirati s ciljanim analitima kao što je to slučaj kada se kao otapalo za FMOC koristi aceton (Jámbor i Molnár-Perl, 2009). U literaturi je također opisano korištenje ACN-a kao otapala za FMOC (Horanni i Englehardt, 2013; Jámbor i Molnár-Perl, 2009).

Koncentracija pripremljenog FMOC-a, 3 mmol L^{-1} , u skladu je s literaturom (Horanni i Englehardt, 2013). Molarni omjer FMOC/aminokiseline iznosio je 6,6/1 za otopinu aminokiselina približne koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Jámbor i Molnár-Perl kao optimalan omjer navode FMOC/aminokiseline = 5,5/1 za koncentraciju aminokiselina $5,4 \cdot 10^{-5} \text{ mmol L}^{-1}$. Stoga, može se zaključiti da bi nešto manja koncentracija FMOC-a mogla biti korištena za derivatizaciju otopine aminokiselina koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$.

pH pri kojem se odvija derivatizacija također ima važan utjecaj. U skladu s literaturom (Horanni i Englehardt, 2013) odabran je kalij-boratni pufer koncentracije $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ i pH 8,5. U literaturi je još opisano i korištenje kalij-boratnog pufera pH 8,5 (Hanyes i sur., 1991) i pH 10,0 (Fabiani i sur., 2002). Jámbor i Molnár-Perl proveli su ispitivanje utjecaja pH na derivatizaciju i utvrdili da je optimalan pH za reakciju derivatizacije pH 9 (Jámbor i Molnár-Perl, 2009).

4.2. Odabir i optimizacija kromatografskih uvjeta za određivanje aminokiselina

Aminokiseline su određivane primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza. Stacionarna faza korištena za određivanje bila je nepolarna, C₁₈ kolona, kao što je to do sada opisano u literaturi (Horanni, i Englehardt, 2013; Haynes i sur., 1991; Fabiani i sur., 2002, Jámbor i Molnár-Perl, 2009). Mobilne faze korištene za određivanje bile su natrij-acetatni pufer koncentracije 0,1 mol L⁻¹ i pH 5,8 te smjesa ACN-a i HPLC vode u omjeru 4 : 1. Horanni i Englehardt opisali su korištenje mobilnih faza upravo ovog sastava (Horanni i Englehardt, 2013). U drugim radovima kao jedna od mobilnih faza koristi se također acetatni pufer (Jámbor i Molnár-Perl, 2009; Fabiani i sur., 2002, Ma i sur., 2015), dok su Haynes i sur. opisali korištenje smjese amonijevog dihidrogenfosfata i metanola, pH 6,5. Kao druga mobilna faza najčešće se navodi korištenje ACN-a u smjesi s vodom (Haynes i sur, 1991), čistog ACN-a (Fabiani i sur., 1991) te ACN-a samog i u smjesi s natrijevim acetatom (Jámbor i Molnár-Perl, 2009; Ma i sur., 2015). Natrij-acetatni pufer pH 5,8 je odgovarajuć odabir mobilne faze obzirom na pK vrijednosti funkcionalnih skupina aminokiselina koje su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. pK vrijednosti funkcionalnih skupina aminokiselina (Stryer, 1991)

Aminokiselina	pK - COOH	pK - NH ₃	pK R-skupine
Asn	2,01	8,8	
Glu	2,19	9,67	4,25
Ser	2,21	9,15	13,60
Arg	2,17	9,04	12,48
Pro	1,99	10,96	
Thr	2,11	9,62	13,60
Met	2,28	9,2	
Ile	2,35	9,68	

Pri pH 5,8 i kisele i bazične funkcionalne skupine su ionizirane i time polarne te ne dolazi do mogućnosti njihovog zadržavanja na stacionarnoj fazi već se eluiraju zajedno s polarnom mobilnom fazom, smjesom ACN-a i HPLC vode. Gradijentnim eluiranjem pri uvjetima prikazanim u tablici 2 i protokom od 1 mL min⁻¹ kroz 30 minuta dobiveni su razdvojeni, uski

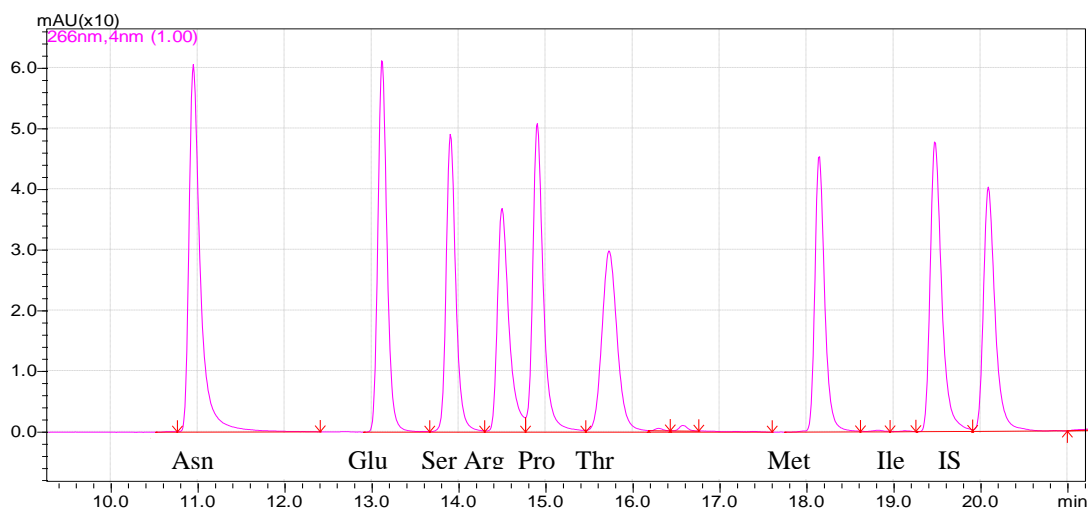
pikovi, što ukazuje na dobru selektivnost metode. Raspon temperatura kolone opisan u literaturi je širok, počevši od 25 °C (Fabiani i sur., 2002), preko 35 °C (Ma i sur., 2015; Haynes i sur., 1991), 40 °C (Horanni i Englehardt, 2013) do 50 °C (Jámbor i Molnár-Perl, 2009). Temperature kolone ispitivane u ovom radu su bile 40 °C i 50 °C pri čemu su dobiveni bolje razdvojeni i uži pikovi pri 50 °C. Za detekciju derivata aminokiselina korišten je PDA detektor pri valnoj duljini 266 nm. Detekcija s tom vrstom detektora opisana je i ranije u literaturi (Horanni i Engelhardt, 2013; Jámbor i Molnár-Perl, 2009; Fabiani i sur., 2002).

4.3. Validacija metode za određivanje aminokiselina

U svrhu validacije metode za određivanje aminokiselina Asn, Glu, Ser, Arg, Pro, Thr, Met, Ile ispitani su sljedeći parametri validacije: selektivnost, linearnost, preciznost – ponovljivost i intermedijarna preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost te su za navedene parametre prikazani rezultati.

4.3.1. Selektivnost

Selektivnost metode ispitivana je analizom otopine aminokiselina koncentracije približno 0,05 mmol L⁻¹ te je dobiveno pripadajućih osam razdvojenih pikova koji ukazuju na odgovarajuću selektivnost metode što prikazuje slika 4 te pik internog standarda. Retencijska vremena svih pojedinačnih aminokiselina prikazana su u tablici 5.

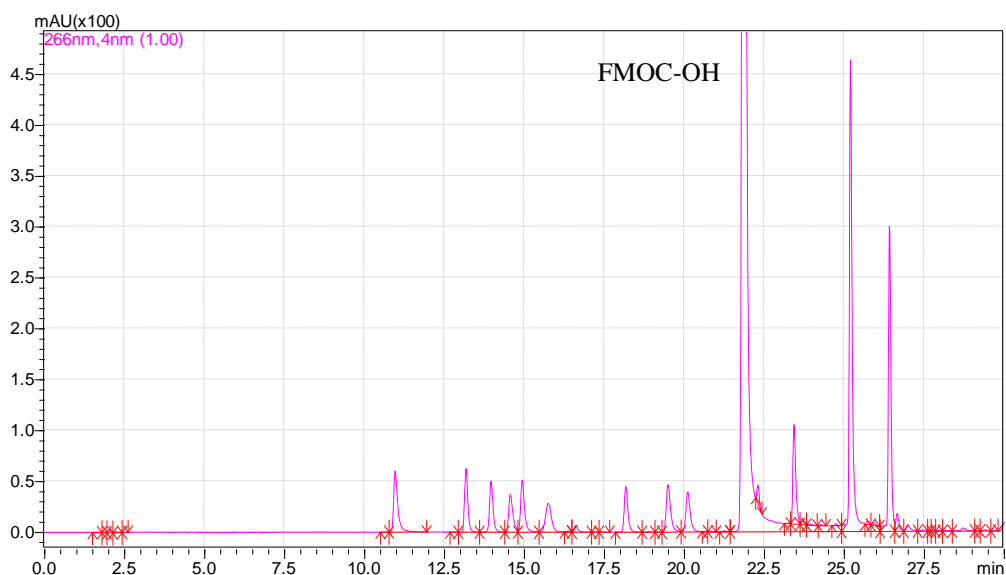


Slika 4. Kromatogram otopine aminokiselina koncentracije približno 0,05 mmol L⁻¹ pri 266 nm

Tablica 5. Retencijska vremena aminokiselina

Aminokiselina	Retencijsko vrijeme (min)
Asn	10,939
Glu	13,204
Ser	13,991
Arg	14,619
Pro	14,98
Thr	15,777
Met	18,201
Ile	19,497

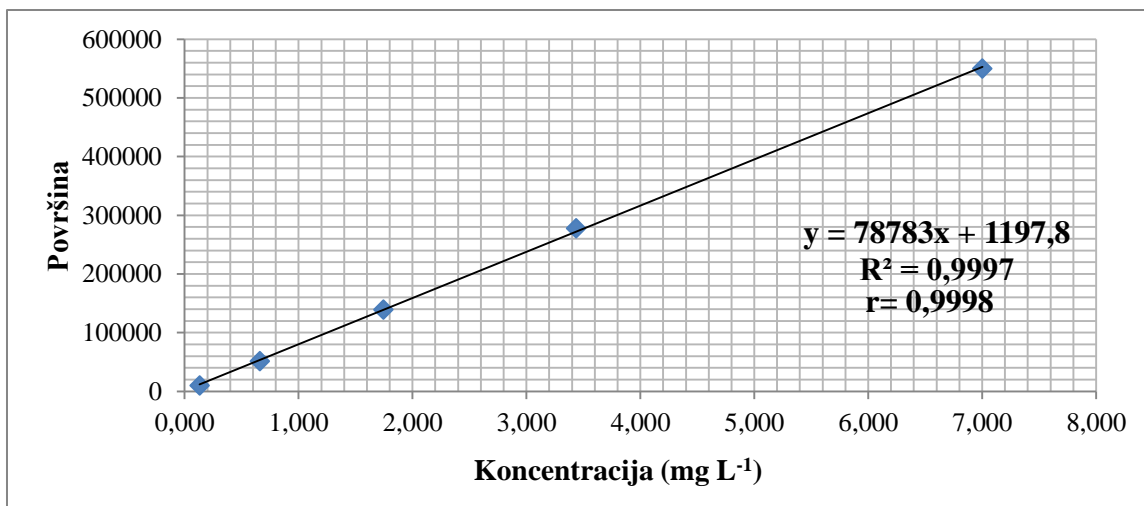
Slika 5 prikazuje pik FMOC-OH na kojoj je uočljivo da pik FMOC-OH izlazi nakon ciljanih aminokiselina i ne inteferira s njima.



Slika 5. Kromatogram otopine aminokiselina približne koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ pri 266 nm

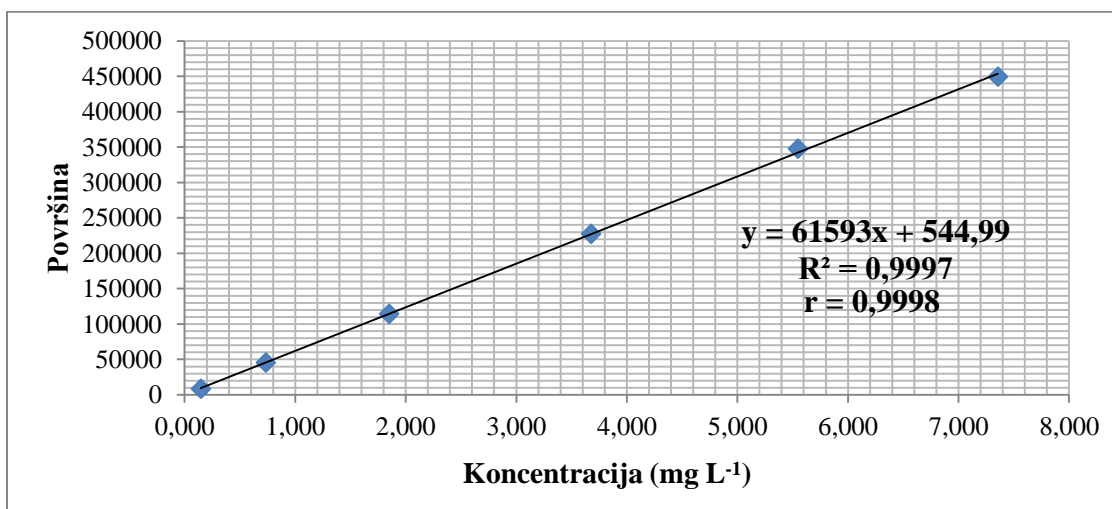
4.3.2. Linearnost

Linearnost metode određena je ispitivanjem otopina standarda aminokiselina na šest koncentracija za svaku pojedinačnu aminokiselinu. Svaka koncentracija aminokiselina ispitana je u tri mjerenja te je dobiven baždarni pravac na kojem je prikazana jednadžba pravca, koeficijent determinacije i koeficijent korelacije.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije asparagina o površini pika pri 266 nm

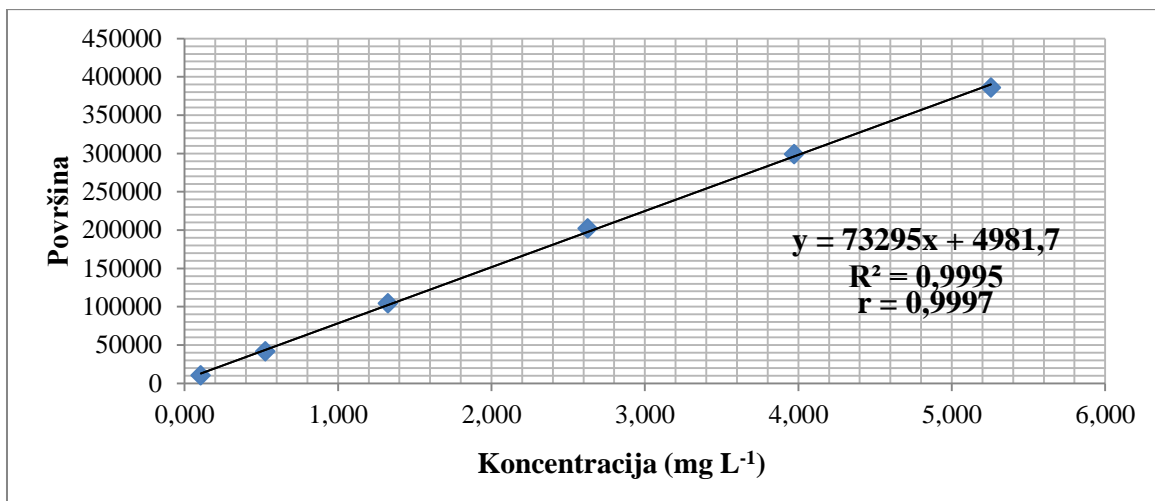
Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 78783x + 1197,8$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 78783$, odsječak na osi y, $b = 1197,8$, uz koeficijent determinacije 0,9997 i koeficijent korelacije 0,9998. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od 0,132 mg L⁻¹ do 7,002 mg L⁻¹.



Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije glutaminske kiseline o površini pika pri 266 nm

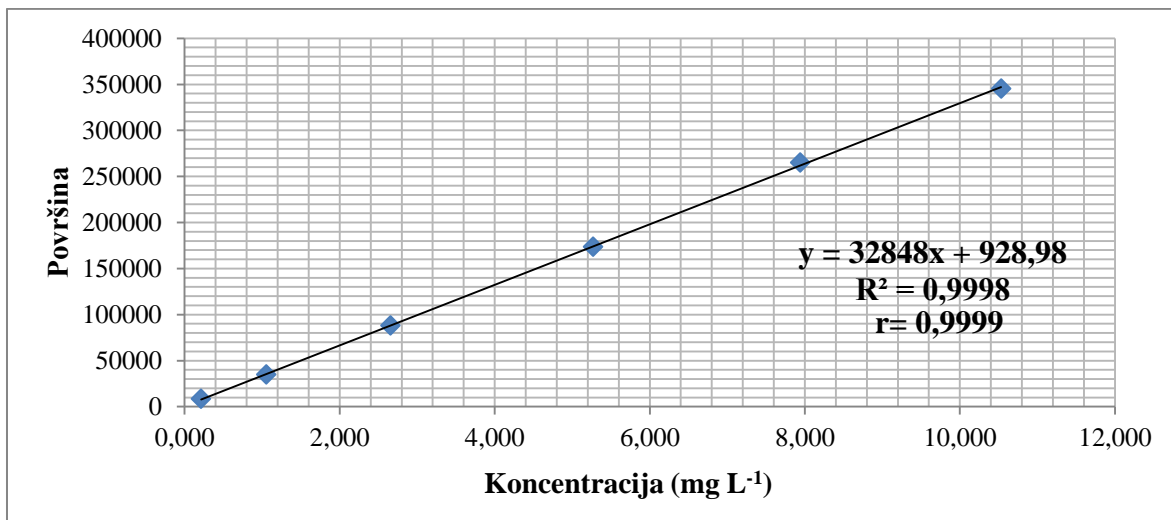
Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 61593x + 544,99$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 61593$, odsječak na osi y, $b = 544,99$, uz koeficijent determinacije 0,9997 i koeficijent korelacije 0,9998.

koeficijent korelacije 0,9998. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od 0,147 mg L⁻¹ do 7,357 mg L⁻¹.



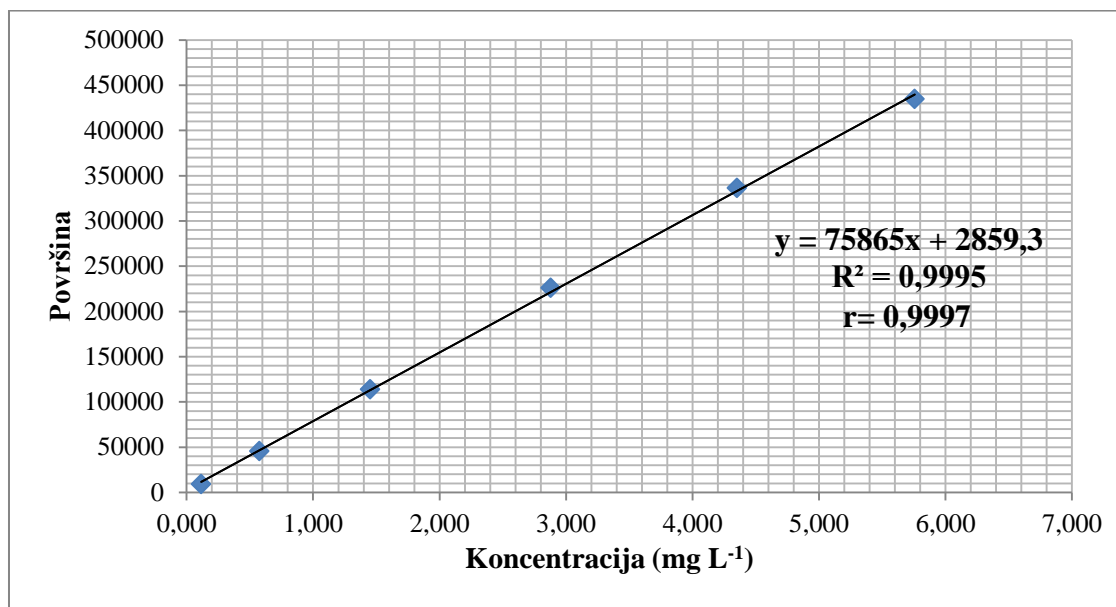
Slika 8. Grafički prikaz ovisnosti serina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 73295x + 4981,7$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 73295$, odsječak na osi y, $b = 4981,7$, uz koeficijent determinacije 0,9995 i koeficijent korelacije 0,9997. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od 0,105 mg L⁻¹ do 5,255 mg L⁻¹.



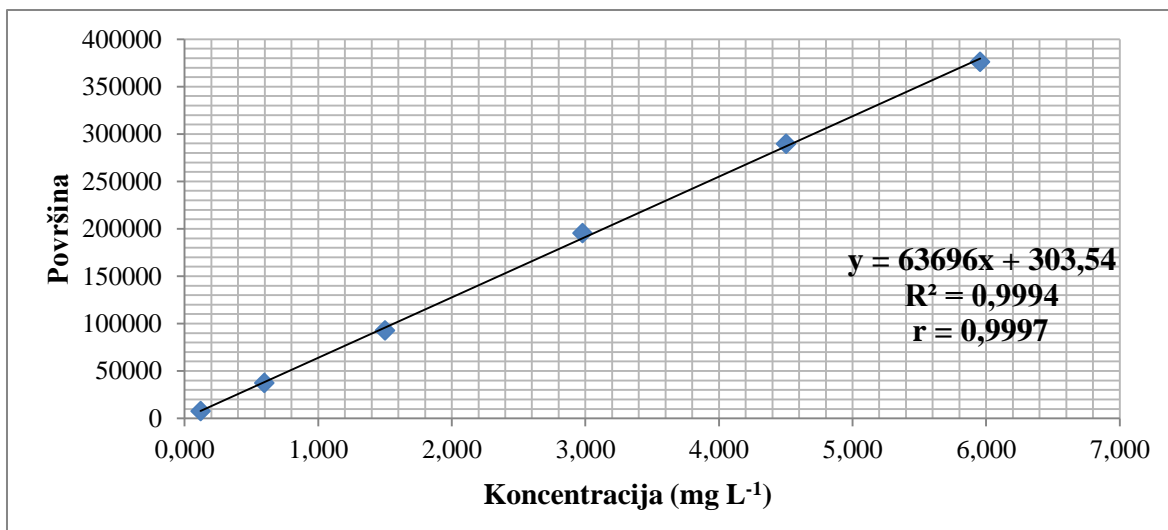
Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije arginina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednačba pravca $y = 32848x + 928,98$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 32848$, odsječak na osi y, $b = 928,98$, uz koeficijent determinacije 0,9998 i koeficijent korelacije 0,9999. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od $0,211 \text{ mg L}^{-1}$ do $10,533 \text{ mg L}^{-1}$.



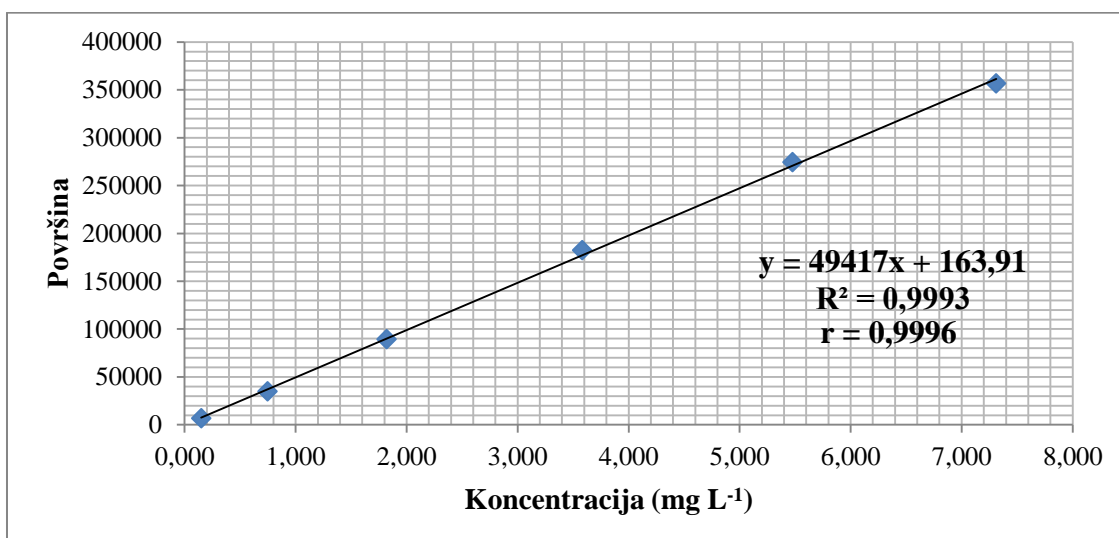
Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije prolina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednačba pravca $y = 75865x + 2859,3$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 75865$, odsječak na osi y, $b = 2859,3$, uz koeficijent determinacije 0,9995 i koeficijent korelacije 0,9997. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od $0,115 \text{ mg L}^{-1}$ do $7,311 \text{ mg L}^{-1}$.



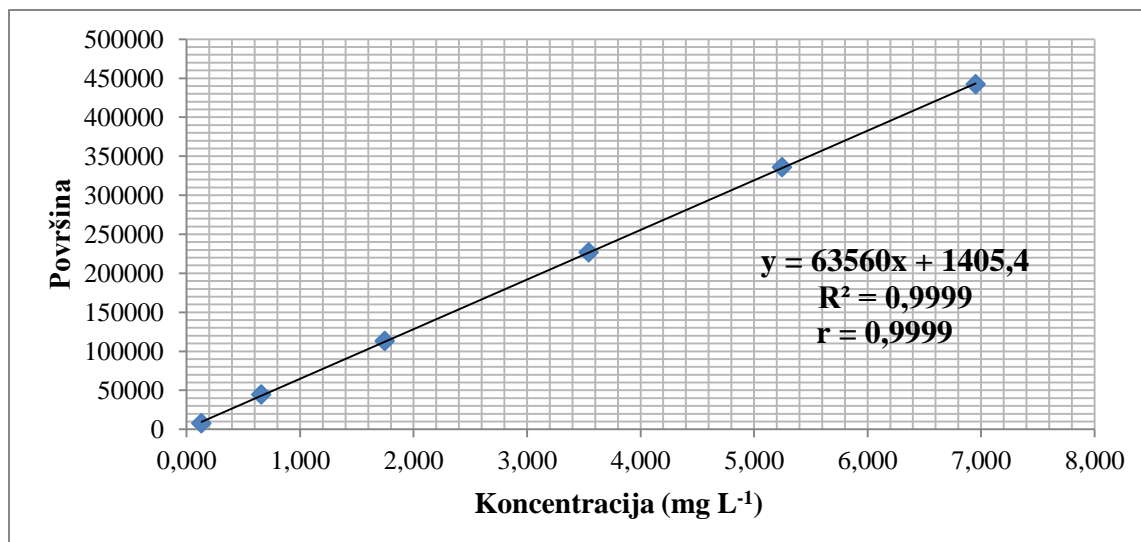
Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije treonina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 63696x + 303,54$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 63696$, odsječak na osi y, $b = 303,54$, uz koeficijent determinacije 0,9994 i koeficijent korelacije 0,9997. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od 0,119 mg L⁻¹ do 5,956 mg L⁻¹.



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije metionina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 49417x + 163,91$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 49417$, odsječak na osi y, $b = 163,91$, uz koeficijent determinacije 0,9993 i koeficijent korelacije 0,9996. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od 0,149 mg L⁻¹ do 7,311 mg L⁻¹.



Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije izoleucina o površini pika pri 266 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 63560x + 1405,4$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 63560$, odsječak na osi y, $b = 1405,4$, uz koeficijent determinacije 0,9999 i koeficijent korelacije 0,9999. Može se zaključiti da je linearnost zadovoljavajuća u rasponu koncentracija od $0,131 \text{ mg L}^{-1}$ do $6,952 \text{ mg L}^{-1}$.

4.3.3. Preciznost

Preciznost je određena na dvije razine – kao ponovljivost i intermedijarna preciznost. Ponovljivost metode ispitana je na šest koncentracijskih razina uz tri ponavljanja, a u rezultate su uključene one koncentracije koje su korištene za izradu baždarnih dijagrama. Intermedijarna preciznost ispitivana je u više dana te je napravljeno ukupno devet mjerenja za svaku od dvije koncentracije otopine $0,001 \text{ mmol L}^{-1}$ i $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ koje se nalaze na krajevima radnog područja kako bi se pokrilo cjelokupno radno područje metode.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja ponovljivosti

	Masena koncentracija (mg L⁻¹)	Srednja vrijednost površine	RSD (%)
Asn	0,132	9812	0,40
	0,661	51436	1,30
	1,744	139048	0,30
	3,435	277852	0,20
	5,245	469551	2,70
	7,002	549966	0,60
Srednja vrijednost			0,92
Glu	0,147	8590	1,60
	0,736	45402	1,90
	1,849	114444	0,50
	3,678	227170	1,40
	5,547	347749	0,30
	7,357	449527	0,50
Srednja vrijednost			1,03
Ser	0,105	10139	2,00
	0,525	41399	0,80
	1,324	104170	1,50
	2,627	201722	0,60
	3,972	298742	1,00
	5,255	385779	0,30
Srednja vrijednost			1,03
Arg	0,211	8250	2,00
	1,053	34825	0,80
	2,654	87771	1,50
	5,267	173425	0,60
	7,942	264861	1,00
	10,533	345020	1,20
Srednja vrijednost			1,18

Tablica 6. Rezultati ispitivanja ponovljivosti – nastavak

	Masena koncentracija (mg L ⁻¹)	Srednja vrijednost površine	RSD (%)
Pro	0,115	8888	1,10
	0,576	45364	3,20
	1,451	113618	2,20
	2,878	225963	1,20
	4,352	336408	0,10
	5,757	434677	1,20
Srednja vrijednost			1,50
Thr	0,119	7800	2,70
	0,596	37305	2,60
	1,500	92688	2,20
	2,978	195416	2,60
	4,503	289581	1,40
	5,956	376005	0,40
Srednja vrijednost			1,98
Met	0,149	6560	2,50
	0,746	34835	2,40
	1,820	89327	0,90
	3,581	182228	1,80
	5,476	274353	1,30
	7,311	356709	0,40
Srednja vrijednost			1,55
Ile	0,131	7548	2,20
	0,656	44498	0,60
	1,745	112989	1,30
	3,542	226758	0,10
	5,247	335981	1,10
	6,952	442086	0,50
Srednja vrijednost			0,97

Za ispitivanje ponovljivosti analizirane su površine pikova na pripadajućim kromatogramima. Dobivene srednje vrijednosti relativne standardne devijacije iznose za Asn 0,92 %, za Glu 1,03 %, za Ser 1,03 %, za Arg 1,18 %, za Pro 1,50 %, za Thr 1,98 %, za Met 1,55 % i za Ile

0,97 %. Usporedbom s kriterijima prihvatljivosti za ponovljivost i iskorištenje (AOAC, 2011), dobivene vrijednosti za preciznost pokazuju odgovarajuću preciznost pripreme. Jámbor i Molnár-Perl naveli su vrijednost relativne standardne devijacije $\leq 3,98$ % s prosječnom vrijednosti RSD od 1,01 %, a Fabiani i sur. raspon relativne standardne devijacije od 2,4 do 6,1 %.

Tablica 7. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti

Aminokiselina	Masena koncentracija (mg L ⁻¹)	Srednja vrijednost površine	RSD (%)
Asn	0,132	9646	1,71
	7,002	567903	3,15
Glu	0,147	8528	1,54
	7,357	459109	6,42
Ser	0,105	10001	4,58
	5,255	381077	5,33
Arg	0,211	8467	3,37
	10,533	338746	5,29
Pro	0,115	9003	4,43
	5,757	427970	5,20
Thr	0,149	8539	5,13
	7,311	382275	3,11
Met	0,119	6517	1,44
	5,956	356670	0,99
Ile	0,131	7213	5,93
	6,952	426605	3,31

Za ispitivanje intermedijarne preciznosti također su analizirane površine pikova na pripadajućim kromatogramima.

4.3.4. Granice detekcije i kvantifikacije

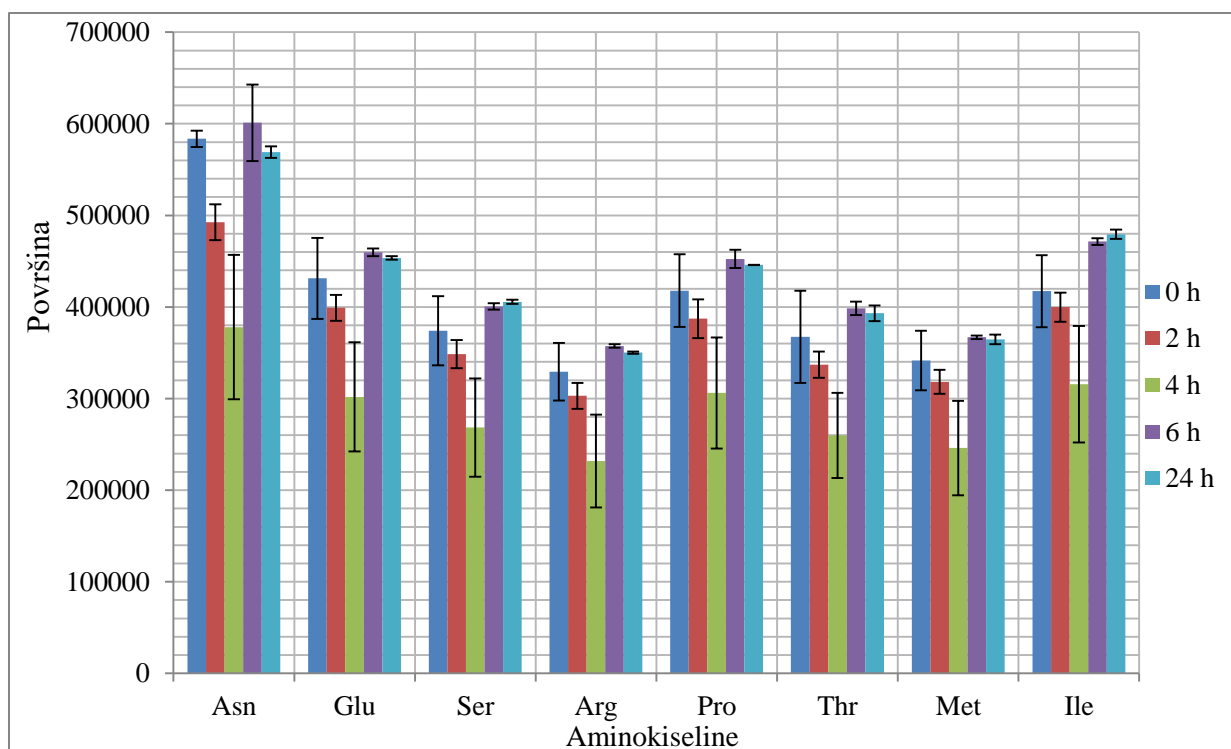
Tablica 8. Granice detekcije i granice kvantifikacije aminokiselina

Aminokiselina	Granica detekcije ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Granica kvantifikacije ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Asn	0,110	0,350
Glu	0,129	0,430
Ser	0,093	0,310
Arg	0,288	0,960
Pro	0,087	0,290
Thr	0,180	0,600
Met	0,204	0,680
Ile	0,090	0,300

Horanni i Engelhardt naveli su granicu detekcije od $0,057 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $0,534 \mu\text{g mL}^{-1}$, a granicu kvantifikacije od $0,235 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $1,849 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fabiani i sur. navode granicu detekcije od 4 do $6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dobivene granice detekcije prikazane u $\mu\text{g L}^{-1}$ više su u odnosu na vrijednosti prikazane u literaturi, ali su ispod donje granice baždarnih dijagrama iz čega se može zaključiti da su dobivene granice detekcije i kvantifikacije zadovoljavajuće.

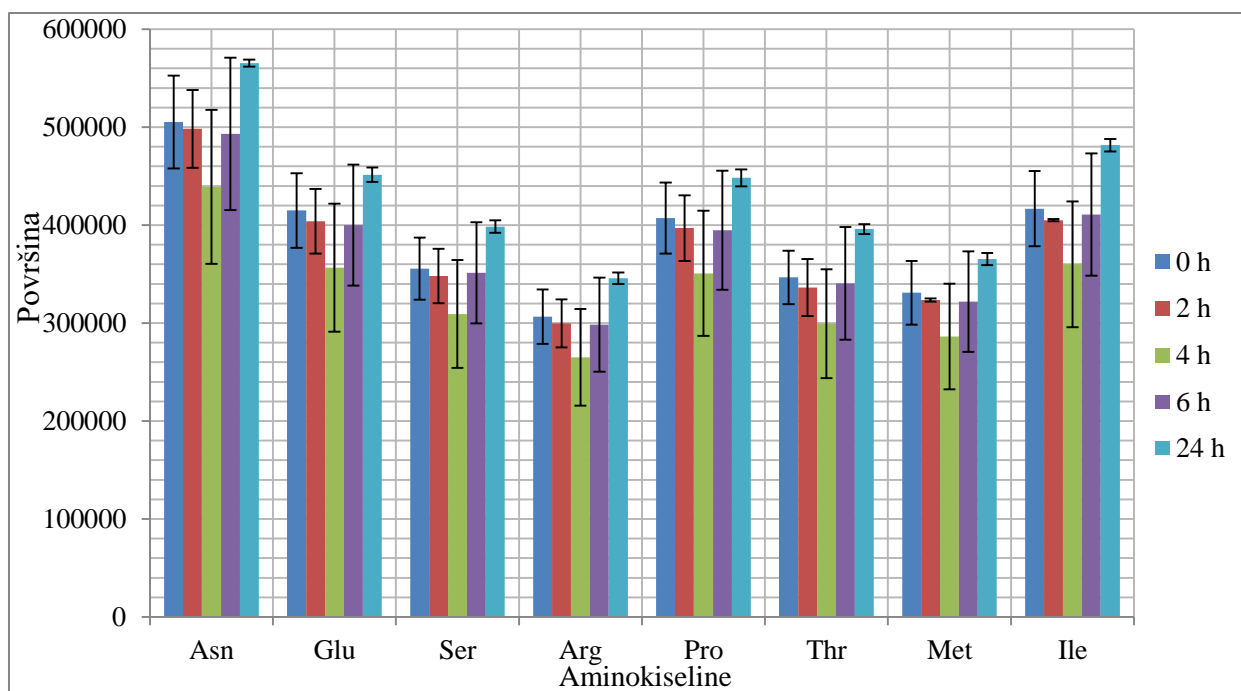
4.3.5. Robusnost

Ispitivanje robusnosti metode provedeno je na način da je ispitana stabilnost derivata aminokiselina. Ispitivanje stabilnosti derivata provedeno je na otopinama približne koncentracije pojedinačnih aminokiselina $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, uz trajanje derivatizacije 20 minuta. Pripremljene otopine zatim su skladištene na sobnoj temperaturi ($+25 \text{ }^\circ\text{C}$) i u hladnjaku ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) te analizirane nakon 0 h, 2 h, 4 h, 6 h i 24 h skladištenja. Slike 15 i 16 prikazuju srednju vrijednost površine pikova dobivenih analizom nakon određenog vremena skladištenja pri sobnoj temperaturi ($+25 \text{ }^\circ\text{C}$), odnosno temperaturi hladnjaka ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) i pripadajuće standardne devijacije.



Slika 14. Prikaz stabilnosti derivata nakon skladištenja na sobnoj temperaturi (+25 °C)

Uspoređivane su površine pikova svih pojedinačnih aminokiselina dobivenih analizom nakon 2 h, 4 h, 6 h i 24 h na sobnoj temperaturi (+25 °C) s površinama pikova svih pojedinačnih aminokiselina dobivenih analizom nakon 0 h. Razlike u površinama pikova nakon 2 h skladištenja u odnosu na površinu pikova nakon 0 h skladištenja kreću se u rasponu od 4,20 % do 15,61 %. Raspon razlika u površinama pikova nakon 4 h skladištenja je od 24,31 % do 35,22 %, nakon 6 h skladištenja raspon razlika u površinama je od 2,92 % do 11,49 %, a raspon razlika u površinama pikova nakon 24 h skladištenja je od 2,49 % do 12,95%. Iz navedenih podataka može se zaključiti da Fmoc derivati aminokiselina nisu stabilni pri sobnoj temperaturi. Haynes i sur. proveli su istraživanje stabilnosti derivata na sobnoj temperaturi (21 °C) tijekom 24 h i navode da su derivati stabilni unutar ispitivanog vremena, uz relativnu standardnu devijaciju od 0,8 % do 5 %.



Slika 15. Prikaz stabilnosti derivata nakon skladištenja na temperaturi hladnjaka (+4 °C)

Uspoređivane su površine pikova dobivenih analizom nakon 2 h, 4 h, 6 h i 24 h skladištenja na temperaturi hladnjaka (+4 °C) s površinama pikova svih pojedinačnih aminokiselina nakon 0 h skladištenja. Razlike u površinama pikova nakon 2 h skladištenja u odnosu na površinu pikova nakon 0 h skladištenja kreću se u rasponu od 1,38 % do 2,99 %. Raspon razlika u površinama pikova nakon 4 h skladištenja je od 13,04 % do 14,11 %, nakon 6 h skladištenja raspon razlika u površinama je od 1,20 % do 3,60 %, a raspon razlika u površinama pikova nakon 24 h skladištenja je od 8,09 % do 13,46 %. Iz navedenih podataka može se zaključiti da su derivati stabilni pri temperaturi hladnjaka (+4 °C) u vremenu od dva sata.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bilo je razviti, optimizirati i validirati metodu za određivanje Asn, Glu, Ser, Arg, Pro, Thr, Met i Ile. Na temelju provedenih ispitivanja različitih uvjeta derivatizacije i uvjeta kromatografske analize te na temelju ispitivanja validacijskih parametara razvijene metode može se zaključiti:

1. Definirano je optimalno vrijeme trajanja derivatizacije aminokiselina od 20 minuta.
2. Definirana je optimalna temperatura kolone od 50 °C te optimalni gradijent elucije.
3. Validacija metode je provedena pri definiranim optimalnim uvjetima. Ključni validacijski parametri bili su selektivnost, linearnost i radno područje, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost.
4. Selektivnost metode utvrđena je pregledom kromatograma te je na temelju zadovoljavajuće razdvojenosti pikova utvrđeno da je metoda selektivna.
5. Koeficijent korelacije baždarnog dijagrama je za svaku pojedinačnu aminokiselinu veći od 0,999 što ukazuje na odgovarajuću linearnost u definiranom radnom području.
6. Rezultati ispitivanja preciznosti pokazuju da dobivene vrijednosti relativne standardne devijacije za svaku aminokiselinu zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti.
7. Granice kvantifikacije su niže od donje granice baždarih dijagrama aminokiselina iz čega se može zaključiti da su zadovoljavajuće.
8. Ispitivanje robusnosti metode pokazalo je stabilnost derivata aminokiselina na temperaturi hladnjaka (+4 °C) u vremenu od 2 sata te da nisu stabilni pri sobnoj temperaturi.
9. Na temelju dobivenih rezultata ispitivanja validacijskih parametara može se zaključiti da je razvijena metoda primjenjiva za namijenjenu svrhu, odnosno određivanje aminokiselina.

6. LITERATURA

Anonymus (2009) Mrežna Hrvatska Enciklopedija, <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2463>>. Pristupljeno 22. lipnja 2017.

Anonymus (2014) <<https://aleksandarcupic47.files.wordpress.com/2014/05/aminoacids.jpg>>. Pristupljeno 22. lipnja 2017.

AOAC (2007) *How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification*. AOAC International – American Association of Analytical Chemists, Gaithersburg.

AOAC (2011) Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SPMR) Documents, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J. C. (1995) Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* **707**, 373-379.

Cabarello, B., Finglas, P., Toldra, F. (2003) *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2. izd., Academic Press, Maryland, str. 181-213.

Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Morales, M. L. (2010) Determination of amino acids in grape-derived products. A review. *Talanta* **81**, 1143-1152.

Casal, S., Beatriz Oliviera, M., Ferreira, M. (2000) Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N (O, S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives. *J. Chromatogr. A* **866**, 221-230.

Cazes, J. (2010) *Encyclopedia Of Chromatography*, 3. izd., Taylor & Francis Group, LLC, Florida, str. 67-78.

Cohen, S. A., De Antonis, K. M. (1994) Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate: analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *J. Chromatogr. A* **661**, 25-34.

Cohen, S. A., Michaud, D. P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of

hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **211**, 279-287.

Dai, Z., Wu., Z., Jia, S., Wu, G. (2014) Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. Review. *J. Chromatogr. B* **964**, 116-127.

De Barber, C. B., Prieto, J. A., Collar, C. (1989) Reversed - phase high performance liquid chromatography analysis of changes in free amino acids during wheat bread dough fermentation. *Cereal Chem.* **66**, 283-288.

del Campo, G., Zuriarrain, J., Zuriarrain, A., Berregi, I. (2016) Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by ¹H NMR. *Food Chem.* **196**, 1031-1039.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., Hewlins, M. J. E. (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10937–10942.

Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S. (1986) High - resolution reversed - phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids. *Anal. Chem.* **58**, 1638-1643.

Einarsson, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S. (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed - phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **282**, 609-618.

Eurachem (1998) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Eurachem, Olomuc.

Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G. P., Castellari, M., Galassi, S. (2002) High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate. *J. Chromatogr. Sci.* **1**, 14-18.

FDA (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. FDA-Food and Drug Administration, Silver Spring.

Fernandez-Tradiella, A. C. (1990) Quantitative analysis of methionine, cysteine, and lysine in feeds by reverse-phase liquid chromatography using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate: preliminary study. *Journal-Association of official analytical chemists* **73.6**, 935-939.

Fürst, P., Pollack, L., Graser, T. A., Godel, H., Stehle, P. (1990) Appraisal of four precolumn derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J. Chromatogr.* **499**, 557-569.

Godel, H., Graser, T., Földi, P., Pfaender, P., Fürst, P. (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **297**, 49-61.

Gustavsson, B., Betnér, I. (1990) Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenyl methylchloroformate and 1-aminoadamantane. *J. Chromatogr. A* **507**, 67-77.

Hayashi T., Tsuchiya, H., Naruse, H. (1983) Application to the determination of amino acids in plasma samples and dried blood on filter papers. *J. Chromatogr.* **274**, 318-324.

Haynes, P. A., Sheumack, D., Kibby, J., Redmond, J. W. (1991) Amino acid analysis using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **540**, 177-185.

Heinrikson, R. L., Meredith, S. C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**, 65-74.

Hermann, T. (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**, 155-172.

Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., Ferreira, V. (2002) Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 2891–2899.

Ho, P. C. (2005) Hydroxyproline Measurement by High Performance Liquid Chromatography: An Improved Method of Derivatization. U: Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography (Molnár-Perl, I., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 471-501.

Horanni, R., Engelhardt, U. H. (2013) Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products. *J. Food Compos. Anal.* **1**, 94-100.

Huber, L. (2011) *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies, 18–19.

Hušek, P., Sweeley C. C. (1991) Gas chromatographic separation of protein amino acids in four minutes. *J. Sep. Sci.* **14**, 751-753.

ICH (2005) Q2(R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH- The International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.

Isaaq, H. J., Chan, K. C. (1995) Separation and detection of amino acids and their enantiomers by capillary electrophoresis: a review. *Electrophoresis* **16**, 467-480.

ISO (1994) *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. ISO- International Organization for Standardization, Geneva.

ISO (2015) 9000:2015 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. ISO- International Organization for Standardization, Geneva.

IUPAC (2002) *Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis*, *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855. IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry, North Carolina.

Jambór, A., Molnár-Perl, I. (2009) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study. *J. Chromatogr. A* **1216**, 3064-3077.

Karlson, P. (1993) *Biokemija*. 8. izd. , Školska knjiga Zagreb, str 20-28.

Khan, A. S., Faiz, F. (2008) Amino acid analysis using ion exchange resins. *J. Nat. Sci. Math.* **48**, 1-17.

Kirschbaum, J., Luckas, B., Beinert, W. D. (1994) Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *J. Chromatogr. A* **661**, 193-199.

Kuban, P. Hauser, P. C. (2006) Application of gradient programs for the determination of underivatized amino acids and small peptides in reversed - phase high - performance liquid chromatography with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. A* **1128**, 97-104.

Ma, X., Zhao, D., Meng, L. (2015) Chromatographic method for determination of the free amino acid content of chamomile flowers. *Pharmacogn Mag.* **11**, 176-179.

Mangge, H., Zelzer, S., Prüller, F., Schnedl, W., Weghuber, D., Enko, D., Bergsten, P., Haybeck, J., Meinitzer, A. (2016) Branched-chain amino acids are associated with cardiometabolic risk profiles found already in lean, overweight and obese young. *J. Nutr. Biochem.* **32**, 123-127.

McAndless, J., Boulet, C., Heyl, M., McGuire, R. (1996) *Analytical Chemistry Associated with the Destruction of Chemical Weapons*. Springer Science + Business media, BV, Brno. Str. 189-191.

Miller, E. J., Narkates, A. J., Niemann, M. A. (1990a) Amino acid analysis of collagen hydrolysates by reverse-phase high-performance liquid chromatography of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *Anal. Biochem.* **190.1**, 92-97.

Miller, E. J., Narkates, A. J., Niemann, M. A. (1990b) Amino acid analysis of collagen hydrolysates by reverse-phase high-performance liquid chromatography of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *Anal. Biochem.* **190**, 92-97

Molnar-Perl, I. (2001) Derivatization and chromatographic behaviour of the o-phthalaldehyde amino acid derivatives obtained with various –SH-group-containing additives. *J. Chromatogr. A* **913**, 283-302.

Moore, S. Stein, W. (1951) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.* **192**, 663-681.

Moore, S., Spackman, D., Stein, W. (1958) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal. Chem.* **30**, 1185-1190.

Moore, S., Stein, W. (1948) Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **176**, 367-388.

Mustafa, A., Aman, P., Anderson, R., Kamal-Eldin, A. (2007) Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chem.* **105**, 317-324.

Näsholm, T., Sandberg, G., Ericsson, A. (1987) Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *J. Chromatogr. A* **396**, 225-236.

Novotny, M. V., Cobb, K. A., Jinping, L. (1990) Recent advances in capillary electrophoresis of protein, peptides and amino acids. *Electrophoresis* **11**, 735-749.

Or-Rashid, M. M., Onodera, R., Wadud, S., Mohammed, N. (2000) Convenient method of threonine, methionine and their related amino compounds by high-performance liquid chromatography and its application to rumen fluid. *J. Chromatogr. B* **741**, 279-287.

Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M. (2002) A Comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *J. Chromatogr.* **961**, 9-21

Pine, S.H. (1994) *Organska kemija*, 3. promijenjeno izdanje, Školska knjiga Zagreb, preveli na hrvatski jezik Ivo Bregovec i Vladimir Rapić, str. 812-815.

Roth, M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* **43**, 880-882.

Sarwar, G., Botting, H. G. (1993) Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *J. Chromatogr. B* **615**, 1-22.

Schilb, A. L., Fiegel, V., Knighton, D. (1991) Hydroxyproline measurement by high performance liquid chromatography: An improved method of derivatization. *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 557

Shively, J. E. (1986). Reverse-phase HPLC isolation and microsequence analysis. *Methods of protein microcharacterization: a practical handbook*, 41-87.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1999) *Osnove analitičke kemije*, 6. izd., 1. hrvatsko izdanje, Školska knjiga, Zagreb, str.645-647, str. 692-701.

Sousa F., Danielle Z., de Moure Leite, F., Barreto, C., Faria, B., Jedlicka, L., de Jesus Silva, E. (2017) Profiles of amino acids and biogenic amines in the plasma of Cri-du-Chat patients. *J. Pharmaceut. Biomed.* **140**, 137-145.

Stryer, L. (1991) *Biokemija*, 2. izd., Školska knjiga Zagreb, prevedeno na hrv jezik. Str. 11-32.

Verner, A., Craig, S., Mc Guire, W. (2006) Effects of taurine supplementation on growth and development in preterm of lowbirth weight infants, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD006072. DOI: 10.1002/14651858.CD006072.

Wu, G. (1993) Determination of proline by reversed - phase high performance liquid chromatography with automated pre-column *o*-phthaldialdehyde derivatization. *J. Chromatogr. A* **641**, 168-175.

Wu, G. (2013) *Amino acids Biochemistry and Nutrition*, Taylor & Francis, Florida.

Wu, G. (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* **37**, 1-17.