

Određivanje udjela slobodnih aminokiselina u listu raštike LC-MS/MS metodom

Grizelj, Diana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:626061>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Diana Grizelj

**ODREĐIVANJE UDJELA
SLOBODNIH AMINOKISELINA U
LISTU RAŠTIKE LC-MS/MS
METODOM**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za fenotipizaciju Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču pod komentorstvom dr. sc. Nikole Majora, v. znan. sur. te uz pomoć Tvrtka Karla Kovačevića, mag. ing. techn. aliment.

ZAHVALA

Veliko hvala dr. sc. Nikoli Majoru, v. znan. sur., na strpljenju, trudu, pomoći, brojnim savjetima, prenesenom stručnom znanju i pruženoj prilici izrade diplomskog rada na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču!

Veliko hvala prof. dr. sc. Mirjani Hruškar i izv. prof. dr. sc. Marini Krpan, na motivaciji i podršci!

Veliko hvala mojim Curama, koje su sada Žene, na svim godinama koje su bile uz mene u najboljem i najgorem!

Najveće hvala mojoj obitelji, ocu Željku, majci Terezi, sestrama Doris i Gabrieli te bratu Petru, koji su uvijek uz mene! VOLIM VAS NAJVIŠE NA SVITU!

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

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

ODREĐIVANJE UDJELA SLOBODNIH AMINOKISELINA U LISTU RAŠTIKE LC-MS/MS METODOM

Diana Grizelj, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212930

Sažetak: Aminokiseline su primarni biljni metaboliti, ključne su za organizam same po sebi, sudjeluju u izgradnji stanica te brojim fiziološkim procesima. Mogu se nalaziti u slobodnom obliku ili vezane. Cilj ovoga rada bio je odrediti udjele slobodnih aminokiselina u listu raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Identificirano je i kvantificirano ukupno 17 slobodnih aminokiselina; alanin, arginin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin i valin. Prolin je najzastupljenija slobodna aminokiselina u listu raštike s prosječnom koncentracijom koja se kretala od 2104 mg/kg suhe tvari do 3237 mg/kg suhe tvari. Cistein je aminokiselina s najnižom prosječnom koncentracijom od 0,116 mg/kg suhe tvari do 0,338 mg/kg suhe tvari.

Ključne riječi: *ESI-LC-MS/MS, ciljana analiza, slobodne aminokiseline, Brassica oleracea* L. var. *acephala*

Rad sadrži: 50 stranica, 22 slike, 10 tablica, 85 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

Komentor: dr. sc. Nikola Major, v. znan. sur., Institut za poljoprivredu i turizam

Pomoć pri izradi: Tvrtko Karlo Kovačević, mag. ing. techn. aliment., Institut za poljoprivredu i turizam

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirjana Hruškar (mentor)
3. dr. sc. Nikola Major, v. znan. sur. IPTPO (član)
4. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjenski član)

Datum obrane: 29. rujna 2023.

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

Graduate university study programme: Food Engineering

DETERMINATION OF FREE AMINO ACID CONTENT IN KALE LEAF BY LC-MS/MS METHOD

Diana Grizelj, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212930

Abstract: Amino acids are the primary herbal metabolites, which are essential to the organism itself, participate in cell construction and many physiological processes. Amino acids can be in free or bound form. The aim of this study was to determine the free amino acid content in the kale leaf (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS). A total of 17 free amino acids have been identified and quantified; alanine, arginine, asparaginic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serin, threonine, tyrosine and valine. Proline is the most abundant free amino acid in the kale leaf with an average concentration in range from 2104 mg/kg dry matter to 3237 mg/kg dry matter. Cysteine is an amino acid with a lowest average concentration in range from 0.116 mg/kg dry matter to 0.338 mg/kg dry matter.

Keywords: *ESI-LC-MS/MS, targeted analysis, free amino acids, Brassica oleracea* L. var. *acephala*

Thesis contains: 50 pages, 22 figures, 10 tables, 85 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Mirjana Hruškar, PhD, Full professor

Co-mentor: Nikola Major, Senior Research Associate, Institute for Agriculture and Tourism

Technical support and assistance: Tvrtko Karlo Kovačević, mag. ing. techn. aliment., Institute for Agriculture and Tourism

Reviewers:

1. Marina, Krpan, PhD, Associate professor (president)
2. Mirjana, Hruškar, PhD, Full professor (mentor)
3. Nikola, Major, PhD, Senior scientific associate, IPTPO (member)
4. Verica, Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 29th, 2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PORODICA <i>BRASSICACEAE</i>	2
2.2. RAŠTIKA (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>)	2
2.2.1. Nutritivna svojstva raštike	3
2.2.2. Biljni metaboliti	5
2.3. SUVREMENE METODE U ANALIZI AMINOKISELINA	7
2.3.1. Kromatografija.....	7
2.3.2. HPLC	7
2.3.3. Masena spektrometrija	9
2.3.4. Pristup određivanju aminokiselina.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorci.....	17
3.1.2. Kemikalije.....	17
3.1.3. Popis uređaja i opreme.....	18
3.1.4. Priprema ekstrakta uzorka za određivanje aminokiselina LC-MS/MS metodom ..	19
3.1.5. Priprema standardnih otopina aminokiselina.....	19
3.1.6. Priprema radnih standardnih otopina aminokiselina.....	19
3.1.7. Priprema matične otopine aminokiselina.....	20
3.1.8. Priprema baždarne otopine aminokiselina	20
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Optimizacija parametara LC-MS/MS metode	20
3.2.2. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju	21
3.2.3. Obrada podataka	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. DOBIVENE KONCENTRACIJE AMINOKISELINA U UZORCIMA	23
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Biljne vrste iz porodice kupusnjača poznate su u cijelome svijetu, ekonomski važne, genetski su vrlo raznolike, imaju veliku hranjivu i biološku vrijednost pa se tako od davnina koriste u tradicionalnoj medicini i prehrani. Kupusnjače su skromnih zahtjeva za toplinom, dobro podnose niske temperature pa su dostupne kao svježe povrće tokom cijele godine (Manchali i sur., 2012; Kantoci, 2006). Aminokiseline su primarni metaboliti, osim što izgrađuju stanice sudjeluju u brojnim fiziološkim procesima poput transporta tvari, sudjeluju u sintezi enzima, održavanju homeostaze te se ponašaju kao osmoliti (Rai, 2002). Mnoge analitičke metode, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kapilarne elektroforeze, upotrebljavane su za identifikaciju aminokiselina u uzorcima, međutim, napretkom znanosti i novim kolonama omogućena je analiza tekućinskom kromatografijom u sprezi s različitim detektorima koja je uvelike skratila vrijeme trajanja analize. Tako je najčešća metoda za identifikaciju i kvantifikaciju postala tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa (Song i sur., 2018). Cilj ovoga rada bio je odrediti udjele slobodnih aminokiselina u listu raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PORODICA *BRASSICACEAE*

Porodica *Brassicaceae*, poznata pod nazivom kupusnjače ili krstašice, složene je taksonomije i sistematike te obuhvaća oko 338 rodova i oko 3709 vrsta koje se tradicionalno tisućama godina uzgajaju u različitim kulturama diljem svijeta (Šamec i sur., 2019; Al-Shehbaz i sur., 2006). Najznačajniji rod ove porodice je *Brassica* koji zadnjih nekoliko desetljeća zaokuplja pažnju znanstvenika zbog brojnih epidemioloških istraživanja koja iznose dokaze kako prehrana bogata ovim povrćem može pomoći u održavanju zdravlja i borbi protiv kroničnih bolesti (Šamec i sur., 2019). Konzumacijom povrća roda *Brassica* može se značajno utjecati na bolesti poput različitih vrsta raka, povišenog krvnog tlaka i šećerne bolesti (Baenas i sur., 2017), a posjeduje antioksidativna, antimutagena i protuupalna svojstva te se tako ovo povrće posljednjih godina prepoznaje i kao funkcionalna hrana (Šamec i sur., 2019). Vrsta koja se najčešće uzgaja je *Brassica oleracea* (Al Shehbaz i sur., 2006), a dijeli se na sedam glavnih kultiviranih skupina koje se razlikuju prema morfologiji i razvojnom obliku: *B. oleracea* L. var. *capitata* (karakterizira ju formiranje glave tokom rasta – kupus), *B. oleracea* L. var. *botrytis* (cvjetača), *B. oleracea* L. var. *italica* (brokula), *B. oleracea* L. var. *gemmifera* (prokulica), *B. oleracea* L. var. *acephala* (ne formira glavu tokom rasta – raštika), *B. oleracea* L. var. *alboglabra* (kineska brokula) i *B. oleracea* L. var. *gongylodes* (korabica) (Rakow, 2004).

2.2. RAŠTIKA (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) jedna je od najstarijih vrsta krstašica čija upotreba datira od 2000 g. prije Krista. Izvorno potječe s istočnog Mediterana (Balkaya i Yanmaz, 2005) dok je prema nekim autorima autohtona vrsta priobalnog područja Dalmacije i Hercegovine (Sefo i sur., 2010). Proizvodnja raštike nema veliku komercijalnu važnost, ali se tradicionalno uzgaja kao povrtna kultura na malim proizvodnim površinama obiteljskih gospodarstava na području Dalmacije, Dalmatinske zagore, Istre i otoka sjemenom iz vlastite proizvodnje (Batelja i sur., 2009). Duga povijest uzgoja raštike diljem svijeta rezultirala je mnogobrojnim genotipovima koji pokazuju veliku genetsku varijabilnost. Prema Cartea i sur. (2003), intra-populacijska varijabilnost nastala je unakrsnim oprašivanjem zbog slabe izolacije biljaka koje se koriste za proizvodnju sjemena, dok je inter-populacijska varijabilnost posljedica odabira poljoprivrednika i prilagodba lokalnim ekološkim uvjetima. Upravo iz razloga prilagodbe na nepovoljne klimatske uvjete (povećani salinitet tla, suša,

visoke i niske temperature) te lakog i jeftinog uzgoja raštiki se povećala popularnost i konzumacija (Linić i sur.,2019; Pavlović i sur.,2019; Pavlović i sur., 2018). Međutim, okolišni uvjeti znatno utječu na akumulaciju biomase, nutritivni sastav i senzorske karakteristike raštike (Thavarajah i sur., 2016).

Raštika (slika 1) obično naraste od 45 cm do 90 cm u visinu te od 30 cm do 90 cm u širinu. Tekstura listova, koji ne tvore glavu, varira od fine do grube, ovisno o sorti. Boja lista kreće se od svjetlozelene do tamnozeleno uz dodatak crvenih i ljubičastih tonova. Uspijeva u dobro dreniranom, dosljedno vlažnom tlu visoke anorganske tvari te pH vrijednosti između 6,0 i 7,5 (Reda i sur., 2021).



Slika 1. *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (Anonymus 1, 2020)

2.2.1. Nutritivna svojstva raštike

Raštika se diljem svijeta koristi u tradicionalnoj medicini za prevenciju i liječenje različitih zdravstvenih poremećaja, uključujući želučane tegobe, visoku razinu kolesterola, hiperglikemiju, reumatizam i bolesti jetre (Kuerban i sur., 2017; Lemos i sur., 2011). Njezine zdravstvene koristi pripisuju se kombinaciji bioaktivnih fitokemikalija uključujući glukozinolate, karotenoide i fenolne spojeve (Šamec i Salopek-Sondi, 2019; Abellán i sur., 2019).

Raštika je nisko kalorično povrće i vrlo nutritivno bogato koje osigurava ≥ 10 % preporučene doze esencijalnih nutrijenata pri čemu se ističu značajne količine vitamina A, C, i K, a od mineralnih tvari se ističu kalij, kalcij, magnezij i fosfor (Pathirana i sur., 2017; Thavarajah i sur., 2016). U tablicama 1, 2 i 3 prikazana je usporedba kemijsko-nutritivnog sastava raštike s ostalim vrstama iz roda *Brassica*.

Tablica 1. Usporedba nutritivnih komponenti u nekoliko različitih vrsta kupusnjača (Šamec i sur., 2008)

Nutritivna komponenta	Raštika/ 100 g	Kelj/ 100 g	Brokula/ 100 g	Cvjetača/ 100 g	Kupus/ 100 g	Prokulica/ 100 g
Voda (g)	84,04	89,62	89,30	92,07	92,18	86,00
Energija (kcal)	49	32	34	25	25	43
Proteini (g)	4,28	3,02	2,82	1,92	1,28	3,38
Lipidi (g)	0,93	0,61	0,37	0,28	0,10	0,30
Ugljikohidrati (g)	8,75	5,42	6,64	4,97	5,80	8,95
Vlakna(g)	3,6	4,0	2,6	2,0	2,5	3,8
Šećeri (g)	2,26	0,46	1,70	1,91	3,20	2,20

Tablica 2. Usporedba udjela mineralnih tvari u nekoliko različitih kupusnjača (Šamec i sur., 2008)

Minerali	Raštika/ 100 g	Kelj/ 100 g	Brokula/ 100 g	Cvjetača/ 100 g	Kupus/ 100 g	Prokulica/ 100 g
Ca (mg)	150	232	47	22	40	42
Fe (mg)	1,47	0,47	0,73	0,42	0,47	1,40
Mg (mg)	47	27	21	15	12	23
P (mg)	92	25	66	44	26	69
K (mg)	491	213	316	299	170	389
Na (mg)	38	17	33	30	18	25
Zn (mg)	0,56	0,21	0,41	0,27	0,18	0,42

Tablica 3. Usporedba udjela vitamina u nekoliko različitih kupusnjača (Šamec i sur., 2008)

Vitamini	Raštika/ 100 g	Kelj/ 100 g	Brokula/ 100 g	Cvjetača/ 100 g	Kupus/ 100 g	Prokulica/ 100 g
Vitamin C (mg)	120	35,3	89,2	48,2	36,6	85
Tiamin (mg)	0,110	0,054	0,071	0,050	0,061	0,136
Riboflavin (mg)	0,130	0,130	0,117	0,060	0,040	0,090
Niacin (mg)	1,000	0,742	0,639	0,507	0,234	0,745
Vitamin B-6 (mg)	0,271	0,165	0,175	0,184	0,124	0,219
Folna kiselina (µg)	141	129	63	57	43	61
Vitamin A (µg)	500	251	31	0	5	38
Vitamin E (mg)	1,54	2,26	0,780	0,08	0,15	0,88
Vitamin K (µg)	704,8	437,1	101,6	15,5	76,0	177,0

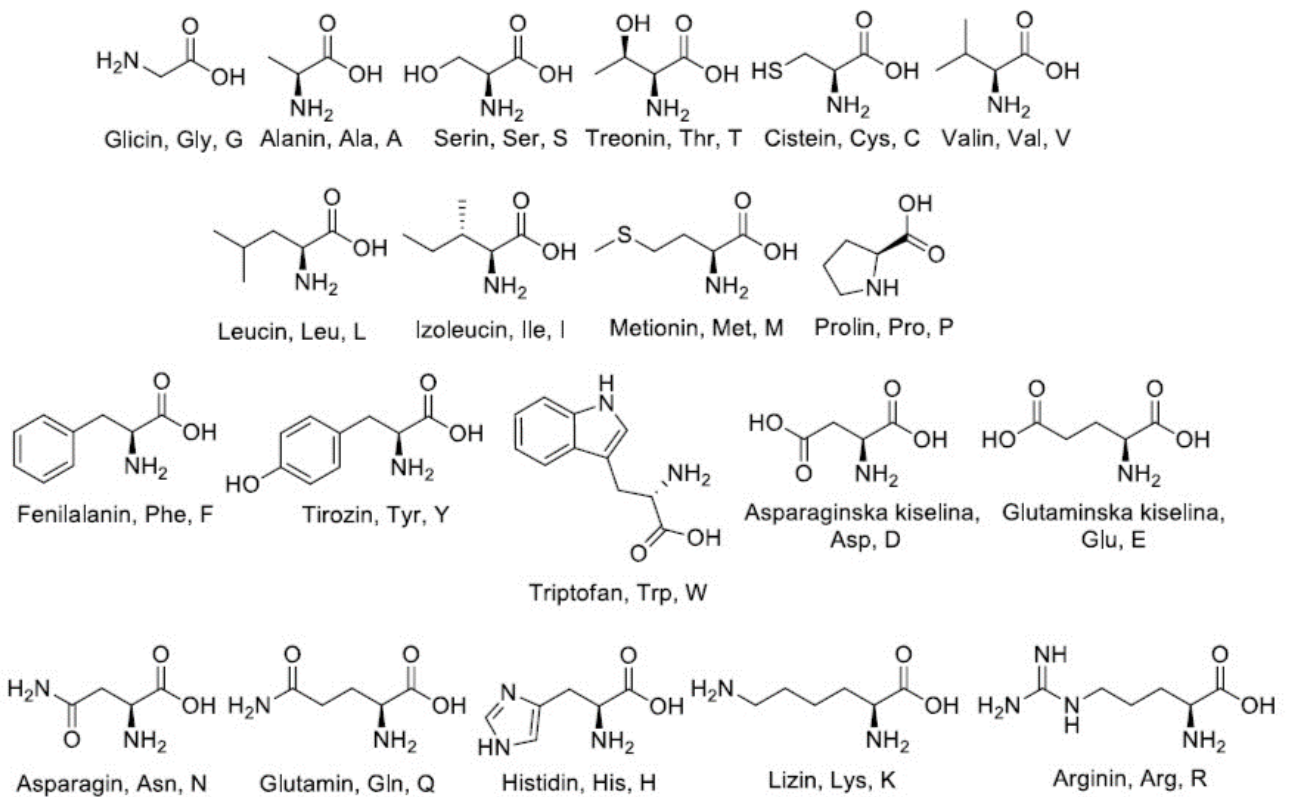
2.2.2. Biljni metaboliti

Metabolizam biljaka može se definirati kao isprepletena mreža fizikalnih i kemijskih promjena te se dijeli na primarni i sekundarni. Primarni metabolizam obuhvaća reakcije i puteve koji su nužni za preživljavanje to jest odgovorni su za osnovne funkcije biljnog organizma, dok sekundarni metabolizam ispunjava veliki broj funkcija potrebnih za rast i razvoj biljke uključujući interakciju bilja s okolišem. Mnogi produkti primarnog metabolizma koji proizlaze iz puta šikimata, glikolize, ciklusa limunske kiseline, puta pentoza-fosfata ili aminokiselina služe kao prekursori za sintezu tisuća sekundarnih metabolita (Pott i sur., 2019).

2.2.2.1. Aminokiseline

Aminokiseline su primarni metaboliti, ključne za organizam same po sebi. Neke funkcioniraju kao signalne molekule poput neurotransmitera, dok neke služe kao prekursori za ostale biomolekule poput hormona, nukleinskih kiselina, lipida, proteina, itd. Građene su od središnjeg α -ugljikovog atoma povezanog s amino-skupinom, karboksilnom skupinom, vodikovim atomom i bočnim ogrankom. Bočni ogranak (R) je skupina specifična za svaku aminokiselinu pa su i svojstva aminokiselina različita. Bočni ogranci se razlikuju po obliku,

naboju, tendenciji stvaranja vodikovih veza te imaju različita hidrofobna svojstva i različitu reaktivnost (Tymoczko i sur. 2013).



Slika 2. Strukturne formule 20 aminokiselina zajedno s troslovnim i jednoslovnim kraticama (prema Tymoczko i sur. 2013)

Esencijalne aminokiseline prikazane na slici 2 – leucin, izoleucin, metionin, fenilalanin, triptofan, arginin, histidin, valin, treonin i lizin sintetiziraju samo biljke te ih je potrebno unositi u organizam putem hrane. Neesencijalne aminokiseline, također prikazane na slici 2 koje se sintetiziraju u ljudskom organizmu su: alanin, asparagin, cistein, glutamin, asparaginska kiselina, glicin, prolin, serin i tirozin (Kumar i sur., 2017).

Biljne stanice sadrže manju količinu proteina u usporedbi sa životinjskim stanicama uglavnom zbog visokih količina ugljikohidrata (celuloze i ostalih) koji čine veći dio strukture biljke. Međutim, uloga aminokiselina ne može se zanemariti. Osim što izgrađuju proteine, uključene su u brojne fiziološke procese: rast i razvoj biljaka, unutarstaničnu kontrolu pH vrijednosti, stvaranje metaboličke energije i redoks snage te otpornost na abiotički i biotički stres (Fagard i sur., 2014; Galili i sur., 2014; Häusler i sur., 2014; Moe, 2013; Pratelli i Pilot, 2014; Watanabe i sur., 2013; Zeier, 2013). Uključene su u transport, skladištenje i

metabolizam ugljikohidrata, proteina, vitamina, vode i masti. Različiti poremećaji poput šećerne bolesti, nesаницe, pretilosti i artritisa su uzorkovani metaboličkim poremećajima, a točan sastav aminokiselina bi mogao popraviti metaboličke defekte (Park, 2016). Tijekom životnog ciklusa, kako se biljka mijenja, mijenjaju se katabolički putevi aminokiselina (Hildebrandt i sur., 2015). Okolišni uvjeti na Zemlji su promjenjivi što često biljku dovodi u stanje stresa. Kad se nađu u takvim uvjetima poput viška ili manjka vode, ekstremnih temperatura, prisutnosti iona toksičnih metala i izloženosti UV zračenju, biljke počinju akumulirati metabolite pa tako i aminokiseline (Hayat i sur., 2012). Jedan od stresnih odgovora je stvaranje reaktivnih kisikovih radikala ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 , itd.) koji uzrokuju značajno oštećenje peroksidacijom lipidnih komponenti membrana i direktnom interakcijom s različitim makromolekulama (Hayat i sur. 2012). Prema Teixeira i sur. (2017), aminokiseline sudjeluju u redukciji slobodnih radikala što ima učinak smanjenja stresa.

2.3. SUVREMENE METODE U ANALIZI AMINOKISELINA

2.3.1. Kromatografija

Kromatografija je od tridesetih godina prošlog stoljeća rutinska laboratorijska metoda (Poole, 2003), a do današnjeg dana je doživjela pravi procvat. Obuhvaća sve analitičke metode pri kojoj se sastojci uzorka razdvajaju na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza, pri čemu je jedna od njih stacionarna, a druga mobilna. Mobilna, odnosno pokretna faza nosi komponente uzorka kroz nepokretnu, stacionarnu fazu te dolazi do razlike u brzini kretanja komponenti zbog različitih interakcija koje komponente ostvaruju sa stacionarnom i mobilnom fazom (Coskun, 2016). Postoje različiti kriteriji podjele kromatografskih tehnika, od kojih su neke opisane u radu Coskun (2016) dok će u sljedećem poglavlju biti opisana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*).

2.3.2. HPLC

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography, LC*), vrsta kromatografije kod koje se mobilna faza nalazi u tekućem agregatnom stanju, najčešća je kromatografska tehnika koja se koristi za odvajanje otopljenih tvari (Skoog i sur., 2016; Cindrić i sur., 2009).

HPLC je napredni tip kolonske LC koji se koristi za odvajanje, određivanje, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva, ali i za preparativne svrhe (Rode i Rao, 2019; Poole, 2003). Za razliku od LC gdje uzorak prolazi silom gravitacije, kod HPLC tehnike uzorak prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom (do 400 bara) te se tako ova tehnika naziva i tekućinska kromatografija

visokog tlaka. Kako bi se uopće mogao postići tako visok tlak u HPLC sustavu, potrebna je složenija oprema u odnosu na običnu LC pa se tako HPLC sastoji od: spremnika mobilne faze, pumpe, injektora uzorka, kolone, detektora i sustava za obradu podataka (Thammana, 2016).

Mobilna faza (otapalo) smjesa je polarnih i nepolarnih tekućih sastojaka koji se nalaze u staklenom spremniku. Ovisno o prirodi uzorka sastav mobilne faze se mijenja, ali uvijek mora biti visoke čistoće, bez prisustva otopljenih plinova ili suspendiranih čestica (Kovačević, 2019; Thammana, 2016). Pumpa usisava mobilnu fazu, stvara tlak nad njom i tako ju pokreće kroz kolonu. Radni tlak koji pumpa stvara ovisi o dimenzijama kolone, veličini čestica analita te protoku i sastavu mobilne faze (Thammana, 2016).

Injektor uzorka služi za unos uzorka u tok struje mobilne faze. Sastoji se od ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*) koji je termostatiran, injekcijske igle i graduirane injekcije te kapilare određenog volumena (Cindrić i sur., 2009).

Kolona je najvažniji dio HPLC sustava. Kućište je najčešće od nehrđajućeg čelika, duljine od 50 mm do 3000 mm i unutarnjeg promjera od 2 mm do 5 mm. Ispunjena je stacionarnom fazom veličine čestica od 3 μm do 10 μm (Thammana, 2016). Kolona, kao i injektor uzorka, mora biti termostatirana jer temperatura ima važnu ulogu u procesu razdvajanja. Naime, ona utječe na veze koje se javljaju između uzorka i stacionarne faze te se stoga održava konstantnom tijekom cijele analize (Kovačević, 2019).

Detektor, smješten nakon kolone na kojoj su se razdvojile komponente smjese, bilježi analite redom kako eluiraju (Thammana, 2016). Postoje različite izvedbe detektora poput ultraljubičastog spektrofotometra, detektora s nizom fotosenzitivnih dioda, fluorescencijskog detektora, elektrokemijskog detektora, detektora indeksa loma, detektora raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku i masenog detektora te su svi opisani u radu Skoog i sur. (2016). Svi su specifični i međusobno se razlikuju u načinu rada, ali svaki od njih daje signal koji je proporcionalan određenom svojstvu komponente (Kovačević, 2019; Cindrić, 2009).

Ovisno o sastavu mobilne i stacionarne faze razlikujemo:

- HPLC normalnih faza – razdvajanje se vrši na temelju razlike u polarnosti. Sadrži polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu. Polarni analit stvara interakciju s polarnom stacionarnom fazom. Jakost adsorpcije se povećava s polarnošću analita. Što je jača interakcija, to je duže retencijsko vrijeme.

- HPLC obrnutih faza – djeluje na principu hidrofobnih interakcija. Sadrži nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Što je veća kontaktna površina nepolarnom analitu, to se on jače veže na stacionarnu fazu, duže se zadržava na njoj pa je i retencijsko vrijeme duže (Malviya i sur. 2010). Popularnost ove faze leži u sposobnosti razlikovanja jako sličnih spojeva, selektivnosti, preciznosti i osjetljivosti (Kovačević, 2019; Kazakevich i LoBrutto, 2007).

Eluiranje je ispiranje uzorka s kolone te može biti izokratno ili gradijentno. Izokratno znači da je sastav mobilne faze stalan, dok gradijentno znači da se sastav mobilne faze mijenja tijekom ispiranja i to najčešće tako da se postepeno mijenja udio jednog sastojka mobilne faze (Skoog i sur., 2016).

Neki od nedostataka HPLC tehnike su: velika potrošnja organskih otapala koja su potrebna za analize, zagađenje okoliša, ne postoji univerzalni detektor za sve analite kao ni za sve vrste analiza i bez obzira na detektor, osjetljivost za neke spojeve je vrlo niska. Sofisticirana je i složena tehnika koja zahtjeva stručnost i educiranost osoba, ali čak i uz takve analitičare moguće je dobiti lažne rezultate ukoliko dođe do npr. ireverzibilne adsorpcije analita ili pak koagulacije analita koju je teško uočiti uz primjenu nekih detektora. Međutim, uz sve ove i druge nedostatke, HPLC ima niz prednosti poput ponovljivosti, točnosti, automatiziranosti, brzine, visoke razlučivosti, zbog čega je postala nezaobilazna tehnika u analitici i brojim drugim granama. Danas se HPLC tehnika povezuje u mnoge vezane sustave kako bi se nizom drugih načina dokazali i odredili razdvojeni analiti smjese, pa tako postoje vezani sustav tekućinske kromatografije i magnetske rezonancije (LC-NMR), infracrvene spektroskopije (LC-IR) ili masene spektrometrije (LC-MS) (Sertić, 2013).

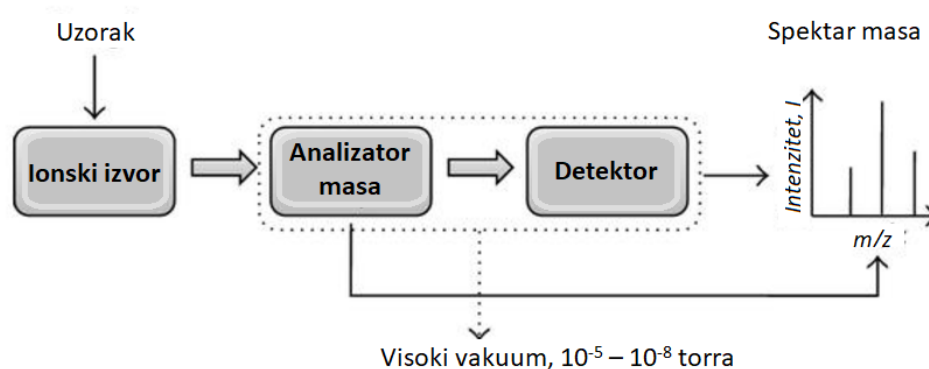
2.3.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry, MS*) široko se primjenjuje pri određivanju strukture organskih, anorganskih, bioloških molekula, elementarnog sastava tvari te pri kvalitativnom i kvantitativnom određivanju sastava smjesa. Bazira se na formiranju pozitivno ili negativno nabijenih iona koji se razdvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja (m/z) (El-Aneed i sur., 2009).

Karakteristike masene spektrometrije – osjetljivost, granice detekcije, brzina i raznolikost primjene, podigle su je na zavidnu poziciju među mnogim tehnikama. U analitičkoj kemiji, najnovije primjene su uglavnom usmjerene ka biokemijskoj problematici poput proteoma, metaboloma, lijekova, ali se primjenjuje i u kontroli hrane, kontroli zagađenja, forenzičkoj

znanosti, kontroli procesa, atomskoj fizici, anorganskoj kemijskoj analizi, ionsko-molekularnim reakcijama ili pak određivanju termodinamičkih parametara (de Hoffmann i Stroobant, 2007). Primjena MS se dramatično promijenila nakon 1990. godine kao rezultat razvoja novih ionizacijskih metoda: ionizacije elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization, ESI*) i matriksom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI*) (Salzano i Crescenzi, 2005) koje su omogućile proizvodnju iona iz nehlapljivih i termolabilnih molekula (Skoog i sur., 2016).

Spektrometar masa je uređaj koji se sastoji od 3 glavna dijela: ionskog izvora, analizatora masa i detektora (slika 3).



Slika 3. Osnovne komponente spektrometra masa (prema Banerjee i Mazumdar, 2012)

Prvi korak u analizi je uvođenje molekula analita u ionski izvor, gdje se ioniziraju nekom od ionizacijskih metoda i dobivaju pozitivne ili negativne naboje. Zatim nastali ioni dolaze do analizatora masa gdje se odjeljuju na temelju omjera mase i naboja, detektiraju se na detektoru i prevode u mjerljivi signal koji grafički prikazujemo kao spektar masa (Banerjee i Mazumdar, 2012). Svi maseni spektrometri moraju raditi pod visokim vakuumom kako bi ioni mogli doći do detektora bez sudara s ostalim molekulama što bi inače izazvalo odstupanja od putanje i gubitak naboja (Skoog i sur., 2013; de Hoffmann i Stroobant, 2007).

2.3.3.1. Ionski izvori

Ionizacija analita se može provoditi različitim metodama, a koja će se primijeniti ovisi o energiji koja se prenosi u samom procesu te o fizikalno-kemijskim karakteristikama samog analita (de Hoffmann i Stroobant, 2007). Ovisno o stupnju fragmentacije, to jest količini unutarnje energije koja se predaje analitu, sve metode ionizacije se dijele u dvije osnovne skupine: tzv. blage ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) u kojima je energija minimalna

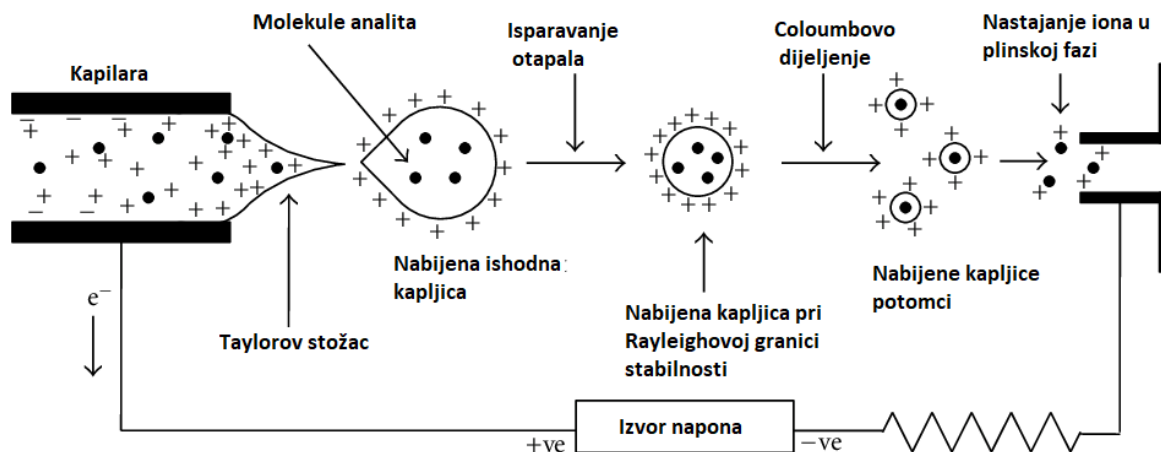
i čvrste ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*) u kojima se koristi veća energija (Niessen, 2006). Veća količina energije uzrokuje jaču fragmentaciju molekula i obrnuto (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

U radu de Hoffman i Stroobant (2007) opisana je ionizacija elektronima, kemijska ionizacija, MALDI, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku, ionizacija bombardiranjem brzim atomima, ionizacija termoraspršenjem i druge, dok će u ovom radu detaljnije biti opisana ESI.

ESI je jedna od najzastupljenijih „blagih“ tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS budući da omogućava direktno prevođenje iona iz otopine u ione u plinskoj fazi pri atmosferskom tlaku. Kompatibilna je sa svim analizatorima i prikladna je za analizu termički nestabilnih ili slabo hlapivih spojeva (Kovačević, 2019; El-Aneed i sur., 2009; Horvatić i Cindrić, 2008). ESI je tehnika osjetljiva na kontaminaciju uzorka solima, kaotropima i detergentima, koji mogu tvoriti klastere, adukte s molekulama analita ili jednostavno ometaju nastajanje stabilnog spreja te se iz navedenih razloga uzorci prije razdvajaju LC obrnutih faza (Tamvakopoulos, 2007; Horvatić i Cindrić, 2009).

Ionizacija može biti pozitivna i negativna, ovisno o primijenjenom naponu, vrsti analize te vrsti i kemijskoj strukturi analita. Pogodna je metoda za analizu biomakromolekula s velikom molekulskom masom (150000 Da), no moguće je analizirati i vrlo male molekule (Sertić, 2013).

Proces elektroraspršenja, prikazan na slici 4, odvija se u struji dušika i na temperaturi iznad 100 °C, tako da se otopina s analitom uvodi kroz metalnu kapilaru koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2 – 5 kV). Na vrhu kapilare se formira maglica od visoko nabijenih kapljica koje kolizijska ćelija privlači dajući im dodatno ubrzanje. Pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala otapalo otparava, kapljice se smanjuju te dolazi do povećanja površinskog naboja. Sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i konačno se kapljice rasprsnu. Ioni analita prelaze u plinovitu fazu te ulaze u analizator (Ho i sur., 2003; Willoughby i sur., 1997).



Slika 4. Mehanizam ionizacije elektroraspršenjem (prema Banerjee i Mazumdar, 2012)

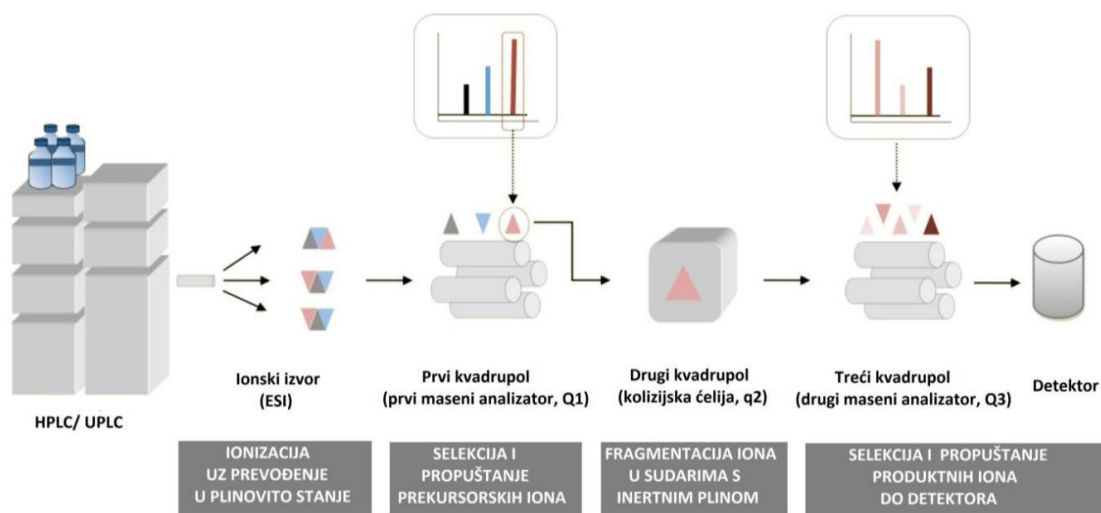
2.3.3.2. Analizatori masa

Analizator je dio uređaja spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Dva su glavna tipa analizatora koji se koriste u MS: kvadrupolni analizator masa (engl. *Quadrupole*, Q) i analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight*, TOF). Kvadrupolni je najčešći jer je kompaktan, jeftiniji i izdržljiviji od ostalih (Skoog i sur., 2016). Analizatore masa karakterizira pet glavnih karakteristika: granice masenog raspona (najmanji i najveći omjer m/z koji analizator može izmjeriti, brzina skeniranja (brzina kojom analizator mjeri u rasponu masa), prijenos (omjer broja iona do detektora i iona koji ulaze u maseni analizator), točnost mase (razlika između izmjerene i teoretske vrijednosti m/z) i snaga razlučivosti (sposobnost masenog analizatora da daje različite signale za ione s malom razlikom u masi). Novi trend u razvoju je kombiniranje više analizatora zajedno kako bi se povećala prilagodljivost i omogućilo izvođenje višestrukih eksperimenata (tandem MS ili MS/MS) (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

Kvadrupol se sastoji od četiri cilindrične paralelne elektrode, dvije pozitivno i dvije negativno nabijene. Dijagonalno su električki povezane te se na njih primjenjuje kombinacija izmjeničnog i istosmjernog potencijala. Električno polje propušta do detektora samo ione određenog omjera m/z koji se gibaju stalnom brzinom, a ostali ioni postaju neutralne molekule u doticaju s elektrodom (Cindrić i sur., 2009).

Povezivanjem tri uzastopna kvadrupola dobiva se trostruki kvadrupolni maseni spektrometar (engl. *Triple Quadrupole*, QqQ) čija je shema prikazana na slici 5. Maseni analizatori su prvi (Q1) i treći (Q3) kvadrupol, dok se drugi (q2) kvadrupol koristi kao kolizijska ćelija (Niessen, 2006). Pomoću ovakvog analizatora dobiva se maseni spektar unaprijed odabranih i

fragmentiranih iona i to na sljedeći način: ionizacijom molekula uzorka dobivaju se ioni koji se uvode u prvi maseni analizator (Q1) i samo se ioni određenog omjera m/z uvode u drugi kvadrupol (q2) te se ti ioni nazivaju parent ili prekursor ioni. U kolizijskoj ćeliji se fragmentacija postiže sudarima s molekulama inertnog plina (engl. *Collision-Induced Dissociation, CID*), nastaju fragmenti iona prekursora koji se nazivaju produkt ioni i analiziraju se u drugom masenom analizatoru (Q3) te konačno detektiraju u detektoru (Skoog i sur., 2016).



Slika 5. Shema trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra u sprezi sa sustavom tekućinske kromatografije i ionizacijom elektroraspršenjem (Anonymus 2, 2023)

2.3.3.3. Detektor

Detektor ima zadatak da registrira broj iona pri svakom određenom omjeru m/z , pretvori tu brojnost u električni signal (proporcionalno) koji mi očitavamo kao maseni spektar (de Hoffman i Strobant, 2007).

Najznačajnija prednost tandem MS/MS spektrometrije je višestruko praćenje tranzicija to jest MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring, MRM*) način skeniranja (Curtasu i Nørskov, 2023). MRM je napredniji način jednostrukog načina skeniranja, SRM-a (engl. *Selected Reaction Monitoring* ili *Single Reaction Monitoring, SRM*), pri kojem se odabire jedna tranzicija odnosno jedna reakcija raspadanja iona pri čemu ovaj način skeniranja uvelike ovisi o učinkovitosti ionizacije, fragmentaciji parent iona te o intenzitetu produkt iona. Kod MRM-a moguće je odabrati više tranzicija za jedan ili više analita koji se prati u jednom MS ciklusu (Yocum i Chinnaiyan, 2009).

2.3.3.4. Vezani sustav HPLC i tandem MS

Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa su do prije dvadesetak godina bile dvije potpuno odvojene tehnike. Međutim, sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća dolazi do velikog iskoraka, povezivanja LC i MS na područjima mehanizama desorpcije, ionizacije pri atmosferskom tlaku, povezivanja ionizatora i analizatora, isparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi (Cindrić i sur., 2009; Tiller i sur., 2003). Tako je ovaj vezani sustav LC-MS ušao u rutinsku upotrebu i vrlo brzo prerastao u jednu od dominantnih analitičkih tehnika u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju molekula male molekulske mase (Tiller i sur., 2003).

Cilj vezanih sustava, pa i ovog, je unaprjeđivanje separacije te izazivanje dodatne fragmentacije kako bi se kvalitetnije odredila struktura spojeva od interesa. Instrumenti LC-a se povezuju s masenim spektrometrima, preko međuspojeva (engl. *interface*), kako bi se povećala brzina, osjetljivost i razlučivost. Međuspojevi su bitni jer se glavni problem u povezivanju javlja pri održavanju visokog vakuuma u spektrometru masa. Međuspojevi reguliraju uvođenje tekuće faze u spektrometar masa te djelotvorno uklanjaju suvišak otapala prije uvođenja analita u ionski izvor (Ursić, 2016; Galić i Drvenkar, 2016; Cindrić i sur., 2009).

Primjer prednosti korištenja LC-MS/MS nad LC-MS je analiza strukturnih izomera koji se slično ponašaju na koloni te daju iste ione u masenom spektrometru. Oni kod LC-MS/MS dodatnom fragmentacijom daju različite fragmente iona (Ursić, 2016).

2.3.3.5. Ciljane analize

Brojne kombinacije ionizatora i analizatora masenog spektra ukazuju koliko je dinamično tržište MS. Osim razlike tih uređaja u načinu rada, razlučivanju, preciznosti, cijeni, selektivnosti, osjetljivosti, postoji razlika i u namjeni (Sertić, 2013).

Ciljane analize (engl. *targeted analysis*) obuhvaćaju identifikaciju i kvantifikaciju već unaprijed poznatih analita koji su okarakterizirani kemijski i biološki (Ballin i Laursen, 2019). Za provođenje ciljane analize je potrebno poznavati strukturu analita te razviti analitičku metodu kako bi se mogla izmjeriti njegova koncentraciju u uzorku. Ovakve analize imaju niske granice detekcije, ali za njihovo provođenje spojevi od interesa moraju biti dostupni u pročišćenoj formi, to jest kao standardi (Shulaev, 2006). Nedostatak tandem MS/MS tehnike s MRM načinom skeniranja je upravo što svi spojevi još uvijek nisu dostupni u obliku

standarda, iako se u zadnjih desetak godina njihov broj uvelike povećao (Curtasu i Nørskov, 2023).

2.3.4. Pristup određivanju aminokiselina

Kvantitativna analiza aminokiselina potrebna je u nekoliko polja, uključujući kliničku dijagnostiku, biomedicinska istraživanja, bio-inženjering, znanost o hrani i mnogim drugima. Razvijene su različite metode određivanja, no ipak se nastoji poboljšati postojeću metodologiju s naglaskom na brzinu analize, robusnost, ponovljivost i osjetljivost (Kaspar i sur., 2009).

Dva su pristupa određivanja aminokiselina, ovisno u kojem se obliku nalaze: u svome izvornom obliku ili derivatizirane gdje su kemijske grupe dodane u njihovu strukturu kako bi pomogle u identifikaciji (Rutherford i Gilani, 2009). Tako se, na primjer, aromatske aminokiseline mogu detektirati spektrofotometrima, međutim, ostale aminokiseline nemaju sposobnost apsorpcije ultraljubičastog/vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja niti sposobnost fluorescencije te ih je potrebno derivatizirati prije detektiranja spektrofotometrima (Violi i sur., 2020). Spektrofotometrijski detektori koji su se koristili za analizu aminokiselina nisu bili u mogućnosti razlikovati molekule i oslanjali su se isključivo na kromatografsku separaciju kako bi odredili retencijsko vrijeme te ga usporedili sa standardom što je moglo rezultirati krivim zaključkom ukoliko bi neka komponenta s amino skupinom imala isto retencijsko vrijeme (Violi i sur., 2020; Kaspar i sur., 2009). LC-MS/MS koristi kombinaciju podataka retencijskog vremena i fragmentacije kako bi osigurao robusnu tehniku identifikacije i kvantifikacije malih molekula (Violi i sur., 2020).

Analiza aminokiselina moguća je i spregom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*), međutim, potrebno je više koraka pročišćavanja uzorka prije same analize nego kod LC-MS-a (Violi i sur., 2020). Derivatizacija je neizostavan korak kod GC-MS-a zato jer aminokiseline nisu dovoljno hlapljive te ih je potrebno prevesti u hlapljive derivate (Callejón i sur., 2010; Kaspar i sur., 2009). Derivatizacijom se mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva aminokiselina tako što derivatizacijski agens stupa u reakciju s karboksilnom ili amino skupinom, a u nekim slučajevima i s obje skupine. Ovim postupkom se skraćuje vrijeme razvoja metode i same analize, ali produljuje vrijeme pripreme uzorka (Violi i sur., 2020).

Ionizirajući, termolabilni i polarni karakter nederivatiziranih aminokiselina čini ih pogodnima za analizu ionizacijom elektroraspršenjem s masenim spektrometrom (Petritis i sur., 2002). Iako se za sada aminokiselinska analiza pomoću LC-MS/MS metode koristi samo za istraživanja, postoji potencijal primjene za klinička i ekološka testiranja (Violi i sur., 2020).

LC-MS/MS je razvijena i validirana metoda određivanja aminokiselina i drugih spojeva, koji ne moraju biti derivatizirani. Njome se pokušavaju nadvladati izazovi dugog vremena pripreme uzorka i analize, skupih reagensa i često neprikladnih karakteristika izvedbe eksperimenta. Tradicionalni pristupi određivanja aminokiselina koji su se desetljećima koristili, s navedenim nedostacima, temeljili su se na ionskoj izmjenjivačkoj HPLC tehnici s derivatizacijom nakon kolone ninhidrinom i LC tehnici obrnutih faza povezanoj s fluorescentnim detektorom ili detektorom ultraljubičastog zračenja pri čemu su aminokiseline bile derivatizirane prije ili nakon kolone (Le i sur., 2014; Kaspar i sur. 2009). Uporabom derivatizacijskih agensa može doći do reakcije između samog agensa i neke druge molekule u uzorku ili stvaranja kompleksa, pa je potrebno i taloženje prije analize, što svakako predstavlja još jedan nedostatak upotrebe derivatizacije (Kaspar i sur., 2009). Nedosljedna proizvodnja derivatizacijskih agensa, promjenjivi sastav, slaba topljivost, nestabilnost agensa i interferiranje također mogu stvarati probleme pri analizi (Gu i sur., 2007; Petritis i sur., 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju, istraživano je šest uzoraka raštike koje su tijekom 2022. godine uzgojene na pokusnom poljoprivrednom imanju Instituta za poljoprivredu i turizam (N 45°13'20.30", E 13°36'6.49") čije je sjeme prikupljeno s različitih lokacija unutar Republike Hrvatske.

Listovi srednje veličine su ubrani u fazi tehnološke zrelosti, potom su odmah nakon berbe smrznuti u tekućem dušiku i liofilizirani na liofilizatoru. Liofilizirani uzorci raštike su zatim samljeveni ultra centrifugalnim mlinom na veličinu čestica 0,2 mm, pohranjeni u polipropilenske epruvete te skladišteni na suhom i tamnom mjestu do provođenja eksperimenta.

3.1.2. Kemikalije

U tablici 4 su prikazane korištene kemikalije, a u tablici 5 korišteni standardi u ovom radu.

Tablica 4. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Metanol (MeOH) HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	≥ 99,9 %	VWR Chemicals
Mravlja kiselina (HCOOH) HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	≥ 99,9 %	VWR Chemicals
Voda HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	LC-MS čistoća	VWR Chemicals

Tablica 5. Popis korištenih analitičkih standarda

Naziv analitičkog standarda	Proizvođač
L-Alanin (Ala) Amonijev klorid L-Arginin (Arg)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD

Tablica 5. Popis korištenih analitičkih standarada – *nastavak*

L-Prolin (Pro)	
Glicin (Gly)	
L-Asparaginska kiselina (Asp)	
L-Cistin	
L-Glutaminska kiselina (Glu)	
L-Leucin (Leu)	
L-Lizin (Lys)	
L-Serin (Ser)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD
L-Treonin (Thr)	
L-Histidin (His)	
L-Izoleucin (Ile)	
L-Metionin (Met)	
L-Fenilalanin (Phe)	

3.1.3. Popis uređaja i opreme

U tablicama 6 i 7 nalaze se popisi uređaja i opreme koji su potrebni za pripremu reagensa i uzoraka te za provođenje analize ovog rada.

Tablica 6. Popis korištenih uređaja i opreme

Vrsta uređaja	Proizvođač i model uređaja
Liofilizator	Labogene ScanVac CoolSafe 95-15 Pro, Allerød, Danska
Ultra centrifugalni mlin	Retsch ZM 200, Haan, Njemačka
Analitička vaga	Shimadzu AUW220D, Kyoto, Japan
Kuglični homogenizator	Bead Ruptor Elite, Omni International, SAD
Vorteks homogenizator	Biosan SIA Vortex V-1 plus, Riga, Latvija
Centrifuga	Domel Centric 350, Železniki, Slovenija
Maseni QQQ (trostruki kvadrupol) detektor	Shimadzu LCMS 8045, Kyoto, Japan

Tablica 7. UHPLC uređaj s dijelovima

Uređaj	Dio uređaja	Proizvođač i model dijela uređaja
UHPLC	Pumpa	Shimadzu Nexera LC-40DX3, Kyoto, Japan
	Automatski uzorkivač	Shimadzu Nexera SIL-40CX3, Kyoto, Japan
	Pećnica za kolonu	Shimadzu Nexera CTO-40C, Kyoto, Japan
	Upravljačka jedinica	Shimadzu Nexera SCL-40, Kyoto, Japan

3.1.4. Priprema ekstrakta uzorka za određivanje aminokiselina LC-MS/MS metodom

Priprema ekstrakta provodi se prema modificiranoj metodi objavljenoj u radu Bauera i sur. (2022). Odvaže se $0,015 \pm 0,001$ g liofiliziranog i samljevenog uzorka u epruvetu volumena 2 mL. Uzorku u epruveti doda se 300 μ L hladne deionizirane vode kako bi se rehidrirao te se uzorak zatim homogenizira na kugličnom homogenizatoru (1 min, 2 ciklusa, 5,5 m/s) kako bi se razorila stanična struktura. Radi inaktivacije enzima doda se 1200 μ L metanola (MeOH) te se uzorak ponovo homogenizira na kugličnom homogenizatoru (1 min, 2 ciklusa, 5,5 m/s). Nakon razaranja stanične strukture uzorka slijedi centrifugiranje na 16000 xg tijekom 10 min čime se odvađa talog od supernatanta. Alikvot od 300 μ L otpipetira se u novu epruvetu s probušenim čepom volumena 2 mL i zatim liofilizira pri tlaku 8 mbara kako bi otapalo uparilo. Nakon uparavanja otapala analit se resuspendira s 600 μ L mobilne faze A (0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi) u epruveti koja se zatim vorteksira i centrifugira na 16000 xg tijekom 10 min. Na kraju se otopina analita profiltrira kroz najlonski filter pora veličine 0,22 μ m u vijale za HPLC uređaj.

3.1.5. Priprema standardnih otopina aminokiselina

Za pripremu standardnih otopina odvaže se 1-1,5 mg standarda u epruvete volumena 2 mL te se otpipetira isti volumen 80 %-tnog MeOH čime se dobije standardna otopina masene koncentracije 1000 mg/L.

3.1.6. Priprema radnih standardnih otopina aminokiselina

Razrjeđivanjem prethodno pripremljenih standardnih otopina aminokiselina dobije se radna standardna otopina aminokiselina i to tako da se alikvot od 100 μ L standardne otopine otpipetira u epruvete volumena 2 mL te se doda 900 μ L 80 %-tnog MeOH. Pripremljena radna standardna otopina ima masenu koncentraciju od 1000 mg/L.

3.1.7. Priprema matične otopine aminokiselina

Matična otopina aminokiselina se dobije miješanjem kombiniranih radnih standarda u kojoj je svaki standard razrijeđen 40 puta. Ukupni volumen matične otopine je 2 mL te da se dobije potrebno razrjeđenje potrebno je uzeti 5 μ L svakog standarda.

3.1.8. Priprema baždarne otopine aminokiselina

Za određivanje baždarnog dijagrama aminokiselina potrebno je pripremiti baždarne otopine aminokiselina različitih koncentracija (1x/10x/100x/1000x) u volumenu 200 μ L. Pripremaju se tako da se u posebne vijale otpipetira točan volumen pripremljene matične otopine i doda određen volumen ultračiste vode i to na način prikazan u tablici 8.

Tablica 8. Priprema baždarnih otopina

Razrjeđenje	Volumen matične otopine (MO) + volumen ultračiste vode
10x	20 μ L (1x MO) + 180 μ L 80 %-tnog MeOH
100	20 μ L (10x MO) + 180 μ L 80 %-tnog MeOH
1000x	20 μ L (100x MO) + 180 μ L 80 %-tnog MeOH

3.2. METODE

3.2.1. Optimizacija parametara LC-MS/MS metode

Molekulski ioni svake aminokiseline dobivaju se izravnim uvođenjem standardnih otopina u maseni detektor. Cjelokupni spektar masa se snima kako bi se mogli odrediti prekursor ioni i odrediti optimalan napon dok se MS/MS spektar snima kako bi se odredili fragmentirani ioni svakog analita. Eksperimenti se provode u pozitivnoj ionizaciji. Produkt ioni se snimaju pri različitim kolizijskim energijama kako bi se utvrdili uvjeti pri kojima se postiže najjači signal MS/MS tranzicije svakog od spojeva. Za kvantifikaciju se odabire tranzicija s jačim odzivom, a ona sa slabijim služi kao potvrđni ion spoja od interesa.

Nakon optimiziranih prijelaza standard svake aminokiseline pušta se na kolonu s ciljem određivanja retencijskih vremena. U tablici 9 nalaze se, ovim radom, dobiveni optimizirani parametri za određivanje aminokiselina.

Tablica 9. Dobiveni optimizirani parametri za određivanje aminokiselina

Naziv aminokiseline	Kemijska formula	Parent ion M+H (m/z)	Produkt ion (m/z) kvantifikacijski	Produkt ion (m/z) kvalifikacijski	Retencijsko vrijeme (min)
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89,9	44,1	/	2,006
Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175,1	70,1	60,1	3,229
Asparaginska kiselina	C ₄ H ₇ NO ₄	134	74,05	88,1	1,874
Cistein	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	241	151,95	73,9	1,786
Glutaminska kiselina	C ₅ H ₉ NO ₄	147	84,1	56,1	2,224
Glicin	C ₂ H ₅ NO ₂	75,9	30,15	/	1,874
Histidin	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,9	110,1	56,1	2,727
Izoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1	86,2	69,15	7,79
Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1	86,05	30,05	8,095
Lizin	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,1	84,1	130	2,596
Metionin	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,9	56,1	104,1	6,327
Fenilalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,1	120,1	103,1	8,88
Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂	116,1	70,15	28,05	2,726
Serin	C ₃ H ₇ NO ₃	105,9	60,1	88	1,83
Treonin	C ₄ H ₉ NO ₃	120,1	74,15	56,05	2,048
Tirozin	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,1	136,1	91,1	7,397
Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118,1	72,15	55,05	5,583

3.2.2. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju

Analiza aminokiselina provedena je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti obrnutih faza primjenom UHPLC instrumenta koji je opremljen pumpom, automatskim uzorkivačem te pećnicom za kolonu u sprezi s masenim spektrometrom s trostrukim kvadrupolom opremljenim s elektrosprej raspršivačem. Kvantitativna analiza podataka izvršena je pomoću softvera LabSolutions.

3.2.2.1. Kromatografska separacija

Kromatografska separacija provodi se injektiranjem 1 μ L pripremljenog uzorka na pentafluorofenil propil (engl. *Pentafluorophenylpropyl*, PFPP) kolonu dimenzija 2,1 x 150 mm, promjer pora 3 μ m (Discovery HS F5-3, Sigma) pri temperaturi od 40 °C te protoku od 0,25 mL/min. Mobilna faza A sastoji se od 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u vodi, a mobilna faza B od 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu. Separacijski gradijent mobilne faze prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Separacijski gradijent mobilne faze

Korak	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0	0	100	0
1	2,0	100	0
2	5,0	75	25
3	11,0	65	35
4	15,0	5	95
5	20,0	5	95
6	20,1	100	0
7	25,1	100	0

3.2.2.2. MS/MS detekcija

Cjelokupni spektar masa i MS/MS spektri svakog pojedinog analita dobivaju se nakon propuštanja otopine analitičkog standarda poznate molekulske mase kroz spektrometar masa. Provjera prekursor iona i iona produkata provodi se uspoređivanjem s literaturnim podacima (Le i sur., 2013; Thiele i sur., 2008; Özcan i Şenyuva, 2006).

3.2.3. Obrada podataka

Deskriptivna statistika uključuje izračun srednje vrijednosti i standardne pogreška dobivenih rezultata uz korištenje programa Microsoft Excel 2019. Statistički značajne razlike koncentracija aminokiselina između pojedinih uzoraka utvrđuju se jednosmjernom analizom varijance (engl. *ANalysis Of Variance*, ANOVA). Fischerov LSD (engl. *Least Significant Difference*, LSD) post hoc test provodi se na rezultatima koji pokazuju statistički značajne razlike. Za ANOVA i Fischer post hoc testove korišten je program Statistica v. 13.4 (StatSoft Ltd., Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

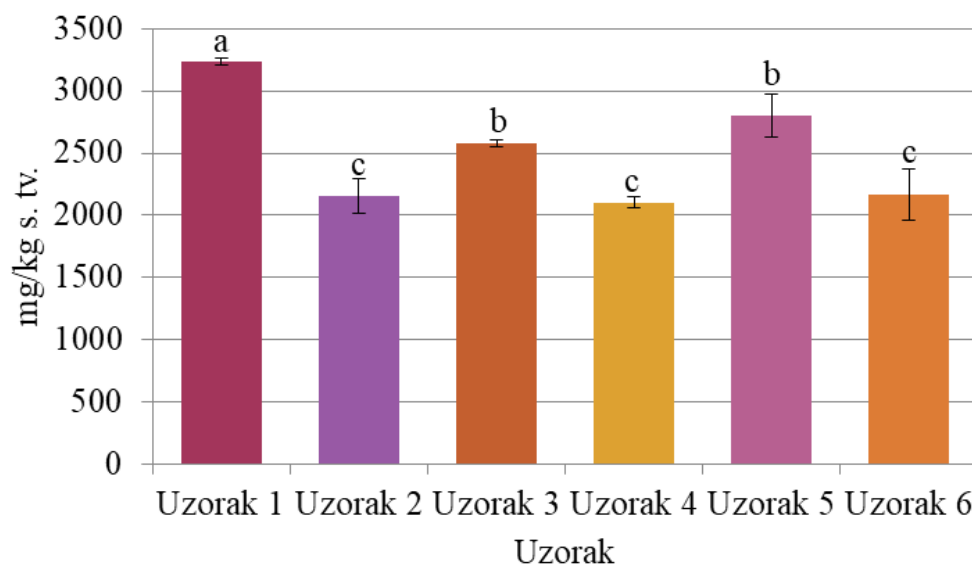
Provedenim radom i optimiziranim parametrima LC-MS/MS metode za određivanje aminokiselina u listu raštike identificirano je i kvantificirano, u 6 različitih uzoraka, ukupno 17 aminokiselina; alanin, arginin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin i valin.

Rezultati provedenog rada prikazani su grafički (slike 6 – 22).

4.1. DOBIVENE KONCENTRACIJE AMINOKISELINA U UZORCIMA

Rezultati koncentracija aminokiselina dobiveni radom su prikazani kao srednje vrijednosti tri paralelna mjerenja za svaki uzorak sa standardnom pogreškom ($N = 3$). Usporedba količina aminokiselina između uzoraka provedena je jednosmjernom ANOV-om dok je za određivanje značajnih razlika među istima provedeno Fisherov-im LSD post hoc testom.

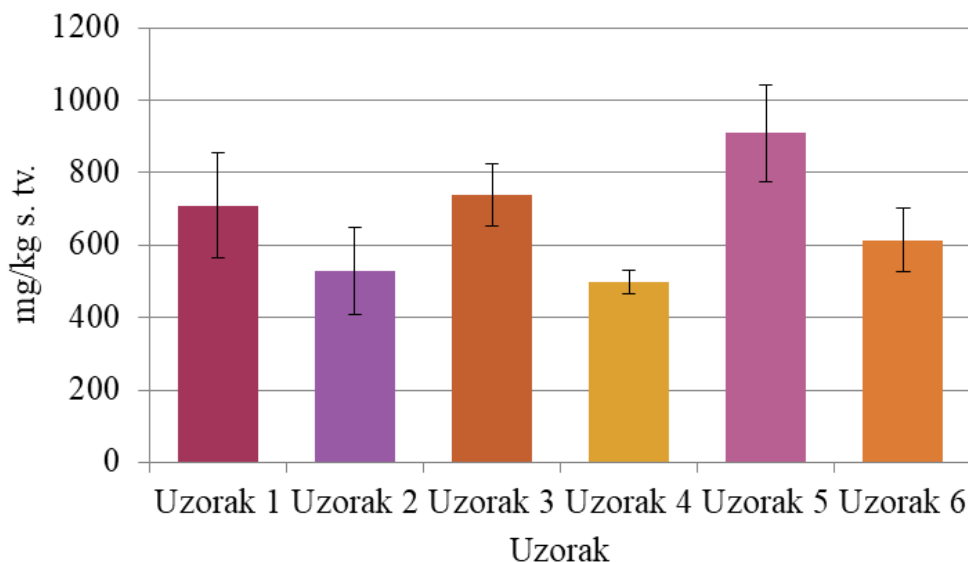
Prolin ima ključnu ulogu u staničnom metabolizmu kao sastavni dio proteina i kao slobodna aminokiselina. Ima ograničenu konformaciju zbog svoje cikličke strukture koja određuje raspored lanca peptida oko njega te i kao posljedica toga vodi stabilizaciji ili destabilizaciju sekundarnih struktura konformacije proteina. Uz svoju ulogu u primarnom metabolizmu kao sastavni dio proteina slobodni aminokiselinski prolin je jedan od najrasprostranjenijih molekula koje se nakupljaju kod biljaka te jača staničnu stijenku što ih čini otpornijima u nepovoljnim okolišnim uvjetima kao što su suša, visoka salinitet ili niske temperature (Hayat i sur., 2012; Lehmann i sur., 2010). Rezultati provedenog rada pokazali su kako je prolin, jedna od najvažnijih aminokiselina u obrani od stresa u biljkama, upravo i aminokiselina s najvišom koncentracijom u raštiki (slika 6).



Slika 6. Koncentracija prolina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Utvrđena koncentracija slobodnog prolina u istraživanim uzorcima raštike kretala se od 2167 mg/kg suhe tvari (s.tv.) do 3237 mg/kg s.tv. Najviša ukupna koncentracija utvrđena je u uzorku 1 i iznosila je 3237 mg/kg s.tv. Uzorak 4 imao je najnižu koncentraciju od 2104 mg/kg s.tv., dok su uzorci 2 i 6 imali nešto više koncentracije od 2154 mg/kg s.tv. odnosno 2167 mg/kg s.tv. te njihovi rezultati nisu statistički značajno različiti, prema ANOVI, kao i koncentracije prolina u uzorku 3 (2154 mg/kg s.tv.) i 5 (2803 mg/kg s.tv.).

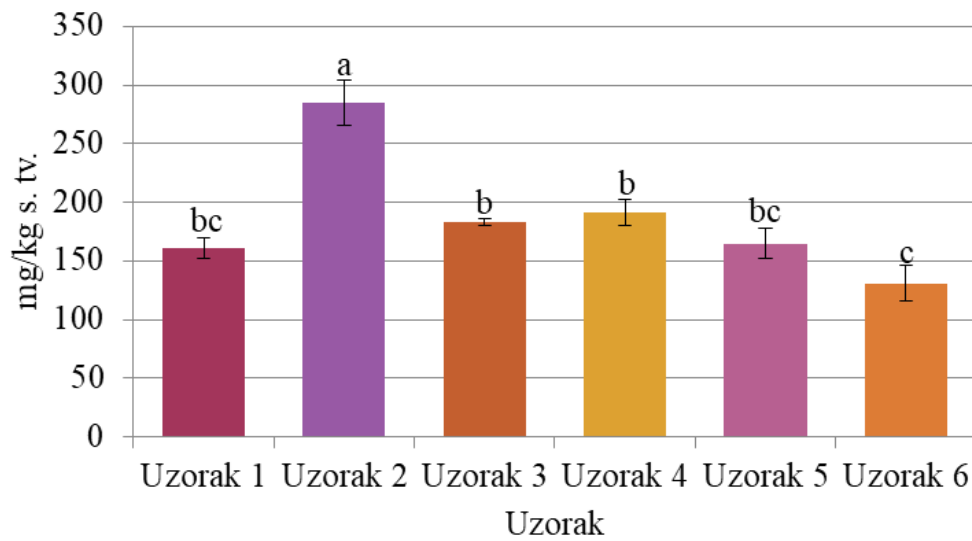
Sljedeća slobodna kvantificirana aminokiselina je arginin koji mnogim biljkama ima ulogu skladištenja i transporta dušika (Hildebrandt i sur., 2015). Na slici 7 je prikazan raspon koncentracije arginina.



Slika 7. Koncentracija arginina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Gornja granica raspona koncentracije slobodnog arginina iznosi 909 mg/kg s.tv. detektirana u uzorku 5, a donja granica iznosi 497 mg/kg s.tv. detektirana u uzorku 4. Uzorak 1 sadrži 709 mg/kg s. tv., uzorak 2 529 mg/kg s. tv., uzorak 3 737 mg/kg s. tv., uzorak 6 614 mg/kg s. tv. arginina. ANOV-om je utvrđeno kako između 6 istraživanih uzoraka nema statistički značajne razlike u količini arginina u listu raštike.

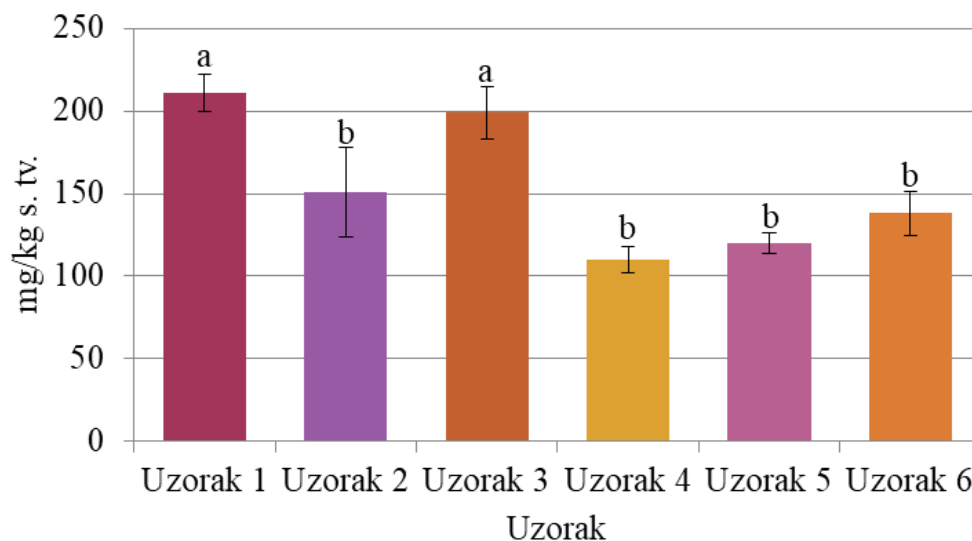
Ukupna koncentracija slobodnog alanina u uzorku 2 (285 mg/kg s.tv.) najviša je vrijednost ove aminokiseline među svim istraživanim uzorcima što je vidljivo na slici 8.



Slika 8. Koncentracija alanina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Približno jednake koncentracije imali su uzorci 1 (161 mg/kg s.tv.) i uzorak 5 (165 mg/kg s.tv.) te uzorak 3 (183 mg/kg s.tv.) i uzorak 4 (191 mg/kg s.tv.). Najniža koncentracija zabilježena je u uzorku 6 (131 mg/kg s.tv.) koja se podudara s vrijednosti alanina u brokuli (133 mg/kg liofiliziranog uzorka) prema radu Arnáiz i sur. (2012). ANOV-om je utvrđeno kako ne postoje statistički značajne razlike između uzoraka 1, 3, 4 i 5 te između uzoraka 1, 5 i 6. Uzorak 1 statistički se značajno razlikuje, prema prosječnoj koncentraciji slobodnog alanina, od svih ostalih uzoraka.

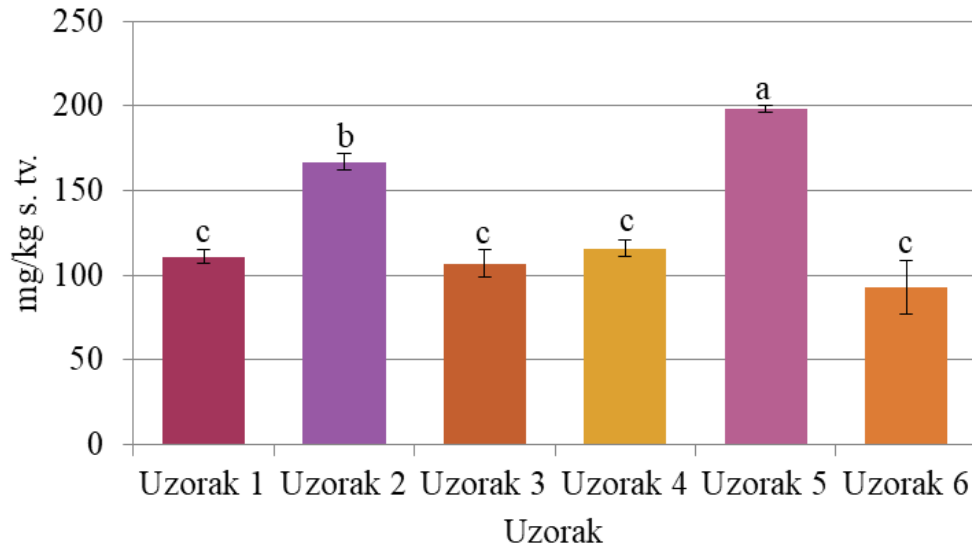
Dobivene koncentracije slobodne asparaginske kiseline u uzorcima prikazane su na slici 9.



Slika 9. Koncentracija asparaginske kiseline (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Donja granica vrijednosti koncentracije slobodne asparaginske kiseline od 110 mg/kg s.tv. kvantificirana je u uzorku 4. Gornja granica vrijednosti koncentracije asparaginske kiseline iznosi 211 mg/kg s.tv. te karakterizira uzorak 1 i usporediva je s vrijednošću uzorka 3 (199 mg/kg s.tv.) što potvrđuje ANOVA. Koncentracije u uzorku 2 (151 mg/kg s.tv.), 4, 5 (120 mg/kg s.tv.) i 6 (138 mg/kg s.tv.) također se nalaze u uskom rasponu vrijednosti te ne postoje statistički značajne razlike između tih uzoraka. Detektirane količine pokazuju kako su listovi raštike bogatiji asparaginskom kiselinom nego listovi brokule (Arnáiz i sur., 2012).

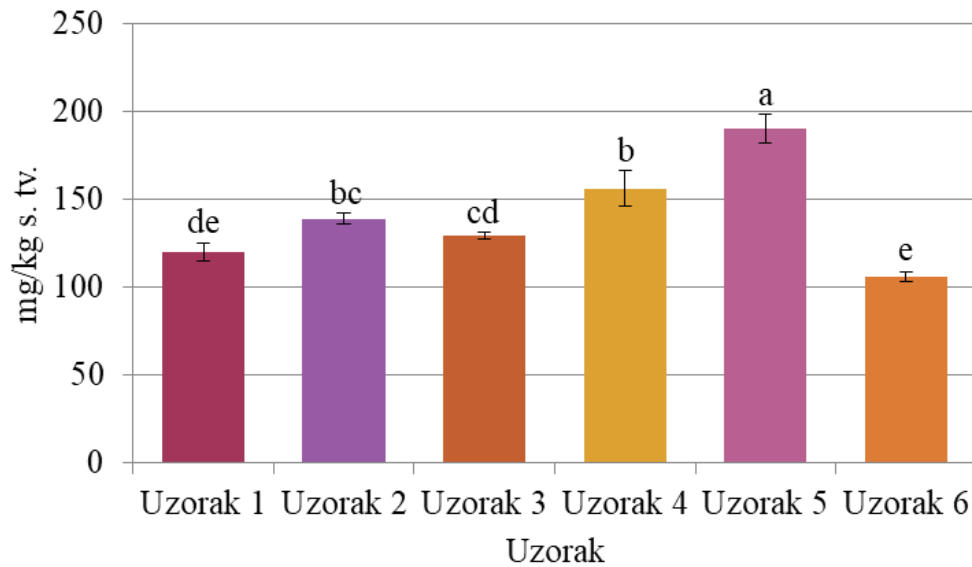
Aminokiselina treonin u biljkama služi kao prekursor sinteze izoleucina (Hildebrandt i sur., 2015). Raspon vrijednosti treonina se kretao, u prosjeku, od 93 mg/kg s.tv. (uzorak 6) prema 198 mg/kg s.tv. (uzorak 5) što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Koncentracija treonina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Količina treonina, prema ANOVI, neznatno se razlikuje u uzorcima 1, 3, 4 i 6 što pokazuju i vrijednosti od 111 mg/kg s.tv., 107 mg/kg s.tv., 116 mg/kg s.tv. i 93 mg/kg s.tv. Uzorak 2 (167 mg/kg s.tv.), kao i uzorak 5, statistički se značajno razlikuju u odnosu na ostale uzorke.

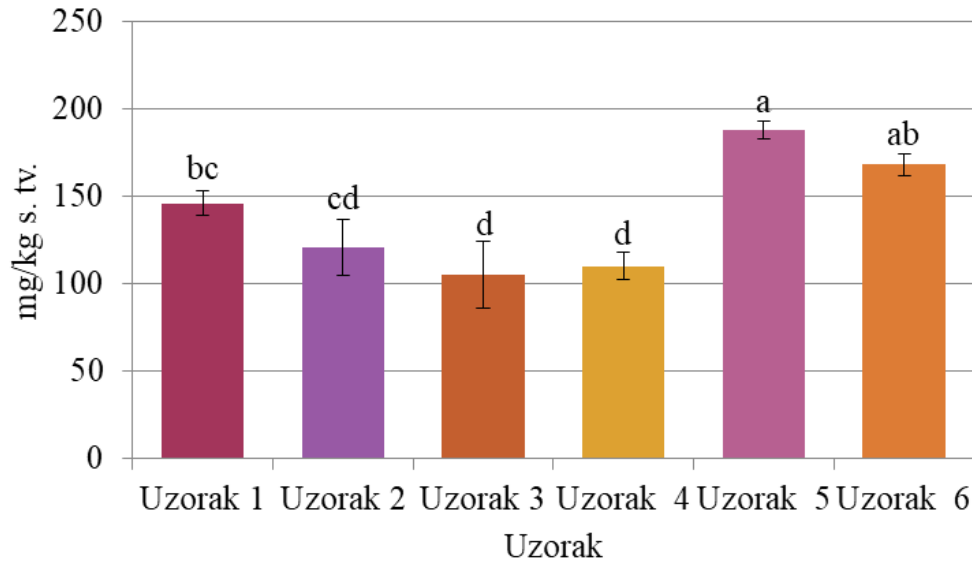
Serin je potreban za rast biljke, točnije meristema, zatim sudjeluje u sintezi ostalih metabolita te ima ulogu signalne molekule (Häusler i sur., 2014). Prosječne koncentracije serina, u ovom istraživanju, varirale su od 106 mg/kg s.tv. (uzorak 6) do 190 mg/kg s.tv. (uzorak 5) što je vidljivo na slici 11.



Slika 11. Koncentracija serina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Koncentracije uzorka 1 (120 mg/kg s.tv.), uzorka 2 (139 mg/kg s.tv.), uzorka 3 (129 mg/kg s.tv.) i uzorka 4 (156 mg/kg s.tv.) ne nalaze se u širokom rasponu vrijednosti. ANOVA pokazuje kako ne postoje značajne razlike u koncentracijama slobodnog serina u uzorcima 1 i 3, 1 i 6, između uzorka 2 i 3 te 2 i 4.

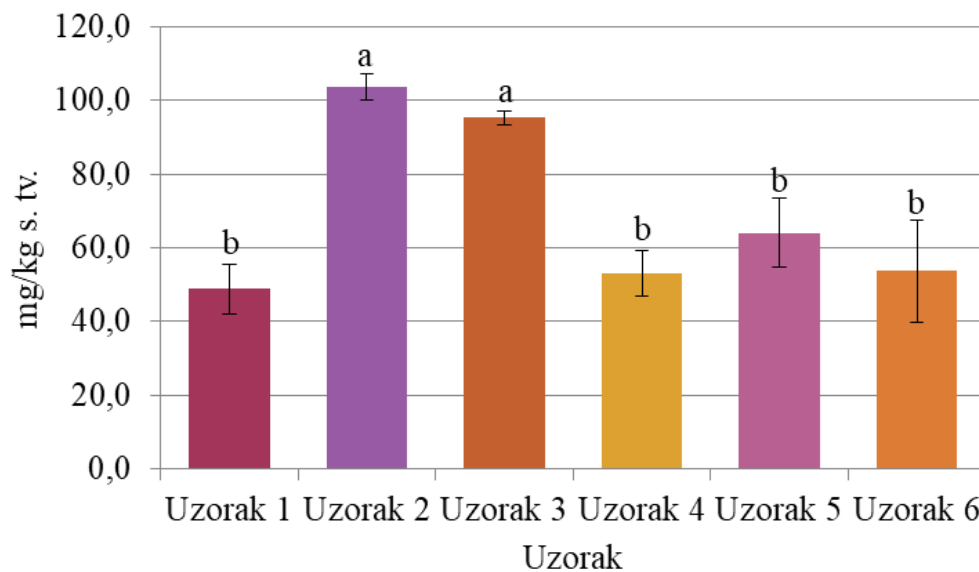
Glutaminska kiselina je detektirana i kvantificirana kao slobodna aminokiselina u listu raštike s rezultatom od 105 mg/kg s.tv. kao najnižom vrijednošću u uzorku 3 dok je najvišu vrijednost imao uzorak 5 s 188 mg/kg s.tv. (slika 12).



Slika 12. Koncentracija glutaminske kiseline (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

ANOVA-om je utvrđeno kako postoje statistički značajne razlike u koncentraciji glutaminske kiseline među uzorcima 1 (146 mg/kg s.tv.) i 2 (121 mg/kg s.tv.) te da ne postoje statistički značajne razlike među uzorcima 3 (105 mg/kg s.tv.) i 4 (110 mg/kg s.tv.). U radu Khasay i sur. (2021) kvantificirana je ista aminokiselina LC-ESI-MS/MS sustavom u listovima nekoliko *Brassica oleracea* etiopijskih biljaka te su rezultati pokazali daleko veće koncentracije glutaminske kiseline u odnosu na ovo istraživanje.

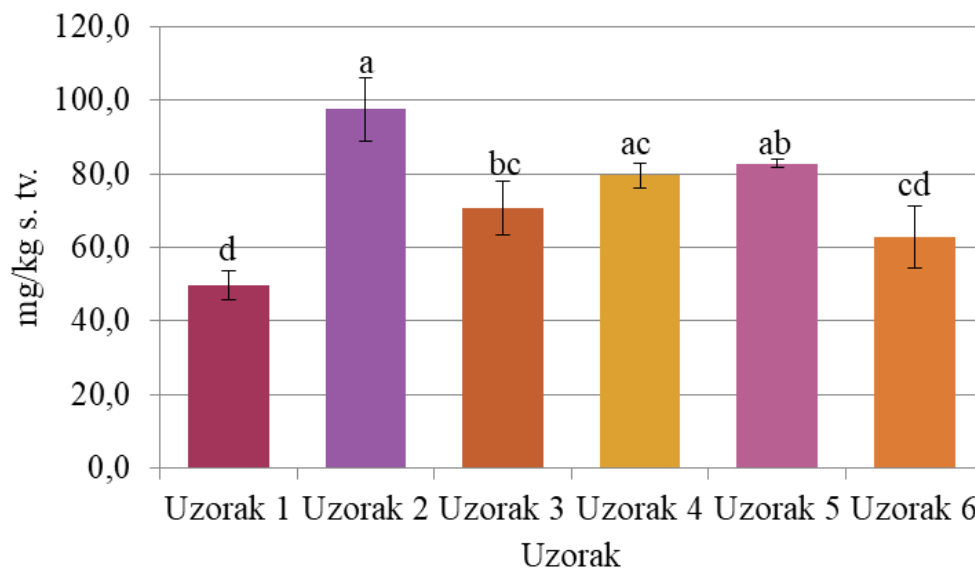
Ovo istraživanje pokazuje kako se najniža koncentracija leucina nalazi u uzorku 1 (48,8 mg/kg s.tv.), a najviša u uzorku 2 (103,6 mg/kg s.tv.) što je vidljivo sa slike 13.



Slika 13. Koncentracija leucina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Rezultat uzorka 3 (95,2 mg/kg s.tv.) usporediv je, prema ANOVI, s najvišom koncentracijom dok su rezultati uzorka 4, 5 i 6, odnosno 53,2 mg/kg s.tv.; 64,0 mg/kg s.tv. i 53,7 mg/kg s.tv. usporedivi s najnižom koncentracijom. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima određivanja leucina u brokuli koje su proveli Arnáiz i sur. (2012). Raspon količine leucina se u tom radu kretao od 39,7 do 90,9 mg/kg liofiliziranog uzorka.

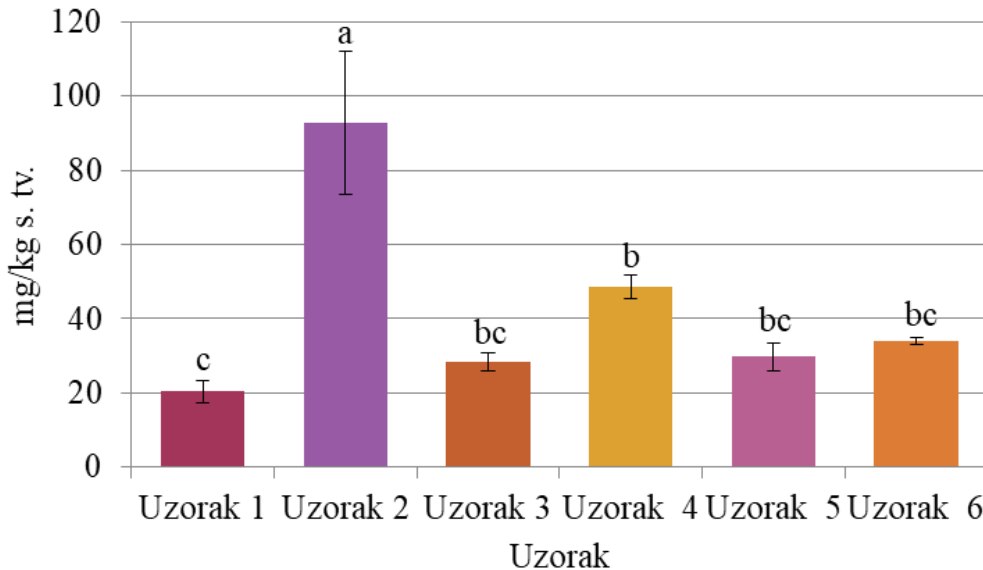
Koncentracije slobodnog valina dobivene u ovom radu prikazane su na slici 14.



Slika 14. Koncentracija valina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Gornja granica valina, kao i mnoge druge koncentracije aminokiselina u ovom istraživanju, nalazi se u uzorku 2 (97,5 mg/kg s.tv.). Uzorak 1 s količinom valina od 49,7 mg/kg s.tv. označava donju granicu raspona količine valina u uzorcima. Prosječna koncentracija slobodnog valina u uzorku 3 iznosi 70,6 mg/kg s.tv., u uzorku 4 79,5 mg/kg s.tv., u uzorku 5 82,8 mg/kg s.tv. i u uzorku 6 62,8 mg/kg s.tv. ANOVA je pokazala kako postoje statistički značajne razlike u količinama valina među svim uzorcima. Prema radu Ahmeda i sur. (2022) količina valina je, u odnosu na ostale aminokiseline detektirane u istom radu, među najmanjim.

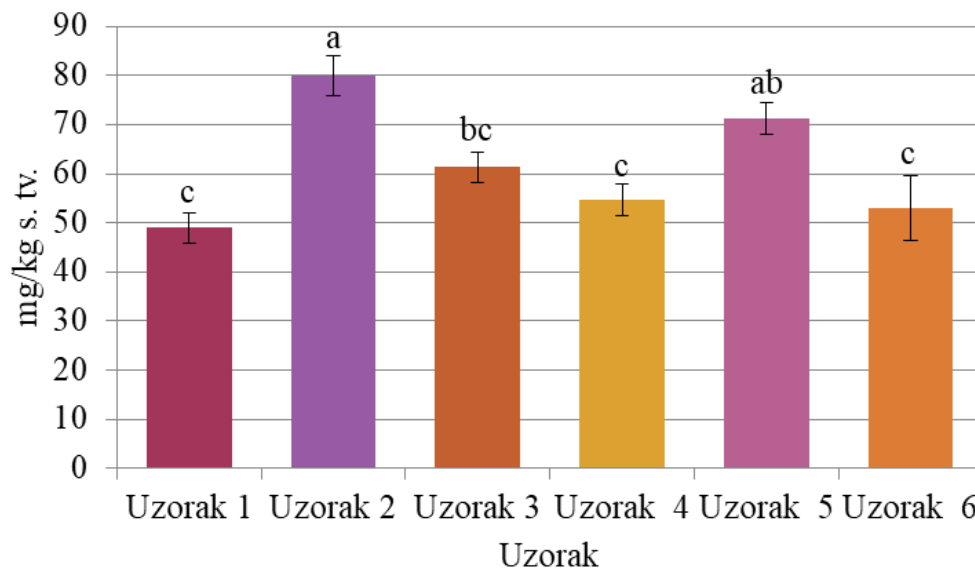
Sa slike 15 vidljivo je kako količina histidina u uzorku 2 ima značajno višu vrijednost, koja je ujedno i najviša vrijednost (92,7 mg/kg s.tv.), u odnosu na ostale uzorke. Najniža vrijednost koncentracije kvantificirana je u uzorku 1 (20,3 mg/kg s.tv.).



Slika 15. Koncentracija histidina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

ANOV-om je utvrđeno kako su usporedive vrijednosti u uzorcima 3 (28,2 mg/kg s.tv.), 5 (29,7 mg/kg s.tv.) i 6 (33,9 mg/kg s.tv.), posebno se s navedenim uzorcima može usporediti uzorak 1 te također posebno uzorak 4 s količinom od 48,5 mg/kg s.tv. histidina. Histidin nije detektiran u kupusu i brokuli prema radovima Park i sur. (2014) i Arnáiz i sur. (2012), međutim, u obje biljke detektirali su ga Kahsay i sur. (2021).

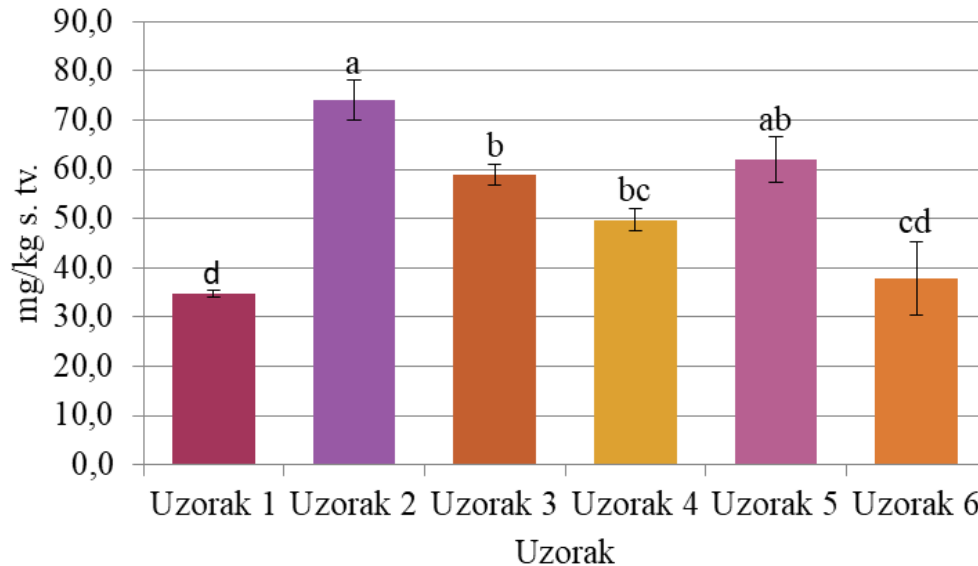
Koncentracije izoleucina (slika 16) kretale su se od one najniže u uzorku 1 (49,0 mg/kg s.tv.) prema najvišoj vrijednosti u uzorku 2 (80,0 mg/kg s.tv.).



Slika 16. Koncentracija izoleucina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Uzorak 3 sadrži 61,3 mg/kg s.tv. slobodnog izoleucina a uzorak 5 71,2 mg/kg s.tv. Rezultati ANOVE pokazuju kako ne postoje značajne razlike u koncentracijama izoleucina kvantificirane od one najniže vrijednosti u uzorku 1 te rezultatima od 54,7 mg/kg s.tv. i 53,0 mg/kg s.tv. koji pripadaju uzorcima 4 i 6.

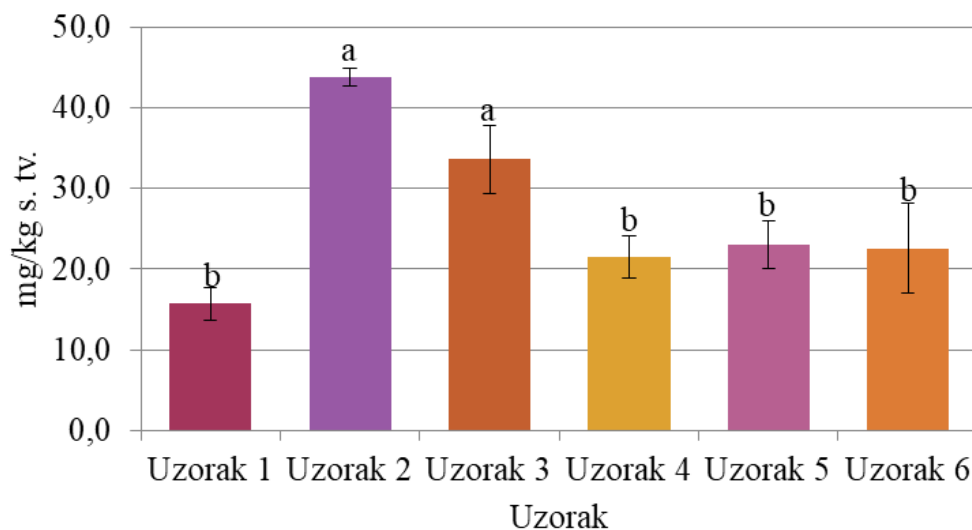
Sa slike 17 možemo vidjeti kako se koncentracija slobodne aminokiseline fenilalanina kretala u rasponu od one najniže 34,7 mg/kg s.tv. kvantificirana u uzorku prema najnižoj, kvantificirana u uzorku 2 vrijednosti od 74,1 mg/kg s.tv. lista raštike.



Slika 17. Koncentracija fenilalanina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Uzorak 3 sadrži 59,0 mg/kg s.tv., uzorak 4 49,7 mg/kg s.tv., uzorak 5 62,0 mg/kg s.tv. i uzorak 6 37,8 mg/kg s.tv. fenilalanina. ANOV-om utvrđeno je da postoje značajne razlike u količini fenilalanina među uzorcima provedenog eksperimenta.

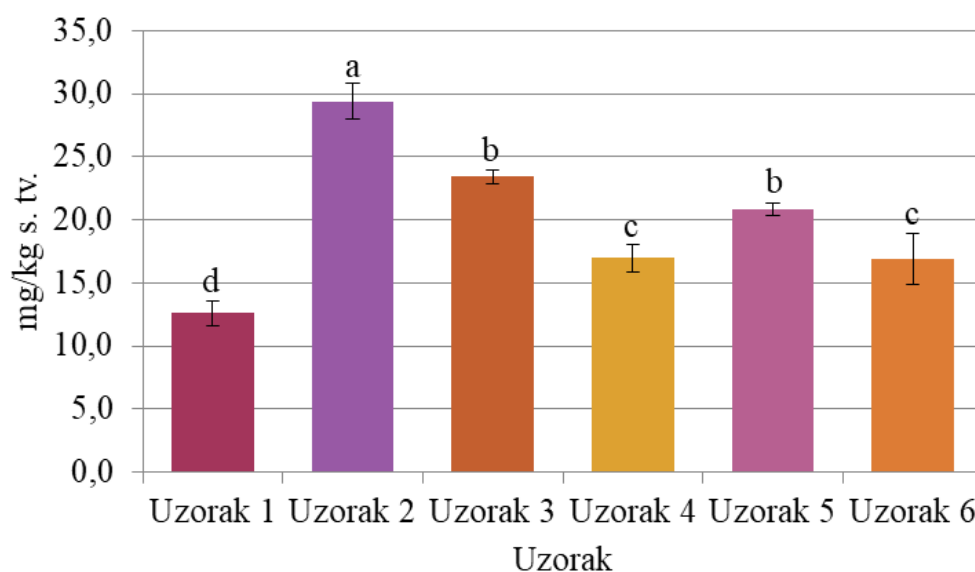
Uzorak 2, također vidljivog odstupanja u količinama prethodnih aminokiselina (leucina, valina, histidina, izoleucina i cisteina) odstupa i od količine tirozina kvantificiranom u uzorcima, te čini gornju granicu raspona s rezultatom od 43,8 mg/kg s.tv. lista raštike (slika 18).



Slika 18. Koncentracija tirozina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Najniža vrijednost iste aminokiseline u uzorku 1 (15,7 mg/kg s.tv.) usporediva je s vrijednostima uzoraka 4, 5 i 6 koje iznose 21,5; 23,0; i 22,6 mg/kg s.tv. Količina tirozina u uzorku 3 (33,6 mg/kg s.tv.) usporediva je s količinom uzorka 1.

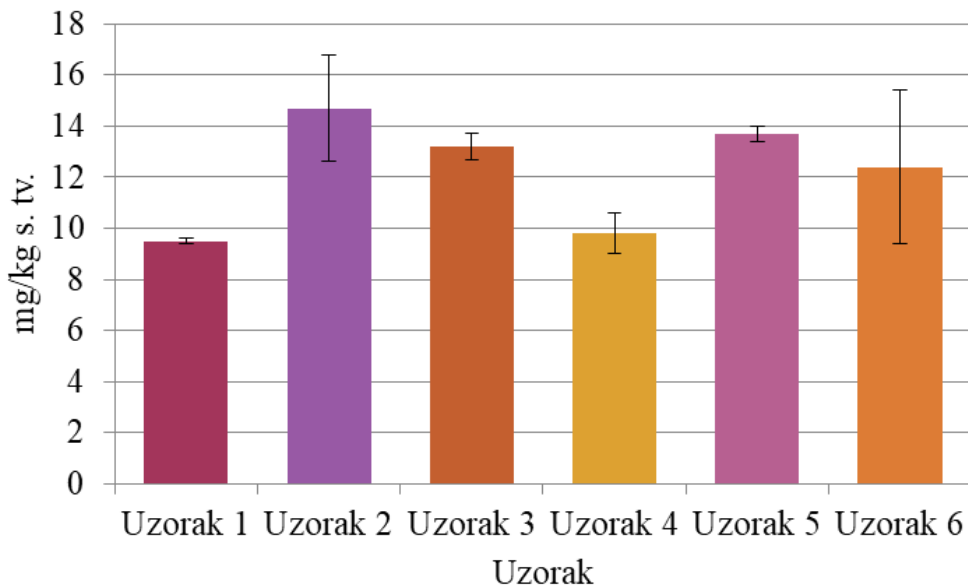
Lizin, u ovome radu, ima raspon vrijednosti koncentracije od 12,6 (uzorak 1) do 29,4 (uzorak 2) mg/kg s.tv. lista raštike što pokazuje slika 19.



Slika 19. Koncentracija lizina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Granične vrijednosti raspona nisu usporedive, međutim, vrijednosti ostalih uzoraka 3 (23,4 mg/kg s.tv.), 5 (20,8 mg/kg s.tv.) te uzorka 4 (17,0 mg/kg s.tv.) i 6 (16,9 mg/kg s.tv.) mogu se usporediti prema provedenoj ANOVI. Arnáiz i sur. (2012) su kvantificirali količinu lizina u jednom rodu vrste *Brassica oleracea* koja se nalazi unutar raspona koncentracije lizina dobivenim ovim eksperimentom i iznosi 14,67 mg/kg liofiliziranog uzorka.

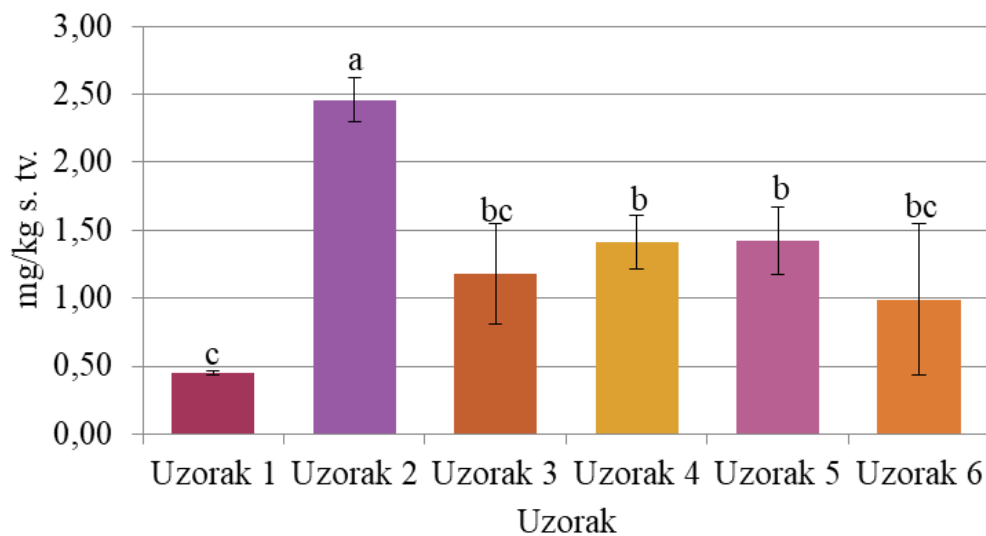
Količina glicina se unutar uzoraka kretala, u prosjeku, od najniže vrijednosti 9,5 mg/kg s.tv. (uzorak1) prema onoj najnižoj 14,7 mg/kg s.tv. (uzorak 2) (slika 20).



Slika 20. Koncentracija glicina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Uzorak 3 sadrži 13,2 mg/kg s.tv., uzorak 4 9,8 mg/kg s.tv., uzorak 5 13,7 mg/kg s.tv. i uzorak 6 12,4 mg/kg s.tv. slobodne aminokiseline glicina. Vrijednosti ove aminokiseline imaju uski raspon vrijednosti, te je i ANOVA pokazala da nema statistički značajnih razlika koncentracija među uzorcima. Nešto viša koncentracija od 15,7 mg/kg liofiliziranog uzorka detektirana je u jednom od varijeteta brokule srodnoj raštiki (Arnáiz i sur., 2012).

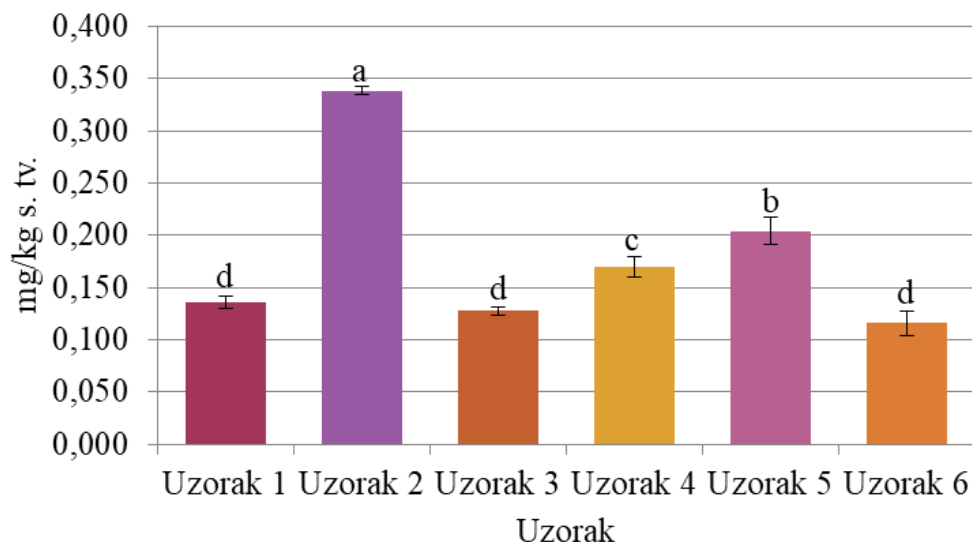
Aminokiselina metionin služi kao supstrat za sintezu izoleucina (Joshi i sur., 2010) te su na slici 21 prikazane prosječne koncentracije slobodne aminokiseline metionina u listu raštike.



Slika 21. Koncentracija metionina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Najmanju prosječnu koncentraciju slobodnog metionina sadržavao je uzorak 1 (0,45 mg/kg s.tv.), a najvišu uzorak 2 (2,46 mg/kg s.tv.). ANOV-om je utvrđeno kako navedena koncentracija metionina uzorka 2 nije usporediva niti s jednom koncentracijom iste aminokiseline u svim ostalim uzorcima. Međutim, istom analizom je utvrđeno kako su usporedivi rezultati koncentracije dobiveni u uzorku 1 uzorku 3 (1,18 mg/kg s.tv.) i uzorku 6 (0,99 mg/kg s.tv.). Količine metionina u uzorcima 4 (1,41 mg/kg s.tv.) i 5 (1,42 mg/kg s.tv.) razlikuju se samo u 0,01 mg/kg s.tv. aminokiseline. Metionin i cistein su najmanje zastupljene slobodne aminokiseline, među 48 istraživanih aminokiselina, prema istraživanju Zhao i sur. (2020) a detektirane su u brokuli, cvjetači i više vrsti kupusa koji su srodne raštiki.

Cistein u biljci ima ulogu održavanja homeostaze (Alvarez i sur., 2010) te je aminokiselina koja se prema rezultatima dobivenim ovim radom nalazila u najmanjoj količini u listu raštike (slika 22).



Slika 22. Koncentracija cisteina (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u listovima raštike određena LC-MS/MS metodom (N = 3)

Vrijednost dobivena u uzorku 2 (0,338 mg/kg s.tv.) daleko je najviša u usporedbi s količinama u ostalim uzorcima. Najmanja količina detektirana je u uzorku 6 i iznosi 0,116 mg/kg s.tv. te nešto više i usporedive vrijednosti imale su uzorak 3 s količinom cisteina 0,128 mg/kg s.tv. i uzorak 1 s 0,136 mg/kg s.tv. Koncentracija slobodne aminokiseline cisteina u uzorku 4 iznosi 0,70 mg/kg s.tv., a u uzorku 5 0,204 mg/kg s.tv. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima objavljenima u radu Dolemana i sur. (2017) koji kazuju da su krstašice poput kupusa i brokule te povrće iz roda *Allium* bogati cisteinom ali ne i raštika.

5. ZAKLJUČCI

- 1) LC-MS/MS metodom uspješno je identificirano i kvantificirano ukupno 17 slobodnih aminokiselina u listu raštike.
- 2) Slobodne aminokiseline s najvećom prosječnom koncentracijom su prolin, raspona koncentracije od 3237 mg/kg s.tv. do 2104 mg/kg s.tv., arginin, raspona koncentracije od 909 mg/kg s.tv. do 497 mg/kg s.tv., i alanin raspona koncentracije od 285 mg/kg s.tv. do 131 mg/kg s. tv. lista raštike.
- 3) Granične vrijednosti prosječnih koncentracija slobodne asparaginske kiseline su 110 mg/kg s. tv. i 211 mg/kg s. tv., treonina 93 mg/kg s. tv. i 198 mg/kg s. tv., serina 106 mg/kg s. tv. i 190 mg/kg s. tv., glutaminske kiseline 105 mg/kg s. tv. i 188 mg/kg s. tv., leucina 48,8 mg/kg s. tv. i 103,6 mg/kg s. tv. lista raštike.
- 4) Prosječne koncentracije slobodnog valina kretale su se u rasponu od 49,7 mg/kg s. tv. do 97,5 mg/kg s. tv., histidina od 20,3 do 92,7 mg/kg s. tv., izoleucina od 49,0 mg/kg s. tv. do 80,0 mg/kg s. tv., fenilalanina od 34,7 mg/kg s. tv. do 74,1 mg/kg s. tv., tirozina od 15,7 mg/kg s. tv. do 43,8 mg/kg s. tv. i lizina od 12,6 mg/kg s. tv. do 29,4 mg/kg s. tv.
- 5) Slobodne aminokiseline s najmanjom prosječnom koncentracijom su glicin, raspona koncentracije od 14,7 mg/kg do 9,5 mg/kg s.tv., metionin, raspona koncentracije od 2,46 mg/kg s.tv. i cistein s rasponom koncentracije od 0,338 mg/kg s.tv. do 0,116 mg/kg s.tv.

6. LITERATURA

Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA (2006) Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (*Cruciferae*): an overview. *Plant Syst Evol* **259**, 89 – 120. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z>

Abellán Á, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C (2019) Sorting out the value of cruciferous sprouts as sources of bioactive compounds for nutrition and health. *Nutrients* **11**, 1 – 22. <https://doi.org/10.3390/nu11020429>

Ahmed MA, Ban N, Hussain S, Batool R, Liu TX, Zhang YJ i sur. (2022) Preference and performance of the green peach aphid, *Myzus persicae* on three Brassicaceae vegetable plants and its association with amino acids and glucosinolates. *PLoS ONE* **17**, 1 – 22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269736>

Alvarez C, Calo L, Romero LC, García I, Gotor C (2010) An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**, 656 – 69. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147975>

Anonymus 1 (2020) *Brassica oleracea* L. var. *acephala* <https://gospodarski.hr/rubrike/rastika-ljubi-siromasna-tla/>. Pristupljeno 25. srpnja 2023.

Anonymus 2 (2023) Shema trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra u sprezi sa sustavom tekućinske kromatografije i ionizacijom elektroraspršenjem /<https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm/>. Pristupljeno 10. srpnja 2023.

Arnáiz E, Bernal J, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L (2012) Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves, *J Chromatogr A* **1250**, 49 – 53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.066>

Ayaz FA, Glew RH, Millson M, Huang HS, Chuang LT, Sanz C (2006) Nutrient contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). *Food Chem* **96**, 572 – 579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.011>

Baenas N, Fusari C, Moreno DA, Valero D, García-Viguera C (2017) Biostimulation of bioactive compounds in radish sprouts (*Raphanus sativus* ‘Rambo’) by priming seeds and

spray treatments with elicitors. *ISHS Acta Hortic* **1256**, 659 – 663.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1256.94>

Balkaya A, Yanmaz R (2005) Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. *N Z J Crop Hortic Sci* **33**, 1 – 7.
<https://doi.org/10.1080/01140671.2005.9514324>

Ballin ZN, Laursen KH (2019) To target or not to target? Definitions and nomenclature for targeted versus non-targeted analytical food authentication. *Trends Food Sci* **86**, 537 – 543. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.025>

Banerjee S, Mazumdar S (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, 1 – 41. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

Bateljka K, Goreta Ban S, Žanić K, Miloš B, Dumičić G, Matotan Z (2009) Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) hrvatskog priobalja. *Poljoprivreda* **15**, 8 – 14.

Bauer N, Tkalec M, Major N, Talanga Vasari A, Tokić M, Vitko i sur. (2022) Mechanisms of Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Tolerance to Individual and Combined Stresses of Drought and Elevated Temperature. *Int J Mo Sci* **23**, 11494.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911494>

Cartea M, Picoaga A, Soengas P, Ordás A (2003) Morphological characterization of kale populations from northwestern Spain. *Euphytica* **129**, 25 – 32.
<https://doi.org/10.1023/A:1021576005211>

Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis* **45**, 218 – 232.
Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/43663>

Coskun O (2016) Separation techniques: chromatography. *North Clin Istanb* **3**, 156 – 160.
<https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

Curtasu MV, Nørskov NP (2023) Comprehensive quantification of flavonoids and salicylic acid representative of *Salix* spp. using microLiquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry: the importance of drying procedures and extraction solvent when performing

classical solid-liquid extraction. *J Chromatogr A* **8**, 1 – 12.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464139>

de Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass spectrometry: principles and applications, 3. izd., John Wiley & Sons Ltd, str. 1, 10, 11, 85, 86.

Doleman JF, Grisar K, Van Liedekerke L, Saha S, Roe M, Tapp HS, Mithen RF (2017) The contribution of alliaceous and cruciferous vegetables to dietary sulphur intake. *Food Chem* **234**, 38 – 45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.098>

El-Aneed A, Cohen A, Banoub J (2009) Mass spectrometry, Review of the Basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev* **44**, 210 – 230.
<https://doi.org/10.1080/05704920902717872>

Fagard M, Launay A, Clément G, Courtial J, Dellagi A, Fatjad M, Krapp A, Soulié MC, Masclaux-Daubresse C (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J Exp Bot* **65**, 5643 – 5656. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru323>

Galili G, Avin-Wittenberg T, Angelovici R, Fernie AR (2014) The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Front Plant Sci* **5**, 1 – 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00447>

Gu L, Jones AD, Last RL (2007) LC-MS/MS Assay for Protein Amino Acids and Metabolically Related Compounds for Large-Scale Screening of Metabolic Phenotypes. *Anal. Chem.* **79**, 8067 – 8075. <https://doi.org/10.1021/ac070938b>

Häusler RE, Ludewig F, Krueger S (2014) Amino acids - A life between metabolism and signaling. *Plant Science* **229**, 225 – 237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.011>

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* **7**, 1456 – 1466.
<https://doi.org/10.4161/psb.21949>

Hildebrandt TM, Nesi AN, Araújo WL, Braun H-P (2015) Amino acid catabolism in plants. *Mol. Plant.* **8**, 1563 – 1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>

Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC i sur. (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3 – 12.

Horvatić A, Cindrić M (2009) Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa. *Medicina Fluminensis* **45**, 258 – 263. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/43667>

Joshi V, Joung JG, Fei Z, Jander G (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino acids* **39**, 933 – 947. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7>

Kahasy BN, Ziegler J, Imming P, Gebre-Mariam T, Neubert RHH (2021) Free amino acid contents of selected Ethiopian plant and fungi species: a search for alternative natural free amino acid sources for cosmeceutical applications. *Amino Acids* **53**, 1105 – 1122. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03008-5>

Kantoci D (2006) Uzgoj kupusnjača. *Glasnik zaštite bilja* **4**, 35.

Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner PJ (2009) Advances in amino acid analysis, *Anal Bioanal Chem* **393**, 445 – 452. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2421-1>

Kazakevich YV, LoBrutto R (2007) HPLC for Pharmaceutical Scientists, A John Wiley & Sons Inc., str. 11.

Kovačević M (2019) Identifikacija razgradnih produkata ceritiniba vezanim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti – tandemna spektrometrija masa (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kuerban A, Yaghmoor SS, Almulaiky YQ, Mohamed YA, Razvi SSI, Hasan MN, Moselhy SS, Al-Ghafari AB, Alsufiani HM, Kumosani TA, L-AL-Malki A (2017) Therapeutic Effects of Phytochemicals of Brassicaceae for Management of Obesity. *J Pharm Res Int* **19**, 1 – 11.

Kumar V, Sharma A, Kaur R, Thukral Ak, Bhardwaj R, Ahmad P (2017) Differential distribution of amino acids in plants. *Amino acids* **49**, 821 – 869. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2401-x>

Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan MT (2014) A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **944**, 166 – 174. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.017>

Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids* **39**, 949 – 962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>

Lemos M, Santin JR, Júnior LCK, Niero R, de Andrade SF (2011) Gastroprotective Activity of Hydroalcoholic Extract Obtained from the Leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in Different Animal Models. *J Ethnopharmacol* **138**, 503 – 507.

Linić I, Šamec D, Grúz J, Vujčić Bok V, Strnad M, Salopek-Sondi B (2019) Involvement of Phenolic Acids in Short-Term Adaptation to Salinity Stress is Species-Specific among Brassicaceae. *Plants* **8**, 155. <https://doi.org/10.3390/plants8060155>

Malviya R, Bansal V, Sharma PK (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *J Glob Pharma Technol.* **2**, 22 – 26.

Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS (2012) Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *JFF* **4**, 94 – 106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>

Moe LA (2013) Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *Am J Bot* **100**, 1692 – 1705. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>

N. Galić, V. Drevenkar (2016) *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Niessen WMA (2006) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3. izd, Taylor & Francis Group, str. 23.

Özcan S, Şenyuva HZ (2006) Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods. *J Chromatogr A* **1135**, 179 – 185.

Park JS (2016) Amino acid content in *Rhododendron schlippenbachii* Maxim flowers in different colors. *Biosci Biotechnol Res Asia* **13**, 1285 – 1289. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2268>

Park S, Arasu MV, Lee MK, Chun JH, Seo JM, Al-Dhabi NA, Kim SJ (2014) Analysis and metabolite profiling of glucosinolates, anthocyanins and free amino acids in inbred lines of green and red cabbage (*Brassica oleracea* L.). *LWT* **58**, 203 – 213.

Pathirana I, Thavarajah P, Siva N, Wickramasinghe AN, Smith P, Thavarajah D (2017) Moisture deficit effects on kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) biomass, mineral, and low molecular weight carbohydrate concentrations. *Sci Hort* **226**, 216 – 222. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.050>

Pavlović I, Mlinarić S, Tarkowská D, Oklestkova J, Novák O, Lepeduš H i sur. (2019) Early *Brassica* crops responses to salinity stress: A comparative analysis between chinese cabbage, white cabbage, and kale. *Front Plant Sci* **10**, 1 – 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00450>

Pavlović I, Petřík I, Tarkowská D, Lepeduš H, Vujčić Bok V, Radić Brkanac S i sur. (2018) Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected *Brassica* crops: chinese cabbage, white cabbage and kale. *Int J Mol Sci* **19**, 1 – 23. <https://doi.org/10.3390/ijms19102866>

Petritis K, Elfakir C, Dreux M (2002) A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *J Chromatogr A* **961**, 9-21. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00377-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00377-1)

Poole CF (2003) The essence of chromatography. Elsevier, str. 3.

Pott DM, Osorio S, Vallarino JG (2019) From Central to Specialized Metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Front Plant Sci* **10**, 1 – 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>

Pratelli R, Pilot G (2014) Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *J Exp Bot* **65**, 5535 – 5556. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru320>

Rai VK (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol Plant* **45**, 481 – 487.

Rakow G (2004) Species origin and economic importance of *Brassica* in biotechnology. U: Pua EC, Douglas CJ (ur.) *Brassica*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Reda T, Thavarajah P, Polomski R, Bridges W, Shipe E, Thavarajah D (2021) Reaching the highest shelf: A review of organic production, nutritional quality, and shelf life of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Plants People Planet* **3**, 308 – 318. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10183>

Rode DM, Rao NN (2019) A review on development and validation of stability indicating hplc methods for analysis of acidic drugs. *Int J Curr Pharm* **11**, 22 – 33. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2019v11i4.34939>

Rutherford SM, Gilani GS (2009) Amino Acid Analysis. *Curr Protoc Protein Sci* **58**, 11.9.1–11.9.37. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1109s58>

Salzano AM, Crescenzi M (2005) Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann Ist Super Sanitř* **41**, 443 – 450.

Sefo E, Matotan Z, Knezović Z, Karić L (2010) Evaluacija hercegovačke autohtone germplazme raštike (*Brassica oleracea* L. var *acephala*). *Sjemenarstvo* **27**, 139 – 154.

Sertić M (2013) Nove kapilarno elektroforetskei kromatografske metode u analitici statina (doktorski rad), Farmakeutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Shulaev V (2006) Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinformatics* **7**, 128 – 139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl012>

Skoog DA, West DM, Holler FJ (2016) Principles of Instrumental Analysis, 7. izd., Cengage Learning, str. 259, 697, 698, 501, 524.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2013) Fundamentals of analytical chemistry, 9. izd., Cengage Learning, str. 805.

Song Y, Xu C, Kuroki H, Liao Y, Tsunoda M. (2018) Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *J Pharm Biomed Ana.* **147**, 35 – 49. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.050>

Šamec D, Salopek-Sondi B (2019) Cruciferous (*Brassicaceae*) vegetables. U: Nabavi MS, Sanches Silva A (ured.) Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements, Academic Press, Cambridge, str. 195–202.

Šamec D, Urlić B, Salopek-Sondi B (2008) Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 2411 – 2422. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400>

Šamec D, Urlić B, Salopek-Sondi B (2019) Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 2411 – 2422. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400>

Tamvakopoulos C (2007) Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spectrom Rev* **26**, 389 – 402. <https://doi.org/10.1002/mas.20120>

Teixeira WF, Fagan EB, Soares LH, Umburanas RC, Reichardt K, Neto DD (2017) Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Front Plant Sci* **8**, 1 – 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00327>

Thammana M (2016) A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J Pharm Anal* **5**, 22 – 28.

Thavarajah D, Thavarajah P, Abare A, Basnagala S, Lacher C, Smith P i sur. (2016) Mineral micronutrient and prebiotic carbohydrate profiles of USA-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *J Food Compos Anal* **52**, 9 – 15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.003>

Thiele B, Füllner K, Stein N, Oldiges M, Kuhn AJ, Hofmann D (2008) Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* **391**, 2663 – 2672. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2167-9>

Tiller PR, Romanyshyn LA, Neue UD (2003) Fast LC/MS in the analysis of small molecules. *Anal Bioanal Chem* **377**, 788 – 802. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2146-0>

Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L (2013) Biochemistry a short course, 2. izd., W.H. Freeman and Company, str. 35, 36.

Ursić I (2016) Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka (Specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Violi JP, Bishop DP, Padula MP, Steele JR, Rodgers KJ (2020) Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC* **131**, 1 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116018>

Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R (2013) Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**, 1290–1310. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217380>

Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S (1997) A Global View of LC-MS, Global View Publishing, Pittsburg.

Yocum AK, Chinnaiyan AM (2009) Current affairs in quantitative targeted proteomics: multiple reaction monitoring-mass spectrometry. *Brief funct genomics proteomics* **8**, 145–157. <https://doi.org/10.1093/bfgp/eln056>

Zeier J (2013) New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ* **36**, 2085–2103. <https://doi.org/10.1111/pce.12122>

Zhao L, Zhao X, Xu Y, Xiaowei L, Zhang J, He Z (2020) Simultaneous determination of 49 amino acids, B vitamins, flavonoids, and phenolic acids in commonly consumed vegetables by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem* **344**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128712>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Diana Grizelj izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Diana Grizelj

Vlastoručni potpis