

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA KOSEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

V LJUBLJANI, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA KOSEC

**RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE
AMINOKISLIN V PROTEINIH S TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI**

**DEVELOPING A METHOD FOR AMINO ACID
ANALYSIS IN PROTEINS BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

V LJUBLJANI, 2016

Mesto izdelave in mentor magistrske naloge

Raziskovalni del magistrske naloge sem opravil na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvo doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm. Liofilizacijo sem izvajal na Katedri za farmacevtsko tehnologijo ob pomoči ge. Mojce Keržan.

Zahvala

Za nasvete, pomoč in usmerjanje pri izvajanju laboratorijskega dela in pisanju magistrske naloge se zahvaljujem mentorju doc. dr. Jožku Cesarju. Zahvala gre tudi ge. Meti Mulej in ge. Martini Tekavec za uporabne nasvete pri laboratorijskem delu in pomoč pri iskanju kemikalij. Zahvaljujem se tudi ge. Mojci Keržan za liofiliziranje vzorcev.

Še posebej se zahvaljujem domačim za podporo med študijem ter za potrpljenje med pisanjem magistrske naloge. Najlepša hvala tudi vsem sošolcem in prijateljem za izjemo prijetna leta študija.

Zahvalil bi se rad tudi vsem, s katerimi sem imel možnost sodelovati v okviru ŠSFFA, ŠSUL, DŠFS, ŠSSFD, IPSF ter najrazličnejših organov in služb FFA in UL. V veliko čast in zadovoljstvo mi je bilo sodelovati z vami pri izboljševanju kakovosti pedagoškega dela na UL in krepitvi položaja študentov kot enakovrednih sogovornikov pri pomembnih strateških odločitvah.

Naj zaključim z mislijo, ki se mi je med vsemi temi letu najbolj vtisnila v spomin: "Spoštujte svoje sogovornike in nikoli se ne boste napačno odločili." Hvala vam.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo, kot zaključno delo Enovitega magistrskega študija Farmacije, izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

V Ljubljani, 2016

Luka Kosec

Senat Fakultete za farmacijo je na seji 28. novembra 2014 odobril temo in določil komisijo za zagovor v sestavi:

1. Predsednica: prof. dr. Marija Bogataj
2. Mentor: doc. dr. Jožko Cesar
3. Član: doc. dr. Bojan Doljak

Vsebina

1. Uvod	1
1.1 Lastnosti aminokislin	2
1.2 Aminokislinska analiza	4
1.2.1 Vzorci	5
1.2.2 Hidroliza proteinov	5
1.2.3 Derivatizacija in kromatografsko ločevanje proteinskih hidrolizatov	6
1.2.4 Ovrednotenje rezultatov	8
1.3 Proteinska prehranska dopolnila	9
1.3.1 Mleko in mlečni proteini	9
2. Namen in načrt dela.....	11
3. Materiali in metode	13
3.1 Reagenti, standardi in vzorci	13
3.2 Naprave in druga laboratorijska oprema	17
3.3 Metode.....	19
3.3.1 Protokol za izvedbo aminokislinske analize	19
3.3.2 Metode za vrednotenje sprememb pri optimizaciji	23
3.3.3 Ovrednotenje metode za aminokislinsko analizo	25
4. Rezultati	26
4.1 Optimizacija analizne metode	26
4.2 Identifikacija kromatografskih vrhov	34
4.2.1 Čistost kromatografskih vrhov	36
4.2.2 Identifikacija neidentificiranih vrhov	36
4.2.3 Ponovljivost retencijskega časa.....	37
4.3 Kvantifikacija odzivov	40
4.3.1 Vpliv hidrolize na STVZ.....	40
4.3.2 Ponovljivost metode in injiciranja.....	41
4.3.3 Linearnost.....	43
4.3.4 Odzivnost	44

Razvoj metode za določanje aminokislin v proteinih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti	
4.3.5 Kalibracija	45
4.4 Analiza vzorcev in ovrednotenje rezultatov	46
4.4.1 Vizualni pregled vzorcev	46
4.4.2 Določanje vsebnosti in skladnosti s specifikacijami	46
5. Razprava.....	49
5.1 Izvedba in optimizacija metode.....	50
5.2 Identifikacija aminokislin.....	57
5.3 Kvantifikacija odzivov	59
5.4 Izgled vzorcev in določanje vsebnosti	61
6. Zaključek	63
7. Literatura	64
8. Priloge	70
Priloga 1: Pregled lastnosti aminokislin.....	70
Priloga 2: Pregled farmakopejskih metod za izvedbo aminokislinske analize	74
Priloga 3: Podatki o mlečnih proizvodih.....	77
Priloga 4: UDP, gradient in spiranje po sekvenci za izvedbo aminokislinske analize.....	78
Priloga 5: Optimizacija 11	81
Priloga 6: Optimizacija 15	82

Povzetek

Analizno vrednotenje proteinov je zapleteno in zahteva uporabo najrazličnejših analiznih tehnik. Ena od njih je aminokislinska analiza. Osnovna cilja te magistrske naloge sta bila uspešno razviti metodo za izvajanje aminokislinske analize ter jo uporabiti pri določanju aminokislin in celokupnih proteinov na izbranih vzorcih proteinskih prehranskih dopolnil.

Metodo smo izvajali z uporabo kislinske hidrolize, avtomatizirane derivatizacije in reverzno fazne kromatografije. Celoten postopek smo izvajali v vialah za kromatografijo z minimalnim številom prenosov vzorca. Izhodiščne raztopine vzorcev smo posušili z liofilizacijo. Hidrolizo smo izvajali v tekoči fazi s 6 M HCl in 1 % fenolom ob 24 urnem segrevanju pri 110°C. Po hidrolizi smo preostalo kislino uparili. Derivatizacijo smo izvedli z uporabo avtomatskega vzorčevalnika za HPLC in programa za derivatizacijo, ki ga definira uporabnik. Uporabili smo orto-ftalaldehid (OPA) za primarne ter fluorenilmetyloksikarbonil klorid (FMOC-Cl) za sekundarne amine. Med optimizacijo smo dodali stopnje za mešanje reakcijske zmesi in spiranje avtomatskega vzorčevalnika, s čimer smo izboljšali odzivnost aminokislin ter omogočili povezljivost med sekvencami. Za reverzno fazno kromatografijo smo uporabili mešanice fosfatno-boratnega pufra s pH 8,2 in organsko fazo sestavljeni iz metanola, acetonitrila in vode. Zadrževanje na koloni in ločljivost med aminokislinami smo izboljšali z znižanjem hitrosti pretoka mobilne faze iz 2 mL/min na 1,5 mL/min, z zmanjšanjem začetne elucije iz 2 % na 1 % organske faze in znižanjem naklona gradiента na 51 % organske faze.

Za določanje istovetnosti smo uporabili retencijski in relativni retencijski čas, saj so se alternativni postopki temelječi na UV-VIS spektrih izkazali za neustrezne. Ugotovili smo, da hidroliza ne vpliva na linearost odzivov in na relativne površine pod vrhovi, a vpliva na absolutne vrednosti površin pod krivuljo kromatografskih vrhov. Ustrezno točno smo uspeli kalibrirati 8 od 18 aminokislin in celokupne proteine, kar kaže na potrebo po dodatnem razvoju metode.

S končno metodo smo analizirali 10 vzorcev proteinskih prehranskih dopolnil. Postavljenim zahtevam ustrezata 2 vzorca, ostali imajo odstopanja večja od postavljenih tolerančnih območij.

Ključne besede

Aminokislinska analiza, program za derivatizacijo, ki ga definira uporabnik, proteinska prehranska dopolnila.

Abstract

Analytical characterisation of proteins is complicated and requires many different techniques, one of them being amino acid analysis. The goals of our research were to successfully develop a method for performing amino acid analysis and to use it on selected protein dietary supplements.

To perform the analysis we used acidic hydrolysis, automatic derivatization and reverse column chromatography. The entire procedure was carried out using chromatography vials with few sample transfers. Initial samples were dried using lyophilisation. Hydrolysis occurred in liquid phase using 6 M HCl and 1 % phenol heated at 110°C for 24 h. The remaining acid was evaporated. Derivatization was accomplished by using autosampler and user defined programme (UDP). As reagents we used orto-phtalaldehyde (OPA) for primary and fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) for secondary amines. During optimisation special steps were added for stirring the reaction mixture and for washing the automatic injector. These steps contributed to the improved amino acid detectability and enable sequence to sequence connectivity. Reverse phase chromatography was performed using a phosphorous-borate buffer of 8,2 pH and organic phase composed of methanol, acetonitrile and water. Retention and resolution of selected amino acid derivates were improved by lowering the flow rate from 2 mL/min to 1,5 mL/min, by lowering the initial stage of elution to 1 % of organic phase and by lowering the gradient peak to 51 % of organic phase.

For identification of amino acids retention time and relative retention time were used as other protocols using UV-VIS spectra were found to be inadequate. Hydrolysis was found to have no influence on linearity of analytical responses and their relative parameters but decreased the absolute surface of chromatographic peaks. During calibration 8 out of 18 amino acids and total protein content were found to have sufficient accuracy. This result was attributed to need for additional optimisation.

Selected 10 protein dietary supplements were analysed using the finalised method. Out of them only 2 were found to be suitable, others were found to be outside of the specified criteria.

Key words

Amino acid analysis (AAA), User-defined programme (UDP), Protein dietary supplements.

Seznam okrajšav

Razvoj metode za določanje aminokislin v proteinih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

AK: aminokislina	NMR: jedrska magnetna resonanca
Seznam okrajšav aminokislin je v prilogi 1.	OPA: ortoftalaldehid
AUC: površina pod krivuljo kromatografskega vrha	Rf: referenčna vrednost v standardu
AUC/IS: kvocient med površino pod krivuljo kromatografskega vrha aminokisline in površino pod krivuljo internega standarda, tudi relativna površina	RNK: ribonukleinska kislina
BSA: goveji serumski albumin	RSD: relativna standardna deviacija
CP: celokupni proteini	S: skladnost
D: derivatizacija	Sf: specificirana vrednost v vzorcu
DNK: dezoksiribonukleinska kislina	ST: standard
Δ: relativno odstopanje od referenčne vrednosti	Seznam okrajšav standardov aminokislin je v preglednici VI.
FMOC-Cl: 9-Fluorenilmetilkloro format	STFMOC: standard za identifikacijo ostankov FMOC-Cl
H: višina kromatografskega vrha	STOPA: standard za identifikacijo ostankov OPA
H/IS: kvocient med višino kromatografskega vrha aminokisline in višino internega standarda, tudi relativna višina	STVZ: standard vzorca
HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	STVZ-H: standard vzorca, ki je bil izpostavljen enakim pogojem kot jih uporabljamo za hidrolizo vzorca
ID: identifikacija	TLC: tankoplastna kromatografija
IS: interni standard	tR: retencijski čas
LPH: hidroliza v tekoči fazi	tR/IS: relativni retencijski čas
MPA: 3-merkaptopropionska kislina	U: ustreznost
MF: mobilna faza	UDP: injekcijski program avtomatskega vzorčevalnika za kromatografijo, ki ga definira uporabnik
ND: ni zaznano	V: vsebnost
	VPH: hidroliza v plinasti fazi

1. Uvod

Proteini v bioloških sistemih zavzemajo posebno mesto, saj so povezani z izvršilnimi funkcijami ter manj z energijskimi rezervami (ogljikovi hidrati ter maščobe) in shranjevanjem informacij (DNK in RNK) (1,2). Te funkcije obsegajo encimske, hormonske, strukturne, obrambne, transportne, skladiščne, regulatorne in receptorske sposobnosti (3). Kljub širokemu naboru bioloških vlog so si proteini struktурno sorodni. Sestavljeni so iz osnovnega aminokislinskega zaporedja temelječega na genskem zapisu, ki se zaradi togosti amidne vezi ter sekundarnih interakcij med stranskimi verigami aminokislin zvije v kompleksne prostorske strukture (4). Izven bioloških sistemov so pomembni na treh področjih: za biotehnološko pridobivanje snovi (3), kot biološka zdravila (5,6) in v prehrani (1,7).

Pri biotehnološkem pridobivanju snovi se uporabljo encimi zaradi njihovih visoko specifičnih katalitičnih sposobnosti za izvajanje kemijskih pretvorb, ki drugače ne bi bile možne ali bi imele nizke izkoristke (3,8).

Biološka zdravila v farmaciji predstavljajo pomembno vejo učinkovin (6,9), saj z njimi lahko nadomeščamo pomanjkanje fiziološko pomembnih proteinov ali tarčno specifično odstranjujemo posamezne strukture iz organizma (nadomestni hormoni, monoklonska protitelesa in fuzijski proteini) (10). Uporabljo se za zdravljenje diabeta (inzulin), motenj v krvni sliki (eritropoetin, filigrastin), rakavih obolenj (transtuzumab) in avtoimunih bolezni (adalimumab, etanercept, toclizumab) (5,10). Pridobivajo se s tehnologijo rekombinantne DNK (5). V zadnjem času pomemben analizni ter zakonodajni izziv predstavljajo biološko primerljiva zdravila (11).

Proteini v prehrani predstavljajo pomemben vir esencialnih in neesencialnih aminokislin (1). V prebavilih se razgradijo do aminokislin, ki se absorbirajo in uporabijo za endogeno sintezo proteinov (1,12). Na podlagi vsebnosti proteinov razdelimo živila v tri večje skupine: (I) živila z vsebnostjo proteinov nad 20 % (meso, ribe, jajca, oreščki, semena, mlečni proizvodi in stročnice), (II) živila z vsebnostjo proteinov med 6 % in 14 % (riž, pšenica, oves, proso in ječmen) in (III) živila z vsebnostjo proteinov pod 5 % (sadje in zelenjava) (1). Za posameznike, ki potrebujejo večji dnevni vnos proteinov ali posameznih aminokislin, so na voljo tudi prehranska dopolnila z višjo vsebnostjo proteinov (1,7). Uporaba proteinskih prehranskih dopolnil se je še najbolj uveljavila pri profesionalnih in amaterskih športnikih (10,13,14). Uporabljo se tudi pri bolnikih, ki zaradi izjemne izgube telesne mase potrebujejo podporno prehransko terapijo z ustreznimi visoko kaloričnimi izdelki (15) ali imajo zaradi genetskih motenj omejen nabor razpoložljive hrane (16).

1. Uvod

Zaradi vse obsežnejše uporabe proteinskih proizvodov se povečuje nevarnost pojavljanja nekakovostnih, nevarnih in neučinkovitih izdelkov na tržišču, saj je njihova analitika še vedno zelo zapletena, počasna in nespecifična (17). Glavni problem je iskanje ustreznih kazalnikov, ki bi omogočali ovrednotenje strukture in funkcionalnosti proteina v pripravku z ozirom na predvideno področje uporabe in potrebe uporabnika (3). Če je proteinski pripravek namenjen prehranski uporabi, služi predvsem kot vir aminokislin. Pomembni analizni parametri so celokupna vsebnost proteinov, aminokislinski profil in celokupna fiziološka uporabnost (13,18–20). Če mora protein po aplikaciji izkazovati farmakološki učinek, je njegova analitika kompleksnejša (2,3). Z ustreznim analiznim protokolom je potrebno zagotoviti njegovo istovetnost, vsebnost ter funkcionalnost. To dosežemo z uporabo nadomestnih kazalnikov (katalitična aktivnost ali imunokemijske metode) (21). Za računalniško načrtovanje funkcionalnosti in sidranja na proteinih potrebujemo dodatne kristalografske, rentgenske in NMR podatke (22).

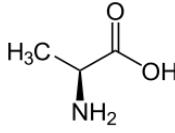
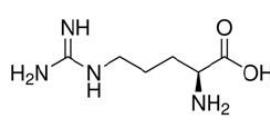
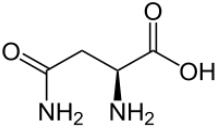
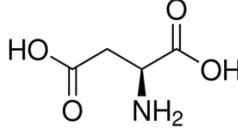
Glavne nevarnosti pri uporabi teh proizvodov so odsotnost učinkovitosti zaradi neustrezne proizvodnje in shranjevanja, imunogenost ter prisotnost anorganskih nečistoč (1,14). Poleg tega se na trgu pojavljajo tudi proizvodi, ki so analizno ustrejni zaradi prirejene sestave in ne zaradi dejanske skladnosti (23,24). V prihodnosti tako težimo k razvoju novih tehnik in izboljševanju obstoječih, da bi lahko zagotavljali ustrezeno kakovost, varnost in učinkovitost proteinskih proizvodov na vseh področjih njihove uporabe. Večina metod uporabnih v farmaciji in prehranski industriji je sistematično opisana v farmakopejah (25–27) in metodah Združenja uradnih kmetijskih kemikov (28).

1.1 Lastnosti aminokislin

Aminokisline so organske spojine, ki hkrati vsebujejo aminske in karboksilne skupine (8). Najpomembnejše so derivati 2-amino karboksilne kisline, ki imajo na isti α -ogljkikov atom hkrati vezano aminsko in karboksilno skupino, saj so osnovni gradniki proteinov in peptidov višjih organizmov (2,3). Preostali substitucijski mesti na mestu 2 zasedata vodik in poljubna stranska skupina (glej sliko 1) (29). Strukture proteinogenih aminokislin so predstavljene v preglednici I. Več informacij o strukturnih lastnostih aminokislin je v prilogi 1.

Preglednica I. Pregled proteinogenih aminokislin in njihovih struktur (3).

Ime aminokisline in njena kemijska struktura (3)

Alanin	Arginin	Asparagin	Asparaginska kislina
			

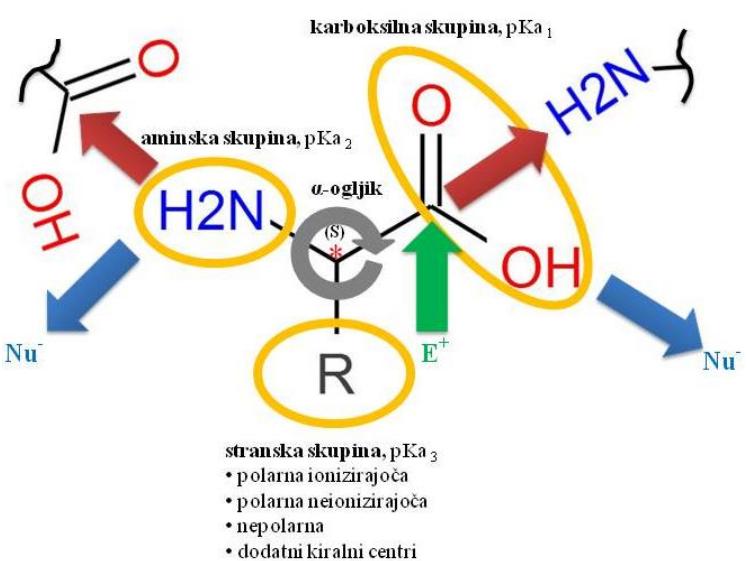
1. Uvod

Cistein	Fenilalanin	Glicin	Glutaminska kislina
Glutamin	Histidin	Izolevcin	Levcin
Lizin	Metionin	Prolin	Serin
Tirozin	Treonin	Triptofan	Valin

Aminokisline se preko amidne vezi na α -ogljiku (glej sliko 1) povezujejo v peptide, ki vsebujejo do 100 aminokislinskih fragmentov, in proteine, ki vsebujejo nad 100 aminokislinskih fragmentov (3,30,31).

Aminokisline so optično aktivne spojine. Kiralni center se nahaja na α -ogljiku (razen pri glicinu) in v stranski verigi (izolevcin in treonin). Konfiguracija proteinogenih aminokislín na α -ogljiku je (L) oziroma (S), samo pri cisteinu (R) (22). (D) oziroma (R) aminokisline so prisotne v nižjih organizmih in pri določenih bolezenskih stanjih (3).

Aminokisline izkazujejo vsaj dve pK_a vrednosti za karboksilno (pK_1) in aminsko skupino (pK_2) na mestu 2 ter dodatne za ionizirajoče skupine v stranski verigi (pK_3) (glej sliko 1). Zaradi elektronskih vplivov je karboksilna skupina bolj kisla ($pK_a < 2,5$) in aminská skupina manj bazična ($pK_a < 10$) od analognih karboksilnih kislin ($pK_a \approx 4,8$) in aminov ($pK_a \approx 10,6$) (3).



Slika 1. Shematski pregled lastnosti aminokislín (3). Navedeni so: posamezne funkcionalne skupine (oranžno) in njihove pK_a vrednosti, α -ogljik in njegova najpogostejsa konfiguracija, smeri povezovanja v proteinih (rdeči puščici), nukleofilni centri (modri puščici) ter elektrofilni center (zelena puščica). Pri stranski skupini so navedene tudi možnosti za njeno strukturno variabilnosti.

1. Uvod

Aminokisline so zelo polarne (22,32) in dobro topne spojine, kadar je ionizirana samo ena od dveh funkcionalnih skupin na α -ogljiku (22).

Pri vrednostih pH, kjer sta obe skupini na α -ogljiku ionizirani, pride do nastanka notranje soli oziroma iona dvojčka (glej sliko 2), ki močno zmanjša topnost (32).

Topnost je pri teh pH odvisna predvsem od lastnosti stranske verige (8). V vodnih raztopinah izkazujejo pH okoli 6, od tega odstopajo samo tiste, ki imajo v stranski verigi močne ionizirajoče skupine (glutamat: $pK_{a3} = 3,4$ in arginin: $pK_{a3} = 11$). Zaradi medsebojnih ionskih vplivov med aminokislinsnimi v raztopini je topnost posamezne aminokisline v mešanicah večja od topnosti za čisto aminokislino (22).

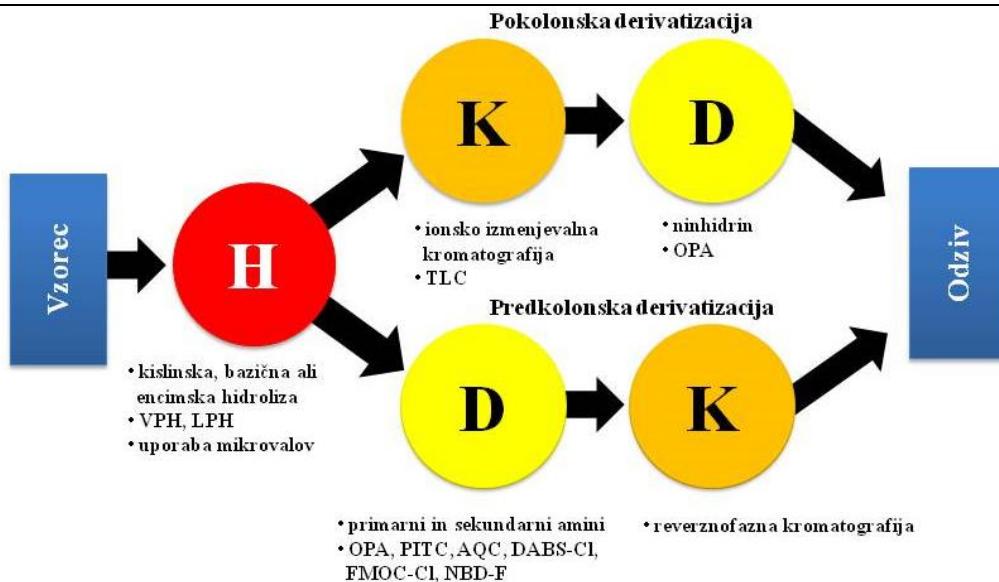
Aminokisline so reaktivne na več mestih v svoji strukturi (glej sliko 1) (22). Na α -ogljiku so prisotne nukleofilna primarna aminska skupina, nukleofilen karboksilatni anion in elektrofilna karbonilna skupina. Za optimalno reaktivnost morajo biti skupine ustrezno ionizirane (33). Reakcije na aminsko skupino moramo izvajati pri pH nad 8 in na karboksilno skupino pri pH pod 3 (8). Prolin je cikliziran do sekundarnega amina (8), zato izkazuje drugačno reaktivnost in drugačen kot amidne vezi (3).

Aminokisline ne absorbirajo UV-VIS valovanja, saj v svoji osnovni strukturi nimajo ustreznih kromofornih funkcionalnih skupin (34). Izjema so aromatske aminokisline (fenilalanin, histidin, tirozin in triptofan) in cistein. Ostalim aminokislinskim je za UV-VIS detekcijo potrebno z derivatizacijo pripeti ustrezne kromofore (glej prilog 2) (32).

1.2 Aminokislinska analiza

Aminokislinska analiza sodi med analizne metode uporabne pri vrednotenju proteinov, saj omogoča določanje aminokislinske sestave vzorca. To omogoča določanje istovetnosti, vsebnosti, čistosti ter celokupnih proteinov (25,35).

Metoda je sestavljena iz treh tehnik (glej sliko 3): hidrolize, derivatizacije in kromatografije (36). Kisilnska hidroliza s 6M HCl pri 110°C 24 ur sklopljena z ionsko izmenjevalno kromatografijo in nihidrinsko detekcijo je najstarejši in izhodiščni način aminokislinske analize (37). Ogromno raziskovalnega dela je bilo vloženega v izboljševanje posameznih stopenj osnovne metode, ki v konceptu ostaja enaka (35,36). Farmakopejske tehnike za izvedbo aminokislinske analize so zbrane v prilogi 2.



Slika 3. Shematska predstavitev aminokislinske analize. Navedene so vse tri stopnje in z njimi povezani analizni parametri: hidroliza (H), kromatografija (K) in derivatizacija (D). Reagenti za hidrolizo so podrobneje predstavljeni v prilogi 2.

1.2.1 Vzorci

Z metodo lahko določimo vsebnost aminokislin v vsakem vzorcu, ki vsebuje aminokisline, peptide ali proteine. Določamo lahko sestavo proteinov ali prostih aminokislin v zmeseh aminokislin, čistih proteinih, vzorcih prehranske industrije ali bioloških vzorcih (30,35,38). Vzorcem moramo pred analizo odstraniti komponente, ki bi lahko motile natančnost analize ali poškodovale kromatografsko kolono (38). Ker je čiščenje vzorcev dolgotrajno in vključuje izgube, ga izvajamo šele, ko količina preostalih snovi presega 10% (30). Pred hidrolizo je potrebno vzorec popolnoma posušiti (30).

1.2.2 Hidroliza proteinov

Hidroliza je razgradnja večjih molekul z adicijo vode na kemijske vezi (8). Termodinamska ugodnost poteka razgradnje je odvisna od stabilnosti osnovne vezi (39). Zaradi dodatne elektronske stabilizacije sodi amidna vez v proteinih med stabilnejše kemijske vezi, zato so za njen hidrolizo potrebni ostri pogoji (29).

Za izvajanje aminokislinske analize mora biti hidroliza neodvisna od oblike, naboja ali funkcionalnosti proteina, saj ga mora popolnoma in nespecifično razgraditi do osnovnih gradnikov (30). Hidroliza ni potrebna pri hidroliziranih vzorcih, zmeseh aminokislin ali pri določanju prostih aminokislin (25). Hidroliza je najpočasnejši korak metode (40), pri katerem pogosto pride tudi do sprememb v vzorcu (25). Z uporabo alternativnih načinov hidrolize lahko zmanjšamo čas hidrolize, razgradnjo aminokislin in razširimo spekter določevanja. Farmakopejske metode za hidrolizo so zbrane v prilogi 2.

1. Uvod

Pri klasični hidrolizi so zaradi prisotne kisline in oksidativne atmosfere triptofan, glutamin in asparagin popolnoma uničeni (35), količine serina, treonina, tirozina, metionina in cisteina se znižajo (41). Ker je amidna vez med valinom in izolevcinom stabilnejša ter zahteva daljše čase hidrolize, so rezultati lahko lažno zmanjšani (42).

Tehnično hidrolizo izvedemo v tekoči ali plinasti fazi v inertni ali evakuirani atmosferi (25). Standardno vzorec prepihamo z argonom ali dušikom, dodamo kislino neposredno v vzorec, hermetično zapremo in hidroliziramo v pečici pri predpisanih pogojih (25). Glavni problem je, da je po reakciji potrebno kislino odstraniti ali nevtralizirati, saj lahko moti derivatizacijo in poškoduje kromatografski sistem. To storimo z odparevanjem, ponovno liofilizacijo ali nevtralizacijo kisline (38). Alternativno lahko kislino dodamo v isti vsebnik, vendar prostorsko ločeno od vzorca, ostali koraki ostanejo isti. Po hidrolizi kisline ni potrebno upariti in ne hlapne kislinske nečistoče ne kontaminirajo vzorca. Slednja metoda je boljša, a ima nizko kapaciteto (35).

Priporočen čas klasične hidrolize je vsaj 24 ur, pri tem je potrebno upoštevati nevarnosti tako premajhne hidrolize proteina kot prevelike razgradnje nastalih aminokislin (25). Ob sumu na nezadostno hidrolizo je potrebno čas podaljšati na 48 ur ali 72 ur (38). Hidroliza z mikrovalovi močno skrajša potreben čas segrevanja reakcijske zmesi (iz 24 ur na 30 min) (33,35). Glavni problem je nizka kapaciteta postopka (43).

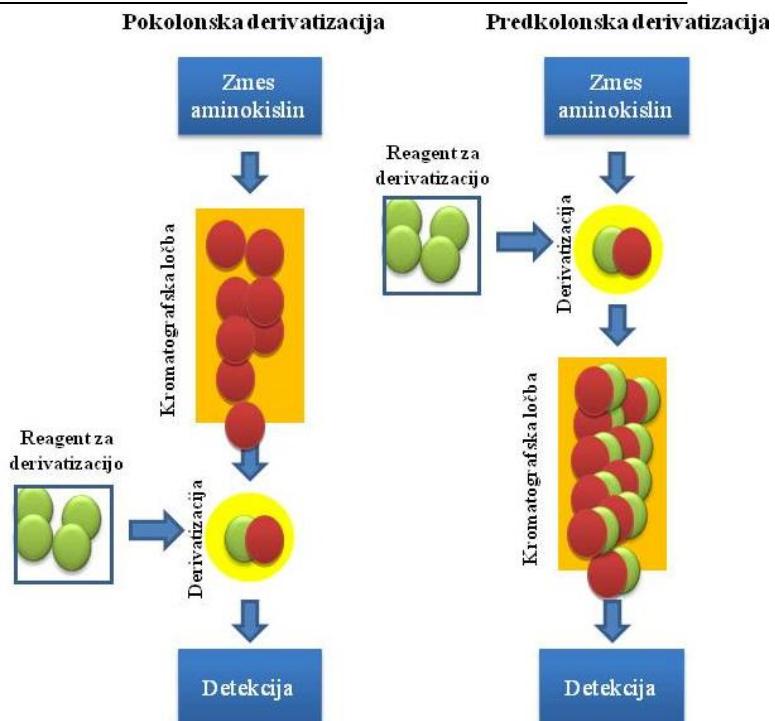
Nobena od opisanih metod ni idealna (38). V realnem raziskovalnem okolju smo omejeni predvsem z dostopno tehnično opremo. V splošnem je metoda izbora klasična kislinska hidroliza, ki jo za potrebe širjenja spektra določljivih aminokislin (25), časovne optimizacije (40) in profila nečistoč (35) lahko dopolnimo z drugimi metodami. Vendar je to velikokrat povezano s podaljševanjem postopka ter vključevanjem vzporednih hidroliz in analiz za isti vzorec (25).

1.2.3 Derivatizacija in kromatografsko ločevanje proteinskih hidrolizatov

Derivatizacija je kemijska tehnika, ki z dodajanjem funkcionalnih skupin na osnovni skelet spreminja fizikalno-kemijske lastnosti struktur (33,44,45). Uporabljam jo kot zadnjo možnost pri razvoju novih metod, saj podaljša čas analize, poveča kompleksnost vzorcev in zmanjša ponovljivost (44). Aminokisline so polarne spojine z nizko molarno absorptivnostjo, zato jih pred reverzno fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) derivatiziramo s funkcionalnimi skupinami, ki zmanjšajo polarnost ter omogočijo spektrofotometrično določanje (32). Uporabimo lahko katero od 8 farmakopejskih metod (25–27) (glej prilogo 2) ali katero od zaščitnih skupin (8,33,45). Derivatizacijo izvedemo pred ali po ločevanju analitov na koloni (glej sliko 4) (25). Pokolonska derivatizacija se izvede tako,

1. Uvod

da mobilna faza po koloni teče skozi ogrevan reaktor, kjer se zmeša z reagentom. Prisotni amini se derivatizirajo, detektor jih zazna in izriše kromatogram (46). Pri predkolonski derivatizaciji reagente dodamo v vzorec ter po določenem času nastalo reakcijsko zmes vodimo na kolono. Lahko jo izvedemo tudi avtomatizirano (glej poglavje 1.2.3.1) (27). Na koloni se nato porazdeljuje celotna reakcijska zmes, katere sestava se po detekciji izriše na kromatogramu.



Slika 4. Primerjava pred- in pokolonske derivatizacije.

Pokolonska derivatizacija je neodvisna od zaostalih pufrov v vzorcu, zahteva večje količine proteinov ($5 \mu\text{g}$) in ne vpliva na ločbo, uporablja se predvsem v povezavi z ionsko izmenjevalno in tankoplastno kromatografijo (TLC) (25–27,47). Predkolonska derivatizacija je veliko bolj občutljiva (od $0,5 \mu\text{g}$), a močno občutljiva na zaostale pufre v vzorcih in značilno vpliva na ločbo, saj se na koloni namesto aminokislin porazdeljujejo njihovi derivati ali več derivatov in reagenti, uporablja se v povezavi z reverznofaznim HPLC (25,32,35). Pri obeh metodah je potrebno posebno skrb nameniti zaščiti kolon, saj lahko zaostala HCl in reagenti za derivatizacijo uničijo stacionarno fazo in zmanjšujejo kakovost ločbe (25–27).

1.2.3.1 Avtomatizirani sistemi za injiciranje

Za izvajanje avtomatizirane derivatizacije mora biti kromatograf opremljen s sistemom za avtomatsko injiciranje. Sistem je sestavljen iz ventila za injiciranje, dodatne zanke, pomožnega bata in robotske roke (48,49). Posledično sta omogočena injiciranje vzorca v mobilno fazo ob nemotenem pretoku mobilne faze in s konstantnim volumnom ter pretok vzorca in tekočin za spiranje skozi vijak in zanko neodvisno od pretoka mobilne faze (48,50). Tak sistem, poleg osnovnega injiciranja vzorca, omogoča avtomatizirano pripravo vzorcev s pomočjo injekcijskega programa, ki ga definira uporabnik (UDP) (48). Posamezne komponente pripravimo v viale, ki jih injektor v skladu z UDP sam zmeša in injicira (primer takega programa je v prilogi 4). Avtomatizacija je zlasti primerna pri vzorcih, kjer ročna priprava lahko signifikantno vpliva na zanesljivost rezultatov (48,50,51).

1.2.4 Ovrednotenje rezultatov

V okviru aminokislinske analize zajamemo dva tipa podatkov: o prisotnosti posameznih aminokislin in o količini posameznih aminokislin (34). Podatke o prisotnosti in količini posameznih aminokislin uporabimo za identifikacijo in kvantifikacijo proteinov in njihovih nečistoč.

Identifikacija aminokislin poteka na osnovi enakoležnih vrhov identifikacijskih standardov, ki so kemijsko enaki vzorcu, in pripadajočih UV-VIS spektrov (52). Za njeno zanesljivost mora sistem zagotavljati ponovljive retencijske čase in ustrezno ločljivost vrhov, saj zaradi velikega števila analitov lahko pride do prekrivanja ali zamenjave posameznih signalov (25). Identifikacija proteinov je možna, ker so nekatere aminokisline v proteinih izredno redke (triptofan, metionin, histidin, cistein in arginin (30)) ali edinstvene (hidroksiprolin (30), lizin in prosti lizin, lizinoalanin, 3-metilhistidin, D- in L- aminokisline (38)), ker so razmerja med posameznimi aminokislinami za posamezen protein zelo specifična in ker nekateri proteini posameznih aminokislin sploh nimajo (30).

Ovrednotenje vsebnosti aminokislin poteka na osnovi primerjave odzivov kvantifikacijskega standarda aminokislin pred in po hidrolizi ter vzorca (26,34,53). Za zanesljivo določitev mora sistem zagotavljati ustrezno ponovljivost in linearnost (25). Pri podajanju rezultatov je potrebno opozoriti na potencialno drugačne dejanske vrednosti zaradi zaostalih dipeptidov in uničenja posameznih aminokislin (26). Pri čistem proteinu s poznano sestavo je možno količino posamezne aminokisline določiti znotraj 10 % teoretično pričakovane vrednosti (30). Zaradi številnih spremenljivk, ki lahko vplivajo na končni rezultat analize, je potrebno nadzorovati tudi ustreznost metode (25). Pridobljeni rezultati brez ustreznosti nadzornih parametrov niso reprezentativni (52). Za nadzor poteka hidrolize in s tem zagotavljanje količinske ustreznosti določene aminokislinske sestave se uporablja prečiščen protein s poznano sestavo, večinoma goveji serumski albumin (25). Zaradi številnih procesov, ki so vpleteni v pripravo in analizo vzorcev, sta priporočljivi uporaba internega standarda, s katerim je omogočena primerjava med posameznimi individualnimi vzorci, in hidroliza zunanjega standarda (52).

1.3 Proteinska prehranska dopolnila

Prehranska dopolnila so živila, s katerimi lahko uporabniki dopolnjujejo običajno uravnoteženo prehrano. So koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom. Lahko vsebujejo tudi aminokisline, maščobne kisline, vlaknine, rastline in rastlinske izvlečke, mikroorganizme ter druge snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, pod pogojem, da je njihova varnost v prehrani ljudi znanstveno utemeljena. Pri označevanju, predstavljanju in oglaševanju se prehranskim dopolnilom ne sme pripisovati lastnosti preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh (54–56). Za varno uporabo mora prehransko dopolnilo imeti ustrezno sestavo ter oznake. Pri določanju ustreznosti prehranskih dopolnil uporabljamо tolerančna območja, ki so odvisna od potencialne biološke aktivnosti ali toksičnosti posamezne sestavine (57).

Proteinska prehranska dopolnila predstavljajo podskupino, ki vključuje več tipov pripravkov: proteinski praški, proteinske tablice, nadomestki obrokov, hidrolizirani proteini in čiste aminokisline (58–61). Uporablja se pri bolnikih, ki imajo moteno preskrbo s posameznimi esencialnimi aminokislinami ali trpijo zaradi splošne ali bolezenske malnutrikcije povezane s stradanjem, bruhanjem, diarejo, opeklinami, rakom ali poškodbami skeleta (12). Uporaba posameznih aminokislin je odsvetovana, saj ni potrebna in lahko moti absorpcijske mehanizme preostalih aminokislin. Povečana celokupna proteinska preskrba ustrezno uravna nivoje vseh esencialnih aminokislin (13). Poleg tega je absorpcija aminokislin veliko boljša v obliki di- ali tri peptidov (12). Kljub omejenim dokazom o učinkovitosti je uporaba omenjenih preparatov široko razširjena pri profesionalnih in amaterskih športnikih z namenom izboljšanja mišične hipertrofije po športnem naporu (10,62). Povečan vnos proteinov ne vpliva signifikantno na razvoj mišične mase ob stalnih enakomernih športnih naporih, vendar ob hkratni neustrezni energijski preskrbi predstavlja pomemben vir metabolnega pridobivanja ogljikovih hidratov (3,63). Povečan vnos je smiseln samo nekaj prvih tednov ob pričetku vadbe (13).

1.3.1 Mleko in mlečni proteini

Mleko je disperzija bele do belo-rumene barve, ki vsebuje približno 86 % vode, 7 % sladkorjev, 5 % maščob, 1 % proteinov, različnih organskih kislin, mineralov in vitaminov v različnih terciarnih strukturnih oblikah (glej prilogo 3).

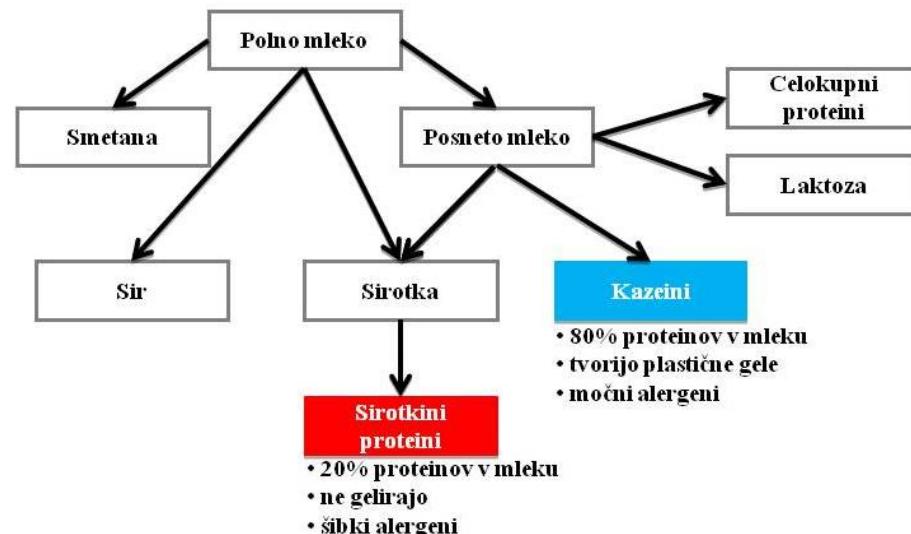
Proteine v mleku delimo na podlagi selektivnegaobarjanja iz posnetega mleka na kazeine in sirotkine proteine (glej sliko 5) (17,22). Kazeini so hidrofobni fosfoproteini, ki predstavljajo 80 % proteinov v posnetem kravjem mleku, najpomembnejša predstavnika sta α_1 -kazein in β -kazein. Pridobivajo se s kislo fermentacijo,obarjanjem v kislem ali s pomočjo encimske hidrolize (22). Zaradi hidrofobnosti v

1. Uvod

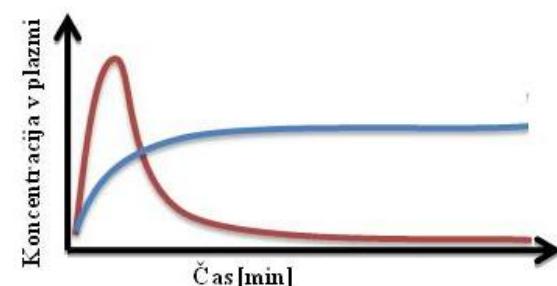
vodnih medijih asocirajo v micle preko kalcijevih ionov in hidrofobnih interakcij ter tvorijo plastične gele (64,65). Sirotkini proteini so hidrofilni globularni proteini, ki predstavljajo 20 % proteinov v posnetem kravjem mleku, najpomembnejša predstavnika sta β -laktoglobulin in α -laktoalbumin. Pridobivamo jih iz sirotke, supernatanta priobarjanju kazeinov, z izhlapevanjem vode ali demineralizacijo preko ionske izmenjave ali elektrodialize (22).

Za uporabo v prehranski industriji je potrebno te produkte še dodatno posušiti in obdelati za zmanjšanje alergenosti ter povečanje hitrosti absorpcije (22,64). Koncentrati izoliranih proteinov predstavljajo najbolj osnovni proizvod, saj vsebujejo še zaostale maščobe, laktozo in so potencialno alergeni (66). Izolati imajo odstranjene maščobe in laktozo z ultrafiltracijo in centrifugiranjem (22). Hidrolizati so še dodatno encimsko obdelani (67).

Kazeini imajo najpočasnejšo hitrost absorpcije, saj v prebavilih tvorijo plastičen gel, ki počasi sprošča aminokisline. Sirotkini proteini imajo večjo konstantno absorpcijo, saj jo omejuje samo hitrost proteolize (21,65,61). Hidrolizati se absorbirajo najhitreje, saj so že razgrajeni do dipeptidov, ki se lahko neposredno absorbirajo (12) (glej sliko 6). Alergenost se manjša z manjšanjem proteinov. Tako so najbolj alergogeni kazeini in najmanj hidrolizati (67).



Slika 5. Shematska predstavitev obdelave polnega mleka do kazeinov (modro) in sirotkinih proteinov (rdeče) (17,22). Poleg obeh produktov so navedene tudi njune najpomembnejše lastnosti.



Slika 6. Prikaz razlike v porastu koncentracije aminokislín v plazmi po zaužitju pripravka s sirotkini proteini (rdeče) in kazeini (modro) (13,14,64). Vrh koncentracije aminokislín iz sirotkinih proteinov nastopi po približno 30 min.

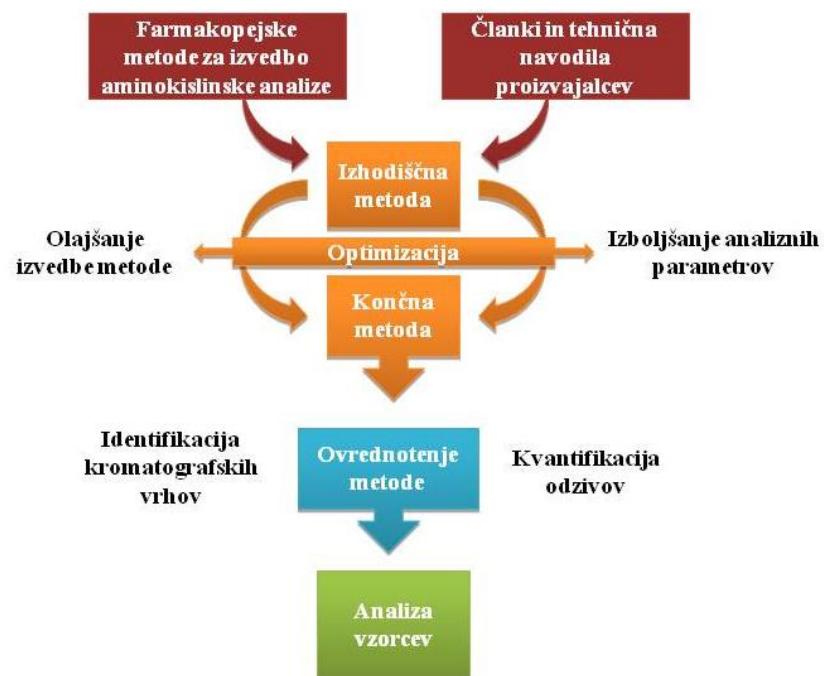
2. Namen in načrt dela

Proteinska prehranska dopolnila so široko uporabljeni dodatki k športni prehrani. Zakonsko spadajo pod živila (54,55), zato so zahteve za njihovo kakovost, varnost in učinkovitost drugačne od teh, ki smo jih navajeni pri zdravilih. Vsa prehranska dopolnila na trgu morajo biti varna, kakovostna in se jim ne sme pripisovati indikacij (54,56). Drugačne zahteve za ustreznosti proizvodov dostopnih na tržišču, se pogosto odražajo v njihovi manj zanesljivi kakovosti (19,20).

Namen magistrske naloge je preveriti ustreznost izbranih proteinskih prehranskih dopolnil dostopnih na slovenskem tržišču. To bomo storili s primerjanem skladnosti med njihovimi specificiranimi in analizno določenimi vsebnostmi za posamezne aminokisline ter celokupne proteine. Za skladne bomo smatrali vrednosti, ki so znotraj 10% referenčne (kalibracija) ali specificirane (vzorci) vrednosti (25,30). Neustreznosti izdelkov zaradi neskladnosti drugih sestavin, zlasti onesnaževal, pesticidov, aditivov in nosilcev, ne bomo preverjali (57). Za njihovo ovrednotenje bomo postavili in optimizirali metodo za izvedbo aminokislinske analize (25–28), ki bo vključevala sodobne pristope k pripravi vzorcev za kromatografijo (68,69). Osnovna ideja je torej povezati tri analizno zanimiva področja: aminokislinsko analizo, avtomatizirane kromatografske postopke in ustreznost proteinskih prehranskih dopolnil.

Zaradi dvodelnosti namena našega dela, smo si postavili dva ločena cilja, ki se medsebojno nadgrajujeta.

V prvem delu želimo postaviti metodo za izvedbo aminokislinske analize, ki je enostavna, se izvede s čim manj prenosi vzorca, je visoko avtomatizirana in ima visoko kapaciteto. Nato bomo v drugem delu s postavljenim in optimizirano



Slika 7. Pregled posledja izvedbe magistrske naloge.
določili aminokislinske profile ter jih primerjali z njihovimi specifikacijami.

2. Namen in načrt dela

Delo bomo pričeli s pregledom farmakopejskih metod za izvedbo aminokislinske analize (glej sliko 7). Na podlagi navodil za izvedbo aminokislinske analize bomo izbrali metodi za hidrolizo proteinov in derivatizacijo nastalih hidrolizatov pred ločevanjem na kromatografski koloni (25–27). Praktične informacije o postavitvi metode bomo pridobili iz tehničnih navodil proizvajalcev avtomatskih vzorčevalnikov (48,50,70,71). Na podlagi zbranih informacij bomo postavili osnovno metodo, ki jo bomo v nadaljevanju optimizirali. Namena optimizacije sta olajšanje njene izvedbe in izboljšanje analiznih parametrov. Pri obeh bomo poskušali sistematično iskati ključne šibke točke ter spremembe kvantitativno ovrednotiti. Končni metodi bomo ovrednotili ustrezne parametre za zanesljivo določanje identitete in vsebnosti izbranih analitov (72). Pridobljene rezultate bomo uporabili na izbranih proteinskih prehranskih dopolnilih.

Zaradi večplastnosti načrtovanega raziskovalnega dela smo si pred začetkom postavili več hipotez:

- (I) Variabilnost retencijskega časa in relativnega retencijskega časa (tR in tR/IS) med sekvencami s svežimi reagenti in mobilnimi fazami je pod 10 %. Variabilnost je manjša pri relativnem retencijskem času (34,52).
- (II) Identifikacija na osnovi UV-VIS spektrov je bolj primerna od identifikacije na osnovi retencijskega časa (70,71).
- (III) Absolutni odzivi aminokislin se v STVZ-H glede na STVZ zmanjšajo (73,74). Sprememba relativnih parametrov odziva (AUC/IS in H/IS) je odvisna od stabilnosti opazovane aminokisline v primerjavi s stabilnostjo internega standarda.
- (IV) Odzivi so linearno odvisni od koncentracije (30,37,46).
- (V) Postavljena optimizirana analizna metoda določa vsebnosti posameznih aminokislin in celokupnih proteinov v standardnem proteinu znotraj 10 % od referenčne vrednosti (25–27).
- (VI) Rezultati določanja skladnosti med specificiranimi ter analizno določenimi vsebnostmi za aminokisline ter celokupne proteine v vzorcih so večinoma izven okolice 10 % sprejemljivega odstopanja. Posledično predvidevamo, da bo večina vzorcev neustreznih (20). Vrednosti medsebojno primerjamo le pri analiznih rezultatih, kjer analiza referenčnega proteina ustrezajo hipotezi (V).

3. Materiali in metode

3. Materiali in metode

Poglavlje o materialih in metodah je razdeljeno v več sklopov: reagenti, standardi in vzorci, naprave in laboratorijska oprema ter metode.

3.1 Reagenti, standardi in vzorci

V preglednicah II in III so predstavljeni uporabljeni reagenti, standardi za določanje istovetnosti (ID) in vsebnosti (V) ter vzorci. Navedeni so podatki o imenu, čistosti, proizvajalcu in uporabi v okviru te magistrske naloge. Podatki so pridobljeni iz primarne ali sekundarne ovojnине.

Preglednica II. Pregled uporabljenih reagentov.

Ime kemikalije in čistost [%]	Proizvajalec	Uporaba
Borna kislina, za analizo in kromatografijo, >99,8	Kemika, Zagreb, Hrvaška	Reagent za pripravo pufra za reagenta A in B
Natrijev hidroksid, pelete za analizo, >98	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Reagent za uravnavanje pH MFA in reagenta D
Kalijev hidroksid, pelete, za analizo, >85	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija	Reagent za uravnavanje pH pufra za derivatizacijo
Cetripur ® Pufrna raztopina, pH 7.00 (25°C)	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	Pufer za umerjanje pH metra
Cetripur ® Pufrna raztopina, pH 10.00 (25°C)	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	Pufer za umerjanje pH metra
di-Natrijevtetraborat-dekahidrat, za analizo, 99,5 – 103,0, Na₂B₄O₇·10H₂O	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	Reagent za pripravo MFA in reagenta D
Natrijev fosfat dibazični dihidrat, 98,5 – 101,0, Na₂HPO₄·2H₂O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Reagent za pripravo MFA in reagenta D
Metanol za HPLC, 99,9	Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija	Topilo za pripravo MFB
Acetonitril za HPLC, 99,9	J.T.Baker, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska	Topilo za pripravo MFB
Izopropanol za HPLC, 99,9	J.T.Baker, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska	Topilo za pripravo MFC
Ortoftalaldehid, za HPLC, >99.0 (OPA)	Tokyo Chemical Industry CO., Tokio, Japonska	Reagent za pripravo reagenta B

3. Materiali in metode

3-Merkaptopropionska kislina, 99+ (MPA)	Acros Organics, Geel, Belgija	Reagent za pripravo reagenta B
9-Fluorenilmetilkloro format, 98 (FMOC-Cl)	Acros Organics, Geel, Belgija	Reagent za pripravo reagenta C
Acetonitril, 99,9, zelo suh, z molekulske siti, AcroSeal®	Acros Organics, Geel, Belgija	Topilo za pripravo reagenta C
Ortofosforna kislina, za HPLC, >85	Fischer Chemical, Leicestershire, Združeno Kraljestvo	Reagent za pripravo reagenta D

Preglednica III. Pregled uporabljenih enokomponentnih standardov.

Ime kemikalije in čistost [%]	Proizvajalec	Uporaba
L-Alanin, 99	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe,	
L-Arginin, 99	Nemčija	Standard za ID
	Fluka Chemie AG, Buchs,	
L-Asparaginska kislina, 99,5	Švica	Standard za ID
L-Cistin, 99	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
	Schuchardt, Muenchen,	
L-Cistein, ~99,5	Nemčija	Standard za ID
L-Fenilalanin, >99	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
	Merck KGaA, Darmstad,	
Glicin, za analizo, >99	Nemčija	Standard za ID
L(+)-Glutaminska kislina, 99	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
L-Histidin, 98	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
L-Izolevcin, 99	Acros Organics, Geel, Belgija	Standard za ID
L-Levcin, brez metionina, 99	Mann Assayed Biochemicals, Mann research laboratories, INC, New York, Združene države Amerike	Standard za ID
L-Lizin monohidroklorid, ne živalskega izvora, >98,5	Kemika, Zagreb, Hrvaška	Standard za ID
L-Metionin, >99	Bachem, Bubendorf, Švica	Standard za ID
L-Prolin, ne živalskega izvora, 99,5	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Standard za ID
L-Serin, ne živalskega izvora, 99,5	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Standard za ID
L-Tirozin, ne živalskega izvora, 99,9	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Standard za ID

3. Materiali in metode

	SIGMA-ALDRICH Chemie	
L-Treonin, 100,0	GmbH, Steinheim, Nemčija	Standard za ID
	Tokyo Chemical Industry	
L-Triptofan, >98,5	CO., Tokijo, Japonska	Standard za ID in V
L-Valin, ne živalskega izvora, 99,9	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	Standard za ID
		Interni standard za določanje
L(+)-Norvalin, 99	Acros Organics, Geel, Belgija	primarnih aminokislin
		Interni standard za določanje
Sarkozin, 98	Acros Organics, Geel, Belgija	sekundarnih aminokislin
	Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija	Standard za identifikacijo
Amonijak 25 (kot NH₃)		ostankov OPA
	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	Standard za identifikacijo
Dietilamin za sintezo, >99		ostankov FMOC-Cl

V preglednicah IV in V so predstavljeni uporabljeni večkomponentni standardi in vzorci. Navedeni so podatki o imenu, sestavi, molekulski formuli in molekulski masi, proizvajalcu in uporabi v okviru te magistrske naloge. Podatki so pridobljeni iz primarne ali sekundarne ovojnine ali označenih virov. Sestava je podana kot [g / 100 g] pripravka. Vrednost celokupnih proteinov je označena s CP.

Preglednica IV. Uporabljena večkomponentna standarda.

Ime standarda in sestava	Proizvajalec	Uporaba
Standard aminokislin – analizni standard	Fluka Analytical, SIGMA-ALDRICH	Standard za
Mešanica aminokislin po specifikaciji (75)	Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija	kalibracijo
Ala, Amonijev Klorid, Arg, Asp, Glu, Gly, Hys, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val	Cistin	
2,50 µmol/mL +/- 4%	1,25 µmol/mL +/- 4%	
Standard proteina – 2mg/vialo	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim,	Standard za
Goveji serumski albumin (22)	Nemčija	kalibracijo
Asp Glu Ser Hys Gly Thr Cys Arg Ala Tyr Val Met Trp Phe Ile Leu Lys Pro		
10,9 16,5 4,2 4 1,8 5,8 6,5 5,9 6,3 5,1r 5,9 0,8 0,6 6,6 2,6 12,3 12,8 4,8		

3. Materiali in metode

Preglednica V. Seznam vzorcev in pregled njihove sestave.

Ime standarda in sestava		Proizvajalec		Uporaba		
Weider® Microfiltrated CFM whey protein (Izolat sirotkinih proteinov, CFM neutral) (59)		Weider Global Nutrition LLC, Phoenix, Arizona, Združene države Amerike		Vzorec 1		
89,5	CP	9,76 Asp	12,62 Glu			
5,42	Asp	8,23	13,5 Glu			
13,5	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,979	Ser	3,798	Ser			
1,8	Hys	2,216	Hys			
1,35	Gly	1,187	Gly			
3,453	Thr	5,618	Thr			
0,321	Cys	1,583	Cys			
2,892	Arg	1,583	Arg			
2,49	Ala	3,086	Ala			
4,658	Tyr	2,928	Tyr			
5,622	Val	3,798	Val			
2,409	Met	1,82	Met			
1,044	Trp	1,187	Trp			
4,176	Phe	2,137	Phe			
3		4,417	Ile			
1,4	Trp	4,194	Ile			
5,9	Val	7,63	Leu			
2,2	Met	8,7	Leu			
3	Phe	9,1	Lys			
6,4	Ile	7,99	Pro			
10,6	Leu					
9,6	Lys					
5,5	Pro					
The Whey Isolate, čokoladni okus (58)		The Nutrition, T.H.E d.o.o., Ribnica, Slovenija	Vzorec 2			
87,5	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
74,5	Asp	1,8 Hys	1,52 Gly			
1,8	Hys	1,8 Hys	1,52 Gly			
1,35	Gly	1,35 Gly	1,52 Gly			
3,453	Thr	5,618	Thr			
0,321	Cys	1,583	Cys			
2,892	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
2,49	Ala	3,086	Ala			
4,658	Tyr	2,928	Tyr			
5,622	Val	3,798	Val			
2,409	Met	1,82	Met			
1,044	Trp	1,187	Trp			
4,176	Phe	2,137	Phe			
3		4,417	Ile			
1,4	Trp	4,194	Ile			
5,9	Val	7,63	Leu			
2,2	Met	8,7	Leu			
3	Phe	9,1	Lys			
6,4	Ile	7,99	Pro			
10,6	Leu					
9,6	Lys					
5,5	Pro					
The Whey, čokoladni okus (58)		The Nutrition, T.H.E d.o.o., Ribnica, Slovenija	Vzorec 3			
87,33	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
74,5	Asp	1,8 Hys	1,52 Gly			
13,5	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,979	Ser	3,798	Ser			
1,8	Hys	2,216	Hys			
1,35	Gly	1,187	Gly			
3,453	Thr	5,618	Thr			
0,321	Cys	1,583	Cys			
2,892	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
2,49	Ala	3,086	Ala			
4,658	Tyr	2,928	Tyr			
5,622	Val	3,798	Val			
2,409	Met	1,82	Met			
1,044	Trp	1,187	Trp			
4,176	Phe	2,137	Phe			
3		4,417	Ile			
1,4	Trp	4,194	Ile			
5,9	Val	7,63	Leu			
2,2	Met	8,7	Leu			
3	Phe	9,1	Lys			
6,4	Ile	7,99	Pro			
10,6	Leu					
9,6	Lys					
5,5	Pro					
The Casein, čokoladni okus (58)		The Nutrition, T.H.E d.o.o., Ribnica, Slovenija	Vzorec 4			
87,33	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
74,5	Asp	1,8 Hys	1,52 Gly			
13,5	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,979	Ser	3,798	Ser			
1,8	Hys	2,216	Hys			
1,35	Gly	1,187	Gly			
3,453	Thr	5,618	Thr			
0,321	Cys	1,583	Cys			
2,892	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
2,49	Ala	3,086	Ala			
4,658	Tyr	2,928	Tyr			
5,622	Val	3,798	Val			
2,409	Met	1,82	Met			
1,044	Trp	1,187	Trp			
4,176	Phe	2,137	Phe			
3		4,417	Ile			
1,4	Trp	4,194	Ile			
5,9	Val	7,63	Leu			
2,2	Met	8,7	Leu			
3	Phe	9,1	Lys			
6,4	Ile	7,99	Pro			
10,6	Leu					
9,6	Lys					
5,5	Pro					
Organic naturya hemp protein		Naturya, Bath, Združeno Kraljestvo	Vzorec 5			
Konopljine beljakovine v prahu						
CP	50	Ni podatkov o aminokislinskem profilu.				
Impact whey protein, čokoladni okus (66)		The Nutrition, T.H.E d.o.o., Ribnica, Slovenija	Vzorec 4			
82	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
11	Asp	8,23	13,5 Glu			
18,1	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,6	Ser	3,798	Ser			
1,7	Hys	2,216	Hys			
1,4	Gly	1,187	Gly			
6,7	Thr	5,618	Thr			
2,2	Cys	1,583	Cys			
2,1	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
5	Ala	3,086	Ala			
2,6	Tyr	2,928	Tyr			
5,9	Val	3,798	Val			
2,2	Met	1,82	Met			
1,4	Trp	1,187	Trp			
3	Phe	4,176	Phe			
6,4	Ile	4,417	Ile			
10,6	Leu	7,63	Leu			
9,6	Lys	8,7	Leu			
5,5	Pro	9,1	Lys			
8,84		9,99	Pro			
Impact whey protein, vanilijev okus (66)		Myprotein, Northwich, Združeno Kraljestvo	Vzorec 6			
82	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
11	Asp	8,23	13,5 Glu			
18,1	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,6	Ser	3,798	Ser			
1,7	Hys	2,216	Hys			
1,4	Gly	1,187	Gly			
6,7	Thr	5,618	Thr			
2,2	Cys	1,583	Cys			
2,1	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
5	Ala	3,086	Ala			
2,6	Tyr	2,928	Tyr			
5,9	Val	3,798	Val			
2,2	Met	1,82	Met			
1,4	Trp	1,187	Trp			
3	Phe	4,176	Phe			
6,4	Ile	4,417	Ile			
10,6	Leu	7,63	Leu			
9,6	Lys	8,7	Leu			
5,5	Pro	9,99	Pro			
Impact whey protein, vanilijev okus (66)		Myprotein, Northwich, Združeno Kraljestvo	Vzorec 7			
82	CP	9,09 Asp	1,8 Hys			
11	Asp	8,23	13,5 Glu			
18,1	Glu	1,052	13,5 Glu			
4,6	Ser	3,798	Ser			
1,7	Hys	2,216	Hys			
1,4	Gly	1,187	Gly			
6,7	Thr	5,618	Thr			
2,2	Cys	1,583	Cys			
2,1	Arg	1,89 Arg	1,97 Arg			
5	Ala	3,086	Ala			
2,6	Tyr	2,928	Tyr			
5,9	Val	3,798	Val			
2,2	Met	1,82	Met			
1,4	Trp	1,187	Trp			
3	Phe	4,176	Phe			
6,4	Ile	4,417	Ile			
10,6	Leu	7,63	Leu			
9,6	Lys	8,7	Leu			
5,5	Pro	9,99	Pro			

3. Materiali in metode

Sokol nutrition 100% Whey	Sokol Group d.o.o., Ljubljana, Slovenija	Vzorec 8
CP 70	Ni podatkov o aminokislinskem profilu.	
Sokol nutrition 100% Whey Concentrate	Sokol Group d.o.o., Ljubljana, Slovenija	Vzorec 9
CP 90	Ni podatkov o aminokislinskem profilu.	
Eiweiß 100, čokoladni okus	Megamax, Aachen, Nemčija	Vzorec 10
CP 78,5	Ni podatkov o aminokislinskem profilu.	

Tekoči dušik: Messer Slovenija, d.o.o, Slovenija.

Argon: Messer Slovenija, d.o.o, Slovenija.

Destilirana in bidestilirana voda sta bili pridobljeni na Fakulteti za farmacijo.

3.2 Naprave in druga laboratorijska oprema

Kromatografski sistem (HPLC): DIONEX Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific, Nemčija
Sistem omogoča delo pri tlaku do 600 bar. Je opremljen z binarno črpalko za mešanje pri visokem tlaku, termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom in termostatiranim prostorom za kolono ter z detektorjem na diodni niz.

- stojalo za topila: DIONEX UltiMate 3000, SRD 3600, UHPLC⁺ focused (76),
- črpalka: DIONEX UltiMate 3000, HPG-3400SD, UHPLC⁺ focused (77),
- avtomatski injektor: DIONEX UltiMate 3000, WPS-3000TSL, UHPLC⁺ focused (49),
- prostor za kolono: DIONEX UltiMate 3000, TCC-3000SD, UHPLC⁺ focused (78),
- diodni detektor: DIONEX UltiMate 3000, DAD-3000 (RS), UHPLC+ focused (79) in

Programska oprema: DIONEX Chromeleon 7.1 SR2, Thermo Scientific, ZDA.

Kromatografske kolone:

- Kolona 1: Kinetex 2.6u C18 100A 100x4,6 mm, 3µm, Phenomenex, ZDA,
- Kolona 2: Thermo Scientific BDS Hypersil C18 100x4,6 mm, 3µm,
- Kolona 3: Thermo Scientific ODS Hypersil 100x4,6 mm, 3µm,
- Kolona 4: Thermo Scientific Accucore C18 100x4,6 mm, 2,6 µm,
- Kolona 5: Thermo Scientific BDS Hypersil C18 125x4 mm, 3µm in
- Predkolona: BDS Hypersil C18 3 Thermo 3UM 10x4 mm.

Proizvajalec kolon od 2 do 5 in predkolone je Thermo Scientific, ZDA.

Sušilnik: UFE 500, Memmert, Schwabach, Nemčija.

Naprava za merjenje pH (pH meter): MP220, Mettler Toledo, Ohio, ZDA. pH meter je bil pred analizo dvotočkovno umerjen na pH 7.00 in pH 10.00 s pufroma za umerjanje.

Precizna tehnica: KERN EG 2200-2NM, KERN & SOHN GmbH, Nemčija.

Analitska tehnica: Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo, Ohio, ZDA.

3. Materiali in metode

Ultrazvočna kad: Sonis 4 GT, Iskra PIO d.o.o., Slovenija.

Magnetno mešalo z grelcem: IKA®- RET CV, IKA®-WERKE GmbH & Co, Staufen, Nemčija. Zraven smo uporabljali 30 mm dolge in 10 mm široke magnete.

Rotavapor: R-215, Buechi, Švica.

Liofilizator: Christ Beta 1-8 LD, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Nemčija.

Hladilnik in zmrzovalnik: HZS156 RF3183W, Gorenje, Slovenija.

Avtomatska pipeta in tipsi: Biohit M1000 mLNE 100-1000 µL, Biohit Oyj, Finska.

Avtomatska pipeta in tipsi: Transferpette® 10-100 µL, Brand GmbH, Westheim, Nemčija.

Viale z navojem: 2 mL, ambr, WrtOn, cert, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Viale za stiskanje: 2 mL, clr, cert, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Modri pokrovi z navojem: 11 mm, PTFE/s, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Zeleni pokrovi z navojem: 11 mm, PTFE/S, 100/PK, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Aluminijasti pokrovi za stiskanje: 11 mm crimp, PTFE/S, 100/PK, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Ročni stiskač za viale z 11 mm pokrovom: Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA.

Ročni odpirač za viale za 11 mm pokrovom: Thermo Scientific, Langerwehe, Nemčija.

Termometer: Silber Brand 805203, Brand, Steinheim, Nemčija.

Filtri za vzorce (0,45 µm filtri): Minisart® RC25 17765, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija.

Filtri iz acetatne celuloze: 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija.

Igle: 0,90 x 40 mm, 20 G x 1,5, Braun, B. Braun Melsungen AG, Nemčija.

Plastične brizge: Braun Injekt 5 mL Luer Solo, Braun, B. Braun Melsungen AG, Nemčija.

Steklovina: polnilne bučke, merilni valji, laboratorijske steklenice in čaše ustreznih volumnov, oprema za nučiranje velikih volumnov, tehtalni čolni, spatule in žlice.

3. Materiali in metode

3.3 Metode

Metode so razdeljene v več delov: (I) metoda za izvedbo aminokislinske analize, (II) postopek optimizacije izhodiščne metode, (III) ovrednotenje analizne metode ter (IV) analiza vzorcev.

3.3.1 Protokol za izvedbo aminokislinske analize

Predstavljena je končna metoda za izvedbo aminokislinske analize, ki temelji na virih (32,70,71). Spremembe v metodi so označene z "optimizacija" in posebej predstavljene v poglavju 4.1.

3.3.1.1 Priprava mobilnih faz, reagentov in standardov

Priprava mobilnih faz (priporočena je priprava 2 L MFA na 1 L MFB (70)):

- Mobilna faza A (MFA) (70) (optimizacija 1): Natehtamo 1,78 g Na₂HPO₄·2H₂O in 3,8 g Na₂B₄O₇·10H₂O ter raztopimo v bidestilirani vodi do 1 L. Po sonificiranju in mešanju na magnetnem mešalu uravnamo pH na 8,2 s koncentrirano HCl. Pred uporabo filtriramo s presesavanjem skozi acetatni filter. Pripravimo dnevno svež.
- Mobilna faza B (MFB) (70): Zmešamo 450 mL acetonitrila za HPLC, 450 mL metanola za HPLC in 100 mL bidestilirane vode. Pripravimo po potrebi.
- Mobilna faza C (MFC): Zmešamo 100 mL izopropanola za HPLC in 900 mL bidestilirane vodi. Pripravimo po potrebi.

Osnovne raztopine za pripravo reagentov:

- 0,4 M boratni pufer (25) (optimizacija 2): Natehtamo 12,4 g H₃BO₃ in 10 g KOH ter počasi dodamo bidestilirano vodo do 500 mL. Po sonificiranju in mešanju na magnetnem mešalu uravnamo pH na 10,2 z 1 M KOH. Po pripravi filtriramo s presesavanjem skozi acetatni filter. Shranujemo v hladilniku na 5°C. Pred nadaljnjo uporabo filtriramo potrebni volumen skozi 0,45 µm filter.
- Raztopina OPA (70): Natehtamo 500 mg OPA in ga raztopimo v 10 mL metanola za HPLC. Shranujemo prepihano z argonom v zamrzovalniku na -20°C.
- Raztopina FMOC-Cl (70): Natehtamo 25 mg FMOC-Cl in ga raztopimo v 10 mL brezvodnega acetonitrila. Shranujemo prepihano z argonom v zamrzovalniku na -20°C.

Priprava reagentov za derivatizacijo (reagente sveže pripravimo pred vsako analizo iz osnovnih raztopin neposredno v viale z navojem) (70):

- Reagent A: 500 µL 0,4 M boratnega pufra filtriranega skozi 0,45 µm filter.
- Reagent B: Zmešamo 200 µL raztopine OPA, 100 µL čiste 3-merkaptopropionske kisline ter 800 mL 0,4 M boratnega pufra filtriranega skozi 0,45 µm filter.
- Reagent C: 500 µL raztopine FMOC-Cl.
- Reagent D (optimizacija 3): 1 mL MFA in 0,4 mL koncentrirane H₃PO₄ za HPLC.

3. Materiali in metode

Reagent za hidrolizo (6 M HCl + 1 % fenola) (25): V erlenmajerico nalijemo 30 mL bidestilirane vode ter vanjo počasi dodamo 52 mL koncentrirane HCl. Po ohladitvi dopolnimo do 100 mL z bidestilirano vodo in dodamo 1,1 g fenola. Shranujemo prepipano z argonom v hladilniku na 5°C.

Osnovne raztopine standardov:

- Interni standard (IS) (70): 23,4 mg norvalina in 17,8 mg sarkozina raztopimo z 0,1 M HCl do 20,0 mL. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Raztopina BSA: V vialo, ki vsebuje 1,98 mg BSA, dodamo 4,94 mL bidestilirane vode in raztopimo (po specifikaciji na ovojnini). Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Raztopina aminokislin (optimizacija 4): 1 mL analiznega standarda aminokislin prenesemo iz primarne ovojnine z 1 mL bidestilirane vode. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Standardi posameznih aminokislin: Znano količino posamezne aminokisline (potrebne količine so navedene v preglednici VI) individualno raztopimo v 10 mL 0,1 M HCl ter dopolnimo do 25,0 mL z bidestilirano vodo, da dobimo približno 1 M raztopine. Pri razapljanju si pomagamo z ultrazvočno kadjo. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.

Preglednica VI. Seznam količin potrebnih za pripravo osnovnih standardov posameznih aminokislin.

Aminokislina (okrajšava standarda)	Molska masa [g/mol]	Natehta za 25,0 mL raztopine [mg]
Alanin (STALA)	98,09	2,5
Arginin (STARG)	174,20	4,5
Asparaginska kislina (STASP)	133,10	3,5
Cistein (STCYS)	120,15	3,0
Fenilalanin (STPHE)	165,19	4,0
Glicin (STGLY)	75,07	2,0
Glutaminska kislina (STGLU)	147,13	3,5
Histidin (STHIS)	155,15	4,0
Izolevcin (STILE)	131,17	3,0
Levcin (STLEU)	31,17	1,0
Lizin (STLYS)	146,19	3,5
Metionin (STMET)	149,21	3,5
Prolin (STPRO)	115,13	3,0
Serin (STSER)	105,09	2,5
Tirozin (STTYR)	181,19	4,5
Treonin (STTHR)	119,12	3,0
Triptofan (STTRP)	204,22	5,0
Valin (STVAL)	117,15	3,0

3. Materiali in metode

Priprava analiznih standardov (v viale z navojem):

- Standard vzorca (STVZ) (70): Zmešamo 100 µL IS, 100 µL STTRP, 400 µL raztopine aminokislin in 400 µL bidestilirane vode. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Standard vzorca izpostavljenega enakim pogojem kot jih uporabljamo za hidrolizo vzorcev (STVZ-H): STVZ izpostavimo enakim pogojem priprave kot vzorce. Pripravimo sveže z vsako serijo hidrolize. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Standard za kalibracijo (STBSA) (25): Zmešamo 125 µL raztopine BSA, 100 µL IS in 775 µL bidestilirane vode. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.

Odmerjanje standardov za identifikacijo (pred analizo v viale z navojem):

- Standardi za identifikacijo (oznake odvisne od aminokisline): V vialo prenesemo 500 µL osnovnega standarda posamezne aminokisline. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Standard za identifikacijo ostankov OPA (STOPA) (80,81): V vialo prenesemo 500 µL 25 % amonijaka. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.
- Standard za identifikacijo ostankov FMOC-Cl (STFMOC) (80,81): V vialo prenesemo 500 µL dietilamina za sintezo. Shranujemo zamrznjeno na -20°C.

Sestavljeni standarde za določanje linearnosti odziva pripravimo kot je predstavljeno v preglednici VII.

Preglednica VII. Priprava STVZ za določanje linearnosti.

Ime standarda	Raztopina aminokislin [µL]	IS [µL]	STTPH [µL]	Bidestilirana voda [µL]
200	200	50	50	700
300	300	75	75	550
STVZ in 400	400	100	100	400
500	500	125	125	250
600	600	150	150	100

Redčene standarde za določanje linearnost odziva pripravimo z redčenjem STVZ-H in slepe po hidrolizi. Po hidrolizi vsebino viale prenesemo v 2 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake. Po premešanju odvzamemo 1 mL, in ga filtriramo skozi 0,45 µL filter v vialo z navojem ter preostanku v bučki dolijemo bidestilirano vodo do oznake. Ponovimo štirikrat.

3.3.1.2 Hidroliza

Za vzorce uporabimo čiste proteine, mešanice proteinov, čiste aminokisline ali mešanice aminokislin, kjer neproteinske sestavine ne presegajo 10 % vsebnosti (30). Raztopine vzorcev pripravimo z dispergiranjem 0,5 g vzorca v 250 mL bidestilirane vode (optimizacija 5), pri tem si pomagamo s sonificiranjem. Pustimo stati vsaj 30 minut. Vzorčimo po premešanju v nekaj urah od priprave. Odvzamemo 1 mL, ga prenesemo v vialo za stiskanje (optimizacija 6) in dodamo 100 µL IS. Za vsak vzorec celoten proces izvedemo v treh paralelnih vialah.

3. Materiali in metode

Vzopredno z vzorci enakim pogojem izpostavimo tudi slepo raztopino, STVZ ter STBSA. Splei preizkus izvedemo na 1 mL bidestilirane vode.

Viale zamrznemo s tekočim dušikom (optimizacija 7) ter liofiliziramo 2 uri pri temperaturi police 5 °C in tlaku 0,630 mbar ter 1 uro pri temperaturi police 20 °C in tlaku 0,630 mbar (82). Liofilizranim vzorcem dodamo 200 µL reagenta za hidrolizo, jih prepihamo z argonom ter zapremo s pokrovčki za stiskanje (optimizacija 8). Tako pripravljene viale z vzorci stehtamo ter segrevamo v sušilniku 24 ur pri 110°C (25). Temperaturo kontroliramo z živosrebrovim termometrom. Po segrevanju viale vizualno pregledamo za znaki izhajanja reagenta in ponovno stehtamo. Viale so uspešno prestale segrevanje, če pokrovčki ne kažejo znakov mehaničnih poškodb, vsebina izkazuje znake pretakanja in sprememb mase za posamezno vialo ne odstopa za več kot 5 % od povprečja sprememb vseh hkrati hidroliziranih vial (optimizacija 9). Viale nato odpremo ter do suhega uparimo topilo z rotavaporjem (optimizacija 10) pri 64 mbar, 250 rpm ter temperaturi kadi 90°C. Posušene vzorce dispergiramo v 1 mL bidestilirane vode s pomočjo plastične brizge ter igel. Zatem celotno vsebino filtriramo skozi 0,45 µm filter v viale z navojem in analiziramo.

3.3.1.3 Derivatizacija in kromatografija

Hidrolizirane vzorce nadalje analiziramo na reverznofaznem HPLC sistemu. Pripravimo mobilne faze, reagente in vzorce ter jih postavimo na ustrezna mesta. Za derivatizacijo uporabimo uporabniško definiram program (UDP 3; glej prilog 4 in optimizaciji 11 in 12), ki v igli zmeša vzorec ter reagente in nastalo zmes injicira na kolono (48,50,51,70). Za kromatografsko ločbo uporabimo kolono 5 in predkolono (optimizacija 13) ter ustrezni gradient (optimizacija 14) (glej prilog 4) (12,70).

Sekvenca se prične s pretokom topila in injiciranjem slepih raztopin (z in brez hidrolize). Nato injiciramo standarde (STVZ, STVZ-H in STBSA) in vzorce. Slep raztopino ter STVZ-H ponovimo na od 5 do 10 injiciranj drugih vzorcev ter na koncu sekvence. Po končani sekvenci sistem speremo z metodo za spiranje 2 (optimizacija 15).

Spremljali smo signal pri 338 nm s širino 10 nm (UV-VIS 1 za primarne amine derivatizirane z OPA) in pri 262 nm s širino 16 nm (UV-VIS 2 za sekundarne amine derivatizirane z FMOC-Cl) (70). Identifikacija posameznih aminokislin med sekvencami izvedemo na osnovi relativnega retencijskega časa in znotraj iste sekvence na osnovi retencijskih časov (optimizacija 16) (71). Vsebnost posamezne aminokisline ter celokupnih proteinov izračunamo iz ustreznih odzivov po enačbah 1, 2 in 3 (25,53). Rezultate podamo kot vsebnost, odstopanje od specificirane vrednosti in ugotovitev ustreznosti. Vzorec ustreza, če je vrednost vseh določenih vsebnosti znotraj 10 % specificirane vrednosti in je hkrati rezultat kalibracije (analiza STBSA) znotraj 10 % referenčne vrednosti (20,25).

3. Materiali in metode

Enačba 1. Izračun vsebnosti posamezne aminokisline v vzorcu

$$m(AK) = \frac{\frac{AUC_{STVZ}^{AK}}{AUC_{STVZ}^{IS}} \frac{AUC_{VZ}^{AK}}{AUC_{VZ}^{IS}}}{\left(\frac{AUC_{STVZ-H}^{AK}}{AUC_{STVZ-H}^{IS}} \right)^2} \frac{1,1}{10} M(AK) C_0$$

$m(AK)$: Vsebnost posamezne aminokisline v vzorcu [g / 100 g vzorca]

AUC_{STVZ}^{AK} : Površina pod krivuljo vrha aminokisline v STVZ [min*mAU]

AUC_{STVZ}^{IS} : Površina pod krivuljo vrha internega standarda v STVZ [min*mAU]

AUC_{VZ}^{AK} : Površina pod krivuljo vrha aminokisline v vzorcu [min*mAU]

AUC_{VZ}^{IS} : Površina pod krivuljo vrha internega standarda v vzorcu [min*mAU]

AUC_{STVZ-H}^{AK} : Površina pod krivuljo vrha aminokisline v STVZ-H [min*mAU]

AUC_{STVZ-H}^{IS} : Površina pod krivuljo vrha internega standarda v STVZ-H [min*mAU]

$M(AK)$: Molska masa aminokisline [g/mol]

C_0 : Koncentracija aminokisline v STVZ [$\mu\text{mol/mL}$]

Enačba 2. Izračun vsebnosti celokupnih proteinov v vzorcu.

$$CP(VZ) = m(AK)_1 + m(AK)_2 + \dots + m(AK)_n$$

$CP(VZ)$: Celokupna vsebnost proteinov [g]

$m(AK)_1, m(AK)_2, m(AK)_n$: Vsebnosti posameznih aminokislín v vzorcu izračunane po enačbi 1 [g]

Enačba 3. Izračun vsebnosti posamezne aminokisline v STBSA. Oznake so enake kot pri enačbi 1.

$$m(AK) = \frac{\frac{AUC_{STVZ}^{AK}}{AUC_{STVZ}^{IS}} \frac{AUC_{VZ}^{AK}}{AUC_{VZ}^{IS}}}{\left(\frac{AUC_{STVZ-H}^{AK}}{AUC_{STVZ-H}^{IS}} \right)^2} 1.1 M(AK) C_0$$

3.3.2 Metode za vrednotenje sprememb pri optimizaciji

Spremembe protokola pri optimizaciji ovrednotimo na tri načine:

(1) pri optimizacijah 8, 11, 12, 13 in 14 primerjamo kromatograma pred in po spremembi ter izberemo postopek, ki bolje ustreza postavljenim okvirom metode,

(2) pri optimizacijah 3, 6, 8, 9 in 16 za ovrednotenje uporabimo posebno metodo neodvisno od protokola za aminokislinsko analizo in

(3) pri optimizacijah 1, 2, 4, 5, 7, 10, 15 spremembe vrednotimo glede na zahtevnost postopka oziroma jih ovrednotimo vizualno.

Primerjani metodi in postopek za njuno primerjavo pri optimizacijah 3, 6, 8, 9 in 16 so predstavljeni v preglednici VIII.

3. Materiali in metode

Preglednica VIII. Pregled uporabljenih metod za primerjavo alternativnih postopkov izvedbe aminokislinske analize

Optimizacija	Alternativne metode in metode za njihovo ovrednotenje
3. Priprava reagenta za derivatizacijo D	V penicilinki zmešamo 500 µL reagenta A, 100 µL vzorca, 100 µL reagenta B, 100 µL reagenta C in 1400 µL reagenta D pripravljenega z ali brez H ₃ PO ₄ . Po vsakem dodatku izmerimo pH raztopine s pH metrom umerjenim na 7,00 in 10,00. Rezultate podamo kot spremembe pH po vsakem dodatku. <i>Za nadaljnjo uporabo izberemo postopek, ki bolje približa pH reakcijske zmesi pH MFA.</i>
6. Izbira vial in pokrovčkov za izvedbo hidrolize	Ustrezno kombinacijo pokrovčka in viale izberemo na podlagi primerjave njihove vzdržljivosti pri pogojih hidrolize. Pripravimo štiri viale z navojem in dve viali za stiskanje ter po dva modra, zelena in pokrova za stiskanje. V tri viale (viale A), ki jih zatesnimo z različnimi pokrovčki, odmerimo 200 µL acetona za HPLC ter jih zapremo. V preostale viale (viale B) odmerimo 500 µL reagenta za hidrolizo ter jih zapremo. Vse viale po zaprtju stehtamo ter segrevamo v sušilniku na 110°C. Viale A segrevamo 1 uro in viale B segrevamo 24 ur. Po segrevanju jih stehtamo ter vizualno pregledamo. Rezultate ovrednotimo s spremembom mase in opisom viale ter njene vsebine po segrevanju. <i>Za nadaljnjo uporabo izberemo kombinacijo viale in pokrovčka, ki po segrevanju ne kaže znakov poškodbe pokrovčka in izhajanja vsebine.</i>
8. Način hidrolize	Ustrezen postopek hidrolize izberemo na podlagi primerjave njunih zmogljivosti in vpliva na aminokisline. Primerjamo postopka hidrolize v plinasti (VPH) in tekoči fazi (LPH) (25). (I) VPH izvajamo v reakcijski komori, v katero postavimo odprte liofilizirane viale vzorca, STBSA, STVZ in slepe raztopine. Na dno komore nalijemo 2,4 mL reagenta za hidrolizo. Komoro zatesnimo, stehtamo in segrevamo 24 ur pri 110°C. (II) LPH izvajamo neposredno v vialah za stiskanje. Liofilizranim vzorcemu, STVZ, STBSA in slepi dodamo 200 µL reagenta za hidrolizo, jih preprihamo z argonom ter zatesnimo. Vsako vialo ločeno postavimo v sušilnik ter segrevamo 24 ur pri 110°C. <i>Za nadaljnjo uporabo izberemo postopek, ki je enostavnejši, bolj zmogljiv ter ima manjši vpliv na ozadje.</i>

3. Materiali in metode

9. Ustrezen način ovrednotenja sprememb izberemo na podlagi primerjave rezultatov segrevanja vial v različnih serijah hidrolize.

Spreminjanje mase vial med segrevanjem Primerjamo absolutno zahtevo (sprememba mase je manjša od 0,05g) z relativno (variabilnost mas vial je manjša od 5 %). Za nadaljnjo uporabo izberemo način vrednotenja, ki najbolje opisuje spremembe med segrevanjem.

16. Identifikacija posameznih aminokislin Primerjamo načine identifikacije na osnovi retencijskega časa, UV-VIS spektrov in obojega. Izvedemo kromatografsko analizo STVZ in standardov za identifikacijo ob uporabi iste kromatografske metode. Iz standardov za identifikacijo pridobimo referenčne retencijske čase in UV-VIS spekture. Nato v drugi sekvenci posnamemo kromatogram STVZ ter posamezne vrhove identificiramo ob uporabi vseh treh postopkov. Za nadaljnjo uporabo izberemo postopek, ki omogoča bolj zanesljivo identifikacijo.

3.3.3 Ovrednotenje metode za aminokislinsko analizo

Optimizirano metodo ovrednotimo z vidika identifikacije aminokislin in z vidika kvantifikacije pridobljenih odzivov. Ovrednotili smo: čistost kromatografskih vrhov in identiteto neidentificiranih vrhov, ponovljivost, linearnost in odzivnost ter vpliv hidrolize na STVZ. Na koncu smo metodi določili še točnost s kalibracijo. Večina uporabljenih metod temelji na uporabi protokola za izvedbo aminokislinske analize (glej poglavje 3.1), razlike so predvsem v načinu priprave vzorcev in izboru standardov. Za ovrednotenje uporabimo kvantitativne podatke o vrhovih.

4. Rezultati

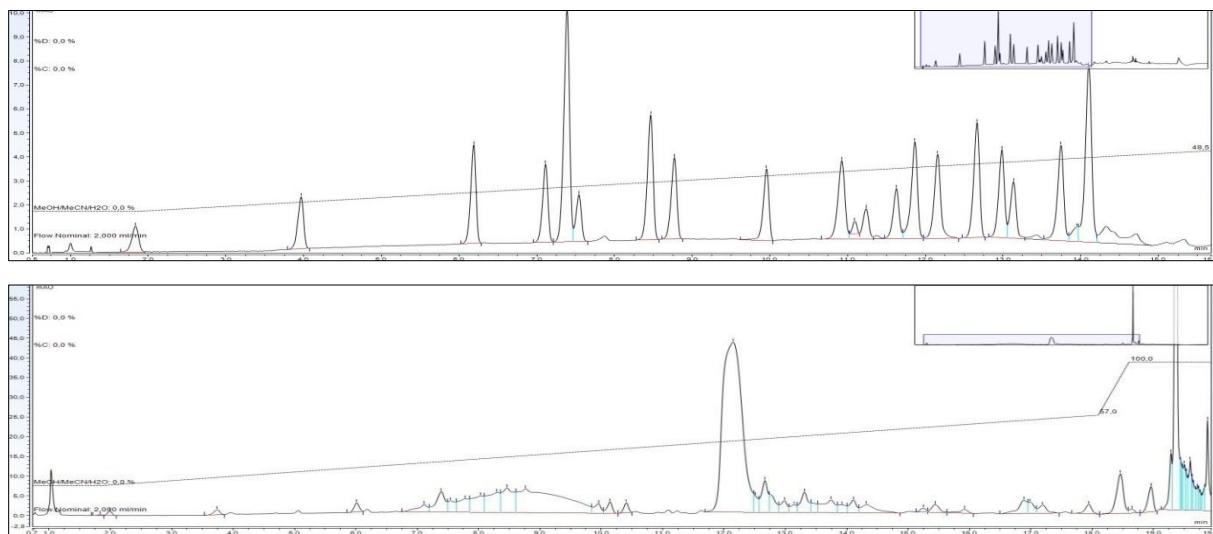
4. Rezultati

Rezultati so razdeljeni v štiri povezana podpoglavlja: optimizacija analizne metode, identifikacija kromatografskih vrhov, kvantifikacija odzivov in analiza vzorcev.

Kromatogrami so prikazani z dvema izpisoma iz programa ločeno za UV-VIS 1 in UV-VIS 2 v območjih, kjer se eluirajo identificirani vrhovi, celotni kromatogrami so prikazani v zgornjem desnem kotu izpisa. Nekateri kromatogrami imajo vrisana tudi pretok in gradient. Oznaka ni zaznano (ND) je uporabljena, ko detekcijski protokol programa za kromatografijo ne zazna vrha aminokisline.

4.1 Optimizacija analizne metode

Na sliki 8 je prikazan kromatogram STVZ ob analizi z analiznimi pogoji postavljenimi izključno na virih (32,70,71) in služi kot izhodišče za nadaljnjo optimizacijo. Za hidrolizo smo izbrali farmakopejsko metodo 1 in za derivatizacijo farmakopejski metodi 5 in 7 (glej prilogo 3).



Slika 8. Kromatogram STVZ posnet z izhodiščnimi pogoji. Prikazana sta tudi gradient in pretok.

Osnovno metodo za aminokislinsko analizo smo optimizirali v 16 točkah z namenom olajšati njeno izvedbo in izboljšati njene analizne parametre. Optimizacije 11, 13 in 14 so namenjene izboljšanju analiznih parametrov; ločljivosti in odzivnosti. Preostale optimizacije olajšujejo način izvedbe, 1, 2, 4, 5, 7, 10 in 15, ali predstavljajo izbiro med alternativnimi načini izvedbe, 3, 6, 8, 9, 12 in 16. V preglednici IX so zbrane vse točke optimizacije, opisane so spremembe v postopku tekom optimizacije in njihova obrazložitev. Pri optimizacijah, kjer smo spremembe ovrednotili, so prikazani in primerjani tudi rezultati izvajanja metode pri alternativnih pogojih.

4. Rezultati

Preglednica IX. Pregled optimizacije metode.

Optimizacija	Spremembe v postopku in utemeljitev
1. Priprava MFA	Pri pripravi MFA izpustimo natrijev azid. Mobilne faze sestavljene iz fosfatov so podvržene mikrobiološki nestabilnosti, zato se priporoča njihovo konzerviranje (43). Zaradi velike porabe MFA njeno konzerviranje ni bilo potrebno, saj jo moramo pred vsako sekvenco pripraviti sveže. Poleg tega konzervans vnaša v sistem dodatno dušikovo spojino, ki bi lahko motila derivatizacijo.
2. Priprava 0,4 M boratnega pufra	Namesto 0,1 M HCl za umerjanje pH uporabimo koncentrirano HCl. Izhodiščna raztopina fosfata in borata ima pH 9,2. Za njegovo umerjanje porabimo vsaj 200 mL razredčene kisline, kar močno poveča celokupni volumen pufra. Za zmanjšanje dodanega volumna uporabimo bolj koncentrirano kislino.
3. Priprava reagenta za derivatizacijo D	Namesto umerjanja pufra z 0,1 M KOH v pufer neposredno dodamo 10 g pelet KOH in nato umerimo pufer z 0,1 M KOH. Problem je podoben kot pri umerjanju pH MFA. Namesto uporabe bolj koncentrirane raztopine KOH, smo ga neposredno dodali kot trdno snov.

Vpliv prisotnosti H_3PO_4 v reagentu D na pH reakcijske zmesi smo vrednotili z merjenjem pH med derivatizacijo ob dodatku posameznega reagenta. Po končnem dodatku reagenta D se mora pH čim bolj približati pH MFA, 8,2. Navedeni so posamezni reagenti, njihovi volumni v UDP, volumni pri analizi spremenjanja pH med derivatizacijo ter rezultati v odvisnosti od sestave reagenta D. Rezultati so predstavljeni v preglednici X. Ugotovili smo, da H_3PO_4 v reagentu D bolje približa pH ciljni vrednosti.

Preglednica X. Spreminjanje pH med derivatizacijo v odvisnosti od sestave reagenta D.

Reagenti	Volumni v UDP	Volumni pri analizi pH	Izmerjeni pH brez H_3PO_4 v reagentu D	Izmerjeni pH z H_3PO_4 v reagentu D
Reagent A	5 μL	500 μL	10,2	10,2
Vzorec	1 μL	100 μL	9,7	9,7
Reagent B	1 μL	100 μL	9,7	9,6
Reagent C	1 μL	100 μL	9,15	9,15
Reagent D	14 μL	1400 μL	8,90	8,25

4. Rezultati

4.

Prenos standarda aminokislin iz primarne ovojnine

5. in 10.

Način raztplavljanja vzorcev in odstranjevanje HCl iz vial po hidrolizi

6.

Ovrednotenje tesnjenja pokrovčkov za viale

Pri pripravi STVZ neposredno iz standarda aminokislin smo ugotovili, da je zaradi ozkega vrha steklene viale težko kvantitativno prenesti ustrezni volumen v vialo s STVZ. Zato smo z iglo prenesli celotno vsebino viale v penicilinko, stekleno vialo sprali 1 mL bidestilirane vode in vsebino združili v penicilinki s standardom aminokislin. Za pripravo STVZ smo v nadaljevanju uporabljali raztopino iz penicilinke ob prilagojenih potrebnih volumnih.

Pri liofilizaciji vzorcev raztopljenih v 0,1 M HCl in zmesi po hidrolizi smo opazili znake korozije na kovinskih delih liofilizatorja zaradi prisotne kisline. Pri sušenju vzorcev pred hidrolizo smo problem rešili tako, da smo zamenjali uporabljeni topilo za dispergiranje vzorcev. Namesto dispergiranja v 0,1 M HCl smo uporabili bidestilirano vodo, ki ne povzroča korozije in je bliže topilom, ki so na voljo uporabnikom. Pri vzorcih po hidrolizi kisline ne moremo izpustiti, saj jo uporabljamo za izvedbo hidrolize. Zato smo pri tej stopnji liofilizacijo nadomestili z rotavapiranjem, ki je odporno na kislinsko razjedanje.

Pri segrevanju vzorcev v vialah z modrimi pokrovi smo ugotovili, da imajo po segrevanju poškodovan septum in viale presušeno vsebino. Med alternativnimi vialami (zeleni pokrovi in pokrovi za stiskanje) so viale za stiskanje bolj primerne za izvajanje hidrolize, saj pri segrevanju acetona kažejo samo manjše znake in pri segrevanju reagenta za hidrolizo ne kažejo znakov mehanskih poškodb.

V posamezne tipe vial in pokrovov smo odmerili 200 µL acetona (A) in 500 µL reagenta za hidrolizo (B) ter jih izpostavili pogoju hidrolize za 1 uro (A) oziroma 24 ur (B). Rezultate smo ovrednotili z opazovanjem mehanskih poškodb na septumih pokrovčkov, merjenjem spremembe mase vial med segrevanjem in vizualnim pregledom vsebine viale po segrevanju. Rezultati so predstavljeni v preglednici XI.

Preglednica XI. Spremembe vial med segrevanjem v odvisnosti od uporabljenega pokrovčka in vsebine.

Pokrovi	Tekočina	Mehanske poškodbe pokrova	Sprememba mase [g]	Izgled vzorca
Moder	A	Da	0,28990	Posušen
Moder	B	Da	0,35146	Posušen
Zelen	A	Da	0,29190	Posušen
Zelen	B	Da	0,34209	Posušen
Stiskanje	A	Da	0,1534	Manjši volumen
Stiskanje	B	Ne	0,00225	Brez sprememb

4. Rezultati

7.

Način zmrzovanja vzorcev pred liofilizacijo

V začetni stopnji liofilizacije (pri zniževanju tlaka) smo opazili izhajanje pene iz vial z vzorci, kar nakazuje, da vzorci niso dovolj zmrznjeni.

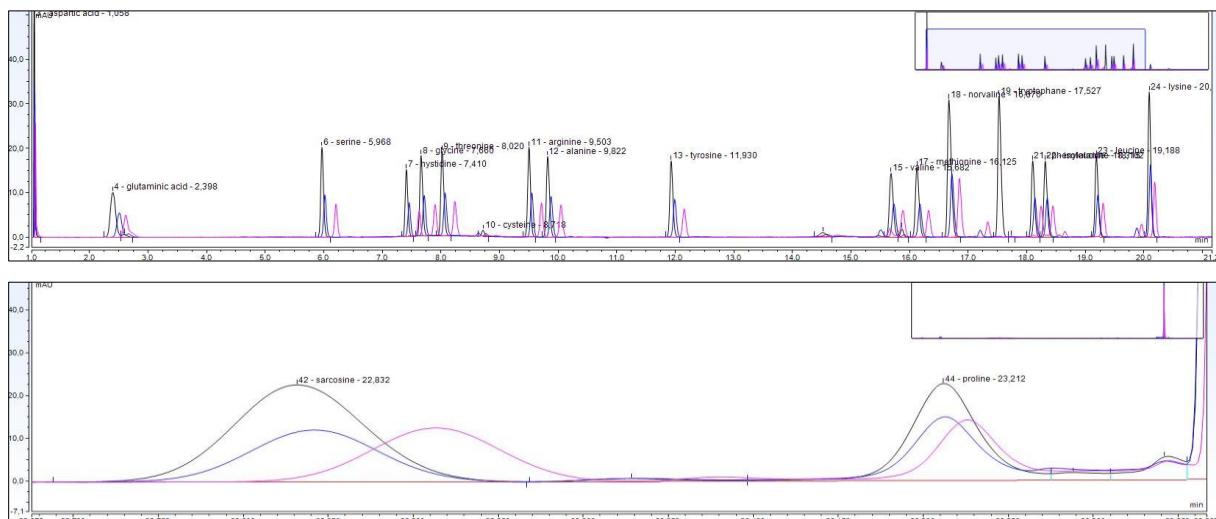
Zmrzovanje v zmrzovalniku v 12 urah smo zato nadomestili z zmrzovanjem s tekočim dušikom. Vzorci zamrznjeni na ta način se ne penijo in so hitreje zamrznjeni.

8

Način hidrolize

Primerjali smo dve razpoložljivi tehniki za izvajanje hidrolize glede na zmogljivost in vpliv na kakovost kromatogramov. Za nadaljnjo uporabo smo izbrali LPH, saj ima večjo zmogljivost brez vpliva na kromatograme. Zmogljivost VPH je ena viala vzorca na eno vialo STVZ, STBSA in slepe (skupna kapaciteta reaktorja je 4 viale), pri LPH ni omejitev glede števila vial. Obe tehniki vključujeta sušenje vial po hidrolizi.

Na sliki 9 so prekrivno prikazani kromatogrami STVZ (črno) in STVZ-H hidroliziranega po LPH (modro) in VPH (rdeče).



Slika 9. Prekrivni kromatogram ob vrednotenju različnih postopkov hidrolize.

0

Določitev meje za ovrednotenje vpliva segrevanja na viale

Pri primerjanju spremembe mas vial v različnih serijah hidrolize smo opazili, da so podatki med serijami slabo primerljivi, a dobro primerljivi znotraj iste serije. Posledično smo namesto absolutne zahteve, da se masa vial ne sme zmanjšati za več kot 0,05 g postavili zahtevo, da se spremembe mase pri isti seriji hidrolize ne smejo razlikovati za več kot 5 %.

11.

Spreminjanje protokola za derivatizacijo

Pri izhodiščnem programu za derivatizacijo smo želeli povečati odzivnost in zaznavnost aminokislin ter omogočiti povezovanje med sekvencami. V izhodiščni protokol (70,71) smo dodali stopnje, ki omogočajo mešanje reakcijske zmesi med derivatizacijo ter spiranje sistema po izvedeni derivatizaciji (50,51). Pri derivatizaciji aminokislin s končno metodo lahko zaznamo vse aminokisline in njihova odzivnost je bolj enakomerna. Preko uporabe sistema za spiranje je omogočeno tudi povezovanje zaporednih sekvenc.

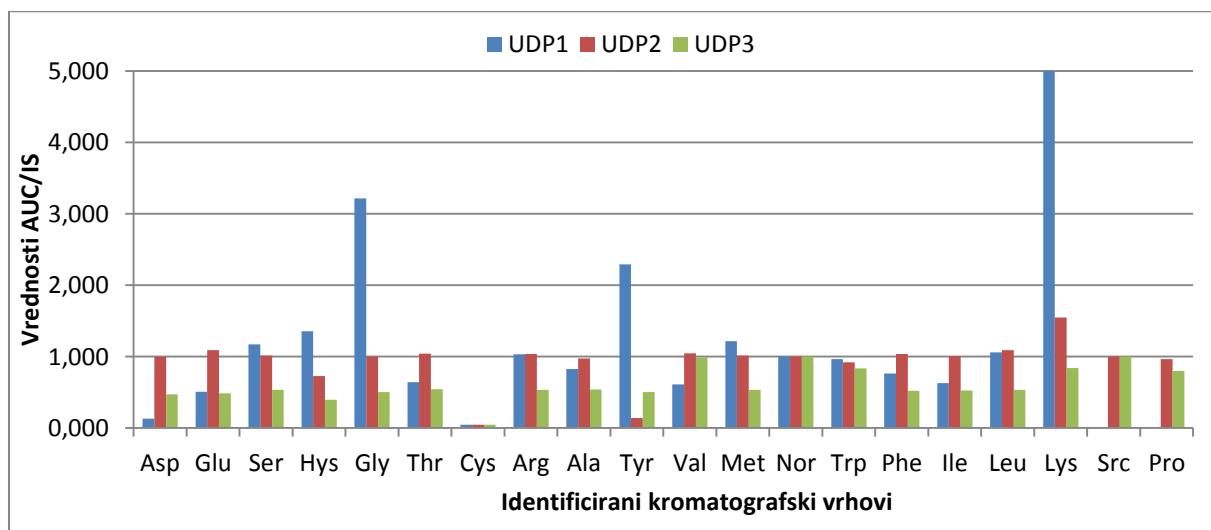
4. Rezultati

V preglednici XII so primerjani uporabljeni postopki za derivatizacijo na podlagi namena in prisotnosti posameznih stopenj ter zaporedja dodajanja reagentov za derivatizacijo. Celotni protokoli so v prilogi 5.

Preglednica XII. Primerjava derivatizacijskih protokolov.

Namen stopnje	UDP1	UDP2	UDP3
	Zaporedje reagentov in prisotnost posamezne stopnje		
Uravnavanje pH vzorca in derivatizacija z OPA	A → vzorec → B	A → B → A → vzorec	A → vzorec → B
Čakanje	Da	Da	Da
Mešanje	Ne	Da	Da
Derivatizacija s FMOC-Cl	→ C	→ C	→ C
Čakanje	Da	Da	Da
Mešanje	Ne	Da	Da
Uravnavanje pH reakcijske zmesi	→ D	→ D	→ D
Čakanje	Da	Da	Da
Mešanje	Ne	Da	Da
Injiciranje na kolono	Da	Da	Da
Spiranje sistema za injiciranje	Ne	Ne	Da

V nadaljevanju (slika 10) so predstavljene spremembe v odzivnosti posameznih aminokislin glede na uporabljen način derivatizacije. Odziv posamezne aminokisline je ovrednoten kot AUC/IS. Opazimo, da z mešanjem reakcijske zmesi odzivi postajajo bolj enakomerni in da lahko zaznamo vse aminokisline.



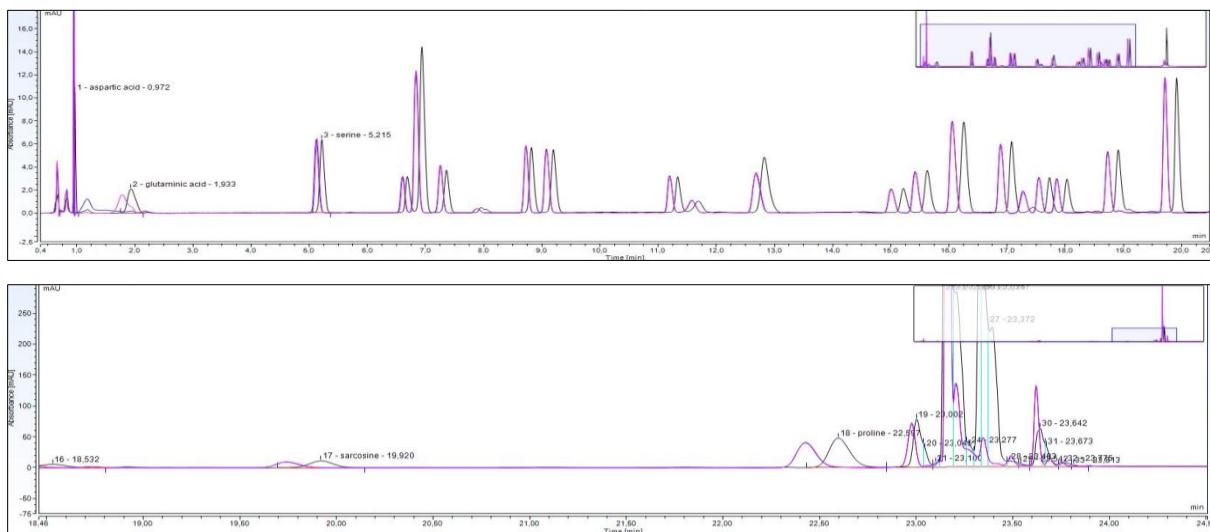
Slika 10. Odziv aminokislin v odvisnosti od načina derivatizacije

12.
Spreminjanje
volumna reagenta D

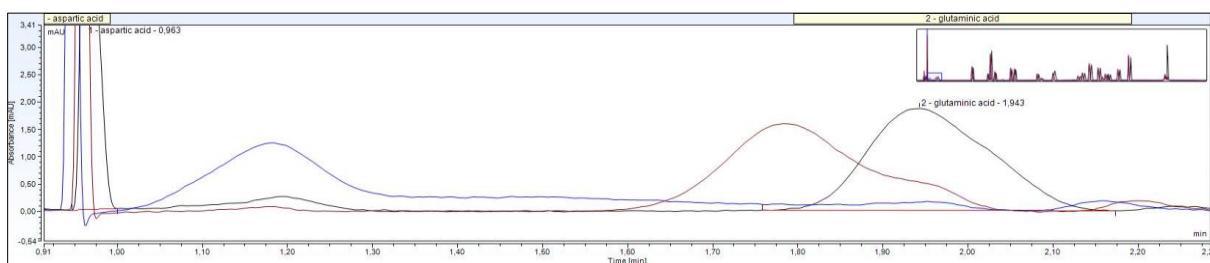
Pri optimiziranem programu za derivatizacijo (UDP 3) smo opazili, da je celokupen volumen reakcijske zmesi ($21 \mu\text{L}$) večji od volumna zanke v injektorju ($15 \mu\text{L}$), kar lahko moti odzivnost. Poskusili smo ga zmanjšati s spremenjanjem volumna reagenta D. Ugotovili smo, da so spremembe pri večini aminokislin znotraj meja ponovljivosti. Le pri glutaminski kislini se vrh zniža in premakne proti manjšim retencijskim časom.

4. Rezultati

Volumen reagenta D v UDP protokolu smo spremenili na 4 µL, 9 µL in 15 µL in opazovali spremembe v kromatogramu STVZ (glej sliko 11). Na sliki 12 je prikazan izsek iz kromatograma pri retencijskem času glutaminske kisline.



Slika 11. Prekrivni kromatogram posneti ob primerjavi vpliva volumna reagenta D na analizo STVZ. Različni volumni so označeni 4 µL z vijolično, 9 µL z modro in 15 µL s črno.



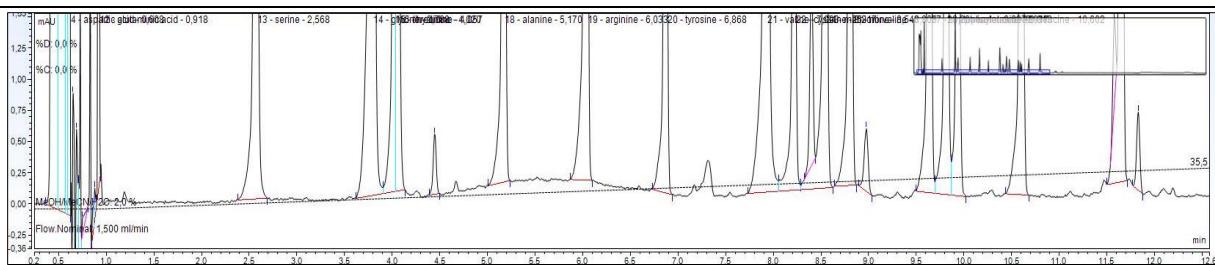
Slika 12. Izsek iz prekrivnega kromatograma ovrednotenja vpliva volumna reagenta D na kromatograme pri UV-VIS 1 (4 µL z vijolično, 9 µL z modro in 15 µL s črno). Označena sta vrhova glutaminske kisline pri 1,943 min in asparaginske kisline pri 0,963 min.

13.
Testiranje različnih
kromatografskih
kolon

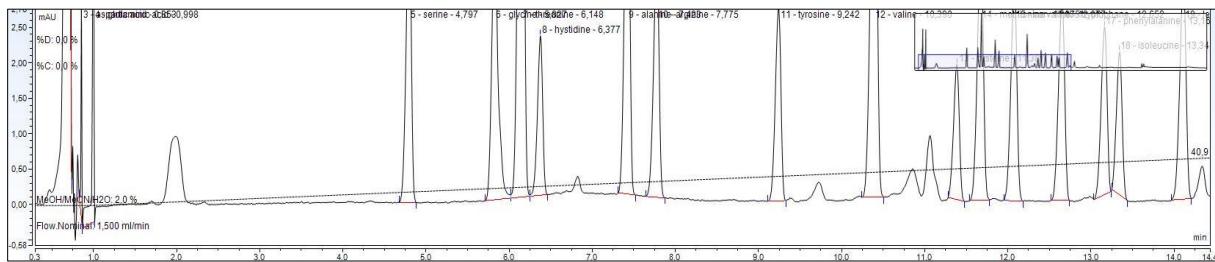
Preizkusili smo različne kolone z oktadecilsilansko stacionarno fazo in za nadaljnje delo izbrali kolono 5. Predkolono uporabimo za podaljšanje življenske dobe kolone.

Na slikah od 13 do 17 so predstavljeni kromatogrami posneti z različnimi kromatografskimi kolonami (njihove lastnosti so navedene v poglavju 3.2). Spremembe ločljivosti smo opazovali samo pri UV-VIS 1.

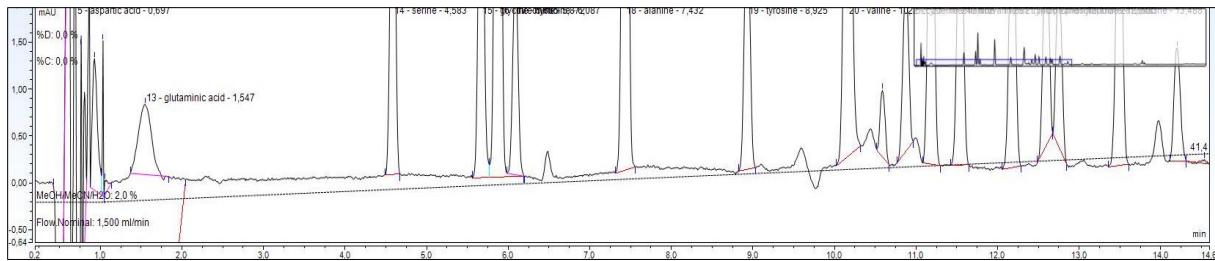
4. Rezultati



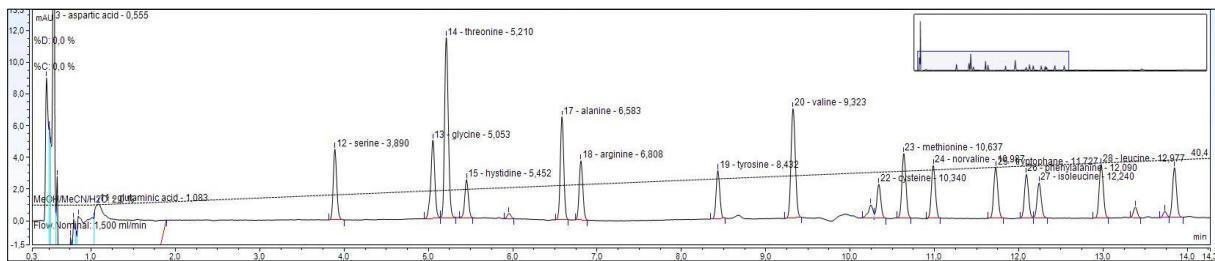
Slika 13. UV-VIS 1 kromatogram ob uporabi kolone 1.



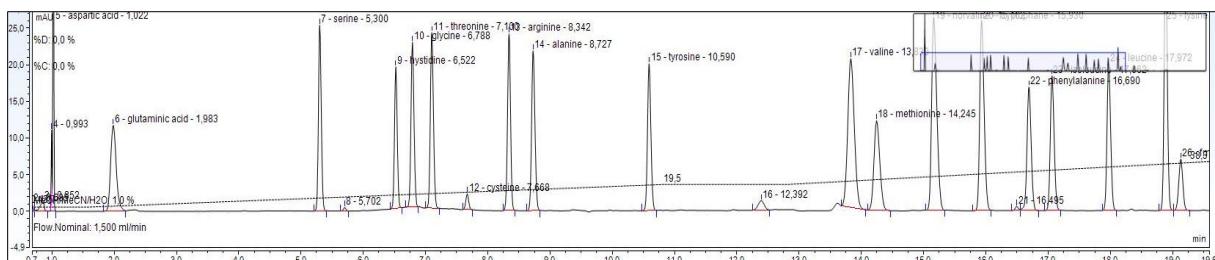
Slika 14. UV-VIS 1 kromatogram ob uporabi kolone 2.



Slika 15. UV-VIS 1 kromatogram ob uporabi kolone 3.



Slika 16. UV-VIS 1 kromatogram ob uporabi kolone 4.

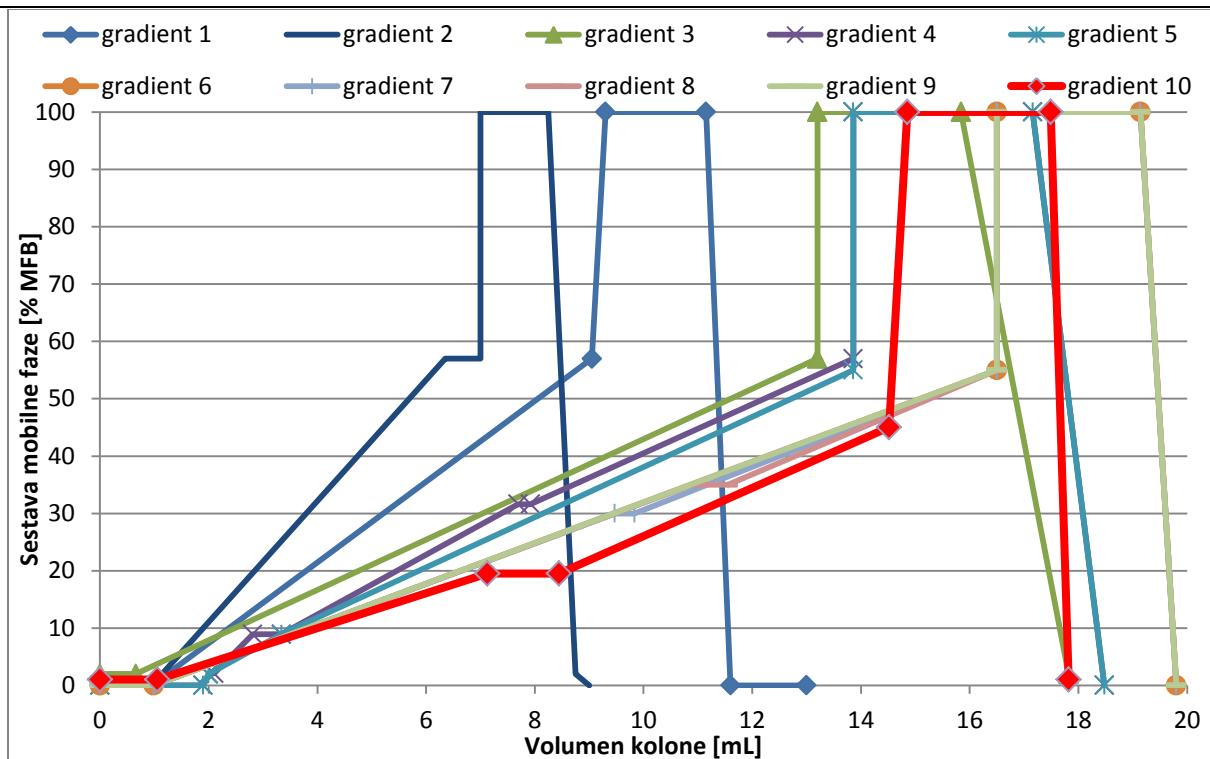


Slika 17. UV-VIS 1 kromatogram ob uporabi kolone 5 in predkolone.

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 14.
Spreminjanje
gradienata | S spremenjanjem gradienata smo dosegli boljše zadrževanje in boljšo ločljivost med aminokislinami. Spremembe ločljivosti smo opazovali samo pri UV-VIS 1. |
|-----------------------------------|---|

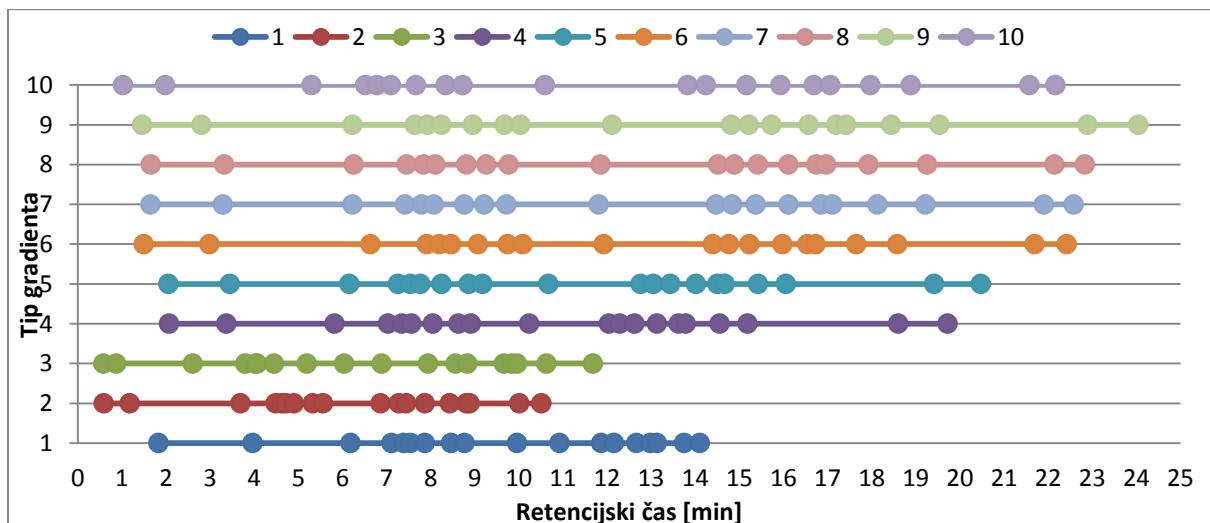
Na sliki 18 je prikazano spremjanje gradienata tekom optimizacije. Prikazano je spremjanje gradienata v % MFB (preostalo do 100% je MFA) v odvisnosti od volumna kolone.

4. Rezultati



Slika 18. Spreminjanje gradienata med optimizacijo metode. Izhodiščna metoda je gradient 1 in končna metoda gradient 10 (rdeče).

Na sliki 19 je prikazano spremjanje retencijskega časa identificiranih vrhov v odvisnosti od gradienata.

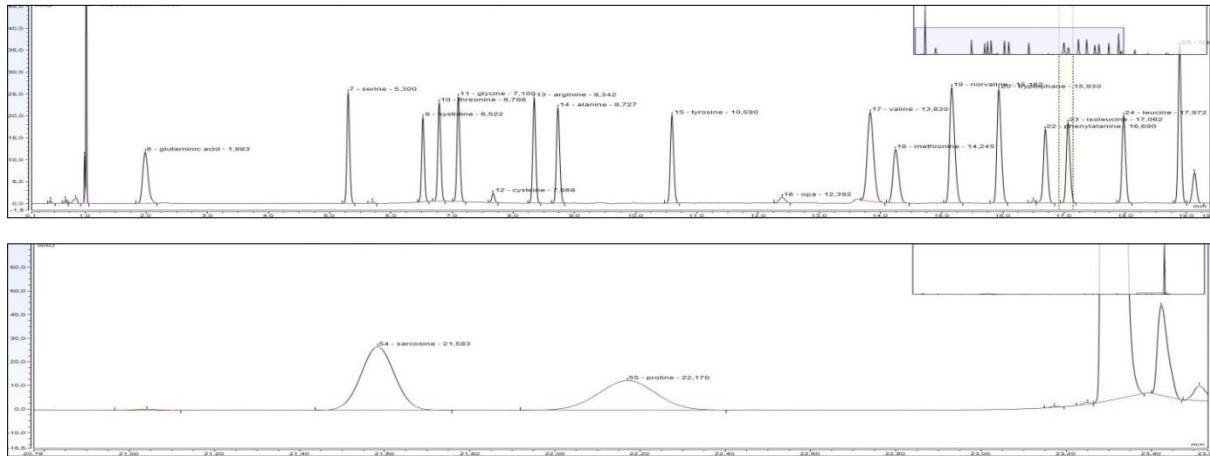


Slika 19. Spreminjanje retencijskih časov analitov v odvisnosti od uporabljenega gradienata.

-
- | | |
|----------------------|--|
| 15. | Namesto spiranja s čistim acetonitrilom 10 min, spiranje podaljšamo na 1 uro |
| Spiranje po sekvenci | in dodamo spiranje z izopropanolom. Dodatno spiranje odpravi težave s črpalko in podaljša življenjsko dobo kolone. Glej prilogo 6. |
-
- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 16. | |
| Identifikacija aminokislin | Rezultati so v poglavju 4.2. |
-

4. Rezultati

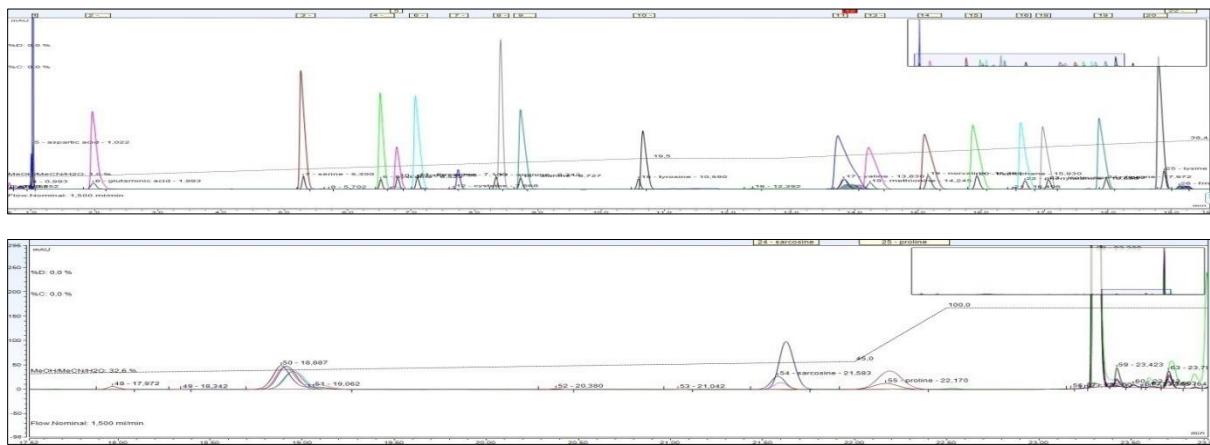
Na sliki 20 je prikazan kromatogram STVZ posnet z optimiziranimi analiznimi pogoji, ki smo jo nato uporabili za analizo vzorcev (glej poglavje 3.3.1). Zaradi razlik v retencijskih časih prekrivno prileganje z izhodiščno metodo ni mogoče.



Slika 20. Kromatogram STVZ posnet z optimiziranimi analiznimi pogoji.

4.2 Identifikacija kromatografskih vrhov

Derivate aminokislín smo identificirali na podlagi enakih retencijskih časov vrhov identifikacijskih standardov in STVZ. Na sliki 21 je prikazan prekrivni kromatogram STVZ (črno) in standardov za identifikacijo (ostali barvni vrhovi). Na vrhu kromatogramov in na vsakem identificiranem vrhu je označena pripadajoča aminokislina. Pridobljen vrstni red smo uporabili tudi pri vrednotenju ostalih postopkov za identifikacijo.



Slika 21. Prekrivna kromatograma STVZ in standardov za identifikacijo.

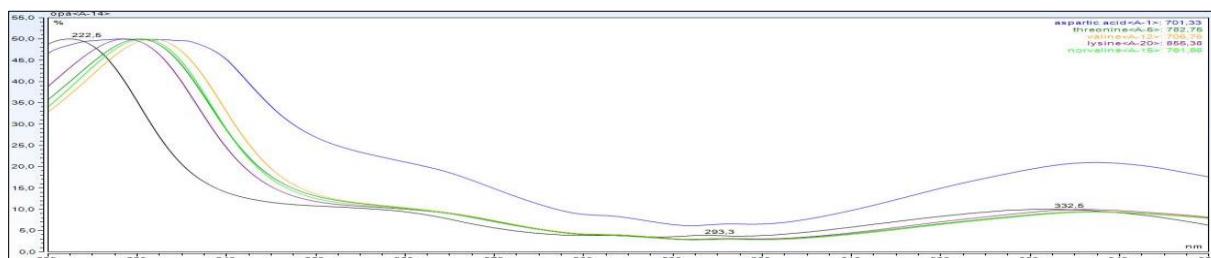
V preglednici XIII so prikazani vrstni redni identificiranih aminokislín glede na metodo identifikacije. Vrhovi so oštevilčeni v enakem vrstnem redu kot jih identificira referenčni postopek. Dodatni identificirani vrhovi so označeni z X. Vsakemu vrhu so pripisane aminokislíne identificirane s posameznim postopkom. Vrhovi, ki pri posameznem postopku niso identificirani, so označeni z ND in vrhovi, ki so po alternativnih postopkih napačno identificirani, so obarvani rumeno.

4. Rezultati

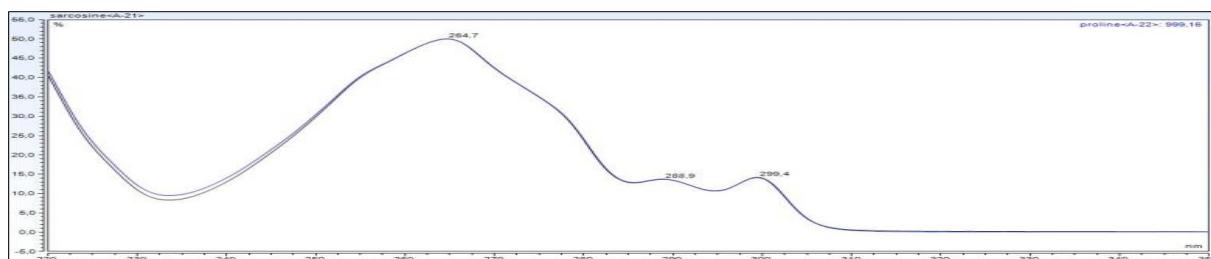
Preglednica XIII. Primerjava vrstnih redov pridobljenih z različnimi postopki.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	X	X	19	20
tR	Asp	Glu	Ser	Hys	Gly	Thr	Cys	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Nor	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	ND	ND	Src	Pro
Spektri	Thr	Glu	Ser	Hys	Gly	ND	Cys	Arg	Ala	Tyr	Lys	Met	Nor	Trp	Phe	Ile	Leu	ND	Val	Asp	Pro	Src
tR in spektre	ND	Glu	Ser	Hys	Gly	Thr	Cys	Arg	Ala	Tyr	ND	Met	Nor	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	ND	ND	Src	Pro

Na slikah 22 in 23 so prikazani spektri izbranih aminokislin, ki so bile z alternativnima postopkoma napačno identificirane. Spektri so prikazani kot odvisnost odstotka absorpcije od valovne dolžine. Pridobljeni so iz vrhov standardov za identifikacijo. Detekcija pri UV-VIS 1 poteka pri 338 nm in pri UV-VIS 2 pri 262 nm.

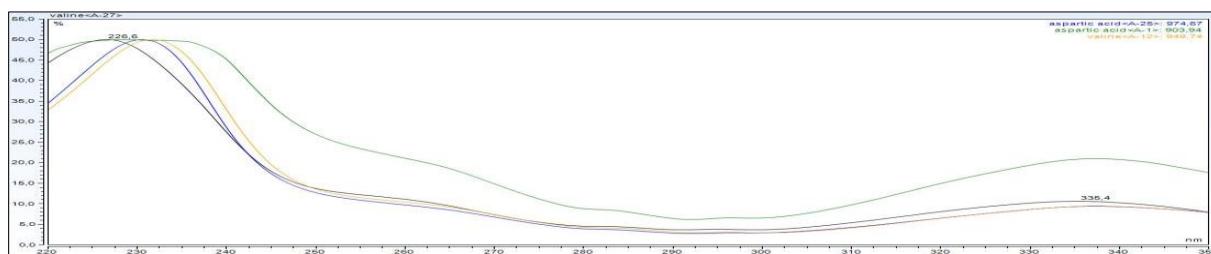


Slika 22. UV-VIS 1 spektri izbranih derivatov aminokislin: asparaginske kislina (modra), treonina (zelena), valina (oranžna), lizina (vijolična), norvalina (turkizna) in OPA (črna).



Slika 23. UV-VIS 2 spektra FMOC derivatov sarkozina (črna) in prolina (modra).

Na sliki 24 so prikazani UV-VIS 1 spektri obeh aminokislin, ki po obeh alternativnih postopkih nista pravilno identificirani (asparaginska kislina in valin). Prikazani so spektri pridobljeni iz standardov za identifikacijo (referenčni) in spektri iz STVZ.



Slika 24. Primerjava referenčnih in dejanskih spektrov derivatov asparaginske kislne (zelen in moder) in valina (rumen in črn).

4. Rezultati

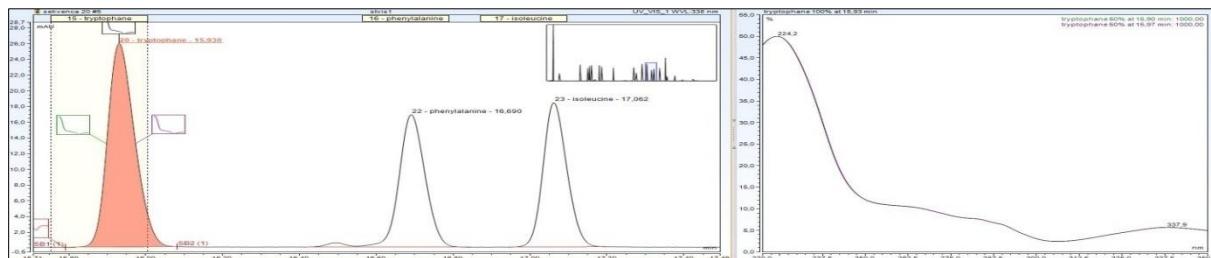
4.2.1 Čistost kromatografskih vrhov

V preglednici XIV so predstavljeni rezultati ovrednotenja čistosti identificiranih kromatografskih vrhov. Navedeni so faktorji ujemanja treh UV-VIS spektrov kromatografskega vrha posnetih na polovičnih in polni višini. Primerjavo izvede program za kromatografijo in vrednosti poda od 0 (ni ujemanja) do 1 (popolno ujemanje). Vrhovi z manjšo čistostjo so: glutaminska kislina, treonin, cistein, alanin, valin, fenilalanin, izolevcin, lizin, sarkozin in prolin.

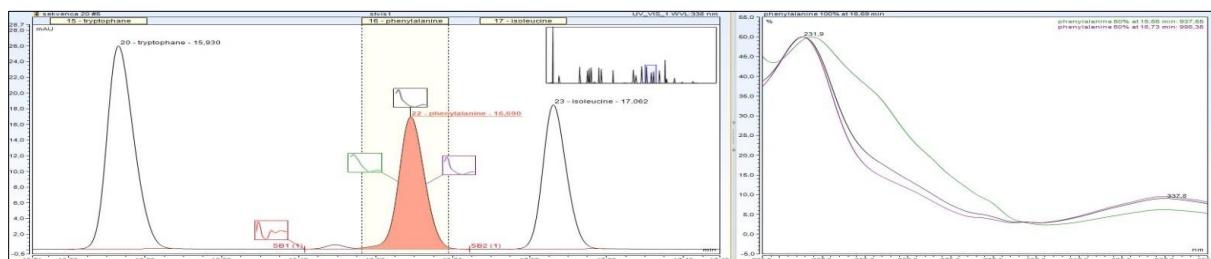
Preglednica XIV. Kvocient ujemanja za posamezno aminokislino pri analizi STVZ.

Ujemanje	Asp	Glutaminska kislina	Ser	Hys	Gly	Thr	Cys	Arg	Alanin	Tyr	Valin	Met	Nor	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Src	Pro
	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,995	0,999	1,000	0,999	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,960	0,995	1,000	0,980	0,983	0,995

Na slikah 25 in 26 sta označena vrhova in prikazani pripadajoči spektri za aminokislino z najboljšim ujemanjem (triptofan) in aminokislino z najslabšim ujemanjem (fenilalanin). Izbrana vrhova sta obarvana rdeče in si v kromatogramu sledita zaporedoma.



Slika 25. Prikazana sta izsek kromatograma STVZ, kjer se nahaja vrh triptofana (rdeče), in njemu pripadajoči UV-VIS 1 spektri.

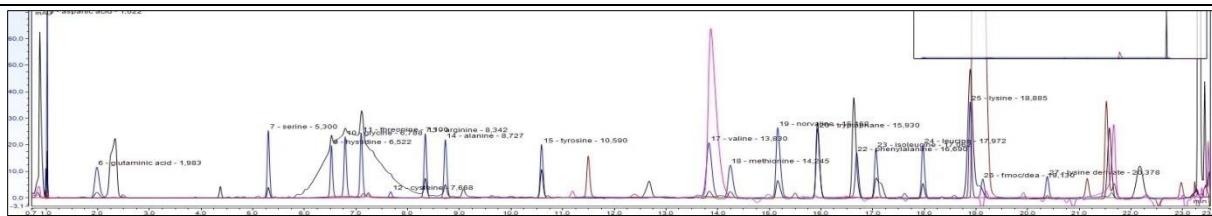


Slika 26. Prikazana sta izsek kromatograma STVZ, kjer se nahaja vrh fenilalanina (rdeče), in njemu pripadajoči UV-VIS 1 spektri.

4.2.2 Identifikacija neidentificiranih vrhov

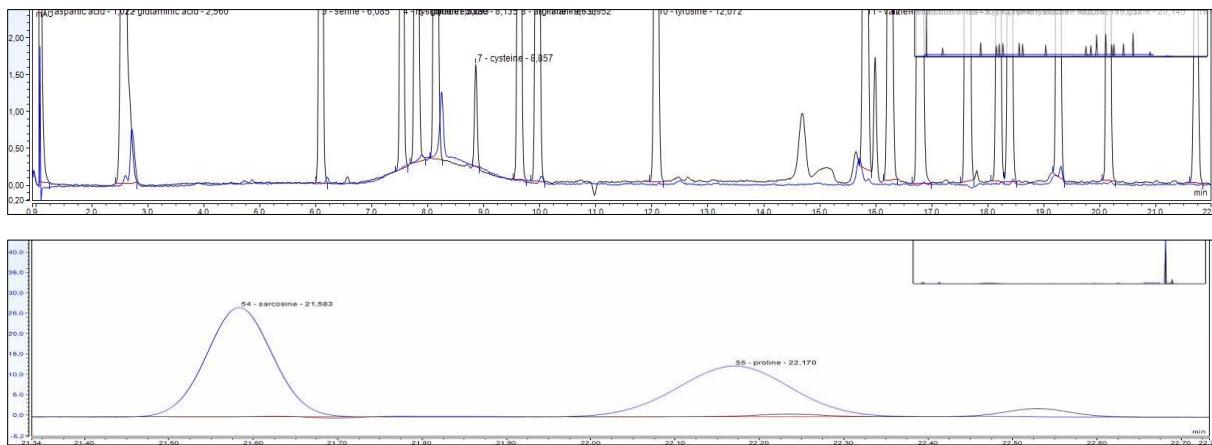
Neidentificirani vrhovi so tisti vrhovi, ki jih ne moremo identificirati s standardi za identifikacijo aminokislin. Ovrednotimo jih s primerjavo slepe, STVZ-H ter standardov za identifikacijo reagentov. Na sliki 27 so prikazani prekrivni kromatogrami STVZ-H, STOPA in STFMOC. Prekrivanje opazimo pri vrhovih valina, lizina in prolina.

4. Rezultati



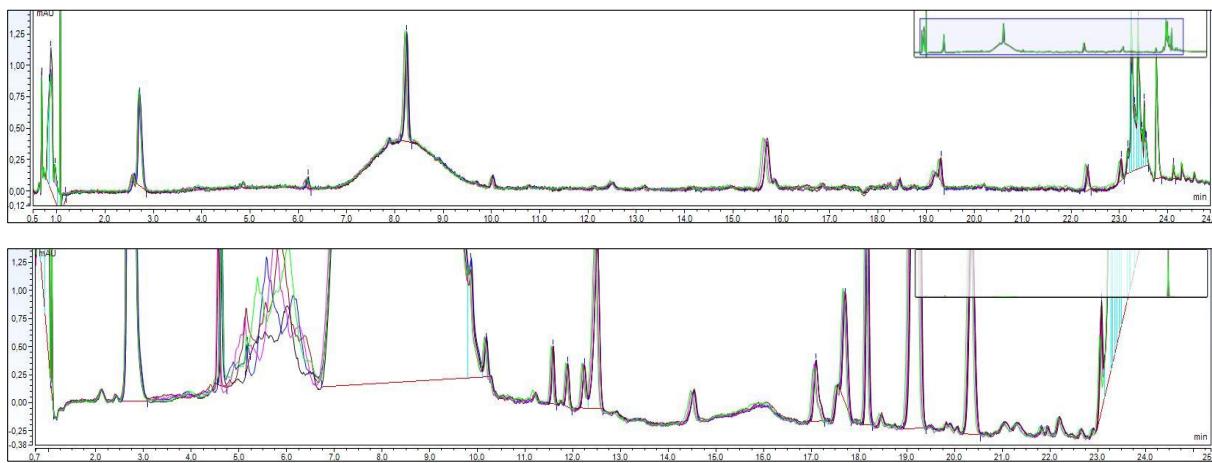
Slika 27. Prekrivna kromatograma med STVZ-H (modro), STOPA (črno) in STFMOC (vijolično).

Na sliki 28 je prikazan prekrivni kromatogram STVZ in slepe. Prekrivanje opazimo pri vrhovih asparaginske kisline, glutaminske kisline, treonina, valina in lizina.



Slika 28. Prekrivni kromatogram STVZ-H (črno) in slepe (modro).

Na sliki 29 so prekrivno prikazani kromatogrami injiciranj hidrolizirane slepe raztopine po štirih redčenjih. Opazimo, da so vrhovi neodvisni od koncentracije in imajo enake retencijske čase kot na sliki 28.



Slika 29. Kromatograma slepe raztopine po hidrolizi ob redčenju.

4.2.3 Ponovljivost retencijskega časa

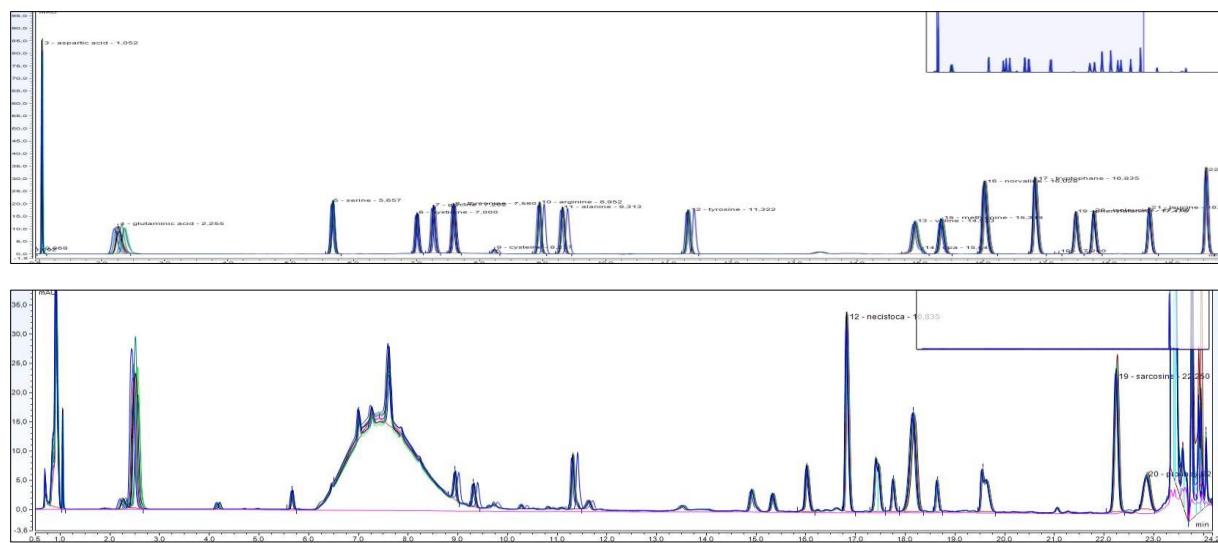
Ponovljivost retencijskega časa smo določali s primerjavo kromatogramov pridobljenih v štirih različnih zaporedjih injiciranjih. Rezultati so podani v preglednici XV. Iz njih vidimo, da je za ustrezno identifikacijo med sekvencami potrebno uporabiti relativni retencijski čas (tR/IS), za identifikacijo znotraj iste sekvence je zadovoljiv tudi retencijski čas (tR).

4. Rezultati

Preglednica XV. Spreminjanje ponovljivosti retencijskega časa in relativnega retencijskega časa ob primerjavi kromatogramov STVZ ob različnih zaporedjih injiciranja. Navedene so povprečne vrednosti tR in tR/IS in RSD med njimi. Manjše vrednosti RSD so označene rumeno. Število primerjanih kromatogramov je navedeno poleg načina injiciranja.

Določanje ponovljivosti injiciranja (10)				Injiciranje z razmikom v isti sekvenci (5)				Injiciranje v različnih sekvencah (3)				Določanje ponovljivosti metode (6)				
	tR	RSD	tR/IS	RSD	tR	RSD	tR/IS	RSD	tR	RSD	tR/IS	RSD	tR	RSD	tR/IS	RSD
Asp	1,050	0,006	0,066	0,006	0,978	0,005	0,061	0,007	1,103	0,105	0,068	0,077	1,081	0,025	0,067	0,025
Glu	2,272	0,025	0,142	0,025	1,920	0,024	0,121	0,022	2,399	0,160	0,148	0,117	2,220	0,094	0,137	0,094
Ser	5,665	0,002	0,354	0,002	5,160	0,005	0,325	0,006	5,837	0,081	0,360	0,037	5,537	0,008	0,342	0,008
Hys	7,004	0,002	0,437	0,002	6,600	0,003	0,415	0,003	7,176	0,074	0,443	0,028	6,936	0,003	0,428	0,002
Gly	7,265	0,002	0,453	0,002	6,835	0,003	0,430	0,004	7,455	0,075	0,460	0,029	7,202	0,004	0,445	0,003
Thr	7,588	0,002	0,474	0,002	7,245	0,003	0,456	0,003	7,783	0,073	0,480	0,027	7,596	0,003	0,469	0,002
Cys	8,241	0,002	0,514	0,003	7,823	0,003	0,492	0,002	8,419	0,071	0,520	0,024	8,199	0,002	0,506	0,001
Arg	8,960	0,003	0,559	0,003	8,670	0,002	0,545	0,002	9,153	0,070	0,565	0,023	9,019	0,002	0,557	0,001
Ala	9,325	0,003	0,582	0,003	9,033	0,003	0,568	0,001	9,519	0,067	0,588	0,021	9,369	0,002	0,579	0,001
Tyr	11,33	0,003	0,707	0,003	11,11	0,003	0,699	0,001	11,51	0,062	0,711	0,015	11,41	0,002	0,705	0,001
Val	14,92	0,001	0,931	0,000	14,84	0,005	0,933	0,001	15,10	0,063	0,932	0,015	15,17	0,002	0,937	0,000
Met	15,34	0,001	0,957	0,000	15,26	0,004	0,960	0,000	15,52	0,061	0,958	0,014	15,59	0,002	0,963	0,000
Nor	16,03	0,001	1,000	IS	15,90	0,004	1,000	IS	16,19	0,048	1,000	IS	16,19	0,001	1,000	IS
Trp	16,83	0,001	1,050	0,000	16,71	0,003	1,055	0,002	16,99	0,047	1,050	0,002	ND	ND	ND	ND
Phe	17,47	0,001	1,090	0,000	17,42	0,003	1,095	0,001	17,64	0,041	1,090	0,008	17,66	0,001	1,091	0,000
Ile	17,76	0,001	1,108	0,000	17,70	0,004	1,113	0,001	17,90	0,036	1,106	0,013	17,91	0,001	1,106	0,001
Leu	18,64	0,001	1,163	0,001	18,57	0,004	1,168	0,001	18,78	0,033	1,161	0,016	18,77	0,001	1,159	0,001
Lys	19,54	0,001	1,219	0,001	19,54	0,004	1,229	0,001	19,66	0,029	1,215	0,019	19,67	0,001	1,215	0,001
Src	22,25	0,001	1,000	IS	22,24	0,003	1,000	IS	21,79	0,014	1,000	IS	22,45	0,000	1,000	IS
Pro	22,86	0,001	1,027	0,000	22,91	0,002	1,030	0,001	22,70	0,016	1,042	0,016	23,02	0,000	1,025	0,000

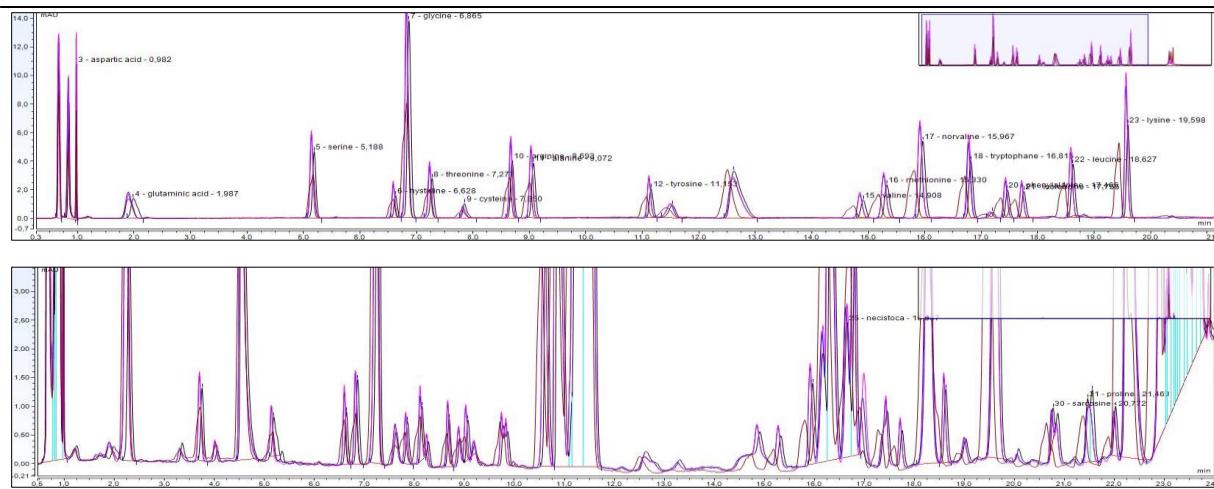
Na sliki 30 so prekrivno prikazani kromatogrami pridobljeni pri določanju ponovljivosti injiciranja. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.



Slika 30. Prekrivni kromatogram STVZ ob določanju ponovljivosti injiciranja.

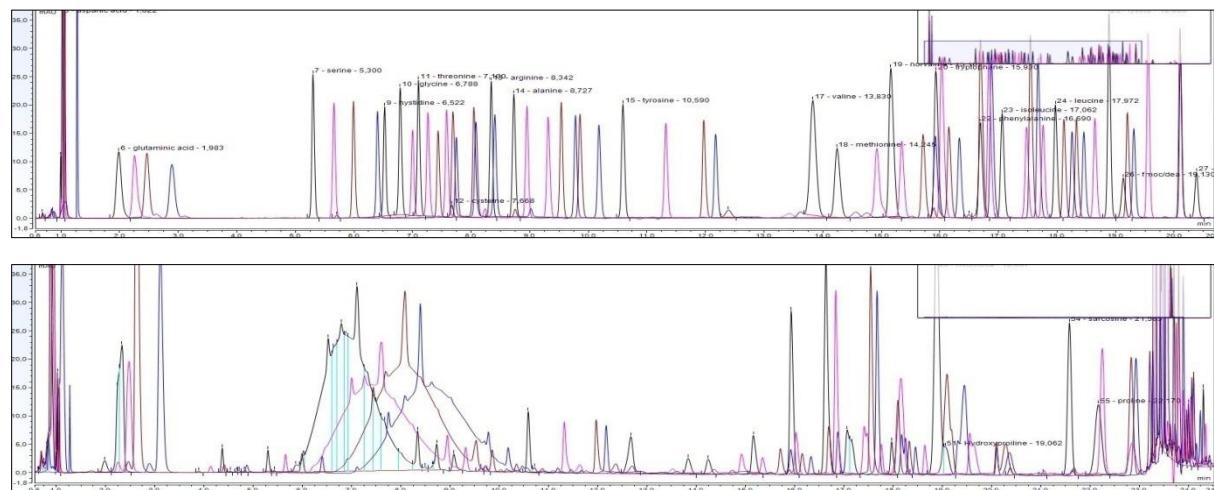
Na sliki 31 so prekrivno prikazani kromatogrami STVZ pridobljeni ob injiciranju z razmikom. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.

4. Rezultati



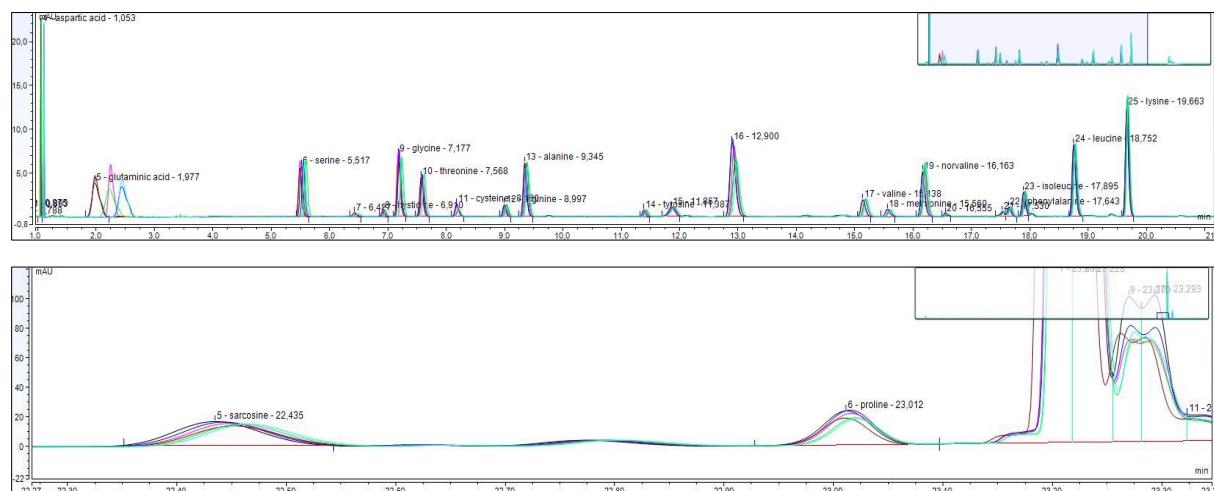
Slika 31. Prekrivni kromatogram STVZ ob določanju ponovljivosti ob injiciranju z razmikom.

Na sliki 32 so prekrivno prikazani kromatogrami pridobljeni ob analizi STVZ v različnih sekvencah. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.



Slika 32. Prekrivni kromatogram analize STVZ v različnih sekvencah.

Na sliki 33 so prekrivno prikazani kromatogrami analize vzorca 1 ob določanju ponovljivosti metode. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.



Slika 33. Prekrivni kromatogram analize vzorca 1 ob določanju ponovljivosti metode.

4. Rezultati

4.3 Kvantifikacija odzivov

S kvantifikacijo odzivov analizne metode bolje spoznamo njene parametre in postavimo okvire za njeno praktično uporabo, zlasti povezavo med količino analitov in njihovim analiznim odzivom. Izvedemo jo na dokončno optimizirani metodi na izbranem kromatografskem sistemu.

4.3.1 Vpliv hidrolize na STVZ

Za ovrednotenje vpliva hidrolize na STVZ smo primerjali kromatograma STVZ in STVZ-H.

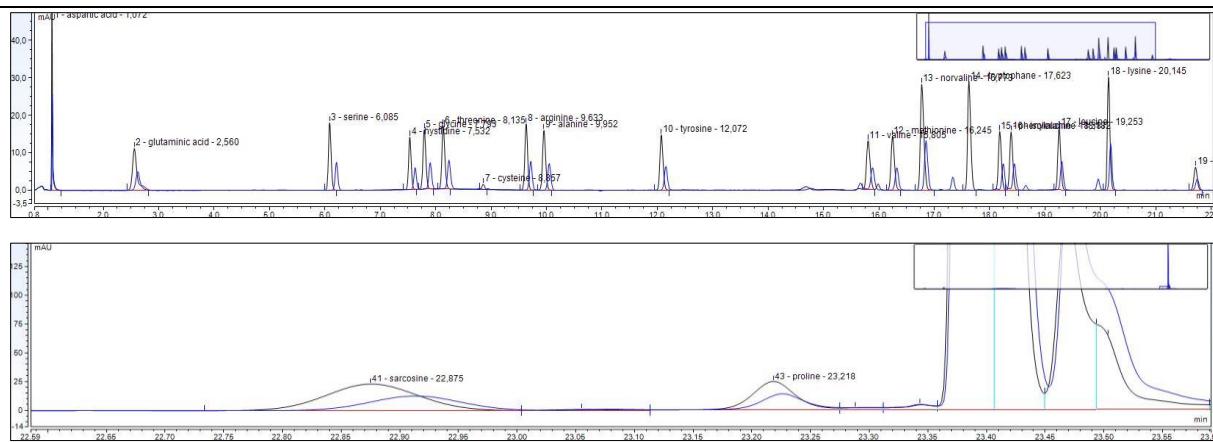
V preglednici XVI so navedeni odzivi ovrednoteni z AUC in AUC/IS. Za ovrednotenjem je navedeno (S), če je odziv STVZ-H znotraj 10% odziva STVZ. Rumeno so označene večje vrednosti odzivov. Pri vrednostih AUC/IS, kjer je vrednosti po hidrolizi večja od vrednosti pred, to nakazuje, da je aminokislina bolj stabilna od internega standarda.

Preglednica XVI. Primerjava odzivov STVZ in STVZ-H.

	AUC [mAU*min]			AUC/IS		
	Pred	Po	S	Pred	Po	S
Asp	0,972	0,435	NE	0,466	0,476	DA
Glu	1,034	0,404	NE	0,496	0,442	NE
Ser	1,013	0,418	NE	0,486	0,457	DA
Hys	0,761	0,316	NE	0,365	0,346	DA
Gly	0,978	0,421	NE	0,469	0,461	DA
Thr	1,058	0,496	NE	0,507	0,543	DA
Cys	0,076	0,012	NE	0,036	0,013	NE
Arg	1,036	0,455	NE	0,497	0,498	DA
Ala	1,039	0,463	NE	0,498	0,507	DA
Tyr	0,967	0,428	NE	0,464	0,468	DA
Val	0,992	0,434	NE	0,476	0,475	DA
Met	1,030	0,427	NE	0,494	0,467	DA
Nor	2,085	0,914	NE	1,000	1,000	DA
Trp	1,891	0,215	NE	0,907	0,235	NE
Phe	0,989	0,403	NE	0,474	0,441	DA
Ile	1,017	0,420	NE	0,488	0,460	DA
Leu	1,037	0,471	NE	0,497	0,515	DA
Lys	1,639	0,664	NE	0,786	0,726	DA
Src	2,119	1,141	NE	1,000	1,000	DA
Pro	1,092	0,660	NE	0,515	0,578	DA

Na sliki 34 sta prikazana prekrivna kromatograma STVZ in STVZ-H. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.

4. Rezultati



Slika 34. UV-VIS 1 in 2 kromatograma STVZ (črno) in STVZ-H (modro) po hidrolizi.

4.3.2 Ponovljivost metode in injiciranja

Ponovljivost injiciranja smo določali z desetkratnim zaporednim injiciranjem STVZ. V preglednici XVII so prikazani rezultati določanja ponovljivosti injiciranja za vse parametre odzivov. Navedeni so povprečni odzivi in RSD med njimi. Posebej so označeni parametri z najmanjšim RSD za kvantifikacijo. Najmanjša variabilnost ima pri večini aminokislin parameter AUC/IS.

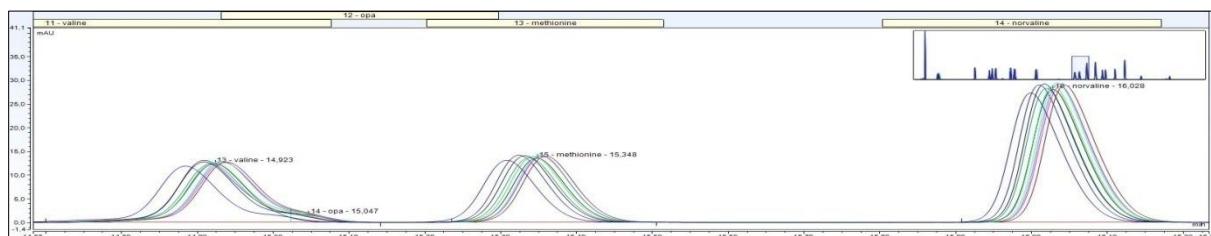
Preglednica XVII. Ponovljivost odziva STVZ ob zaporednem injiciranju.

	AUC [mAU*min]				Višina [mAU]			
	AUC	RSD	AUC/IS	RSD	H	RSD	H/IS	RSD
Asp	1,120	0,022	0,479	0,004	83,026	0,030	2,897	0,026
Glu	1,063	0,026	0,455	0,015	10,553	0,063	0,369	0,071
Ser	1,144	0,022	0,490	0,003	20,904	0,026	0,729	0,009
Hys	0,840	0,022	0,359	0,003	15,757	0,021	0,550	0,007
Gly	1,101	0,023	0,472	0,005	18,778	0,022	0,655	0,007
Thr	1,171	0,023	0,501	0,007	19,449	0,022	0,679	0,012
Cys	0,094	0,043	0,040	0,032	1,689	0,047	0,059	0,038
Arg	1,163	0,022	0,498	0,002	20,179	0,022	0,704	0,010
Ala	1,169	0,022	0,501	0,001	18,280	0,021	0,638	0,008
Tyr	1,084	0,022	0,464	0,002	17,310	0,026	0,604	0,013
Val	1,269	0,044	0,543	0,034	12,601	0,029	0,440	0,011
Met	1,159	0,023	0,496	0,003	13,829	0,025	0,483	0,004
Nor	2,336	0,022	1,000	IS	28,660	0,023	1,000	IS
Trp	2,127	0,022	0,910	0,002	29,945	0,023	1,045	0,004
Phe	1,110	0,023	0,475	0,002	16,489	0,024	0,575	0,003
Ile	1,137	0,023	0,487	0,002	16,878	0,023	0,589	0,004
Leu	1,168	0,023	0,500	0,003	18,075	0,023	0,631	0,005
Lys	1,876	0,027	0,803	0,007	33,711	0,028	1,176	0,007
Src	2,381	0,059	1,000	IS	24,676	0,057	1,000	IS
Pro	0,846	0,087	0,356	0,087	5,720	0,060	0,232	0,048

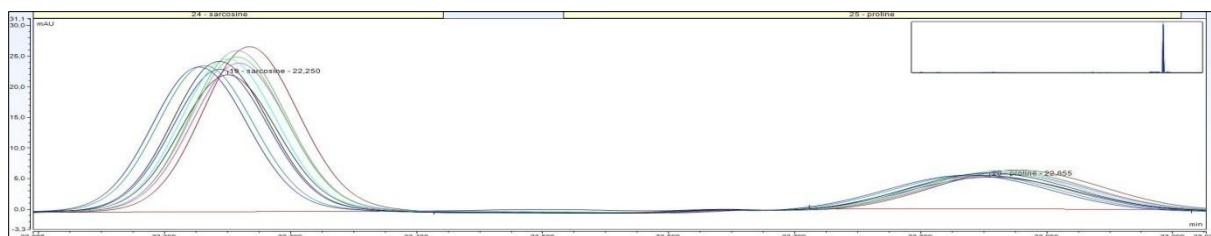
Na slikah 35 in 36 so prekrivno prikazani kromatogrami valina, metionina in prolina z ustreznima internima standardoma ob določanju ponovljivosti injiciranja. Vrhova valina in prolina imata edino boljšo ponovljivost pri opisu z H/IS, vrh metionina je prikazan kot referenca. Pri valinu vidimo, da na slabšo ponovljivost relativne površine vrha vpliva vrh pri

4. Rezultati

15,047 (OPA), ki se občasno prekrivno integrira. Vrh prolina ima slabšo ponovljivost zaradi večje variabilnosti vrha internega standarda (sarkozina).



Slika 35. UV-VIS 1 prekrivni kromatogrami valina, metionina in norvalina pri določanju ponovljivosti injiciranja.



Slika 36. UV-VIS 2 prekrivna kromatograma sarkozina in prolina pri določanju ponovljivosti injiciranja.

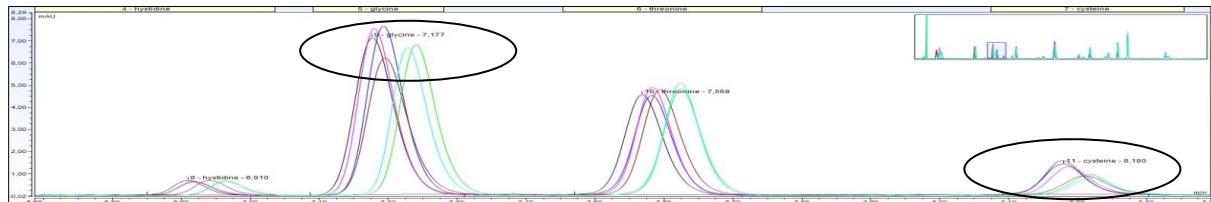
Ponovljivost metode smo določali tako, da smo izvedli celotno metodo za vzorec 1 v šestih paralelah, ki smo jih nato hidrolizirali v isti seriji in analizirali v isti sekvenci. V preglednici XVIII so prikazani rezultati določanja ponovljivosti metode. Navedene so določene vsebnosti posameznih aminokislin in celokupnih proteinov (CP) pri vsaki od šestih vial, povprečna vsebnosti, RSD in specificirana vsebnost (Rf). Vse vsebnosti so podane kot [g / 100 g] vzorca. Posebej so označeni parametri, pri katerih je variabilnost pod 10 %.

Preglednica XVIII. Rezultati določanja ponovljivosti metode.

	1	2	3	4	5	6	povprečje	RSD [%]
Asp	8,894	8,569	8,196	8,263	7,746	6,973	8,107	8,3
Glu	12,380	12,752	12,102	11,743	10,647	10,409	11,672	8,1
Ser	3,474	3,600	3,365	3,138	2,978	2,801	3,226	9,5
Hys	0,967	1,022	0,966	0,901	0,879	0,798	0,922	8,6
Gly	0,721	0,766	0,686	0,582	0,543	0,503	0,634	16,7
Thr	5,645	5,848	5,613	5,313	5,017	4,857	5,382	7,2
Cys	4,197	4,739	3,847	2,661	2,421	2,093	3,326	32,4
Arg	1,246	1,234	1,223	1,142	1,047	0,997	1,148	9,2
Ala	3,581	3,654	3,494	3,300	3,051	2,968	3,341	8,5
Tyr	1,768	1,746	1,730	1,664	1,554	1,474	1,656	7,1
Val	4,817	4,858	4,666	4,611	4,236	4,080	4,545	7,0
Met	1,295	1,430	1,256	1,013	1,072	1,035	1,183	14,3
Trp	ND	ND						
Phe	2,284	2,283	2,235	2,128	1,959	1,879	2,128	8,2
Ile	4,958	5,406	5,204	5,110	4,626	4,139	4,907	9,3
Leu	7,031	7,217	6,799	6,428	6,005	5,708	6,531	9,1
Lys	5,804	5,881	5,745	5,762	5,386	5,142	5,620	5,2
Pro	3,724	3,557	3,672	3,290	2,936	2,995	3,362	10,0
CP	72,787	74,564	70,798	67,048	62,102	58,851	67,692	9,2

4. Rezultati

Na sliki 37 so prekrivno prikazani kromatogrami histidina, glicina, treonina in cisteina ob določanju ponovljivost metode. Glicin in cistein imata največjo variabilnost med določenimi vsebnostmi aminokislin, histidin in treonin sta prikazana kot referenci. Iz kromatograma vidimo, da so odzivi glicina in cisteina veliko bolj variabilni kot vrhova histidina in treonina.



Slika 37. UV-VIS 1 prekrivni kromatogram histidina, glicina, teronina in cisteina ob določanju ponovljivosti metode.

4.3.3 Linearnost

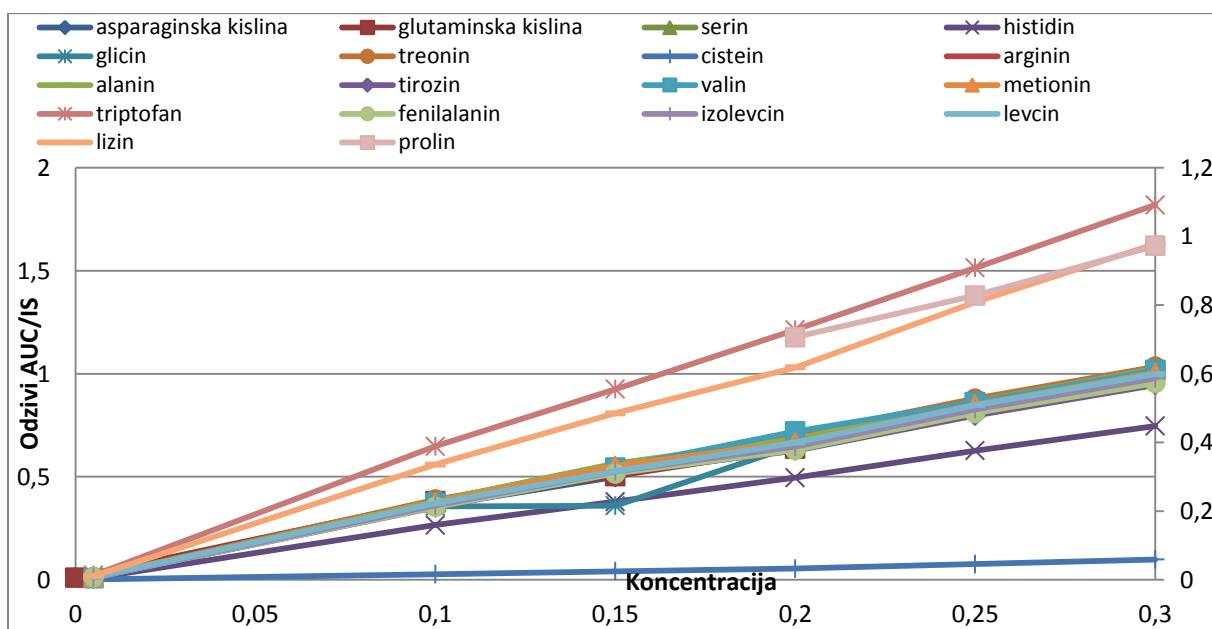
Linearnost odzivov smo določali s sestavljenimi standardi pred hidrolizo ter z redčenimi standardi po hidrolizi. V preglednici XIX so prikazani rezultati določanja linearnosti s parametri umeritvenih premic (naklon premice (k), začetna vrednost (n) in Pearsonov koeficient (r)). Za sestavljene standarde so podani rezultati za vse štiri parametre kvantifikacije (AUC, AUC/IS, H, H/IS), za redčene standarde samo AUC/IS. Posebej (rumeno) so označene vrednosti z najbliže 1 med primerjanimi parametri kvantifikacije. Parameter AUC/IS ima pri vseh aminokislinaх najvišje vrednosti ter pri redčenju ohranja linearnost.

Preglednica XIX. Parametri umeritvenih premic ob določanju linearnosti.

	Določanje linearnosti pred hidrolizo									Po hidrolizi		
	AUC [mAU*min]			AUC/IS			H [mAU]			H/IS		
	k	n	r	k	n	r	k	n	r	k	n	r
Asp	4,44	0,19	0,99	2,53	0,00	1,00	238,28	17,22	0,98	11,28	0,04	0,99
Glu	4,55	0,16	0,99	2,54	0,00	1,00	46,05	1,75	0,99	2,03	-0,02	0,99
Ser	4,48	f0,21	1,00	2,54	0,01	1,00	78,58	3,50	0,99	3,53	-0,02	0,99
Hys	3,29	0,14	0,99	1,86	0,00	1,00	60,76	2,32	0,99	2,71	-0,03	0,99
Gly	4,41	0,13	0,97	2,48	-0,02	0,99	73,20	2,06	0,96	3,25	-0,05	0,97
Thr	4,40	0,24	0,99	2,56	0,02	1,00	73,01	3,58	0,99	3,33	-0,02	0,99
Cys	0,44	0,01	0,98	0,24	0,00	0,99	7,79	0,11	0,97	0,34	-0,01	0,98
Arg	4,45	0,22	1,00	2,52	0,02	1,00	77,38	3,33	0,99	3,46	-0,02	1,00
Ala	4,46	0,22	0,99	2,53	0,02	1,00	68,65	3,27	1,00	3,09	-0,02	1,00
Tyr	4,11	0,20	0,99	2,33	0,02	1,00	67,87	1,59	0,96	3,01	-0,06	0,98
Val	4,76	0,15	1,00	2,56	0,01	1,00	57,13	2,42	0,98	2,42	0,01	1,00
Met	4,37	0,21	0,99	2,48	0,02	1,00	57,88	3,24	0,99	2,58	0,01	1,00
Trp	7,89	0,36	0,99	4,51	0,01	1,00	139,0	3,22	0,99	5,88	-0,07	0,99
Phe	4,16	0,20	0,99	2,36	0,01	1,00	64,22	3,32	1,00	2,88	0,00	1,00
Ile	4,25	0,20	0,99	2,42	0,01	1,00	62,44	3,58	1,00	2,83	0,00	1,00
Leu	4,34	0,21	0,99	2,47	0,01	1,00	67,57	3,52	1,00	3,05	-0,01	1,00
Lys	7,20	0,27	0,99	4,04	0,00	1,00	128,6	5,30	0,99	5,72	-0,04	1,00
Pro	3,47	0,43	0,95	2,00	0,13	1,00	23,03	15,62	1,00	1,50	0,61	0,82

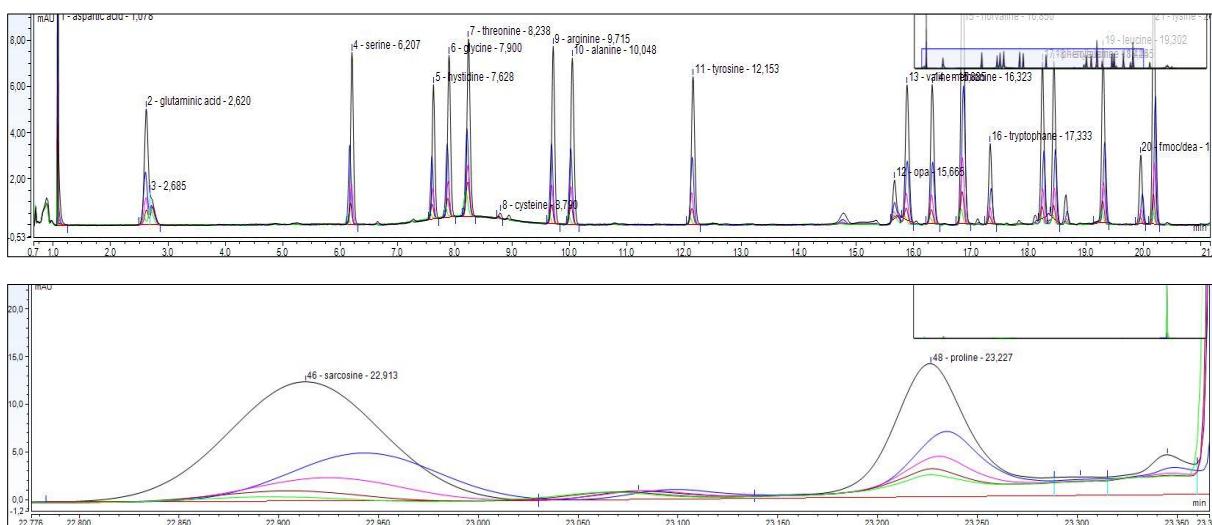
4. Rezultati

Na sliki 38 je prikazana odvisnost odzivov AUC/IS od naraščanja koncentracije vzorca.



Slika 38. Odvisnost AUC/IS od koncentracija vzorca. Koncentracija je podana v $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

Na sliki 39 so prekrivno prikazani kromatogrami posameznih redčenj STVZ-H. Označeni so vrhovi identificiranih aminokislin.



Slika 39. UV-VIS 1 in 2 kromatograma določanja linearnosti odzivov ob različnih redčenjih STVZ-H.

4.3.4 Odzivnost

Odzivnost je razmerje med količino vzorca in njegovim odzivom (25). Izračunamo jo na dva načina: (I) povprečno vrednost odzivov kvantifikacijskih parametrov iz določanja ponovljivosti ob zaporednem injiciranju delimo s količino posamezne aminokisline v STVZ (P), (II) izenačimo z naklonom umeritvenih premic kvantifikacijskih parametrov iz določanja linearnosti pred hidrolizo (k). V preglednici XX so prikazane izračunane vrednosti odzivnosti. Z rumeno so označene največje vrednosti glede na način izračuna znotraj istega parametra in z zeleno največje vrednosti med parametri. Največjo vrednost ima pri H.

4. Rezultati

Preglednica XX. Odzivnost aminokislin v odvisnosti od kvantifikacijskih parametrov in načina izračuna.

	AUC [mAU*min] P k		AUC/IS P k		H [mAU] P k		H/IS P k	
Asp	2,24	4,44	0,958	2,53	166,052	238,28	5,794	11,28
Glu	2,126	4,55	0,91	2,54	21,106	46,05	0,738	2,03
Ser	2,288	4,48	0,98	2,54	41,808	78,58	1,458	3,53
Hys	1,68	3,29	0,718	1,86	31,514	60,76	1,1	2,71
Gly	2,202	4,41	0,944	2,48	37,556	73,20	1,31	3,25
Thr	2,342	4,40	1,002	2,56	38,898	73,01	1,358	3,33
Cys	0,188	0,44	0,08	0,24	3,378	7,79	0,118	0,34
Arg	2,326	4,45	0,996	2,52	40,358	77,38	1,408	3,46
Ala	2,338	4,46	1,002	2,53	36,56	68,65	1,276	3,09
Tyr	2,168	4,11	0,928	2,33	34,62	67,87	1,208	3,01
Val	2,538	4,76	1,086	2,56	25,202	57,13	0,88	2,42
Met	2,318	4,37	0,992	2,48	27,658	57,88	0,966	2,58
Trp	2,127	7,89	0,91	4,51	29,945	139,0	1,045	5,88
Phe	2,22	4,16	0,95	2,36	32,978	64,22	1,15	2,88
Ile	2,274	4,25	0,974	2,42	33,756	62,44	1,178	2,83
Leu	2,336	4,34	1	2,47	36,15	67,57	1,262	3,05
Lys	3,752	7,20	1,606	4,04	67,422	128,6	2,352	5,72
Pro	1,692	3,47	0,712	2,00	11,44	23,03	0,464	1,50

4.3.5 Kalibracija

Metodi smo določili točnost na podlagi analize STBSA v treh neodvisnih paralelah in primerjave pridobljenih rezultatov z referenčnimi podatki (Rf) (22). Rezultati so navedeni v preglednici XXI. Prikazane so AUC/IS vrednosti odzivov (O), določene vsebnosti pri posameznih odzivih (V), odstopanje od reference (Δ) in skladnost (S). Z rumeno so označene vrednosti, ki so znotraj 10 % referenčne vrednosti (25,30). V skladu s postavljenimi zahtevami za skladnost pri analizi standardnega proteina je metoda sposobna ustrezeno določiti 8 aminokislin ter celokupne proteine. Triptofana ni mogoče zaznati..

Preglednica XXI. Določanje vsebnosti ob kalibraciji metode.

Rf	1. paralela				2. paralela				3. paralela				Povprečje	
	O	V	Δ	S	O	V	Δ	S	O	V	Δ	S	Δ	S
Asp 10,900	0,090	9,565	0,123	NE	0,106	11,048	0,014	DA	0,096	10,022	0,081	DA	0,072	DA
Glu 16,500	0,169	16,235	0,016	DA	0,206	18,472	0,120	NE	0,193	17,296	0,048	DA	0,061	DA
Ser 4,200	0,078	3,642	0,133	NE	0,060	4,554	0,084	DA	0,056	4,223	0,005	DA	0,074	DA
Hys 4,000	0,027	3,294	0,177	NE	0,021	3,873	0,032	DA	0,019	3,565	0,109	NE	0,106	NE
Gly 1,800	0,068	1,747	0,029	DA	0,029	1,645	0,086	DA	0,027	1,539	0,145	NE	0,087	DA
Thr 5,800	0,114	6,044	0,042	DA	0,100	8,250	0,422	NE	0,095	7,851	0,354	NE	0,273	NE
Cys 6,500	0,005	3,580	0,449	NE	0,011	7,005	0,078	DA	0,009	6,085	0,064	DA	0,197	NE
Arg 5,900	0,069	5,548	0,060	DA	0,062	5,590	0,052	DA	0,061	5,512	0,066	DA	0,059	DA
Ala 6,300	0,135	6,051	0,039	DA	0,129	6,398	0,016	DA	0,124	6,155	0,023	DA	0,026	DA
Tyr 5,100	0,038	4,475	0,123	NE	0,072	6,923	0,357	NE	0,069	6,601	0,294	NE	0,258	NE
Val 5,900	0,062	5,270	0,107	NE	0,100	5,487	0,070	DA	0,097	5,324	0,098	DA	0,092	DA
Met 0,800	0,008	0,567	0,291	NE	ND	ND	ND	NE	ND	ND	ND	NE	0,291	NE
Trp 0,600	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NE	ND	ND	ND	NE	ND	ND

4. Rezultati

Phe	6,600	0,050	5,379	0,185	NE	0,068	6,445	0,023	DA	0,056	5,255	0,204	NE	0,137	NE
Ile	2,600	0,025	2,160	0,169	NE	0,035	2,097	0,193	NE	0,032	1,929	0,258	NE	0,207	NE
Leu	12,300	0,180	10,535	0,143	NE	0,203	11,763	0,044	DA	0,201	11,597	0,057	DA	0,081	DA
Lys	12,800	0,319	11,386	0,110	NE	0,161	8,471	0,338	NE	0,194	10,196	0,203	NE	0,217	NE
Pro	4,800	0,064	3,538	0,263	NE	0,095	7,324	0,526	NE	0,085	6,577	0,370	NE	0,386	NE
CP	113,4		99,016	0,13	NE		115,345	0,017	DA		109,727	0,033	DA	0,06	DA

4.4 Analiza vzorcev in ovrednotenje rezultatov

Vzorci so označeni od 1 do 10 (glej poglavje 3.1).

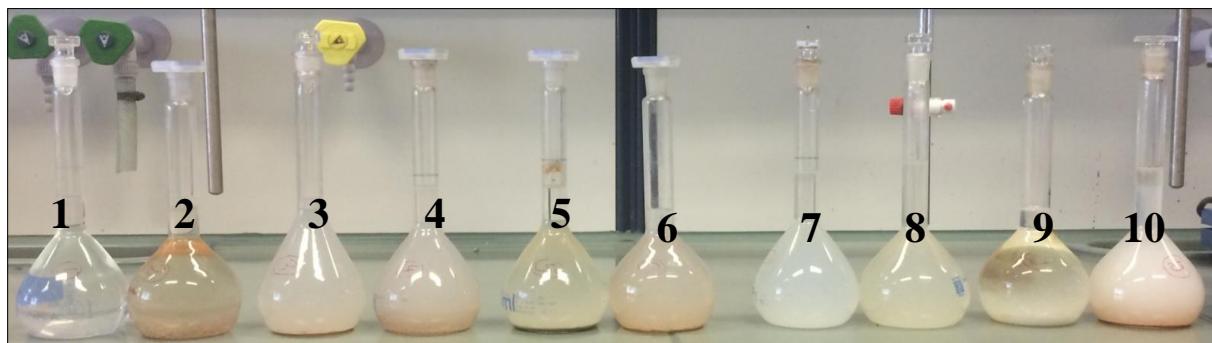
4.4.1 Vizualni pregled vzorcev

V preglednici XXII so predstavljeni rezultati vizualnega ovrednotenja disperzij vzorcev.

Preglednica XXII. Organoleptični podatki o praških vzorcev in njihovih disperzijah.

VZ	Barva praška	Barva in motnost disperzije	Barva oborine	Barva in motnost topila
1	Belo rumen	Rahlo bela, skoraj prosojna	Rahlo bela	Prosojna
2	Belo rumen	Rjava, skoraj prosojna	Rjava	Bela, prosojna
3	Belo rjav	Belo rjava, motna	Rjava	Bela, motna
4	Belo rjav	Belo rjava, motna	Rjava	Bela, motna
5	Zelen	Zelena, motna	Zelena	Zelena, motna
6	Belo rjav	Rjava, motna	Rjava	Rjava, motna
7	Belo rumen	Bela, motna	Bela	Bela, motna
8	Bel	Bela, motna	Bela	Bela, motna
9	Bel	Bela, motna	Bela	Prosojna
10	Belo rjav	Rjava, motna	Rjava	Bela, motna

Na sliki 40 so prikazane disperzije vzorcev po 24 urnem posedanju.



Slika 40. Disperzije vzorcev po 24 urni sedimentaciji.

4.4.2 Določanje vsebnosti in skladnosti s specifikacijami

Vsebnost posameznih aminokislin smo izračunali na podlagi odziva iste aminokisline v STVZ, STVZ-H in vzorcu opisanega kot AUC/IS (glej enačbo 1). Vsebnost celokupnih proteinov smo izračunali kot vsoto vrednosti posameznih aminokislin (glej enačbo 2). V preglednici XXIII je prikazan izračun vsebnosti aminokislin in celokupnih proteinov na primeru vzorca 1. Navedeni so molska masa aminokislin (M), kolčina aminokislin v STVZ pred hidrolizo (c_0) [$\mu\text{mol} / \text{mL}$], odziv v STVZ, odziv v STVZ-H, odziv v vzorcu, določene vsebnosti pri posameznih odzivih (V), specificirana vrednost (Sf), odstopanje od specifikacije (Δ) in skladnost (S). Navedeni sta tudi izračunana in referenčna vrednost celokupnih proteinov (CP).

4. Rezultati

Preglednica XXIII. Primer izračuna vsebnosti aminokislin za vzorec 1.

M	STVZ		Vzorec AUC/IS	V	Izračun vsebnosti			
	c ₀	AUC/IS			STVZ-H AUC/IS	Sf	Δ	S
Asp	133,1	0,2	0,275	0,234	0,553	8,107	9,760	0,169 NE
Glu	147,13	0,2	0,338	0,350	1,311	11,672	12,620	0,075 DA
Ser	105,09	0,2	0,497	0,538	0,814	3,226	4,390	0,265 NE
Hys	155,15	0,2	0,275	0,288	0,081	0,922	1,700	0,458 NE
Gly	75,07	0,2	0,641	1,295	1,004	0,634	1,520	0,583 NE
Thr	119,12	0,2	0,494	0,407	0,687	5,382	6,530	0,176 NE
Cys	120,15	0,2	0,040	0,077	0,183	3,326	1,970	0,689 NE
Arg	174,2	0,2	0,476	0,547	0,188	1,148	1,970	0,417 NE
Ala	98,09	0,2	0,482	0,537	0,927	3,341	4,210	0,206 NE
Tyr	181,19	0,2	0,336	0,298	0,110	1,656	2,510	0,340 NE
Val	117,15	0,2	0,304	0,257	0,383	4,545	5,910	0,231 NE
Met	149,21	0,2	0,438	0,440	0,159	1,183	2,060	0,426 NE
Trp	204,22	0,2	0,719	0,331	ND	ND	1,610	ND ND
Phe	165,19	0,2	0,336	0,319	0,178	2,128	2,690	0,209 NE
Ile	131,17	0,2	0,329	0,291	0,438	4,907	6,710	0,269 NE
Leu	131,17	0,2	0,494	0,536	1,316	6,531	9,930	0,342 NE
Lys	146,19	0,2	0,900	0,967	1,817	5,620	7,070	0,205 NE
Pro	115,13	0,2	0,461	0,512	0,756	3,362	6,360	0,471 NE
CP					72,229	89,520	0,193	NE

Rezultati določanja vsebnosti so prikazni v preglednicah od XXIV do XXVI. Navedene so določene vsebnosti (V), specifikirana vrednost (Sf), odstopanje od specifikacije (Δ), ovrednotenje skladnosti (S) in ustreznosti (U). Celokupni proteini so označeni s (CP).

Preglednica XXIV. Določanje vsebnosti za vzorce 1, 2 in 3.

AK	Vzorec 1				Vzorec 2				Vzorec 3			
	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S
Asp	8,107	9,760	0,169	NE	9,714	9,090	0,069	DA	6,890	8,230	0,163	NE
Glu	11,672	12,620	0,075	DA	15,451	13,500	0,145	NE	11,412	10,520	0,085	DA
Ser	3,226	4,390	0,265	NE	4,196	2,250	0,865	NE	3,362	3,798	0,115	NE
Hys	0,922	1,700	0,458	NE	1,195	1,800	0,336	NE	0,809	2,216	0,635	NE
Gly	0,634	1,520	0,583	NE	1,227	1,350	0,091	DA	10,681	1,187	7,998	NE
Thr	5,382	6,530	0,176	NE	5,711	3,600	0,586	NE	4,114	5,618	0,268	NE
Cys	3,326	1,970	0,689	NE	7,450	2,430	2,066	NE	6,504	1,583	3,108	NE
Arg	1,148	1,970	0,417	NE	1,669	1,890	0,117	NE	1,583	1,583	0,000	DA
Ala	3,341	4,210	0,206	NE	4,557	3,870	0,178	NE	3,224	3,086	0,045	DA
Tyr	1,656	2,510	0,340	NE	2,903	2,880	0,008	DA	2,237	2,928	0,236	NE
Val	4,545	5,910	0,231	NE	4,264	4,500	0,052	DA	3,214	3,798	0,154	NE
Met	1,183	2,060	0,426	NE	0,578	1,890	0,694	NE	0,315	1,820	0,827	NE
Trp	ND	1,610	ND	ND	ND	2,250	ND	ND	ND	1,187	ND	ND
Phe	2,128	2,690	0,209	NE	1,883	2,880	0,346	NE	1,710	2,137	0,200	NE
Ile	4,907	6,710	0,269	NE	4,528	4,410	0,027	DA	2,954	4,194	0,296	NE
Leu	6,531	9,930	0,342	NE	7,999	9,720	0,177	NE	5,758	8,704	0,338	NE
Lys	5,620	7,070	0,205	NE	5,765	9,090	0,366	NE	4,990	9,100	0,452	NE
Pro	3,362	6,360	0,471	NE	5,173	3,600	0,437	NE	4,056	7,992	0,493	NE
CP	72,229	89,520	0,193	NE	88,388	81,000	0,091	DA	77,939	79,681	0,022	DA
U	NE				NE				NE			

4. Rezultati

Preglednica XXV. Določanje vsebnosti za vzorce 4, 6 in 7.

	Vzorec 4				Vzorec 6				Vzorec 7			
	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S
Asp	5,423	5,863	0,075	DA	8,748	11,000	0,205	NE	8,009	11,000	0,272	NE
Glu	14,534	13,500	0,077	DA	13,701	18,100	0,243	NE	13,227	18,100	0,269	NE
Ser	3,854	4,979	0,226	NE	3,889	4,600	0,155	NE	3,800	4,600	0,174	NE
Hys	1,577	1,800	0,124	NE	1,064	1,700	0,374	NE	1,124	1,700	0,339	NE
Gly	0,995	1,350	0,263	NE	1,130	1,400	0,193	NE	1,040	1,400	0,257	NE
Thr	3,117	3,453	0,097	DA	4,826	6,700	0,280	NE	4,669	6,700	0,303	NE
Cys	8,649	0,321	25,945	NE	9,178	2,200	3,172	NE	8,876	2,200	3,035	NE
Arg	2,275	2,892	0,214	NE	2,012	2,100	0,042	DA	1,738	2,100	0,172	NE
Ala	2,384	2,490	0,043	DA	4,044	5,000	0,191	NE	3,800	5,000	0,240	NE
Tyr	3,549	4,658	0,238	NE	2,806	2,600	0,079	DA	2,815	2,600	0,083	DA
Val	3,619	5,622	0,356	NE	3,870	5,900	0,344	NE	3,920	5,900	0,336	NE
Met	0,578	2,409	0,760	NE	0,123	2,200	0,944	NE	0,119	2,200	0,946	NE
Trp	ND	1,044	ND	ND	ND	1,400	ND	ND	ND	1,400	ND	ND
Phe	2,640	4,176	0,368	NE	2,292	3,000	0,236	NE	1,797	3,000	0,401	NE
Ile	2,750	4,417	0,377	NE	4,002	6,400	0,375	NE	3,564	6,400	0,443	NE
Leu	5,697	7,630	0,253	NE	7,101	10,600	0,330	NE	7,071	10,600	0,333	NE
Lys	3,475	6,506	0,466	NE	4,694	9,600	0,511	NE	4,444	9,600	0,537	NE
Pro	6,619	8,835	0,251	NE	4,340	5,500	0,211	NE	4,432	5,500	0,194	NE
CP	75,860	87,330	0,131	NE	81,946	82,000	0,001	DA	78,571	82,000	0,042	DA
U	NE				NE				NE			

Preglednica XXVI. Določanje vsebnosti za vzorce 5, 8, 9 in 10.

	Vzorec 5				Vzorec 8				Vzorec 9				Vzorec 10			
	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S	V	Sf	Δ	S
Asp	5,453				7,779				7,278				6,358			
Glu	9,394				18,74				12,52				14,35			
Ser	2,567				3,641				3,417				3,690			
Hys	1,001				1,093				1,080				1,388			
Gly	1,201				0,774				1,007				0,875			
Thr	2,576				4,182				3,816				3,866			
Cys	5,706				7,221				7,308				8,501			
Arg	3,415				1,703				1,706				2,059			
Ala	2,485				3,500				3,309				2,799			
Tyr	1,910				3,004				2,855				3,834			
Val	2,350				3,774				3,506				3,973			
Met	0,198				0,141				0,146				0,171			
Trp	ND				ND				ND				ND			
Phe	1,555				1,814				1,940				2,297			
Ile	1,887				3,488				3,181				3,142			
Leu	3,760				6,580				6,646				6,374			
Lys	2,093				3,063				4,577				3,143			
Pro	2,421				4,464				4,889				6,433			
CP	54,1	50,0	0,08	DA	79,08	70,0	0,13	NE	73,30	90,0	0,19	NE	77,37	78,5	0,01	DA
U	DA				NE				NE				DA			

5. Razprava

Namen magistrske naloge je bil postaviti metodo za izvedbo aminokislinske analize ter jo uspešno uporabiti na izbranih vzorcih proteinskih prehranskih dopolnil. Pri postavitvi izhodiščne metode smo se oprli predvsem na farmakopejske metode (25–27) in tehnična navodila proizvajalcev avtomatskih vzorčevalnikov (48,50,70,71). Odločili smo se, da bomo hidrolizo izvajali po farmakopejski metodi 1 (6 M HCl z 1 % fenolom), saj predstavlja najbolj osnoven pristop k hidrolizi proteinov. V okviru optimizacije smo morali izbrati še način njene izvedbe (LPH ali VPH). Za derivatizacijo smo izbrali metodi 5 (OPA) in 7 (FMOC-Cl) (glej prilog 2). Združevanje je potrebno, saj v vzorcih pričakujemo tudi sekundarne (prolin) in OPA reagira samo z primarnimi amini. Oba reagenta sta primerna za avtomatizirano derivatizacijo in sledečo kromatografijo, saj reagirata hitro in ne absorbirata UV-VIS valovanja (OPA) ali je mogoče zaostali reagent kromatografsko ločiti od produktov (FMOC-Cl). Pri uporabi OPA je avtomatizacija še bolj smotrna, saj so nastali produkti izredno nestabilni (25). Navzkrižno reaktivnost med reagentoma preprečimo z večstopenjsko derivatizacijo (51). Iz tehničnih navodil smo pridobili izhodiščni program za derivatizacijo (UDP 1) (70,71) in izhodiščni gradient (gradient 1) (70,71).

Izhodiščno metodo smo v nadaljevanju optimizirali z namenom olajšati izvedbo in izboljšati analizne parametre. Pri optimizaciji izvedbe smo stremeli k zagotavljanju enostavne, avtomatizirane in visoko zmogljive metode. Poenostavili smo način priprave standardov, reagentov in mobilnih faz, zmanjšali smo število prenosov vzorca med različnimi vsebniki ter pospešili metodo z drugačnimi načini zamrzovanja in sušenja vzorcev. Pri izboljševanju analiznih parametrov smo se osredotočili predvsem na ločljivost in odzivnost ter optimizirali gradient, kromatografsko kolono, UDP in način izvedbe hidrolize.

Končno metodo smo uporabili za preizkus hipotez (glej poglavji 5.2 in 5.3) in analizo vzorcev (glej poglavje 5.4). Hipoteza I je povezana z variabilnostjo retencijskega in relativnega retencijskega časa. Zaradi velikega števila analitov nas je zanimalo, kako se spremenjata oba parametra v odvisnosti od staranja in menjavanja reagentov ter mobilnih faz. Vrednotenje smo izvedli tako, da smo primerjali kromatograme posnete zaporedoma, z razmikom in v različnih sekvencah. Hipoteza II ravno zaradi možnih premikov retencijskega časa predpostavlja, da je identifikacija na osnovi UV-VIS spektrov bolj zanesljiva. Povečana zanesljivost temelji na zaznavanju strukturnih lastnosti posameznih vrhov in neodvisnosti od retencijskega časa. Primerjavo smo izvedli na podlagi vrstnih redov aminokislin pridobljenih z različnimi postopki. Poleg retencijskih časov analitov nas je zanimalo tudi spremenjanje velikosti odziva v odvisnosti od različnih parametrov. Predvidevali smo, da bo hidroliza zaradi nespecifičnosti

5. Razprava

zmanjšala absolutne vrednosti odzivov aminokislin. Nasprotno bo pri večini relativna vrednost odziva ostala enaka kot pred hidrolizo, zaradi njenega enakomernega vpliva na vse komponente v viali (hipoteza III). Za ovrednotenje smo primerjali kromatograma STVZ in STVZ-H. Dodatno smo predvideli, da so odzivi linearno odvisni od koncentracije aminokislin (hipoteza IV). To smo preverili s primerjanjem linearnosti odzivov sestavljenih in redčenih standardov. S kalibracijo metode smo preizkusili, ali je metoda zmožna ustrezeno točno določiti vsebnost posamezne aminokisline v vzorcu. Mejo smo povzeli po farmakopejski zahtevi, da naj bodo izračunane vsebnosti aminokislin v standardu referenčnega proteina (STBSA) znotraj 10% referenčnih vrednosti (hipoteza V). Zadnja hipoteza (VI) je usmerjena v drugi del naloge, ko smo prešli iz razvoja metode na njeno uporabo na izbranih vzorcih. Na podlagi podobnih študij o kakovosti proteinskih prehranskih dopolnil (20) smo predvidevali, da določene vsebnosti posameznih aminokislin ter celokupnih proteinov ne bodo vedno skladne z deklariranimi. Pri tem smo poudarili tudi pomen kalibracije, saj le za te rezultate lahko trdimo, da so točni in jih primerjamo s specifikacijami.

V nadaljevanju so predstavljene in obrazložene posamezne točke naloge, glavni rezultati in ugotovitve povezane s hipotezami.

5.1 Izvedba in optimizacija metode

Metoda za izvedbo aminokislinske analize sestoji iz treh korakov in vmesnih priprav vzorca, ki so shematsko prikazani na sliki 41. Izvedbo metode pričnemo s pripravo vzorcev, standardov in slepe raztopine. Vzorce smo dispergirali in nato sušili namesto neposrednega tehtanja, saj je odmerjanje volumnov z avtomatskimi pipetami bolj natančno od tehtanja majhnih količin praškov. Dispergirali smo jih v bidestilirani vodi, ker smo se z izbranim topilom žeeli čim bolj približati topilu, ki ga navadno uporabljajo uporabniki (voda iz pipe). V procesu optimizacije smo preizkusili tudi dispergiranje v 0,1 M HCl, saj sprememjanje vrednosti pH izboljša topnost aminokislin. V končno metodo dodatka kisline nismo vključili, saj zaradi razjedanja naprave preprečuje liofilizacijo raztopin vzorcev. Vzoreci v vodi niso dobro topni, zato smo morali njihovo dispergiranje izvajati v več stopnjah. Vzorec smo zmešali s topilom, sonificirali in pustili stati. Pred odvzemom vzorca za nadaljnjo analizo smo z mešanjem zagotovili enakomerno vsebnost po celotnem volumnu topila. S tem smo se izognili možnemu odstopanju rezultatov v odvisnosti od časa posedanja in višine odvzema. Vzorce smo pripravljali v treh neodvisnih vialah od osnovne raztopine naprej. Za slepo raztopino smo vzeli bidestilirano vodo.

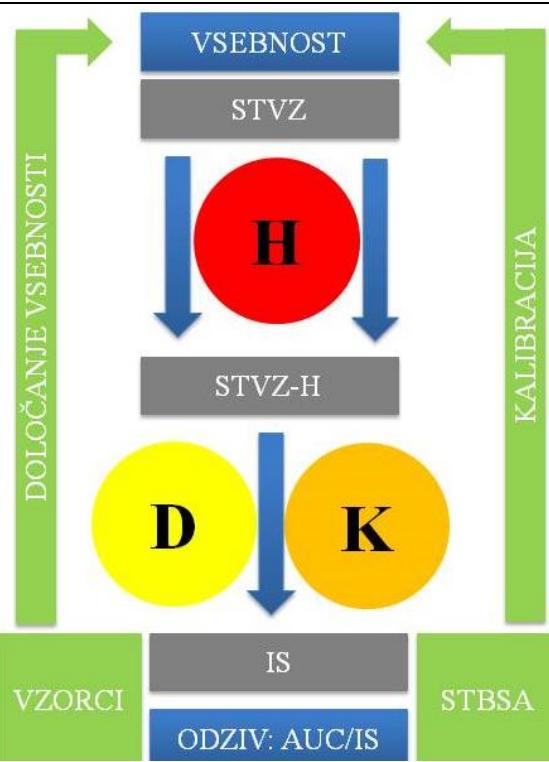


Slika 41. Shematski pregled izvedbe metode

5. Razprava

Za ovrednotenje postopka smo uporabili številne standarde (glej sliko 42). Interna standarda (norvalin za primarne in sarkozin za sekundarne aminokisline (25)) dodamo v vse standarde in vzorce. Njen namen je izboljšanje ponovljivosti med različnimi injiciranjami, različnimi sekvencami in različnimi serijami hidrolize (52). Za izračun vsebnosti in identifikacijo v različnih sekvencah smo uporabljali STVZ in STVZ-H (glej poglavji 5.3 in 5.4). STVZ vsebuje 20 komponent, od tega 17 iz raztopine aminokislín, oba interna standarda in STTPH. Sestavili smo ga neposredno v vialo za kromatografijo ter s tem zmanjšali izgube osnovnih raztopin in povečali natančnost. Ker je od točnosti koncentracij tega standarda odvisna analizna točnost celotnega postopka, smo se odločili, da bomo izhodiščno mešanico aminokislín redčili v razmerju 1:1 za lažje zagotavljanje kvantitativnosti prenosa njene vsebine v STVZ. Standard triptofana smo dodali posebej, saj je med aminokislinami najmanj stabilen. S tem preprečimo onesnaženje mešanice ostalih aminokislín z njegovimi razpadnimi produkti. V STVZ smo poskusili doseči približno enake koncentracije, kot smo jih pričakovali v vzorcih. STVZ-H je STVZ izpostavljen enakim pogojem kot vzorci med hidrolizo. Uporabljali smo ga za izračun vsebnosti aminokislín v vzorcu pred hidrolizo (53). Za kalibracijo smo uporabili standard govejega serumskega albumina (STBSA) (25).

Vzorce in standarde, ki se morajo hidrolizirati, smo pripravili v viale za stiskanje. Izbrali smo jih, ker edine prenesejo izpostavitev pogojem hidrolize brez poškodb ali izhajanja vzorca. Pred hidrolizo je bilo potrebno vse viale posušiti (25). To smo storili z liofilizacijo. Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku, saj zamrzovanje v zmrzovalniku na do -20°C ni zadostovalo. Makroskopsko to lahko opazujemo kot izhajanje pene v prvi stopnji liofilizacije, ko pri znižanju tlaka zavre preostalo tekoče topilo. Zmrzovanje v tekočem dušiku izniči ta problem, saj dosega občutno nižje temperature (-196°C v primerjavi z -20°C). Uporaba tekočega dušika tudi občutno pospeši postopek, saj so vzorci zamrznjeni v eni uri namesto v vsaj 12 urah.



Slika 42. Shematski prikaz izvedbe aminokislinske analize in uporabljenih standardov za izračun vsebnosti pred hidrolizo.

5. Razprava

Izvajali smo klasično kislinsko hidrolizo v tekoči fazi (LPH) s 6 M HCl z dodanim 1 % fenolom. Reagent smo dodali neposredno v viale z liofiliziranimi vzorci, jih prepihali z argonom in zatesnili. Tekom optimizacije smo preizkusili tudi hidrolizo v plinasti fazi (VPH). Oba postopka imata enak proces priprave vzorcev, sušenje vzorcev po hidrolizi in dajeta primerljive kromatograme, vendar ima VPH izredno nizko kapaciteto. Zaradi slednjega smo se odločili, da bomo uporabljali hidrolizo v tekoči fazi. Sušenje vzorcev in prepihanje z argonom smo izvedli za zmanjšanje porabe reagenta za druge namene (reagiranje z vodo in oksidacija). Fenol smo dodali v reagent za zmanjšanje halogenizacije tirozina (25). Zatesnjene viale stehtamo in postavimo v sušilnik. Potrebni so ostri pogoji hidrolize, saj cepimo amidno vez, ki je dodatno elektronsko stabilizirana (8,29). Po hidrolizi viale vizualno pregledamo za znaki izhajanja vsebine (strukturna integriteta pokrovčkov in fluidnost vsebine) ter stehtamo. Vizualno in kvantitativno pregledovanje vsebine vial po hidrolizi smo izvajali zaradi težav z vzdržljivostjo pokrovov med hidrolizo, ki včasih vseeno popustijo. Z ugotavljanjem variabilnosti v masi med vialami in z vizualnim pregledom zagotovimo, da so spremembe v vsebini zaradi hidrolize enakomerne ter da ni prišlo do hudi sprememb (odprt septum, popolnoma presušena vsebina). Vzdržljivost vial je pomembna, saj med hidrolizo iz vial izhlapeva predvsem kislina, kar zmanjša njeno hidrolitično učinkovitost.

Po hidrolizi vzorcem z rotavapiranjem odstranimo zaostala topila. Pogoji rotavapiranja so zelo ostri (v primerjavi s pogosto uporabljenimi organskimi topili), saj iz vial odparevamo vodo. Med optimizacijo smo preizkusili vzorce ponovno sušiti z liofilizacijo, vendar to zaradi prisotne kisline ni bilo mogoče. Posušenim vialam smo dodali 1 mL bidestilirane vode ter vsebino kvantitativno filtrirali v viale za kromatografijo. S tem je bil postopek priprave vzorcev in standardov za končno analizo končan.

Pred pričetkom kromatografije in derivatizacije pripravimo reagente za derivatizacijo in mobilne faze. Pri pripravi obojih smo izvedli nekaj sprememb glede na izhodiščni protokol. Pri pripravi MFA in 0,4 M boratnega pufra smo opazili, da je pH zelo stabilen (raztopina je pufer z visoko kapaciteto) in jima je posledično težko uravnati pH na zahtevane vrednosti. Problem smo rešili tako, da smo uporabili bolj koncentrirano kislino (koncentrirana HCl namesto 0,1 M HCl) oziroma smo nekaj baze dodali že k osnovnim sestavinam pufra (trdni KOH). Pri pripravi MFA smo poleg tega izpustili tudi konzervans (natrijev azid), saj zaradi velike porabe njeno shranjevanje ni potrebno in ker konzervans vnaša dodatno dušikovo spojino, ki lahko moti derivatizacijo. Vse spremembe tudi poenostavijo postopek.

5. Razprava

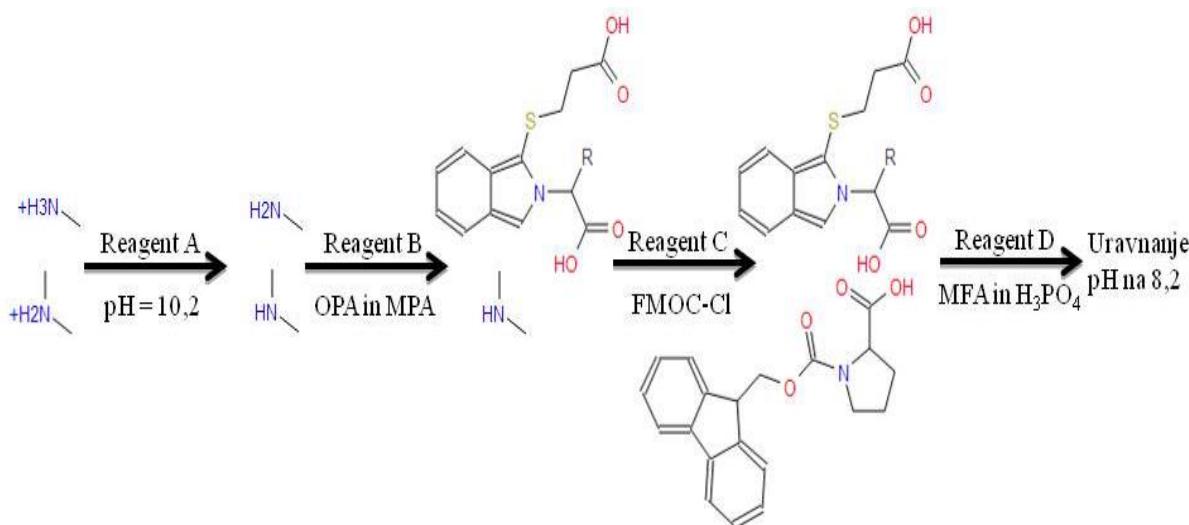
Pri reagentu D smo preizkusili, kaj se zgodi, če iz protokola izpustimo H_3PO_4 . Ugotovili smo, da je prisotnost kisline ključna, saj reagent D s kislino bolje zniža pH reakcijske zmesi proti pH MFA in s tem zmanjša pH obremenitev kolone. Edina slaba lastnost je povečanje vrha topila, ki se loči od vrha prve aminokisline.

Vse pripravljene vzorce, standarde, slepe raztopine, reagente za derivatizacijo in mobilne faze smo namestili na HPLC. Snemanje sekvenc smo pričeli z dvema pretokoma topila in dvema injiciranjema slepa raztopine (glej sliko 43). Nato so sledili vsi standardi, STVZ-H in slepa sta se ponovila na vsakih 10 injiciranj. Pomembno je, da se vzorci analizirajo s pripadajočima STVZ-H in STBSA.

slepa	Blank
?	Unknown
?	Unknown
?	Unknown
slepa	Blank
STVZ	Calibration Standard
STVZ-H	Calibration Standard
STBSA	Calibration Standard
?	Unknown
slepa	Blank
STVZ-H	Calibration Standard

Slika 43. Primer postavitve sekvence za analizo vzorcev.

Derivatizacijo smo izvajali popolnoma avtomatizirano s pomočjo UDP (glej sliko 44 in prilogo 4). Postopek se prične, ko injektor odvzame 1 μL zraka, 5 μL reagenta A in 1 μL vzorca. S tem korakom se uravna pH reakcijske zmesi na 10,2. Pri tem se aminska skupina na α -ogljiku deionizira in postane bolj nukleofilna (8,29). Z obračanjem vijaka in čakanjem zagotovimo homogenost vsebine v zanki. V naslednjem koraku injektor odvzame 1 μL reagenta B in ponovno premeša vsebino. V tej stopnji poteče derivatizacija primarnih aminov z OPA in MPA do derivata izoindola, ki absorbira UV-VIS in fluorescira (70). V naslednji stopnji se z 1 μL reagenta C in ponovnim mešanjem derivatizirajo sekundarni amini do derivatov karbaminske kisline (33). V zadnji stopnji se z 14 μL reagenta D ter mešanjem derivatizacija zaključi in uravna pH reakcijske zmesi na pH MFA. Ta stopnja je namenjena zaščiti kolone pred previsokimi pH in zaostalimi reagenti.

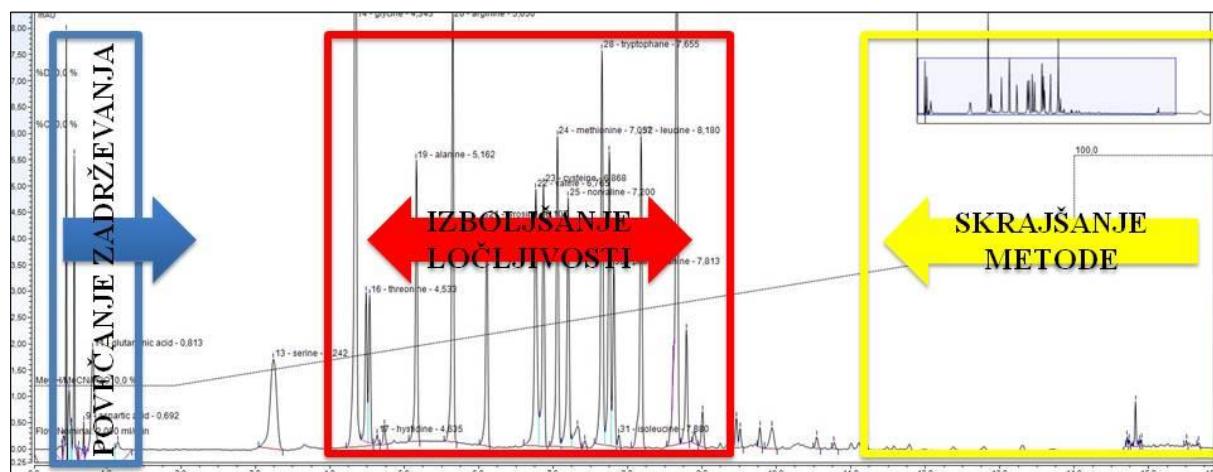


Slika 44. Potek derivatizacije.

5. Razprava

Pri optimizaciji UDP smo želeli izboljšati odzivnost aminokislin (zlasti cisteina, sarkozina in prolina) in omogočiti povezljivost med sekvencami. V zaporedju dodajanja reagentov sta si UDP1 in UDP3 enaka, UDP2 pred prvim odvzemom vzorca že zmeša reagenta A in B. Z uvedbo stopenj mešanja smo pri derivatizaciji s FMOC-Cl povečali odzivnost in jo poenotili pri derivatizaciji z OPA. V končnem protokolu smo le še dodali spiranje injektorja po derivatizaciji, kar nam je omogočilo izvajanje več zaporednih sekvenc.

Po injicirjanju se derivati aminokislin ločujejo na kromatografski koloni na podlagi ravnotežja interakcij med stacionarno in mobilno fazo. Uporabljali smo reverznofazni kromatografski sistem, saj so derivatizirane aminokisline nepolarne. Z optimizacijo gradiента in pretoka ter menjavanjem kromatografske kolone smo želeli povečati zadrževanje aminokislin, izboljšati ločljivost in skrajšati metodo (glej slike 45, 46 in 47).

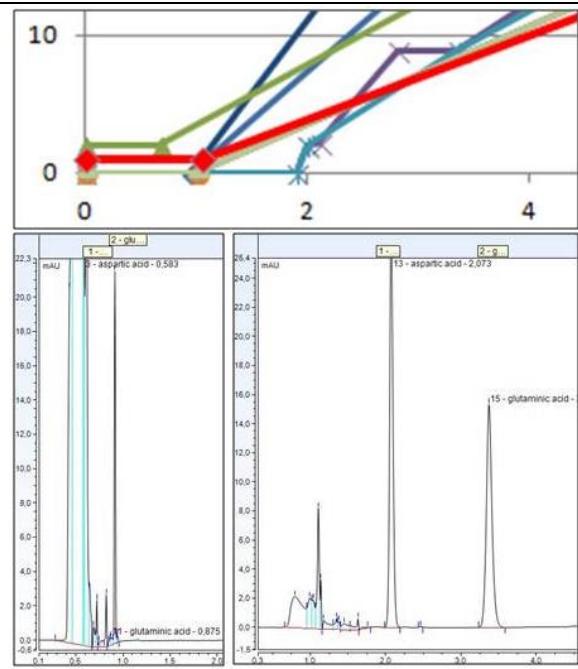


Slika 45. UV-VIS 1 kromatogram STVZ posnet z izhodiščno metodo z označenimi področji optimizacije.

Na kromatogramu začetne metode smo identificirali skupine aminokislin, pri katerih je bila potrebna nadaljnja optimizacija. Pri asparaginski kislini in glutaminski kislini je bilo potrebno povečati zadrževanje na koloni, saj sta se eluirali že v vrhu topila. Pri treh skupinah aminokislin je bilo potrebno izboljšati ločljivost. Vrhovi serina, alanina, arginina, tirozina in lizina so bili že v osnovni metodi ustrezno ločeni od okolice. Vrhova asparaginske in glutaminske kisline ostaneta, kljub pripenjanju nepolarnih skupin, močno polarna zaradi ionizirane karboksilne skupine v stranski verigi (glej sliko 46). Njuno zadrževanje smo povečali z manjšim pretokom (iz 2 mL/min na 1,5 mL/min) in z zmanjšanjem količine organske faze na začetku elucije (2 % na 1 %). Še boljše rezultate dobimo s pretokom 1 mL/min ter 0 % organske faze. Vendar je takva metoda prepočasna in močno uničuje stacionarno fazo, zato je v končni različici nismo uporabili.

5. Razprava

Ločljivosti med glicinom, histidinom, treoninom in cisteinom, med valinom, metioninom, norvalinom in triptofanom ter med fenilalaninom, izolevcinom in levcinom smo delno izboljšali z manjšo hitrostjo pretoka (iz 2 mL/min na 1,5 mL/min), nižjim naklonom gradiента in izokratskimi območji v gradientu (glej sliko 47). Klub delnem izboljšanju ločljivosti s spremenjanjem gradiента in pretoka, nekaterih vrhov ni bilo mogoče ločiti. Zato smo preizkusili še druge kromatografske kolone z različnimi volumni in lastnostmi stacionarne faze. Po primerjavi smo izbrali kolono 5. Posebno pozornost smo posvetili tudi zaščiti kolone, zaradi neposrednega injiciranja reagentov ter visokih delovnih pH vrednosti. V ta namen smo dodali predkolono in podaljšali spiranje po sekvenci.



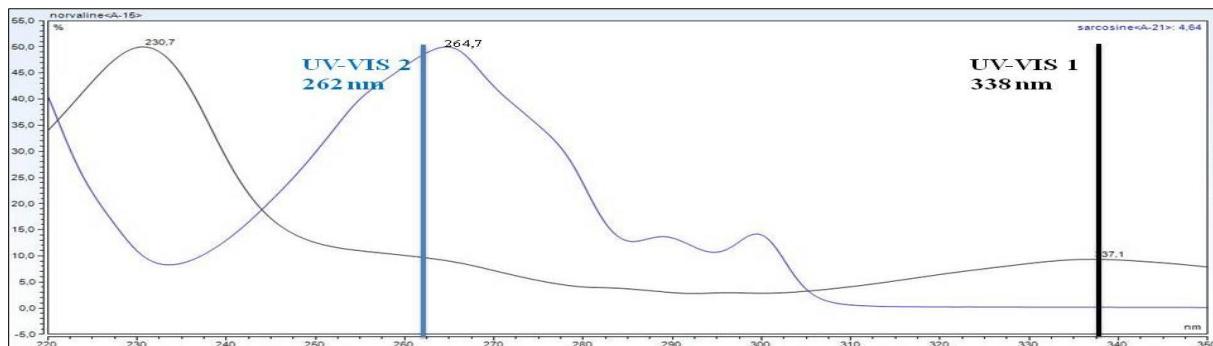
Slika 46. Spreminjanje gradienta (%MFB) v odvisnosti od volumna retencije (izsek iz grafa 19). Spodaj sta prikazana izseki iz kromatogramov začetne in končne (rdeči gradient) metode z opazovanima vrhovoma asparaginske ter glutaminske kisline.



Slika 47. Spreminjanje ločljivosti med vrhovi v UV-VIS 1 pri spremembi gradienta in kromatografske kolone. Označena območja (modro in rdeče) sovpadajo.

5. Razprava

Po ločevanju se derivati aminokislin zaznajo na UV-VIS detektorju pri 338 nm za primarne amine derivatizirane z OPA in 262 nm za sekundarne amine derivatizirane z FMOC-Cl (glej sliko 48). Pri izbranih valovnih dolžinah imajo derivati obeh reagentov absorpcijske maksimume. Selektivnost zagotovimo s tem, da FMOC-Cl pri 338 nm ne absorbira ter se derivati OPA predhodno sperejo iz kolone.



Slika 48. UV-VIS spektra norvalina (črno) in sarkozina (modro) z označenima področjema za detekcijo.

S primerjanjem retencijskih časov v STVZ in vzorcih smo opredelili vrhove posameznih aminokislin ter jih nato kvantitativno ovrednotili (glej poglavji 5.3 in 5.4). Kot odziv smo uporabljali razmerje med površino pod krivuljo vrha posamezne aminokisline in internega standarda. Vsebnost posamezne aminokisline v vzorcu pred hidrolizo smo izračunali po enačbi 1 (glej sliko 49). Najprej smo izračunali vsebnost v hidrolizatu iz odziva v hidrolizatu in odziva STVZ-H (modro), nato smo jo preračunali na vsebnost pred hidrolizo glede na razliko med odzivi STVZ in STVZ-H (rdeče). Vsebnost celokupnih proteinov smo izračunali kot vsoto vsebnosti posameznih aminokislin.

Določeno vsebnost pri posamezni aminokislini smo smatrali za skladno s specifikacijami, če se je nahajala znotraj 10 % vrednoti, ki jo je navedel proizvajalec. Vzorec smo označili kot ustrezen, če so se vsi analizni rezultati skladali s specificiranimi vrednostmi pri skladno kalibriranih rezultatih.

$$m(AK) = \frac{\frac{AUC_{AK}^{STVZ}}{AUC_{IS}^{STVZ}} \cdot \frac{AUC_{VZ}^{AK}}{AUC_{VZ}^{IS}}}{\frac{AUC_{AK}^{STVZ-H}}{AUC_{IS}^{STVZ-H}} \cdot \frac{AUC_{VZ}^{AK}}{AUC_{VZ}^{IS}}} \cdot \frac{1,1}{10} M(AK) C_0$$

Preračun na vsebnost pred hidrolizo

Redčenje

Slika 49. Shematska obrazložitev posameznih delov enačbe 1.

5.2 Identifikacija aminokislin

Vrhove aminokislin smo identificirali na podlagi referenčnih relativnih retencijskih in retencijskih časov pridobljenih iz kromatogramov standardov za identifikacijo (glej sliko 50). Identifikacija temelji na prepoznavanju vrhov znotraj določene okolice njihovega referenčnega retencijskega časa neodvisno od njihove kemijske identitete. V vsaki novi sekvenci smo reference prilagodili glede na vrhove v kromatogramu STVZ posnetem v tisti sekvenci.

Zanesljivost te metode temelji na ustreznih ponovljivosti retencijskega časa znotraj sekvence in med sekvencami. Pri primerjanju retencijskih časov kromatogramov pri zaporednem injiciranju ter injiciranje z razmikom (daljše sekvence) smo ugotovili, da je variabilnost pod 1 %. Identifikacija znotraj sekvence torej ni problematična, če so le aminokisline v osnovnem STVZ v sekvenci pravilno prepozname. Za dodatno zmanjšanje variabilnosti znotraj sekvence smo dodali 4 minutno stopnjo ekvibrilacije. Na podlagi primerjave rezultatov analize STVZ v različnih sekvencah z različnimi mobilnimi fazami in reagenti za derivatizacijo smo ugotovili, da variabilnost pri retencijskem času naraste do 7 %, pri relativnem retencijskem času naraste le do 2 %. Iz tega smo ugotovili, da je potrebno identifikacijo med sekvencami izvajati na osnovi relativnega retencijskega časa, znotraj sekvence je ustrezni tudi retencijski čas. S tem smo potrdili hipotezo I, saj je variabilnost obeh parametrov identifikacije med sekvencami pod 10% in je manjša pri relativnem retencijskem času. Sistem se kaže kot zelo robusten in ustrezno ponovljiv.

Zaradi velikega števila vrhov v vsakem kromatogramu, variabilnosti v retencijskem času in možnosti menjavanja vrhov smo preizkusili tudi alternativni metodi za identifikacijo na podlagi UV-VIS spektrov in retencijskega časa ter UV-VIS spektrov. Predpostavljali smo, da bosta postopka temelječa na spektrih bolj zanesljiva in robustna, saj ne bosta odvisna od lastnosti sistema, ampak le od absorpcijskih lastnosti in kemijske entitete posameznega vrha. Spektre smo pridobili iz kromatogramov čistih aminokislin, ki smo jih uporabili tudi za

#	Name	Ret.Time	Window	Channel
1	aspartic acid	1,269	0,045 AF	UV_VIS_1
2	glutaminic acid	2,103	0,209 AF	UV_VIS_1
3	serine	5,323	0,148 AF	UV_VIS_1
4	histidine	6,605	0,187 AF	UV_VIS_1
5	glycine	6,972	0,095 AF	UV_VIS_1
6	threonine	7,381	0,145 AF	UV_VIS_1
7	cysteine	7,941	0,140 AF	UV_VIS_1
8	arginine	8,785	0,120 AF	UV_VIS_1
9	alanine	9,222	0,171 AF	UV_VIS_1
10	tyrosine	11,074	0,166 AST	UV_VIS_1
11	valine	14,806	0,113 AF	UV_VIS_1
12	methionine	15,358	0,156 AF	UV_VIS_1
13	norvaline	15,960	0,156 AF	UV_VIS_1
14	tryptophane	16,778	0,136 AF	UV_VIS_1
15	phenylalanine	17,372	0,112 AF	UV_VIS_1
16	isoleucine	17,652	0,112 AF	UV_VIS_1
17	leucine	18,475	0,142 AF	UV_VIS_1
18	lysine	19,500	0,185 AF	UV_VIS_1
19	sarcosine	22,232	0,177 AF	UV_VIS_2
20	proline	22,810	0,245 AF	UV_VIS_2

Slika 50. Obrazec za identifikacijo aminokislin. Prikazani so referenčni vrstni red, retencijski čas, identifikacijske okolice in valovna dolžina identifikacije.

5. Razprava

postavitev referenčnega vrstnega reda. Pri identifikaciji izključno na podlagi UV-VIS spektrov je 6 aminokislin napačno identificiranih ali neidentificiranih (asparaginska kislina, treonin, valin, lizin, sarkozin in prolin), 2 pri hkratnem upoštevanju retencijskega časa in UV-VIS spektrov (asparaginska kislina in valin). S tem smo zavrnili hipotezo II, saj alternativni postopek identifikacije ni ustrezен, ker ne uspe pravilno prepozнатi vseh 20 analitov. Ocenili smo, da sta poglavita razloga za to prevelika podobnost spektrov derivatov posameznih aminokislin in vpliv čistosti vrha na njegov UV-VIS spekter. Večina aminokislin nima lastne UV-VIS absorptivnosti, zato je njihov spekter odvisen predvsem od absorptivnosti dodanih kromofornih skupin. To pomeni, da so si spektri med seboj zelo podobni in program med njimi težko loči (sarkozin – prolin). Pri aminokislinah, ki tudi po dodatku retencijskega časa ostaneta neidentificirani (asparaginska kislina in valin), najverjetneje primesi iz ozadja dovolj vplivajo na spektra vrhov, da nista podobna referencam.

Po identifikaciji smo ovrednotili še preostale vrhove, ki ne pripadajo izbranim analitom. Za ocenjevanje ostankov OPA in FMOC-Cl na kromatogramu smo uporabili amonijak (STOPA) in dietilamin (STFMOC). Njun namen je stabilizirati ostanke obeh reagentov brez velikega spremjanja njihovih hidro-lipofilnih lastnosti, zato se vrhovi v kromatogramih pojavijo približno pri enakih retencijskih časih kot vrhovi neporabljenih reagentov. Za ovrednotenje vpliva ozadja smo uporabili slepo raztopino po hidrolizi. Opazimo (glej sliko 27), da je začetni vrh odvisen od prisotnosti H_3PO_4 v reagentu D, pri istem retencijskem času kot ga ima glutaminska kislina je v UV-VIS 2 prisoten velik vrh FMOC-Cl, v UV-VIS 2 je med serinom in argininom prisoten dolg vrh FMOC-Cl, vrh valina prekriva ostanek OPA pri UV-VIS 1, vrh fenilalanina ima v UV-VIS 2 enakoležni vrh OPA, vrh lizina ima pri obeh valovnih dolžinah sledove obeh reagentov in pod sarkozinom je prisoten velik negativni vrh FMOC-Cl. Slepa raztopina ima prekrivanja pri asparaginski kislini, glutamski kislini, treoninu, valinu in lizinu. Vpliv ugotovljenih prekrivanj smo ovrednotili z določanjem čistosti identificiranih vrhov. Čistost je znatno zmanjšana (več kot 1%) pri fenilalaninu, lizinu in sarkozinu. Pri vseh treh na manjšo čistost vplivata slepa in zaostali reagenti. Slepo raztopino po hidrolizi smo tudi linearno redčili. Odzivi po redčenju so si med seboj enaki in so enaki osnovi slepi raztopini, kar pomeni da vrhovi v kromatogramu izhajajo iz reagentov in ne iz same slepe raztopine.

5.3 Kvantifikacija odzivov

Za uporabnost metode smo morali poleg identifikacije vrhov ugotoviti tudi, kako se spreminjajo odzivi v odvisnosti od različnih parametrov metode. Ovrednotili smo vpliv hidrolize, variabilnosti in količine vzorca na odziv ter določeno vsebnost. Pri ponovljivosti, odzivnosti in linearnosti smo primerjali tudi vpliv načina ovrednotenja na rezultate.

Ob vrednotenju velikosti odzivov smo upoštevali priporočilo, da naj metoda pri standardih in proteinih s poznano sestavo določa vsebnosti posameznih aminokislin ter celokupnih proteinov v okolici 10 % referenčne vrednosti (25,30). Posledično smo vrednosti znotraj te okolice pri primerjanju kvantitativnih rezultatov šteli za enake, saj jih metoda ne loči.

Vpliv hidrolize na posamezne aminokisline smo vrednotili s primerjanjem AUC in AUC/IS odzivov STVZ in STVZ-H. Po hidrolizi se absolutna vrednost odzivov (AUC) pri vseh aminokislinah zniža, kar je posledica kislinske razgradnje in med procesnih izgub. Zaradi uporabe internega standarda lahko primerjamo tudi relativne vrednosti (AUC/IS). Pri tem ugotovimo, da se vrednosti odziva povečajo ali zmanjšajo. To nakazuje, da metoda različno vpliva na posamezne aminokisline, ki so bolj ali manj občutljive od referenčnega internega standarda. Pri nekaterih aminokislinah relativna vrednost spremembe ostane znotraj 10 % odziva pred hidrolizo, kar lahko okarakteriziramo kot enak odziv. To potrjuje hipotezo III.

Ponovljivost injiciranja smo določali z desetkratnim zaporednim injiciranjem STVZ. Odzive smo ovrednotili z vsemi štirimi parametri in primerjali RSD med izračunanimi vrednostmi za posamezna injiciranja. Uporaba internega standarda zniža variabilnost iz 2 % na 0,5 %. AUC/IS ima nižjo variabilnost kot alternativni H/IS, izjemi sta le valin in prolin, kjer ima H/IS boljšo ponovljivost. V vrh valina se občasno integrira še sosedni vrh (ostanek OPA), ki vpliva na površino in ne na višino. Variabilnost prolina je posledica velike variabilnosti pripadajočega internega standarda.

Pri določanju linearnosti smo postopali v dveh korakih. Analizirali smo odzive neodvisnih (sestavljenih) ter odvisnih (redčenih) standardov. Pri prvih smo po enakem postopku kot STVZ pripravili pet ekvivalentov v koncentracijskem območju od 0,1 $\mu\text{mol/mL}$ do 0,3 $\mu\text{mol/mL}$. Izbrane koncentracije pokrivajo okolico pričakovanih odzivov vzorcev. Pri tem smo ugotovili, da so odzivi linearni za večino aminokislin ne glede na način opisa, najboljše vrednosti dosega parameter AUC/IS. Linearost derivatov FMOC smo zaradi višjega praga detekcije lahko opazovali od 0,2 $\mu\text{mol/mL}$ naprej. Pri drugih, smo STVZ-H štirikrat zaporedno polovično redčili. Zanimalo nas je, če se linearno redčenje odraža v linearinem spremenjanju odziva. Primerjali smo samo podatke za parameter AUC/IS, ki je bil pri sestavljenih standardih najbolj ustrezен. Ugotovili smo, da se linearnost ohrani (nad 0,99).

5. Razprava

Primesi dodane v vzorce z reagentom za hidrolizo torej ne vplivajo na linearnost. Oba rezultata potrjujeta hipotezo IV.

Odzivnost je razmerje med odzivom in količino vzorca (25). Izračunali smo jo za vsak parameter kvantifikacije posebej na dva načina in primerjali rezultate. Ugotovili smo, da je odzivnost največja izračunana kot naklon krivulje linearnosti pred hidrolizo in izračunana iz parametra H. Naklon krivulje pred hidrolizo je največji, saj zajame več točk kot izračun iz ponovljivosti. Parameter H ima največjo vrednost, saj so odzivi podani kot H številčno največji. Odzivnost relativnih odzivov je manjša, saj osnovni odziv delimo z odzivom internega standarda in količino vzorca.

Ponovljivost metode smo določili tako, da smo postopek analize za vzorec 1 vodili ločeno v šestih vialah od izhodiščne raztopine naprej. Odzive smo ovrednotili z AUC/IS, za vsako vialo posebej izračunali vsebnost ter RSD med njimi. Vzorce smo smatrali za skladne, če je bila variabilnost manjša od 10 % (25,30). Ugotovili smo, da je od določanih 18 aminokislin in celokupnih proteinov 15 rezultatov znotraj meje, 3 izven in 1 aminokislinski sistem ni zaznal. Aminokisline, ki imajo razsev večji od 10% so glicin, cistein in metionin. Triptofan podleže kislinski razgradnji in ga v vzorcih po hidrolizi ni možno zaznati.

Metodo smo kalibrirali z določanjem aminokislin ter celokupnih proteinov v referenčnem proteinu. V ta namen smo uporabili goveji serumski albumin (STBSA). Proizvajalec ni certificiral njegove aminokislinske sestave, zato smo jo povzeli iz vira (22). Izbrali smo jo, kljub različnim literaturno dostopnim vrednostim (17,22,83), saj so bile vse ostale razpoložljive vrednosti v njeni 10 % okolini.

Ustrezno točnost ima metoda pri 8 od 18 določanih aminokislin ter pri celokupnih proteinih. Glavna razloga za to sta nezanesljivost referenčnih vrednosti in neustrezno ovrednotenje vpliva izvedbe metode na vsebnost. Izboljšamo jo lahko z več ponovitvami analize STBSA in analizo alternativnih standardnih proteinov za lažjo oceno potencialne sistemske napake, dodatnim razvojem derivatizacije (predvsem spremenjanjem sestave reagentov B in C) ter boljšim poznavanjem sestave standardnih proteinov. Pri cisteinu je potrebno izboljšati odzivnost ter pri triptofanu z alternativnimi metodami hidrolize omogočiti njegovo določljivost. Zaradi nezmožnosti metode za ustrezno ovrednotenje vseh 18 določanih aminokislin ter celokupnih proteinov smo hipotezo V zavrgli.

5.4 Izgled vzorcev in določanje vsebnosti

Vzorce smo izbrali zaradi njihove široke uporabe na področju športa in pogosto izraženih dvomih v njihovo kakovost. Uporabili smo 10 proteinskih prehranskih dopolnil, od tega 8 mlečnega izvora, 1 rastlinskega izvora (vzorec 5) in 1 iz jajčnih proteinov (vzorec 10). Pri vzorcih se nismo ozirali na vsebnost nečistoč, saj nas je zanimalo tudi, kako se metoda odziva na prisotne večje količine neproteinskih sestavin.

Podatke o sestavi analiziranih dopolnil smo pridobili iz njihove ovojnine ali iz spletnih strani proizvajalcev (58–61,66). Pri šestih vzorcih smo lahko pridobili celotne aminokislinske profile, pri preostalih štirih vzorcih so bile podane samo vrednosti za celokupne proteine. Pri določanju ustreznosti vzorcev smo jih zato obravnavali ločeno, saj ne moremo primerjati ustreznosti vzorca, ki mora izpolniti eno zahtevo, ter vzorca, ki mora izpolniti 19 zahtev.

Praški so blede rumene do rjave barve, le pri vzorcu 5 izrazito zelene. Na obarvanje vplivata izvor praška in dodani okusi: praški s čokoladnim okusom so rjave barve in rastlinski zelene. Pri raztpljanju vzorci tvorijo kompleksnejše disperzne sisteme. Tipa disperznega sistema nismo posebej okarakterizirali. Na podlagi vizualnega pregleda sklepamo, da gre za destabiliziran grobo-disperzni sistem, saj njegove elemente lahko vidimo s prostim očesom ter se po določenem času razplasti. Obarvanje disperzij je ponovno posledica izvora praška ter dodanih aditivov za okus.

Za tolerančno območje pri določanju skladnosti proteinskih prehranskih dopolnil lahko uporabljammeje od 70 % do 200 %, saj jih ni na seznamih posebej nadzorovanih substanc, v literaturi ni posebej omenjenih drugačnih območijih in njihova prekomerna uporaba ne predstavlja resnega tveganja (57). V okviru magistrske naloge smo za določanje skladnosti med določenimi in specificiranimi vsebnostmi uporabljali mejo 10 %. To območje smo povzeli po priporočeni zahtevi za točnost metode (25,30). Manjše vrednosti bi bile nesmiselne, ker bi bila napaka metode večja od zahtevane točnosti specifikacij. Po drugi strani bi nam veliko širše območje od napake metode otežilo določanje točnosti podanih vrednosti specifikacij. Vzorce smo označili za ustrezne, če so bile pri vseh ustrezeno kalibriranih določitvah določene vsebnosti znotraj postavljenega tolerančnega območja okoli specificirane vrednosti.

Pri določanju vsebnosti smo v vsakem vzorcu določali 18 aminokislin ter celokupne proteine. Skupno smo določili 190 vrednosti in jih primerjali s 118 specificiranimi vrednostmi. Do razhajanja je prišlo, ker imajo nekateri vzorci podano samo vsebnost celokupnih proteinov brez polnega aminokislinskega profila. Od primerljivih vrednosti jih je 22 skladnih 86 ne neskladnih in 10 ni mogoče zaznati (vrhovi triptofana). Ko v določanje vsebnosti vključimo

5. Razprava

še kalibracijo, ugotovimo, da lahko upoštevamo samo 58 določitev, od katerih jih 17 lahko označimo kot skladne in 41 kot neskladne.

Od vseh vzorcev sta ustrezna samo 5 in 10, saj imata specificirane samo celokupne proteine, katerih specificirana vrednost je skladna. Ostala vzorca samo s specificiranimi celokupnimi proteini, 8 in 9, ne ustreza.

Od 6 vzorcev s specificiranimi aminokislinskimi profili noben v celoti ne ustreza. Skupno lahko upoštevamo 9 določenih vrednosti, od tega so v povprečju skladne tri in je neskladnih šest. Najbolj ustrezena sta vzorca 2 in 3 (4 skladni in 5 neskladnih) in najmanj ustrezena vzorca 1 in 7 (1 skladen in 7 neskladnih).

S tem smo potrdili hipotezo VI, da bo večina specificiranih vrednosti zunaj postavljenega tolerančnega območja za določanje skladnosti. Posledično smo večino vzorcev označili kot neustrezne. Vendar smo to storili v omejenem obsegu, saj lahko rezultate metode upoštevamo le pri 9 parametrih. Poleg tega je potrebno opozoriti, da oba ustrezena vzorca nimata specificiranih aminokislinskih profilov, zato moramo njuno ustreznost videti ožje. Če enak princip ustreznosti uporabimo tudi pri ostalih vzorcih so ustrezeni tudi 2, 3, 6 in 7, ki imajo skladne rezultate analize celokupnih proteinov, a smo jih zaradi neskladnosti v aminokislinskem profilu označili kot neustrezne.

Vzorci lahko ne ustrezano zaradi intrinčne neustreznosti ali pa ustrezano, a jih zaradi napak v analiznem protokolu ne določimo ustrezeno. Pri analiznem protokolu so glavni problemi neuspešna kalibracija, potencialno izgubljanje vzorca med postopkom priprave ter nehomogenost vzorcev pri odvzemu iz osnovne raztopine. Možna je tudi intrinčna neskladnost, saj prehranska dopolnila niso podvržena enakim zahtevam za ustreznost kot zdravila. Nekatere od skladnih aminokislin so lahko skladne tudi zaradi naknadnega dodajanja neposredno v sam izdelek. Zaradi zapletov pri kalibraciji metode je za pridobitev bolj zanesljivih in celovitih rezultatov potrebno razširiti spekter točnih analiz ter določati tudi proste aminokisline.

Na koncu moramo opozoriti, da so vsi analizirani vzorci prosti dostopni na slovenskem tržišču. Odkrita neskladja med specificiranimi in dejanskimi vsebnostmi torej uporabnikov ne ogrožajo. Na ustreznost prestavljenih vzorcev moramo gledati bolj celovito, saj so vzorci lahko neustrezni tudi zaradi prisotnih snovi, ki zdravju bolj škodujejo in jih v naši raziskavi nismo zajeli (pesticidi, aditivi).

6. Zaključek

Namen magistrske naloge je bil postaviti metodo za izvedbo aminokislinske analize ter jo uspešno uporabiti na izbranih vzorcih proteinskih prehranskih dopolnil. Oba cilja smo uspešno izpolnili. Metodo smo izvajali s kislinsko hidrolizo v tekoči fazi, derivatizacijo z OPA in FMOC ter reverznofaznim HPLC. V okviru optimizacije smo zagotovili enostavno, hitro, avtomatizirano in visoko zmogljivo metodo, ki ustrezeno določi istovetnost in vsebnost opazovanih analitov. Enostavnost smo dosegli s spreminjanjem načina priprave standardov, mobilnih faz in reagentov ter zmanjšanjem števila prenosov vzorca. Metodo smo pospešili z uporabo alternativnih načinov zamrzovanja in sušenja vzorcev. Avtomatizacijo smo vključili z uporabo UDP. Visoko zmogljivost smo omogočili z uporabo hidrolize v tekočem stanju. Ustrezno ločljivost in odzivnost smo dosegli s spreminjanjem gradienta, kromatografske kolone in protokola za derivatizacijo. Pri gradientu smo z zmanjšanjem hitrosti pretoka, zmanjšanjem količine organske faze v začetni izokratski eluciji in znižanjem naklona gradienta dosegli izboljšanje ločljivosti. Protokol za derivatizacijo smo dopolnili s stopnjami mešanja reakcijske zmesi ter s spiranjem, kar je izboljšalo odzivnost analitov ter omogočilo povezljivost med sekvencami. Za boljšo zaščito kromatografske kolone smo dodali predkolono ter podaljšali spiranje s polarnimi topili po vsaki sekvenci.

Od zastavljenih 6 hipotez smo 4 potrdili in 2 ovrgli. Za določanje istovetnosti smo uporabili retencijski in relativni retencijski čas, saj sta znotraj meja pričakovane variabilnosti, ki je bila manjša pri relativnem retencijskem času. Identifikacija na podlagi UV-VIS spektrov ni dovolj natančna, da bi jo lahko uporabili kot ustrezeno alternativo. Absolutne vrednosti odzivov se po hidrolizi zmanjšajo, relativne pa se pri večini aminokislin ne spremenijo. Kromatografski odzivi podani kot AUC/IS so linearno odvisni od koncentracije aminokislin.

Pri analiziranju referenčnega proteina smo ugotovili, da je metoda sposobna ustrezeno določiti 8 aminokislin od 18 določanih ter celokupne proteine. V nadalnjem razvoju metode zato priporočamo dodatno optimizacijo hidrolize in derivatizacije za izboljšanje zaznavnosti in odzivnosti aminokislin. Poleg tega je potrebno kalibracijo razsiriti na več ponovitev, različne referenčne proteine in proteine z bolj zanesljivimi referencami.

Rezultati določanja aminokislin in celokupnih proteinov v vzorcih so pokazali, da ustreza samo 2 vzorca od 10. Pri tem moramo upoštevati, da smo lahko primerjali analizne odzive samo pri 9 ustrezeno kalibriranih spremenljivkah ter da smo pri štirih vzorcih lahko primerjali samo vrednosti za celokupne proteine. Za boljši vpogled v dejansko sestavo in potencialno neustreznost je potrebno izboljšati kalibracijo ter izvesti več analiz na vzorcih s podanimi aminokislinskimi profili. Dodatno je potrebno opozoriti, da so vzorci lahko neustrezni tudi zaradi neskladnosti v preostalih sestavinah, ki pa jih v okviru te raziskave nismo zajeli.

V prihodnosti vsekakor upamo, da bo metoda olajšala delo raziskovalcem pri vrednotenju proteinov ter zagotavljanju ustrezne varnosti in kakovosti prehranskih dopolnil.

7. Literatura

1. Willson L. The importance of proteins [Internet]. <http://drlwilson.com>. 2014 [citirano 19. avgust 2015.]. Pridobljeno od: <http://drlwilson.com/articles/PROTEIN2.htm>
2. Alberts B, urednik. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. 1548 str.
3. Boyer RF, Abram V, Cigić B, Dolinar M, Drobnič-Košorok M, Gubenšek F, idr. Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba; 2005.
4. Chapter 3. Proteins and Amino Acids [Internet]. [citirano 19. avgust 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e04.htm>
5. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, idr. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
6. Biologics Take Top Spots in Best Selling Drugs of 2012 - Cell Culture Dish [Internet]. [citirano 11. januar 2015.]. Pridobljeno od: <http://cellculturedish.com/2013/03/biologics-take-top-spots-in-best-selling-drugs-of-2012/>
7. Protein: Moving Closer to Center Stage | The Nutrition Source | Harvard T.H. Chan School of Public Health [Internet]. [citirano 29. marec 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/protein-full-story/>
8. Clayden J, Nick Greeves, Stuart Warren, Peter Wothers, uredniki. Organic chemistry. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2001. 1508 str.
9. Rader RA. (Re)defining biopharmaceutical. Nat Biotechnol. julij 2008.;26(7):743–51.
10. Rang HP, Dale MM. Rang and Dale's pharmacology [Internet]. Edinburgh; New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2012 [citirano 4. december 2014.]. Pridobljeno od: <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C2009060489X>
11. Nick C. The US Biosimilars Act: Challenges Facing Regulatory Approval. Pharm Med. junij 2012.;26(3):145–52.
12. Osvaldo de Freitas, Gilberto J. Padovan, Luciaono Vilela, Jose E. Dos Santos, Jose E Dutura de Oliveira, Lewis J. Greene. Characterisation of Protein Hydrolysates Prepared for External Nutrition. J Agric Food Chem. 1993.;(41):1432–8.
13. Mahan LK, Escott-Stump S, uredniki. Krause's food & nutrition therapy. 12th ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier; 2008. 1352 str.
14. Protein Supplements: The Good, The Bad, and & The Ugly... [Internet]. [citirano 10. april 2015.]. Pridobljeno od: <http://healthandwellness.kaplan.edu/articles/nutrition/Protein%20Supplements.html>
15. Cachexia, Cancer Nutrition, Prosure | prosure.com [Internet]. [citirano 29. marec 2015.]. Pridobljeno od: <http://prosure.com/>
16. Juhlin L. Incidence of intolerance to food additives. Int J Dermatol. 1980.;19(10):548–51.

7. Literatura

17. Nielsen SS, urednik. Food analysis. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. 557 str.
18. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score. J Nutr. julij 2000.;130(7):1865S – 7S.
19. Recent developments in protein quality evaluation [Internet]. [citirano 16. november 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.fao.org/docrep/U5900t/u5900t07.htm>
20. Top 10 Protein Supplements - LabDoor [Internet]. [citirano 25. november 2015.]. Pridobljeno od: <https://labdoor.com/rankings/protein>
21. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, uredniki. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 732 str.
22. Belitz H-D. Food chemistry. 2nd ed. Berlin ; New York: Springer; 1999. 992 str.
23. WHO | Questions and Answers on melamine [Internet]. WHO. [citirano 20. januar 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.who.int/csr/media/faq/QAmelamine/en/>
24. Tainted milk: Unravelling China's melamine scandal [Internet]. [citirano 20. januar 2015.]. Pridobljeno od: <http://thinkbusiness.nus.edu/articles/item/118-tainted-milk-unravelling-china%E2%80%99s-melamine-scandal>
25. Service européen de la qualité du médicament. European pharmacopoeia published in accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European treaty series no. 50). Strasbourg: Council of Europe; 2014.
26. United States Pharmacopeial Convention. The United States pharmacopeia. The national formulary. 37th revision 32nd edition. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2013.
27. The Japanese pharmacopoeia: official from April 1, 2011. Tokyo: Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan; 2012.
28. AOAC International, Latimer GW. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Md.: AOAC International; 2012.
29. Tišler M. Organska kemija. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo; 2013.
30. Rutherford SM, Dunn BM. Quantitative Amino Acid Analysis. V: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, uredniki. Current Protocols in Protein Science [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011 [citirano 2. december 2014.]. Pridobljeno od: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps0302s63>
31. Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT. Chemical synthesis of proteins. Annu Rev Biophys Biomol Struct. junij 2005.;34(1):91–118.
32. Rita Steed. Analysis of Amino Acids by HPLC. Agilent Technologies, Inc.; 2010.

7. Literatura

33. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S. Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2010.
34. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis. 2007.
35. Rutherford SM, Gilani GS. Amino Acid Analysis. V: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, uredniki. Current Protocols in Protein Science [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009 [citrano 2. decembar 2014.]. Pridobljeno od: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps1109s58>
36. Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. *J Chromatogr A*. november 1998.;826(2):109–34.
37. Stein WH, Moore S. Chromatographic determination of the aminoacid composition of proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1. januar 1950.;14(0):179–90.
38. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, uredniki. Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition. London ; San Diego: Academic Press; 1993. 8 str.
39. Atkins PW. Physical chemistry. 9th ed. New York: W.H. Freeman; 2010. 1139 str.
40. Engelhart WG. Microwave hydrolysis of peptides and proteins for amino acid analysis. *Am Biotechnol Lab*. november 1990.;8(15).
41. Rees MW. The estimation of threonine and serine in proteins. *Biochem J*. 1946.;40(5-6):632.
42. Rayner CJ. Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. *J Agric Food Chem*. 1985.;33(4):722–5.
43. Chen S-T, Chiou S-H, Chu Y-H, Wang K-T. Rapid hydrolysis of proteins and peptides by means of microwave technology and its application to amino acid analysis. *Int J Pept Protein Res*. 12. januar 2009.;30(4):572–6.
44. Snyder LR. Practical HPLC method development. 2nd ed. New York: Wiley; 1997. 765 str.
45. Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Foye's principles of medicinal chemistry. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
46. Bartolomeo M, Maisano F. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. *J Biomol Tech*. 2006.;(17):131–7.
47. Kazakevich Y, LoBrutto R, uredniki. HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007. 1104 str.
48. Technical note 707. Injection Routines Explained: Effectively Using a User Defined Program. Dionex, Thermo Fischer Scientific, Inc; 2011.
49. Operating Instructions, Declaration of Conformity and Certificates. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series: Autosamplers (WPS-30000SL, WPS-3000RS, WPS-3000TXRS). 1.6 izd. Thermo Fischer Scientific Inc.; 2012.

7. Literatura

50. Technical note 107. Automated In-Needle Derivatization Applying a User-Defined Program for the Thermo Scientific Dionex WPS-3000 Split-Loop Autosampler. Dionex, Thermo Fischer Scientific, Inc; 2011.
51. Huang Xiongfeng, Xu Qun, Jeffrey Roher. Automatic Precolumn Derivatization for the HPLC Determination of Aliphatic Amines in Air. Dionex, Thermo Fischer Scientific, Inc; 2011.
52. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR, uredniki. Fundamentals of analytical chemistry. 8th ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole; 2004. 1 str.
53. Alison J. Darragh, Dorian J. Garrick, Paul J. Moughan, Wouter H. Hendriks. Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified Protein. *Anal Biochem*. 1996.;236:199–207.
54. Ministrstvo za Zdravje. Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Uradni list RS, št. 82/03, 44/04, 72/05, 22/07, 104/10 in 66/13 2013.
55. Državni zbor RS. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. Uradni list RS, št. 52/00, 42/02 in 47/04 2004.
56. Ministrstvo za zdravje. Napotki glede področja prehranskih dopolnil v Republiki Sloveniji in skladnosti tovrstnih izdelkov z veljavno zakonodajo. dec, 2014.
57. Blaznik U, Krbavčič A, Kreft S. Priporočila za zagotavljanje kakovosti prehranskih dopolnil. Farm Vestn. 2012.;(4).
58. THE Nutrition | Sports Nutrition | Dietary Supplements [Internet]. [citirano 26. marec 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.the-nutrition.com/p2a/Products/4>
59. Weider Global Nutrition — Sports Nutrition [Internet]. [citirano 26. marec 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.weider.com/>
60. Flexshop Športna prehrana, Proteini [Internet]. [citirano 26. marec 2015.]. Pridobljeno od: <https://www.flexshop.com/si/>
61. Športna prehrana Proteini.si [Internet]. [citirano 26. marec 2015.]. Pridobljeno od: <https://www.proteini.si/sl/>
62. Krissansen GW. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. *J Am Coll Nutr*. december 2007.;26(6):713S – 723S.
63. Health and Human Performance Dept., University of Montana, Missoula, MT., Cramer MJ, Dumke CL, Hailes WS, Cuddy JS, Ruby BC. Postexercise Glycogen Recovery and Exercise Performance is Not Significantly Different Between Fast Food and Sport Supplements. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 1. oktober 2015.;25(5):448–55.
64. van der Ven C, Gruppen H, de Bont DBA, Voragen AGJ. Emulsion Properties of Casein and Whey Protein Hydrolysates and the Relation with Other Hydrolysate Characteristics. *J Agric Food Chem*. oktober 2001.;49(10):5005–12.
65. Dalgleish DG. Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *J Dairy Sci*. november 1998.;81(11):3013–8.

7. Literatura

66. Myprotein | Leading Sports Nutrition Brand | Free UK Delivery [Internet]. [citirano 26. marec 2015.]. Pridobljeno od: <http://www.myprotein.com/home.dept>
67. Lee Y-H. Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *J Pediatr.* november 1992.;121(5):S47–50.
68. Gorges Guiochon. A Perspective on the Future of Chromatography. Department of Chemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN.
69. James R. Bruno. Chromatography: Past, Present and Future. 2005 mar; Contemporary Technology for large scale chromatography.
70. John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, Cliff Woodward. Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids: Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC. Agilent Technologies, Inc.; 2000.
71. John W. Henderson, Anne Brooks. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals. Agilent Technologies, Inc.; 2010.
72. Guideline IHT. Impurities in new drug substances Q3A (R2). ICH Steer Comm Step [Internet]. 2006. [citirano 28. marec 2015.];4. Pridobljeno od: http://ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/St ep4/Q3A_R2_Guideline.pdf
73. Buňka F, Kříž O, Veličková A, Buňková L, Kráčmar S. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *J Food Compos Anal.* maj 2009.;22(3):224–32.
74. Darragh AJ, Moughan PJ. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *J AOAC Int.* junij 2005.;88(3):888–93.
75. Certificate of analysis. Protein Standard 2 mg/vial. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; 2010.
76. Operating Instructions, Declaration of Conformity and Certificates. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series: Solvent Racks (SRD-3x00). 1.7 izd. Thermo Fischer Scientific Inc.; 2012.
77. Operating Instructions, Declaration of Conformity and Certificates. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series: SD, RS, BM and BX Pumps. 1.6 izd. Thermo Fischer Scientific Inc.; 2012.
78. Operating Instructions, Declaration of Conformity and Certificates. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series: Column Compartments (TCC-3000SD and TCC-3000RS). 1.3 izd. Thermo Fischer Scientific Inc.; 2012.
79. Operating Instructions, Declaration of Conformity and Certificates. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series: Diode Array Detectors (DAD-3000(RS) and MWD-3000(RS)). 1.3 izd. Thermo Fischer Scientific Inc.; 2012.

7. Literatura

80. Nancy E. Astephen. Waters AccQ Tag Method for Hydrolisate Amino Acid Analysis. Waters Corporation; 2000.
81. Hillary B. Hewitson, Thomas E. Wheat, Diane M. Diehl. Amino Acid Analysis of pure protein hydrolisate with Waters UPLC Amino Acid Analysis Solution. Waters Corporation; 2007.
82. Ó'Fágáin C. Lyophilization of Proteins. V: Protein Purification Protocols [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2003 [citirano 15. julij 2015.]. str. 309–22. Pridobljeno od: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-655-X:309>
83. Wrolstad RE. Handbook of food analytical chemistry. Hoboken, N.J.: J. Wiley; 2005.
84. Livingstone CD, Barton GJ. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. Comput Appl Biosci CABIOS. december 1993.;9(6):745–56.
85. Royal Society of Chemistry (Great Britain). The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 15th ed. O’Neil MJ, Heckelman PE, Dobbelaar PH, Roman KJ, Kenny CM, Karaffa LS, uredniki. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2013. 1 str.
86. CRC handbook of chemistry and physics. Oakville, US: Apple Academic Press Inc.; 2014.

8. Priloge

Priloga 1: Pregled lastnosti aminokislin

V preglednici XXVIII so predstavljene osnovne proteinogene aminokisline (22) ter njihove glavne strukturne in fiziološke lastnosti. Prikazani so: imena aminokislin ter njihov zapis v eno- in tričrkovnem načinu, struktura molekul (3), tip amina vezanega na α -ogljikov atom (8), način derivatizacije tega amina ter način detekcije nastalega derivata (70), lastnosti aminokislin v vodnem mediju ter izkazane lastnosti pri zvijanju proteinov (84), opredelitev glede na tip stranske skupine (3) ter esencialnost oziroma sposobnost endogene sinteze v človeškem organizmu (22). Opredelitev posameznih lastnosti je na voljo v označenih virih.

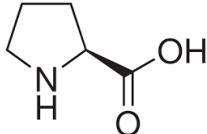
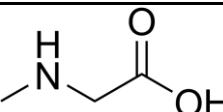
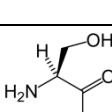
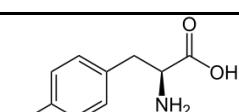
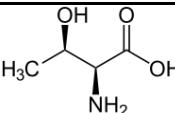
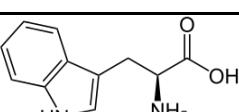
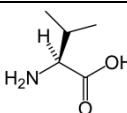
Preglednica XXVII. Pregled aminokislin in njihovih strukturnih lastnosti.

Ime spojine	Struktura	Tip amina	Delitev aminokislin	Esencialnost
Tri- in enočrkovni zapis		Derivatizacija in detekcija	Lastnosti aminokislin, položaj v proteinih in tip stranske skupine	
Alanin <i>Ala</i> <i>A</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, alifatska, hidrofobna, nevtralna, majhna, centralna, nepolarna in neionizirajoča	Ne
Arginin <i>Arg</i> <i>R</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, bazična, ionizirajoča, velika, polarna, pozitivna, površinska, polarna in ionizirajoča	Delno
Asparagin <i>Asn</i> <i>N</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, srednje velika, nevtralna, polarna, površinska, polarna in neionizirajoča	Ne
Asparaginska kislina <i>Asp</i> <i>D</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Kisla, aciklična, ionizirajoča, srednje velika, negativno nabita, polarna, površinska, polarna in ionizirajoča	Ne
Cistein <i>Cys</i> <i>C</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, srednje velika, nevtralna, polarna, centralna, polarna in neionizirajoča	Ne
Fenilalanin <i>Phe</i> <i>F</i>		Primarni OPA UV-VIS 1	Aromatska, ciklična, hidrofobna, velika, nevtralna, centralna, nepolarna in neionizirajoča	Da

8. Priloge

Glicin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, alifatska, hidrofobna, nevtralna, majhna, površinska, nepolarna in neionizirajoča.	Ne
Glutaminska kislina		Primarni OPA UV-VIS 1	Kisla, aciklična, ionizirajoča, velika, negativno nabita, polarna, površinska, polarna in ionizirajoča.	Ne
Glu				
E				
Glutamin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, velika, nevtralna, polarna, površinska, polarna in neionizirajoča	Ne
Gln				
Q				
Histidin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aromatska, bazična, ionizirajoča, ciklična, velika, polarna, pozitivno nabita, površinska, polarna in ionizirajoča	Da
Hys				
H				
Izolevcin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, alifatska, hidrofobna, velika, nevtralna, centralna, nepolarna in neionizirajoča	Da
Ile				
I				
Levcin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, alifatska, hidrofobna, velika, nevtralna, centralna, nepolarna in neionizirajoča	Da
Leu				
L				
Lizin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, bazična, ionizirajoča, velika, polarna, pozitivno nabita, površinska, polarna in ionizirajoča	Delno
Lys				
K				
Metionin		Primarni OPA UV-VIS 1.	Aciklična, hidrofobna, velika, nevtralna, centralna, nepolarna in neionizirajoča.	Da
Met				
M				
Norvalin		Primarni OPA UV-VIS 1	Aciklična, alifatska, hidrofobna, srednje velika, nevtralna in nepolarna in neionizirajoča.	Interni standard za primarne aminokisline
Nor				
Interni				
standard				

8. Priloge

Prolin		Sekundarni	Cikličen, hidrofoben, srednje velik, nevtralen, površinski, nepolarna in neionizirajoča	Ne
<i>Pro</i>		FMOC-Cl		
<i>P</i>		UV-VIS 2		
Sarkozin		Sekundarni	Aciklična, alifatska, hidrofobna, nevtralna, majhna, nepolarna in neionizirajoča	Interni standard za sekundarne aminokisline
<i>Src</i>		FMOC-Cl		
<i>Interni standard</i>		UV-VIS 2		
Serin		Primarni	Acikličen, nevtralen, polaren, majhen, površinski, polarna in neionizirajoča	Ne
<i>Ser</i>		OPA		
<i>S</i>		UV-VIS 1		
Tirozin		Primarni	Aromatski, cikličen, hidrofoben, velik, nevtralen, površinski, polarna in neionizirajoča	Ne
<i>Tyr</i>		OPA		
<i>Y</i>		UV-VIS 1		
Treonin		Primarni	Acikličen, srednje velik, nevtralen, polaren, površinski, polarna in neionizirajoča	Da
<i>Thr</i>		OPA		
<i>T</i>		UV-VIS 1		
Triptofan		Primarni	Aromatski, cikličen, hidrofoben, velik, nevtralen, centralen, nepolarna in neionizirajoča	Da
<i>Trp</i>		OPA		
<i>W</i>		UV-VIS 1		
Valin		Primarni	Acikličen, alifatski, hidrofoben, srednje velik, nevtralen, centralen, nepolarna in neionizirajoča	Da
<i>Val</i>		OPA		
<i>V</i>		UV-VIS 1		

8. Priloge

V preglednici XXVIII so predstavljene fizikalno-kemijske lastnosti proteinogenih aminokislin. Navedene so: konstante ionizacije za posamezno ionizirajoče mesto v spojini (pK_1 za karboksilno kislino na α -ogljiku, pK_2 za aminska skupina na α -ogljiku ter pK_3 za ionizirajoče funkcionalne skupine v stranski verigi, če so le-te prisotne), izoelektrična točka (pI), logaritem porazdelitvenega koeficiente (logP), topnost v vodi ter opredelitev molarne absorptivnosti pri maksimumih absorpcije (22,85,86). Opredelitev metod za določanje vrednosti posameznih lastnosti je v označenih virih.

Preglednica XXVIII. Fizikalno-kemijske lastnosti aminokislin.

Ime spojine	pK_1	pK_2	pK_3	pI	logP	Topnost [g/100g H ₂ O pri 25°C]	Molarna absorptivnost (maksimum absorpcije) [logAU pri pH ≈ 7]
Alanin	2,34	9,69	/	6,00	-2,692	16,51	Ni absorpcije
Arginin	2,18	9,09	12,60	10,80	-3,632	15,000	Ni absorpcije
Asparagin	2,02	8,80	/	5,40	-2,810	3,350	Ni absorpcije
Asparaginska kislina	1,88	3,65	9,60	2,80	-3,518	0,500	Ni absorpcije
Cistein	1,71	8,35	10,66	5,00	-2,714	277,0	2,46 (250 nm)
Fenilalanin	1,83	9,13	/	5,50	-1,328	2,965	3,97 (206 nm), 2,30 (257 nm)
Glicin	2,34	9,60	/	6,00	-2,550	24,990	Ni absorpcije
Glutaminska kislina	2,19	4,25	9,67	3,20	-3,248	0,843	Ni absorpcije
Glutamin	2,17	9,13	/	5,70	-3,762	2,500	Ni absorpcije
Histidin	1,80	5,99	9,07	7,50	-3,002	4,290	3,77 (211 nm)
Izolevcin	2,36	9,68	/	6,00	-1,410	4,117	Ni absorpcije
Levcin	2,36	9,60	/	6,00	-1,382	2,190	Ni absorpcije
Lizin	2,20	8,90	10,28	9,60	-3,184	105,0	Ni absorpcije
Metionin	2,28	9,21	/	5,70	-2,239	3,381	Ni absorpcije
Norvalin	2,36	9,76	/	/	-1,597	83,9	Ni absorpcije
Prolin	1,99	10,60	/	6,30	-1,723	162,3	Ni absorpcije
Sarkozin	2,36	11,64	/	/	-1,569	300,0	Ni absorpcije
Serin	2,21	9,15	/	5,70	-3,667	5,023	Ni absorpcije
Tirozin	2,20	9,11	10,07	5,70	-1,807	0,045	3,90 (222 nm), 3,15 (274 nm)
Treonin	2,15	9,12	/	5,60	-3,304	477,0	Ni absorpcije
Triptofan	2,38	9,39	/	5,90	-1,080	1,136	4,67 (219 nm), 3,75 (280 nm)
Valin	2,32	9,62	/	6,00	-1,913	8,850	Ni absorpcije

Priloga 2: Pregled farmakopejskih metod za izvedbo aminokislinske analize

Preglednica XXIX prikazuje vse farmakopejske metode za hidrolizo proteinov pred derivatizacijo in ločevanjem na kromatografski koloni (17,25–27,83). Navedena so imena metode, osnovni reagent za hidrolizo, pogoji pri katerih moramo izvajati reakcijo ter možni postopki izvedbe.

Preglednica XXIX. Pregled farmakopejskih metod za hidrolizo proteinov. Natančnejše informacije so v virih (17,25–27,83).

Ime metode	Lastnosti metode
Metoda 1	HCl
<i>Pogoji</i>	6 M HCl z 0,1 % do 1 % fenola; 24 ur pri 110°C
<i>Postopki</i>	Hidroliza v tekoči ali plinasti fazi
Metoda 2	Merkaptoetansulfonska kislina
<i>Pogoji</i>	2,5 M C ₂ H ₆ O ₃ S ₂ ; 12,5 min pri od 170°C do 185°C
<i>Postopki</i>	Hidroliza v plinasti fazi
Metoda 3	Tioglikolna kislina
<i>Pogoji</i>	7 M HCl z 1 % fenola, 10 % trofloroocentne kisline in 20 % tioglikolne kisline; od 15 do 30 min pri 166°C
<i>Postopki</i>	Hidroliza v plinasti fazi
Metoda 4	Permetanojska kislina
<i>Pogoji</i>	Pred pričetkom hidrolize dodamo sveže pripravljeno permetanojsko kislino iz metanojske kisline in H ₂ O ₂
<i>Postopki</i>	Oksidacija v tekoči fazi, sledi hidroliza po metodi 1 ali 2
Metoda 5	Natrijev azid
<i>Pogoji</i>	6 M HCl z 0,2 % fenola in 2 g/L natrijevega azida; 24 ur pri 110°C
<i>Postopki</i>	Hidroliza v tekoči fazi
Metoda 6	DMSO
<i>Pogoji</i>	6M HCl z 0,1 % fenola in 2 % DMSO; 24 ur pri 110°C
<i>Postopki</i>	Hidroliza v plinasti fazi
Metoda 7	Piridiletilacija v plinasti fazi
<i>Pogoji</i>	Piridin, 4-vinil pridiidin, tributylfosfin in voda; 5 min pri 100°C
<i>Postopki</i>	Reakcija v plinasti fazi, nato hidroliza po drugih metodah

8. Priloge

Metoda 8	Piridiletilacija v tekoči fazi	
<i>Pogoji</i>	6 M Gvanidinijev klorid v 0,25 M tris-kloridu in 4-vinilpridin; 4h pri sobni temperaturi v temi; pred hidrolizo je potrebno čiščenje s HPLC	
<i>Postopki</i>	Reakcija v tekoči fazi, nato hidroliza po drugih metodah	
Metoda 9	Karboksimetilacija v tekoči fazi	
<i>Pogoji</i>	100 g/L jodoacetamida v etanolu; 30 min pri sobni temperaturi v temi	
<i>Postopki</i>	Reakcija v tekoči fazi, nato hidroliza po drugih metodah	
Metoda 10	Ditioglikolna oziroma ditiopropanojska kislina	
<i>Pogoji</i>	10 g/L ditioglikolne oziroma ditiopropanojske kisline v 0,2 M NaOH	
<i>Postopki</i>	Reakcija v tekoči fazi, hidroliza po metodi 1	
Metoda 11	Bis (1,1trifluoroacetoksi) jodobenzen	
<i>Pogoji</i>	BTI, TFA in gvanidinijev klorid; 4 ure pri 60°C v temi	
<i>Postopki</i>	Reakcija v tekoči fazi, nato hidroliza po drugih metodah	
Farmakopejski načini za derivatizacijo nastalih hidrolizatov pred ali po kromatografski ločbi so navedeni v preglednici XXX (17,25–27,83). Predstavljeni so reagent in posebni pogoji derivatizacije, reaktivnost reagenta, mesto derivatizacije ter območje in linearost odziva.		
Preglednica XXX. Pregled metod za derivatizacijo aminokislin v okviru aminokislinske analize. Natančnejše informacije so v navedenih virih. Praktična navodila		
Ime	Derivatizacija	Detekcija
metode	Reagent za derivatizacijo in pogoji Reagira z primarnimi ali sekundarnimi amini Derivatizacija pred ali po ločevanju na kromatografski koloni	LOD Območje linearnosti (L) Potrebna količina vzorca pred hidrolizo za pridobitev ustreznih rezultatov
Metoda 1 Ninhidrin	Primarni in sekundarni amini Po ločevanju	Primarni amini izkazujejo absorpcijski maksimum pri 570 nm ter sekundarni amini pri 440 nm LOD: 10 pmol za primarne amine in 50 pm za sekundarne amine L: od 20 pmol do 500 pmol; R = 0,999 1 µg

8. Priloge

Metoda 2	o-Ftalaldehid (OPA)	Flourimetrično določanje z ekscitacijo pri 348 nm in emisijo pri 450 nm Absorpcijski maksimum pri 383 nm Primarni amini. Sekundarni samo po predhodni oksidaciji z hipokloritom ali kloraminom T Po ločevanju	LOD: 0,1 pmol L: od 1 pmol do 1 nmol 500 ng
Metoda 3	Fenilizotiocianat (PITC)	Primarni in sekundarni amini. Po odstranitvi reagenta so derivati stabilni več tednov, v tekočem do tri dni.	Absorpcijski maksimum pri 254 nm LOD: 1 pmol L: od 20 pmol do 500 pmol; R = 0,999
Metoda 4	6-aminokinolil-N-hidroksisukcinilimidil karbamat (AQC)	Pred ločevanjem Presežni reagent hidrolizira Primarni in sekundarni. Derivatizirani vzorci so stabilni do enega tedna.	500 ng Flourimetrično določanje z ekscitacijo pri 250 nm in emisijo pri 395 nm LOD: od 40 fmol do 800 fm, odvisno od aminokisline L: od 2,5 µmol do 200 µmol; R = 0,999
Metoda 5	o-Ftalaldehid (OPA) v prisotnosti tiola	Pred ločevanjem Reagent sam po sebi ne absorbira ali fluorescira. Zaradi hitre kinetike je primeren za avtomatizacijo. Samo primarni amini. Derivati niso stabilni.	30ng Flourimetrično določanje z ekscitacijo pri 348 nm in emisijo pri 450 nm Absorpcijski maksimum pri 338 nm LOD: 0,1 pmol L: od 1 pmol do 1 nmol
Metoda 6	(Dimetilamino)azobenzensulfonil klorid (DABS-Cl)	Pred ločevanjem Primarni in sekundarni amini. Tudi tripofan, asparagin, glutamin po alternativnih metodah hidrolize (glej).	500 ng Absorpcijski maksimum pri 436 nm LOD: 2 pmol
		Pred ločevanjem	10 ng

8. Priloge

Metoda 7	9-fluorenilmethyl kloroforamte (FMOC-Cl)	Flourimetrično določanje z ekscitacijo pri 260 nm in emisijo pri 313 nm. Absorpcijski maksimum pri 262 nm.
	Reakcija poteče hitro. Reagent fluorescira, vendar ga je mogoče ločiti od derivatov aminokislín.	
	Primarni in sekundarni amini. Derivati so stabilni.	LOD: 0,1 pmol L: od 0,1 µmol do 50 µmol
	Pred ločevanjem	
Metoda 8	7-floro-4-nitrobenzen-2-oksa-1,3-diazol (NBD-F)	Flourimetrično določanje z ekscitacijo pri 480 nm in emisijo pri 530 nm.
	Za potek reakcije je potrebno segrevanje na 60°C za 5min.	
	Primarni in sekundarni amini	LOD: 0,1 pmol L: od 1 pmol do 1 nmol
	Pred ločevanjem	1,5 mg

Priloga 3: Podatki o mlečnih proizvodih

Mleko je homogen večkomponentni sistem. Njegove glavne sestavine in njihove pojavne strukture v mediju so navedene v preglednici XXXI.

Preglednica XXXI. Sestava mleka (22).

Ime sestavine	Molekularna zgradba	Strukturni elementi
Voda	Je osnovi mlečni medij, v katerem so dispergirane ostale sestavine.	
Sladkorji	Glavni mlečni sladkor je laktoza.	Sladkorji so raztopljeni v mediju.
Maščobe	Najpogosteje so prisotne v obliki trigliceridov z masleno kislino. Na prisotne kisline vplivajo krma, letni čas in prehranski dodatki. V sledovih se pojavljajo razvezjane, substituirane in oksidirane maščobne kisline, lahko znatno vplivajo na stabilnost končni proizvodov. Fosfolipidi in steroli predstavljajo manj kot 2%.	V mediju so dispergirane v obliki maščobnih kapljic velikih do 10µm in emulgirane s fosfolipidnim slojem in kazeinskim dvoslojem. Po dolgotrajnejšem shranjevanju ali centrifugiranju se kapljice zberejo na površju (mleko se razplasti) in tvorijo mlečno smetano. Emulzijo lahko stabiliziramo s homogenizacijo.
Proteini	Prisotne so tri glavne skupine proteinov: kazein, laktalbumin in laktoglobulin (sirotkina proteina).	Kazeni tvorijo proteinske micele in sodelujejo pri stabilizaciji maščobnih kapljic. Sirotkini proteini so v mediju topni.

8. Priloge

Proste organske kisline	Najpogosteje je prisotna citronska kislina. Pojavnost mlečne in ocetne kisline je posledica razpada lakoze. Orotna kislina je visoko specifična za mleko in se uporablja kot marker za ugotavljanje količine mleka v prehranskih izdelkih.	
Minerali	Mleko vsebuje mikro in makro elemente: natrij, kalij, kalcij, magnezij, fosfor, klor, žveplo, cink, aluminij, železo, baker, molibden, mangan, nikelj, silicij, brom, bor, fluor in jod.	
Vitamini	Mleko vsebuje lipidotopne in vodotopne vitamine: retionol, kalciferol, tokoferol, tiamin, riboflavin, piridoksin, cianokobalamin, nikotinamid, pantotsko kislino, askorbinsko kislino, biotin in folno kislino.	Lipidotopni so raztopljeni v maščobnih kapljicah, vodotopni v mediju. Po razplastitvi lipidotopni ostanejo v mlečni smetani, vodotopni ostanejo v posnetem mleku in sirotki.
Encimi	Mleko med vsebuje: amilaze, lipaze, esteraze, proteinaze, fosfolipaze in oksidoreduktaze. Z merjenjem njihove aktivnosti lahko ocenimo obseg segrevanja mleka med njegovo predelavo.	

Priloga 4: UDP, gradient in spiranje po sekvenci za izvedbo aminokislinske analize

Protokol za izvedbo derivatizacije je predstavljen v preglednici XXXII. Navedeni so položaji posameznih reagentov ter vzorca in zaporedje vnesenih ukazov hkrati z njihovimi parametri. Podatki so pridobljeni neposredno iz programa za kromatografijo, virov (48,50,51) in optimizacije 11.

Preglednica XXXII. Protokol uporabniškega programa za derivatizacijo (UDP3).

Uporabniško definiran program (UDP 3)

Ukaz	Parametri ukaza
1 UDP Sestavi	Zrak, 1,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
2 UDP Sestavi	Reagent A, 5,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
3 UDP Sestavi	Vzorec, 1,000 µL; 1,000 µL/s; Splošna višina
4 UDP Sestavi	Zrak, 6,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
5 UDP Premik bata	Obrat nazaj 6,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
6 UDP Premik bata	Obrat 6,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
7 UDP Premik bata	Obrat nazaj 6,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
8 UDP Premik bata	Obrat 6,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
9 UDP Premik bata	Obrat nazaj 6,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
10 UDP Čakaj	15 s
11 UDP Spiranje igle	100,000 µL
12 UDP Sestavi	Reagent B, 1,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
13 UDP Sestavi	Zrak, 7,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina

8. Priloge

14	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
15	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
16	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
17	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
18	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
19	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
20	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
21	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
22	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
23	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
24	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
25	UDP Čakaj	60 s
26	UDP Spiranje igle	100,000 µL
27	UDP Sestavi	Reagent C, 1,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
28	UDP Sestavi	Zrak, 7,000 µL; Splošna hitrost; Splošna višina
29	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
30	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
31	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
32	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
33	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
34	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
35	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
36	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
37	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
38	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
39	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
40	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
41	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
42	UDP Premik bata	Obrat 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
43	UDP Premik bata	Obrat nazaj 7,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
44	UDP Čakaj	60 s
45	UDP Spiranje igle	100,000 µL
46	UDP Sestavi	Reagent D, 14,000 µL; 5,000; Splošna višina
47	UDP Sestavi	Zrak, 15,000 µL; 5,000; Splošna višina
48	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
49	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
50	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
51	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
52	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s

8. Priloge

53	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
54	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
55	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
56	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
57	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
58	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
59	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
60	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
61	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
62	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
63	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
64	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
65	UDP Premik bata	Obrat 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
66	UDP Premik bata	Obrat nazaj 15,000 µL; Hitrost zanke 33,000 µL/s
67	UDP Čakaj	60 s
68	UDP Spiranje igle	100,000 µL
69	UDP Označba injiciranja	Začetni čas: t = 0
70	UDP Premik vijaka za injiciranje	Injiciranje
71	UDP Premik vijala	Odpad
72	UDP Premik vijaka na začetek	Splošna hitrost
73	UDP Sestavi	Čiščenje, 100,000 µL; 10,000 µL/s; Splošna višina
74	UDP Odpad	Sprazni, 100,000 µL; 10,000 µL/s; Splošna višina

Gradient in pretoki uporabljeni za ekvibrilacijo, izvedbo kromatografske ločbe in spiranje po sekvenci v okviru aminokislinske analize so predstavljeni v preglednici XXXIII. Navedeni so časi pred oziroma od injiciranja pri katerih se spremeni pretok ali gradient. Pri gradientih je MFA razlika med 100% in označenimi vrednostmi MFB in MFC. Podatki so pridobljeni iz optimizacij 13 in 14 ter virov (12,73,74).

Preglednica XXXIII. Parametri pretoka, ekvibrilacije, gradienta in spiranja po sekvenci za izvedbo končne analizne metode.

Čas [min]	Elucija		Čas [min]	Spiranje po sekvenci		
	Gradient [% MFB]	Pretok [mL/min]		Gradient [% MFB]	% MFC	Pretok [mL/min]
-4	1	1,5	0	1	0	1,5
0	1	1,5	1	5	0	1
1,6	1	1,5	1	5	95	1
10,8	19,5	1,5	30	5	95	1
12,8	19,5	1,5	45	100	0	1
22	45	1,5	60	100	0	1
22,5	100	1,5	0	1	0	1,5
26,5	100	1,5	1	5	0	1
27	1	1,5	1	5	95	1

8. Priloge

Priloga 5: Optimizacija 11

V preglednici XXXIV so prikazani vsi različni uporabljeni protokoli za derivatizacijo (UDP1, UDP2 in UDP3). Navedeni so nameni posameznih stopenj in pripadajoči UDP ukazi.

Preglednica XXXIV. Primerjava protokolov za izvedbo derivatizacije.

Namen stopnje	UDP1	UDP2	UDP3
Razporeditev reagentov	Reagent A: RA1 Reagent C: RA3	Reagent B: RA2 Reagent D: RA4	
Uravnavanje vzorca	pH		
Derivatizacija z OPA			
Derivatizacija FMOC-Cl	Z		
Uravnavanje reakcijske zmesi	pH		
Injiciranje na kolono			
Spiranje sistema za injiciranje			

Detailed description of the table content:

- Row 1: Namenski naslov** (Namen stopnje) - Headers for UDP1, UDP2, and UDP3 columns.
- Row 2: Reagent placement** (Razporeditev reagentov)
 - UDP1: Reagent A (RA1) and Reagent C (RA3) are listed.
 - UDP2: Reagent B (RA2) and Reagent D (RA4) are listed.
 - UDP3: No specific reagent placement is shown.
- Row 3: Navigation** (Uravnavanje vzorca)
 - UDP1: pH is specified.
 - UDP2: No specific navigation is shown.
 - UDP3: No specific navigation is shown.
- Row 4: Derivatization with OPA** (Derivatizacija z OPA)
 - UDP1: No specific steps are shown.
 - UDP2: No specific steps are shown.
 - UDP3: No specific steps are shown.
- Row 5: Derivatization with FMOC-Cl** (Derivatizacija FMOC-Cl)
 - UDP1: Z is specified.
 - UDP2: No specific steps are shown.
 - UDP3: No specific steps are shown.
- Row 6: Navigation during reaction mixture preparation** (Uravnavanje reakcijske zmesi)
 - UDP1: pH is specified.
 - UDP2: No specific steps are shown.
 - UDP3: No specific steps are shown.
- Row 7: Column injection** (Injiciranje na kolono)
 - UDP1: No specific steps are shown.
 - UDP2: No specific steps are shown.
 - UDP3: No specific steps are shown.
- Row 8: System venting during injection** (Spiranje sistema za injiciranje)
 - UDP1: No specific steps are shown.
 - UDP2: No specific steps are shown.
 - UDP3: No specific steps are shown.

8. Priloge

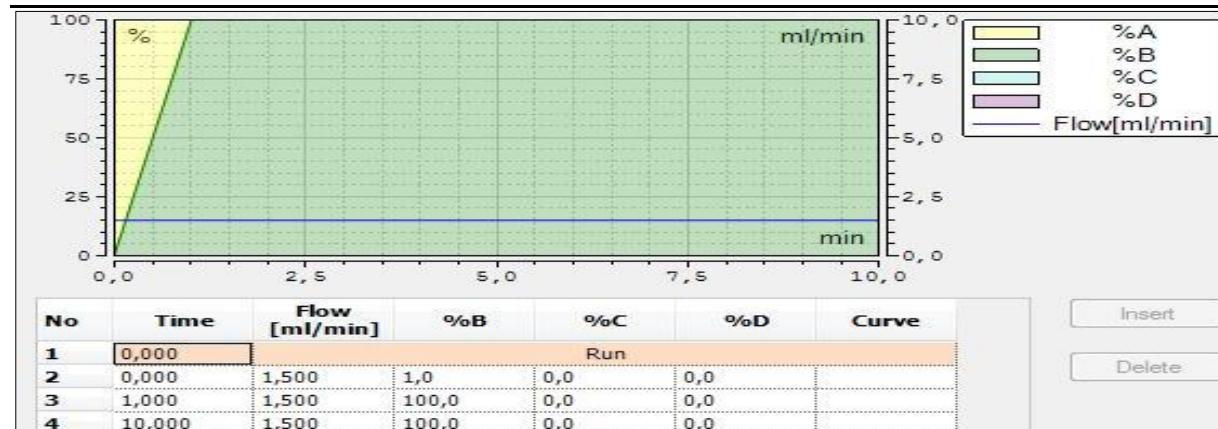
Priloga 6: Optimizacija 15

Na preglednici XXXV sta prikazani alternativni metodi za spiranje po sekvenci. Navedeni so tip spiranja (1 in 2) ter gradient in pretok med spiranjem. Pri gradientih je MFA razlika med 100% in označenimi vrednostmi MFB in MFC.

Preglednica XXXV. Alternativni metodi za spiranje kolone po sekvenci.

Spiranje

1



2

