

Određivanje aminokiselina metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz detekciju ultraljubičastim zračenjem

Belajević, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:839877>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marin Belajević

**Određivanje aminokiselina metodom
tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti
uz detekciju ultraljubičastim zračenjem**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2021. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomimetičku kemiju na
institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Lidije Brkljačić.
Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zahvale

Hvala mentorici dr.sc. Lidiji Brkljačić koja mi je dala slobodu pri stvaranju ovog diplomskog rada.

Hvala na nesebičnoj pomoći, izdvojenom vremenu, prenesenom znanju i iskustvu.

Hvala ostalim LBK-ovcima na savjetima i pomoći.

Želim zahvaliti svojoj obitelji koja je bila uz mene svo ovo vrijeme, nećaku Lovri uz kojega sam napisao ovaj diplomski rad.

Želim zahvaliti prijateljima koji su mi olakšali i uljepšali studiranje,

posebno hvala Doris i Moniki koje su uz mene od početka studija.

Sadržaj

| | |
|--|------------|
| SAŽETAK..... | X |
| ABSTRACT | XII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED..... | 3 |
| 2.1. Aminokiseline, uloga i struktura | 3 |
| 2.1.1. <i>Glutaminska kiselina i umami okus</i> | 5 |
| 2.2. Analitičke metode određivanja aminokiselina | 6 |
| 2.3. Kromatografske metode | 7 |
| 2.3.1. <i>Metode plinske kromatografije za određivanje aminokiselina</i> | 8 |
| 2.4. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti | 10 |
| 2.4.1. <i>Metode tekućinske kromatografije za određivanje aminokiselina</i> | 14 |
| 2.5. Derivatizacijski reagensi..... | 15 |
| 2.5.1. <i>o-ftaldialdehid</i> | 16 |
| 2.5.2. <i>Fenilizotiocijanat</i> | 17 |
| 2.5.3. <i>9-fluorenilmetil-klorformijat</i> | 18 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 20 |
| 3.1. Kemikalije i metode karakterizacije pripremljenih spojeva..... | 20 |
| 3.1.1. <i>Kemikalije</i> | 20 |
| 3.1.2. <i>Instrumenti</i> | 20 |
| 3.1.3. <i>Spektrometrija masa</i> | 21 |
| 3.1.4. <i>Eksperimenti NMR</i> | 21 |
| 3.2. Priprava standardnih spojeva..... | 21 |
| 3.2.1. <i>Opći sintetski protokol</i> | 21 |
| 3.2.2. <i>Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-glutaminske kiseline (Fmoc-Glu)</i> | 22 |
| 3.2.3. <i>Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-fenilalanina (Fmoc-Phe)</i> | 23 |
| 3.2.4. <i>Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-serina (Fmoc-Ser)</i> | 24 |
| 3.2.5. <i>Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-1-adamantana (Fmoc-Ad)</i> | 24 |
| 3.3. Razvoj metode HPLC-UV za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata | 25 |
| 3.4. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju glutaminske kiseline s Fmoc-Cl | 26 |
| 3.4.1. <i>Smjesa otapala za derivatizaciju</i> | 26 |
| 3.4.2. <i>0,2 mol L⁻¹ boratni pufer, pH 10,2 (pufer 1)</i> | 27 |
| 3.4.3. <i>0,4 mol L⁻¹ boratni pufer pH 8,1 (pufer 2)</i> | 27 |
| 3.4.4. <i>Priprema standardnih otopina za derivatizaciju</i> | 27 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.5. Ispitivanje stabilnosti derivatizacijskog reagensa u puferskim otopinama | 27 |
| 3.4.6. Optimiranje dodatka derivatizacijskog reagensa | 28 |
| 3.4.7. Optimiranje vremena derivatizacije | 29 |
| 3.4.8. Priprema kalibracijskih otopina Fmoc-Glu | 30 |
| 3.5. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju aminokiselina u smjesi | 31 |
| 3.5.1. Priprema standardnih otopina za derivatizaciju | 31 |
| 3.5.2. Derivatizacijska reakcija aminokiselina u smjesi | 31 |
| 3.5.3. Priprema serije kalibracijskih otopina za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata u smjesi | 32 |
| 3.6. Određivanje sadržaja Na-glutamata u dodacima jelima | 33 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 34 |
| 4.1. Priprava standardnih spojeva..... | 34 |
| 4.2. Razvoj metode HPLC-UV za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata | 35 |
| 4.3. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju glutaminske kiseline s Fmoc-Cl | 36 |
| 4.3.1. Smjesa otapala za derivatizaciju i stabilnost derivatizacijskog reagensa | 36 |
| 4.3.2. Optimiranje dodatka derivatizacijskog reagensa i vremena derivatizacije | 38 |
| 4.3.3. Ekvimolarnost derivatizacijske reakcije | 40 |
| 4.4. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju aminokiselina u smjesi | 42 |
| 4.4.1. Ekvimolarnost derivatizacijske reakcije smjese aminokiselina | 44 |
| 4.5. Određivanje sadržaja Na-glutamata u dodacima jelima..... | 46 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 48 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA | 50 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 52 |
| § 8. ŽIVOTOPIS | XVI |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE AMINOKISELINA METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE UČINKOVITOSTI UZ DETEKCIJU ULTRALJUBIČASTIM ZRAČENJEM

Marin Belajević

Metoda tekućinske kromatografije uz detekciju ultraljubičastim zračenjem (HPLC-UV) korištena je za određivanje odabranih aminokiselina u vodenim uzorcima uz derivatizacijski reagens 9-fluorenilmetil-klorformijat (Fmoc-Cl).

Sintetizirani su Fmoc-aminokiselinski derivati i okarakterizirani spektroskopskim metodama te korišteni kao analitički standardi. Razvojem metode optimirani su kromatografski uvjeti kojim je postignuta dobra rezolucija i razdvajanje odabranih Fmoc-aminokiselinskih derivata i nusprodukata koji nastaju u derivatizacijskoj reakciji. Istraženi su i optimirani reakcijski uvjeti za osiguravanje ekvimolarnosti derivatizacijske reakcije s obzirom na poznati dodatak pojedine aminokiseline. Kromatografskom HPLC-UV metodom određen je maseni udio glutaminske kiseline (1,2 -13,4 %) u odabranim dodacima jelima.

(54 stranice, 21 slika, 15 tablica, 42 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: Aminokiseline, derivatizacijski reagens, tekućinska kromatografija

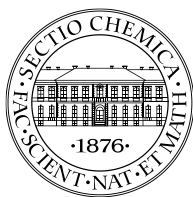
Mentor: dr. sc. Lidija Brkljačić, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc.dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 23. 2. 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF AMINO ACIDS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET DETECTION

Marin Belajević

Liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) was used for the determination of selected amino acids in aqueous samples using 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc-Cl) as a derivatization reagent.

Fmoc-amino acid derivatives were synthesized and characterized by spectroscopic methods. Formed products were used as analytical standards. Through the development of the HPLC method, the chromatographic conditions were optimized, which led to a fine resolution and separation of the selected Fmoc-amino acid derivatives and by-products formed in the derivatization reaction. The reaction conditions for ensuring the equimolarity of the derivatization reaction were investigated and with respect to the known addition of each amino acid. By the obtained HPLC-UV method, the mass content of glutamic acid (1,2 -13,4%) in some food additives was determined.

(54 pages, 21 figures, 15 tables, 42 references, original in [Croatian])

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: Amino acids, Derivatization Reagents, High Pressure Liquid Chromatography

Mentor: Dr. Lidija Brkljačić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 23rd February 2021

§ 1. UVOD

Aminokiseline su prirodni spojevi, sastavni dio peptida i proteina. Kako bi se bolje razjasnila njihova biološka uloga, određuju se u biološkim uzorcima nakon hidrolize peptida ili proteina. Prisutne su i u okolišu, hrani, u dodacima prehrani i dodacima jelima. Najčešće korištena analitička tehnika za kvalitativno i/ili kvantitativno određivanje aminokiselina je tekućinska kromatografija visoke razlučivosti uz detekciju ultraljubičastim zračenjem (engl. *high performance liquid chromatography-UV detection*, HPLC-UV). Kako su aminokiseline polarne molekule, na nepolarnim kromatografskim kolonama koje se koriste u kromatografiji obrnutih faza euliraju se u mrtvom volumenu. Osim toga, većina aminokiselina nema odgovarajuću kromoforu za UV detekciju. Zato je prije ili tijekom ekstrakcije takvih spojeva nužna njihova kemijska derivatizacija.

U peptidnoj sintetskoj kemiji kao zaštitna skupina amino-kraja aminokiselina ili peptida često se koristi 9-fluorenilmetil-klorformijat (Fmoc-Cl), u analitičkoj kemiji važan i učinkovit derivatizacijski reagens za aminokiseline. Reakcijom 9-fluorenilmetil klorformijata i aminokiselina nastaju stabilni Fmoc-aminokiselinski derivati preko kojih je moguće odrediti koncentraciju aminokiselina u uzorku uz uvjet da je derivatizacijska reakcija kvantitativna, odnosno da je množina nastalog produkta ekvimolarna množini prisutne aminokiselina. U literaturi je malo podataka vezano uz stabilnost nastalih Fmoc-derivata, vremena derivatizacije, većina radova navodi korištenje velikih suvišaka Fmoc-Cl u svrhu analize ciljanih uzoraka.

Cilj ovog rada jest razviti metodu HPLC-UV za određivanje masenog udjela glutaminske kiseline u dodacima jelima. Glutaminska kiselina derivatizirana je s Fmoc-Cl s naglaskom na ispitivanje uvjeta za postizanje kvantitativne derivatizacijske reakcije i na stabilnosti reagensa i nastalih derivata. Na modelnim otopinama, uz poznati dodatak glutaminske kiseline, istražen je optimalni suvišak derivatizacijskog reagensa i vrijednosti pH reakcijske smjese, vrijeme derivatizacije, stabilnost nastalih derivata, te optimalan dodatak 1-aminoadamantan hidroklorida koji se dodaje za uklanjanje suviška Fmoc-Cl. Osim glutaminske kiseline u sljedećem koraku istraživanja uključeni su i serin kao polarnija, te fenilalanin kao nepolarnija aminokiselina u odnosu na glutaminsku kiselinu. Razvijena metoda podešena je za istovremenu derivatizaciju smjese navedenih aminokiselina prema njihovom poznatom dodatku.

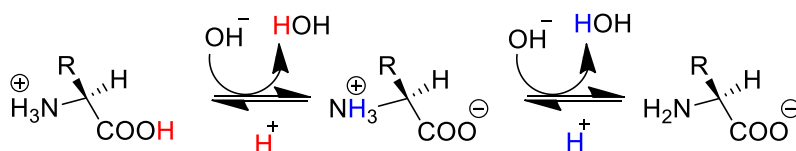
U okviru rada sintetizirani su Fmoc-aminokiselinski derivati glutaminske kiseline, serina i fenilalanina te nusprodukt derivatizacijskog postupka Fmoc-aminoadamantan (Fmoc-Ad). Pripremljeni spojevi okarakterizirani su spektroskopskim i spektrometrijskim metodama te korišteni kao analitički standardi.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Aminokiseline, uloga i struktura

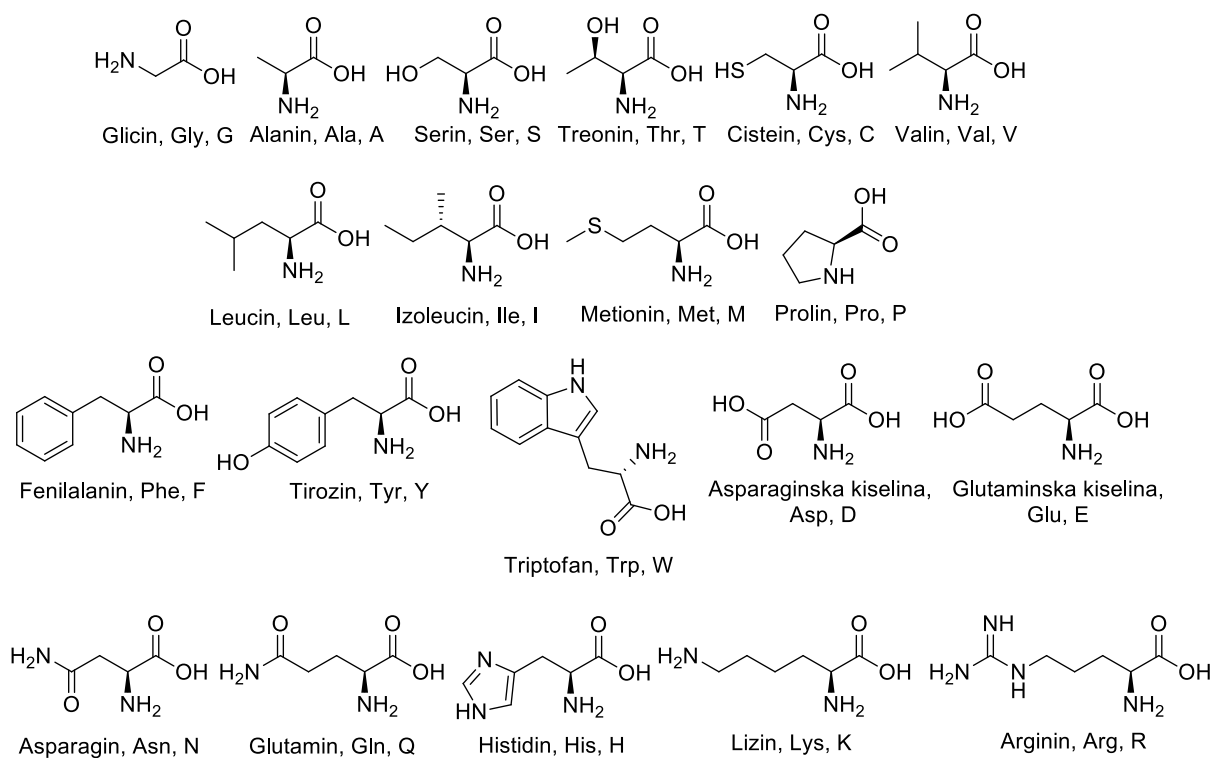
Aminokiseline izgrađuju proteine koji nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom, a od velike su važnosti u organizmu jer obavljaju veliki broj funkcija, održavaju organizam biološki stabilnim, katalizatori su u biološkim procesima, sudjeluju u transportu tvari i živčanih impulsa, odgovorni su za imunološku obranu, daju mehaničku potporu i sl.¹

Aminokiseline su građene od središnjeg α -ugljkovog atoma povezanog s amino-skupinom, karboksilnom skupinom, vodikovim atomom i skupinom koja je specifična za svaku aminokiselinu (R), a naziva se bočnim ogrankom. Svaka aminokiselina ima različit bočni ogranak pa tako imaju i različita svojstva. Budući da su četiri funkcijske skupine vezane na α -ugljkov atom, aminokiseline su kiralne molekule. Relativna konfiguracija prirodnih aminokiselina jest L, pa su proteini građeni samo od L-aminokiselina. Jedina aminokiselina koja nije kiralna i ne pokazuje optičku aktivnost je glicin. Apsolutna konfiguracija svih aminokiselina je S, osim cisteina čija je konfiguracija na α -ugljkovog atoma R. U neutralnim otopinama, odnosno u otopinama neutralne pH-vrijednosti aminokiseline imaju dipolarni oblik gdje je amino-skupina protonirana, a karboksilna skupina deprotonirana. Takav dipolarni oblik aminokiselina nazivamo *zwitterioni*. Do promjene ionizacije dolazi ili zbog smanjenja vrijednosti pH, što dovodi do protoniranja funkcijskih skupina pri čemu je neto naboj +1, ili zbog povećanja vrijednosti pH gdje su obje skupine deprotonirane pri čemu je neto naboj -1, dok je u *zwitterionskom* obliku jednak 0.¹



Slika 1. Ionizacijska stanja aminokiselina pri različitim vrijednostima pH.¹

Svaki bočni ogranak ima svoj oblik, naboj, različite su im tendencije stvaranja vodikovih veza, različite su reaktivnosti te imaju različita hidrofobna svojstva.



Slika 2. Prikaz strukturalnih formula aminokiselina i njihove oznake.¹

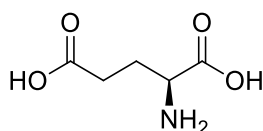
Alanin je najjednostavnija kiralna aminokiselina. Serin i treonin imaju alifatske hidroksilne skupine te su polarne i bez naboja. Cistein sadrži tiolnu skupinu –SH. Valin, leucin, izoleucin i metionin su aminokiseline s alifatskim bočnim skupinama. Metionin ima tioetersku skupinu, –S–. Prolin je aminokiselina prstenaste strukture čiji je bočni ogranak vezan na dušikov atom. Fenilalanin, tirozin i triptofan su aminokiseline s aromatskim bočnim ograncima. Fenilalanin ima hidrofobna svojstva dok tirozin i triptofan imaju više hidrofilna svojstva koja potječu od hidroksilne skupine, odnosno amino-skupine iz bočnog ogranka. Asparaginska i glutaminska kiselina imaju kisele bočne ogranke s karboksilnom skupinom na kraju, ali pri fiziološkoj vrijednosti pH su negativno nabijene. Asparagin i glutamin su aminokiseline bez naboja i imaju amino-skupinu na kraju bočnog lanca. Bazične aminokiseline su histidin, lizin i arginin. Lizin i arginin su pozitivno nabijene aminokiseline pri neutralnoj vrijednosti pH, dok histidinski aromatski prsten može i ne mora biti pozitivno nabijen pri neutralnom pH što ovisi o neposrednoj okolini te aminokiseline.¹

Aminokiseline najviše sadrži hrana poput mesa, jaja, mlijeka, žitarica, povrća i voća, hrana za stoku, čaj, itd. U goveđem mesu najviše ima metionina i cisteina, riža je bogata lizinom i treoninom, kukuruz triptofanom i lizinom, mahunarke metioninom², breskve su bogate s

asparaginom, brokula sadrži dosta prolina³, nadalje, u zelenom čaju je najviše teanina, glutamina, glutaminske kiseline i asparagina⁴, u ribljem mesu prevladavaju cistein, alanin, glicin, leucin.⁵ U lubenici su određene visoke koncentracije citurlina, neesencijalne, neproteinske aminokiseline, koja ima vrlo važnu ulogu u staničnom metabolizmu i praćenju vitalnosti organa.⁶

2.1.1. Glutaminska kiselina i umami okus

Glutaminska kiselina je neesencijalna aminokiselina i ima svojstvo kiralnosti. Sintetizira se iz α -ketoglutarata, a služi kao prekursor iz kojeg se dalje sintetiziraju druge aminokiseline poput glutamina, prolina i arginina.¹



Slika 3. Strukturna formula glutaminske kiseline.¹

Glutaminska kiselina je bjeli prah topljiv u vodi i neotrovna je. U 19. stoljeću otkrio ju je Rizzo Johnson i opisao kao proziran prah koji ima okus te kao tvar koja je topljiva u vodi i otopini klorovodične kiseline. U medicini se koristi pri liječenju hepatične kome, u prehrambenoj industriji kao aditiv hrani u obliku natrijevog glutamata. Izoelektrična točka glutamata je $\text{pH} = 3,22$. Ove kiseline ima u žitaricama, biljkama i mikroorganizmima te u životinjskom mozgu gdje sudjeluje u važnim biokemijskim reakcijama, prisutna je i u brojnim proteinima, daje glutation koji djeluje kao antioksidans u organizmu. Kao natrijeva sol, natrijev glutaminat, daje umami okus koji je jedan od pet glavnih okusa pored okusa za slatko, kiselo, gorko i slano.⁷

Pojam okusa "umami" odnosi se na soli glutaminske kiseline, a u 20. stoljeću opisao ga je japanski znanstvenik K. Ikeda kada je izolirao glutamat iz morskih algi koje se koriste u kulinarstvu, u pripravi juhe od morskih algi. Većina sisavaca može prepoznati umami okus. Za taj okus odgovorni su glutamat i 5'-ribonukleotidi poput inozinata i gvanilata. Hrana poput ribljih umaka i umaka od soje bogata je glutamatom, dok glutaminske kiseline ima u mesu (perad, govedina, svinjetina), morskoj hrani i povrću. U mesu ima više 5'-inozinat je dok je 5'-gvanilat više prisutan u biljkama.

Osim u navedenim namirnicama, glutaminska kiselina je u velikom udjelu prisutna u ljudskom majčinom mlijeku u odnosu na ostale aminokiseline. Istraživanja različitih okusa mlijeka na novorođenčadi pokazala su različite ekspresije lica s obzirom na sastav mlijeka. Mlijeko obogaćeno natrijevim glutamatom i mlijeko slatkog okusa izazvalo je slične reakcije kod novorođenčadi, počela su više i jače sisati te činiti pokrete rukama koji su protumačeni kao povećana želja za hranjenjem. Zanimljivo je kako zapadna kultura nema prikladnu riječ koja bi mogla bolje definirati pojam "umami", odnosno okus natrijevog glutamata. Okusni pupoljci na srednjem dijelu jezika prepoznaju umami okus što uključuje činjenicu da postoji i poseban mehanizam za glutamat.⁸ Neka istraživanja pokazala su kako je dodatak natrijevog glutamata umjesto soli u prehrani pokazao pozitivan učinak na zdravlje kod starije populacije.⁹

2.2. Analitičke metode određivanja aminokiselina

Aminokiseline su sveprisutne u biološkim uzorcima stoga je kvantitativna i kvalitativna analiza aminokiselina važna pri obradi kliničkih uzoraka u dijagnostici, medicinskim istraživanjima, kontroli kvalitete hrane u prehrambenoj industriji te u farmaceutskoj industriji za određivanje sadržaja tableta i drugim područjima.

Za kvalitativno i kvantitativno određivanje aminokiselina u biološkim uzorcima najviše se koriste kromatografske metode koje će detaljnije biti opisane u nastavku ovog diplomskog rada.

Jedna od manje korištenih metoda u biokemiji i analitičkoj kemiji je elektroforeza, a temelji se na gibanju nabijenih čestica pod utjecajem električnoga polja. Kapilarna elektroforeza je metoda odvajanja bioloških molekula i molekula manje molekulske mase unutar kapilare, te je ova metoda često zamijenjena za tradicionalnu metodu elektroforeze na gelu. Kapilarna elektroforeza koristi se za analizu aminokiselina u hrani. Metoda ne zahtjeva veliku potrošnju uzoraka i reagensa te je dobre rezolucije i učinkovitosti.¹⁰

S obzirom da su aminokiseline analiti koji mogu biti nabijeni ovisno o vrijednosti pH medija, one mogu biti odvojene kapilarnom elektroforezom, a usvrhu poboljšanja osjetljivosti metode najčešće se kombinira sa spojevima za derivatizaciju koji aminokiselini daju kromoforu za optičku detekciju. Novije tehnike, poput kapilarne elektroforeze s laserski induciranom fluorescentnom detekcijom, koriste se za određivanje slobodnih aminokiselina u biološkim uzorcima. Nadalje, kombinacijom metoda kapilarne elektroforeze i spektrometrije masa mogu se analizirati aminokiseline bez prethodne derivatizacije.¹¹

Osim kapilarne elektroforeze za određivanje aminokiselina ponekad se koristi nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear magnetic resonance*, NMR). Temelji se na interakcijama između jezgri atoma u uzorku pod utjecajem magnetnog polja visokog intenziteta. Navedena spektroskopska metoda najčešće se koristi u organskoj kemiji za određivanje molekulskih struktura organskih spojeva u krutom stanju ili u otopini. Povratna informacija je NMR spektar koji prikazuje signale rezonancije nakon što uzorak apsorbira određene frekvencije elektromagnetskog izvora.¹²

Aminokiseline u uzorku urina mogu se analizirati direktno uz minimalnu pripremu uzorka, a prednost je što metoda ne ovisi o kemijskim svojstvima analita. Metoda ima nešto manju osjetljivost od spektrometrije masa. U biološkim uzorcima prisutan je velik broj različitih metabolita aminokiselina čiji se signali mogu preklapati u jednodimenzionalnom spektru ^1H NMR, a preklapanja se mogu riješiti pomoću modelnih signala. Postoji i tehnika višedimenzijnski NMR pri kojoj je moguće odvojiti preklapljene signale analita.¹¹ U istraživanju del Campo i suradnika spektroskopijom ^1H NMR istovremeno je određeno više različitih analita poput karboksilnih kiselina, aminokiselina, alkohola i dr. u realnim uzorcima kao što su različite vrste meda, poput lavande i eukaliptusa te su izračunati omjeri fruktoze i glukoze za svaku vrstu. Aminokiseline koje su određene u medu spektroskopijom ^1H NMR su alanin, fenilalanin, tirozin i prolin. Za kvantifikaciju su korištene apsolutne površine signala pa uzorke meda nije bilo potrebno prethodno ekstrahirati ili prekoncentrirati.¹³

2.3. Kromatografske metode

Kromatografija je metoda koja se primjenjuje u svim granama kemije zbog toga što omogućuje istovremeno odvajanje, identifikaciju i određivanje spojeva kompleksnih matrica. Uzorak je otopljen u mobilnoj fazi koja može biti plin, tekućina ili superkritični fluid, a mobilna se faza kreće kroz stacionarnu fazu u koloni ili na čvrstoj površini. Faze se odabiru tako da se komponente uzorka mogu raspodijeliti između njih na temelju određenih interakcija sa stacionarnom fazom odnosno mobilnom fazom na temelju svojih fizikalno kemijskih svojstava. Odvajanje se temelji na različitom zadržavanju komponenata. Komponente koje se duže zadrže na stacionarnoj fazi imaju duže vrijeme zadržavanja, dok se komponente koje stvaraju slabije interakcije sa stacionarnom fazom kreću brže uz mobilnu i kraće zadržavaju na stacionarnoj fazi. Vrijeme potrebno da analit prođe kroz kolonu i dođe do detektora naziva se retencijskim vremenom ili vremenom zadržavanja. Pri različitoj brzini gibanja kroz kolonu odnosno

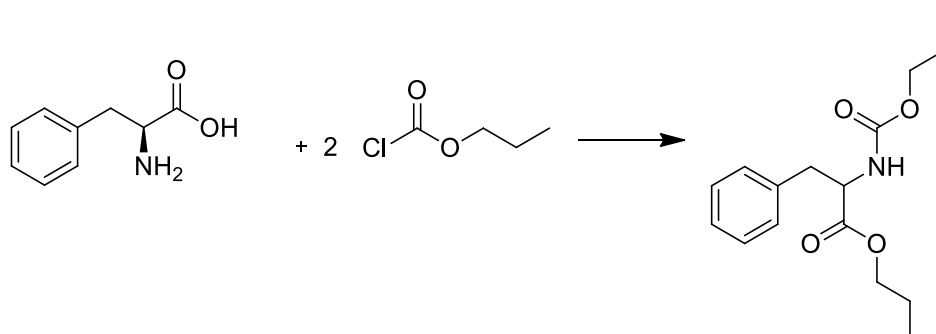
zadržavanja na fazama, analiti se razdvajaju u određene zone ili vrpce (signale) te se mogu određivati kvantitativno i kvalitativno.

Kromatografske metode su podijeljene u dvije grupe, a to su kolonska kromatografija, gdje je stacionarna faza u uskoj koloni kroz koju prolazi mobilna faza pod pritiskom i plošna kromatografija gdje je stacionarna faza ploha ili papir određenog materijala po kojem se analiti kreću pod utjecajem kapilarnih sila. Tekućinska kromatografija se za razliku od plinske kromatografije i kromatografije fluida pri superkritičnim uvjetima može izvoditi i na koloni i na papiru. Kromatografske metode razdvajaju analit između dvije faze, izoliraju i analiziraju pojedine komponente smjese pa se kromatografija često koristi kao metoda pročišćavanja.¹⁴

2.3.1. Metode plinske kromatografije za određivanje aminokiselina

Plinska kromatografija temelji se na raspodjeli komponenata između inertnog plina koji je mobilna faza i stacionarne faze. Plin nosilac je inertni plin poput helija, dušika, argona ili vodika, a njegova je uloga prijenos analita kroz sustav bez neželjenih nusprodukata. Odvajanje kromatografijom rezultira u konačnici kromatogramom o sastavu uzorka smjese.¹²

Za analizu kromatografskom metodom aminokiseline moraju biti derivatizirane. Najčešći postupak derivatizacije je proces sililacije pri kojem se aktivni vodik zamijeni alkilsililnom grupom kao što je trimetilsilil. Međutim, nisu sve sililirane aminokiseline stabilne, npr. arginin se raspada na ornitin, a glutaminska kiselina na piroglutaminsku kiselinu. Ktome, reagensi i derivati su osjetljivi na vlagu. Osim sililacije, u svrhu derivatizacije provodi se i acilacija anhidridom ili esterifikacija alkoholom poput pentafluoropropil anhidrida ili izopropanola. Također se može provesti i indirektna alkilacija kloroformatima uz prisutnost alkohola i piridina (slika 4).¹¹



Slika 4. Derivatizacija fenilalanina s propil-kloroformijatom.¹¹

U reakciji s propil-kloroformatom karboksilne grupe prevode se direktno u estere, a amino grupe u karbamate. Pomoću alkil kloroformata, aminokiseline se mogu derivatizirati direktno u vodenoj otopini bez prethodnog uklanjanja proteina, reagiraju brzo, a derivati mogu biti ekstrahirani organskim otapalom. Iz organske faze alikvot uzorka može biti direktno unešen u sustav za plinsku kromatografiju sa spektrometrom masa kao detektorom (engl. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS). Za analizu aminokiselina plinskom kromatografijom osim spektrometra masa GC-TOF-MS (engl. TOF-MS, *Time of flight mass spectrometer*) često se koristi i plamenoionizacijski detektor GC-FID (eng. FID, *Flame ionization detector*). Kaspar i suradnici su visoko razlučivom metodom GC-MS odvojili 34 aminokiseline unutar 10 minuta u uzorcima fizioloških tekućina, a kao unutarnji standardi korišteno je 19 aminokiselina označenih izotopom.¹¹ Za kvantitativnu analizu potrebna je kalibracija pomoću standardnog uzorka poznate koncentracije.¹⁵

Plamenoionizacijski se detektor upotrebljava uz kapilarne kolone jer je velike osjetljivosti i raspona linearnog odziva te jednostavan za uporabu. Većina organskih spojeva pri sagorijevanju na temperaturi plamena smjese vodik/zrak daju ionske međuspojeve i elektrone. Posljedica sagorijevanja je prijenos elektriciteta plazmom. Sabirna elektroda hvata nabijene spojeve, a struje iona se zatim pojačava i bilježi. Nedostatak koji se javlja kod ovog detektora je razaranje uzorka.¹⁴

Khuhawar i Majidano su razvili metodu GC-FID za analizu aminokiselina pomoću trifluoroacetilacetona (FAA) i etil-kloroformata (ECF) kao derivatizirajućih reagensa u vodenom mediju. Uzorak je bila koža pacijenata koji su oboljeli od psorijaze i arsenikoze, dok je referentni uzorak bila zdrava ljudska koža. Spoj FAA reagira s primarnim aminokiselinama pri čemu nastaju Schiffove baze koje su dovoljno hlapljive za analizu metodom GC. Spoj ECF je korišten kako bi se povećala hlapljivost i osjetljivost za detekciju FID. Određeno je 19 aminokiselina u različitim koncentracija u koži zdravih ljudi u usporedbi s kožom pacijenata oboljelih od psorijaze i arsenikoze.¹⁶

Analiza metodom GC-TOF-MS uključuje derivatizaciju aminokiselina, isparavanje u injektoru te ionizaciju u izvoru. Prvi korak detekcije TOF je ionizacija. Ioni nastali udarom pulsa lasera se akceleriraju s iste prostorne ravnine u isto vrijeme. Oni su različite mase i konstantne kinetičke energije te će zbog toga imati odgovarajuće brzine koje su proporcionalne

kvadratu korijena m/z . Metoda TOF-MS mjeri vrijeme potrebno da ion dođe do detektora, a ono ovisi o brzini iona.¹⁷

Noctor i suradnici su u svome radu opisali metodu GC uz detekciju pomoću analizatora masa TOF za određivanje aminokiselina iz lišća biljke uročnjaka *Arabidopsis thaliana* L. Uzorak lišća bio je ohlađen tekućim dušikom, a nakon usitnjavanja, ekstrakcije i centrifugiranja, aminokiseline su prevedene u nestabilne trimetilsilil-derivate. Metodom je određeno 20 aminokiselinskih derivata u biljci uročnjaka.¹⁸

2.4. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) koristi se kao separacijska tehnika za analizu organskih, anorganskih i bioloških spojeva, polimera, kiralnih spojeva, termički nestabilnih spojeva te malih iona i makromolekula. Osim navedenih primjena služi i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te izolaciju i pročišćavanje spojeva. Koristi se za određivanje aminokiselina, nukleinskih kiselina i proteina u fiziološkim uzorcima, a mogu se odrediti aktivni spojevi u lijekovima, pesticidi i insekticidi, kontrola kvalitete itd.

U metodi HPLC otopljene tvari prolaze kroz kromatografsku kolonu gdje se separiraju između mobilne i stacionarne faze. Na uspješnost kromatografske analize utječu čimbenici poput odabira punila u koloni (stacionarne faze) i mobilne faze, vrsta kromatografske kolone, protok mobilne faze, temperatura kolone, veličina čestica uzorka te priprema uzorka.¹⁵ Za uspješnu i kvalitetnu analizu potrebno je uspostaviti ravnotežu međumolekulskih sila između stacionarne faze, mobilne faze i analita te su one opisane relativnom polarnošću reaktanata.¹⁴

HPLC kromatografske metode se dijele na reverznu i normalnu kromatografiju ovisno o polarosti mobilne i stacionarne faze.

U normalnoj kromatografiji je mobilna faza manje polarna od stacionarne faze pa će se nepolarni analiti eluirati prvi dok će se u reverznoj kromatografiji polarni analiti eluirati prvi jer je mobilna faza polarnija od stacionarne. Kromatografija normalnih faza se ne koristi toliko često. U tom načinu rada podrazumijeva se korištenje polarne stacionarne faze i manje polarne mobilne faze poput heksana ili propil-etera. Separacija se temelji na sposobnosti analita da ostvari polarne interakcije poput vodikovih veza ili dipol-dipol interakcija sa površinom stacionarne faze. Ako je analit polaran on će se duže zadržati na koloni zbog polarnih interakcija

vode i polarne organske molekule, npr. metanola. Zbog toga se nepolarna komponenta sporije eluira.¹⁹

U tekućinskoj kromatografiji moguća su dva načina eluiranja. Prvi način je izokratno eluiranje gdje je sastav mobilne faze isti, a drugi način je gradijentno eluiranje gdje se sastav mobilne faze mijenja. Gradijentnim eluiranjem se može postići bolje odvajanje i bolje razlučivanje spojeva.¹⁴

Uzorci za analizu metodom HPLC moraju biti u tekućem stanju kako bi se mogli injektirati u uređaj. Sama zahtjevnost pripreme ovisi o prirodi analita i kompleksnosti matrice u kojoj se nalazi. Nerijetko je da je sama priprema uzorka složena i oduzme više vremena nego analiza jer se uzorci moraju ekstrahirati iz matrice i ukoncentrirati.

Ekstrakcija je jedna od najvažnijih separacijskih tehnika u kemijskoj analizi koja se koristi za odvajanje analita ili interferencije iz matrice, preliminarno čišćenje kompleksnih bioloških uzoraka, koncentriranje analita u tragovima kako bi se postigla granica detekcije pri čemu se analit ekstrahira iz većeg volumena u manji. Ekstrakcija je prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u drugu fazu u kojoj analit (tvar koja se ekstrahira) mora biti više topljiv.²⁰

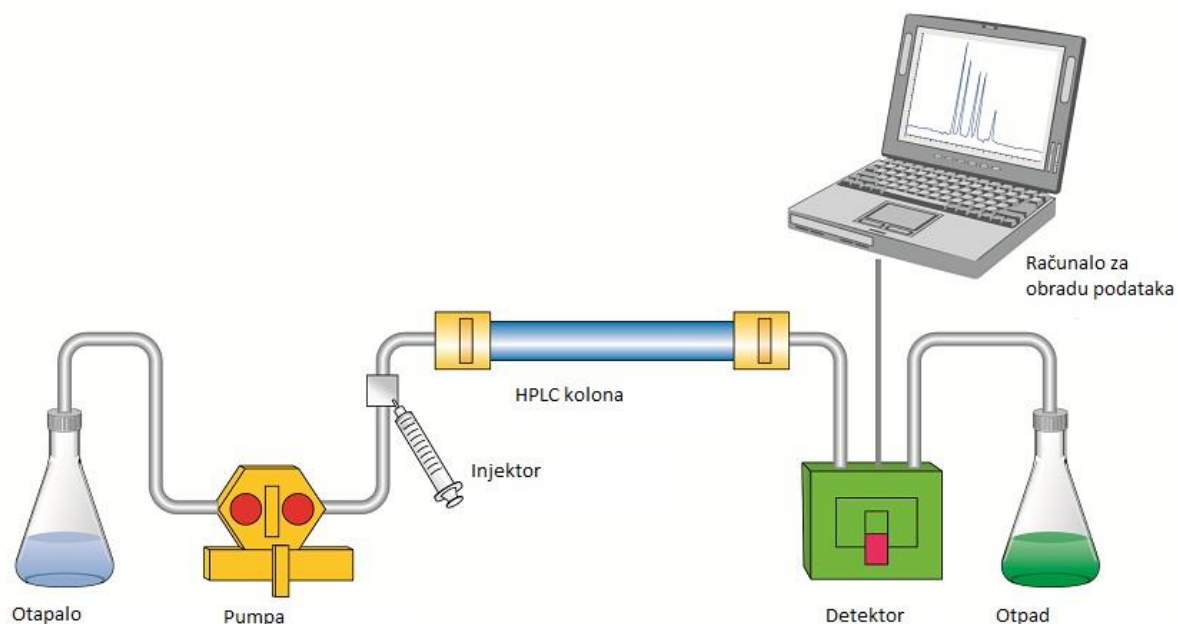
U ekstrakciji čvrsto-tekuće se analit iz krute faze izdvaja u tekuću fazu. Ekstrakcija na čvrstoj fazi podrazumijeva odvajanje analita od matrice na temelju selektivnog vezanja analita na sorbens (silicijev dioksid, kemijski modificirani SiO₂). Otopina analita se koncentrira na aktivnoj površini sorbensa prolaskom kroz kolonicu ili disk i eluira manjim volumenom pogodnog otapala. Sorbens se najčešće stavlja u mikrokolone ili diskove.²⁰

U ekstrakciji tekuće-tekuće dolazi do raspodjele tvari između dvije tekuće faze koje se ne miješaju. Jedna faza je obično voda, a druga organsko otapalo koje se ne miješa s vodom kako bi nastao dvofazni sustav. Analit mora imati veći afinitet prema otapalu nego prema matrici u kojoj se nalazi te odvajanje analita ekstrakcijom tekuće-tekuće može biti potpuno ili djelomično.²⁰

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Izbor metode ekstrakcije svakako ovisi o svojstvima tvari koja se ekstrahira poput strukture, polarnosti, topljivosti itd.²⁰

Svaki HPLC sustav sadrži jednu ili više pumpi za tekuću mobilnu fazu i reguliraju njen protok. Mobilna faza prolazi kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza. Uglavnom se izgrađuje od nehrđajućeg čelika te kako bi se zaštitila i produljio njezin vijek trajanja, a na nju se postavlja pretkolona ispunjena istim punilom.¹⁵ Uobičajena stacionarna faza u obrnuto

faznom načinu rada je kolona punjena silika C₁₈ česticama promjera 2 do 5 µm. Uređaj HPLC ima sustav za unos uzorka, automatski ili ručni, a čine ga petlje i ventili, za unos uzorka, detektor poput primjerice niza fotodioda, te softver za kontrolu operacija i izračun rezultata (slika 6).



Slika 6. Dijelovi uređaja HPLC.²¹

Neki uređaji HPLC imaju i dodatne dijelove poput kolonskog termostata, degazera, a mogu se dodati i drugi moduli.¹⁴

Detektor generira električni signal proporcionalan nekom od svojstava mobilne faze ili analita. Odabir detektora ovisi o prirodi uzorka, a detekcija se može podijeliti na indirektnu i direktnu. Kod indirektna se detekcije prati promjena određenog svojstva mobilne faze (raspršenje svjetla, vodljivost, indeks loma) dok se kod direktne detekcije prati svojstvo analita (apsorpcija UV zračenja, fluorescencija, elektrokemijska reakcija).

Apsorpcijski detektori mjere apsorpciju UV zračenja i vidljivog svjetla u mobilnoj fazi. Mobilna faza iz kolone dolazi u protočnu kvarcnu ćeliju. Postoje tri vrste apsorpcijskih detektora, a to su: fotometar sa živinom lampom i filtrom koji propušta svjetlost valne duljine $\lambda=254$ nm, fotometar s ugrađenom optičkom rešetkom ili prizmom s mogućnošću detekcije pri različitim valnim duljinama te detektor s nizom fotodioda koji snima cijeli UV spektar analita. Problem apsorpcijskih detektora je što neki spojevi nemaju kromofore, skupine koje apsorbiraju UV zračenje za pouzdanu i osjetljivu detekciju no taj problem se rješava derivatizacijom.¹⁹

Fluorimetrijski detektori su prikladni za fluorescirajuće analite što ih čini osjetljivijima od UV detektora. Izvor zračenja je živina lampa ili ksenonov luk. Valna duljina pobude i emisije određuje se monokromatorom ili fluorimetrom. Analiti koji ne fluoresciraju prevode se u fluorescirajuće derivate korištenjem derivatizacijskih reagensa, a najčešće se koristi *o*-ftaldialdehid, dansil-klorid, 4-metil-7-metoksikumarin. Elektrokemijski detektori mjere struju kao posljedicu redukcije ili oksidacije analita koji se eulira s kolone. To znači da prikladnost ove detekcije ovisi o redoks karakteristikama analita i mobilne faze. Detekcija je visoke selektivnosti i osjetljivosti. Detektor indeksa loma bilježi refrakcijski indeks odnosno njegovu promjenu između refrakcije same mobilne faze i mobilne faze s analitom. U usporedbi s apsorpcijskim i fluorimetrijskim detektorima bilježi nedostatke poput manje osjetljivost. Indeks loma ovisi i o temperaturi te je detektor osjetljiv na mijenjanje tlaka. Spektrometar masa kao detektor je važan detektor HPLC jer daje informacije o strukturi i molekulskoj masi analita. Sustav HPLC-MS omogućava separaciju i identifikaciju analita na osnovi molekulske mase. Danas se vrlo često koriste sustavi HPLC-MS za kvalitativnu i kvantitativnu analizu mnogih spojeva, pogotovo kod analita prisutnih u niskim koncentracijama i složenim matricama. U tekućinskom kromatografu dolazi do razdvaja komponenata uzorka, a spektrometar masa stvara i detektira nabijene ione.¹⁵

2.4.1. Metode tekućinske kromatografije za određivanje aminokiselina

Slobodianiuk i suradnici su u svome radu opisali korištenje metode HPLC za određivanje aminokiselina u tri vrste jaglaca. Za odvajanje anlita korišten je gradijentni protok mobilne faze od 1,5 mL/min. Aminokiseline su određivane na način da su derivatizirane reagensima OPA i Fmoc. Identifikacija derivatiziranih aminokiselina izvršena je pomoću fluorescencijskog detektora pri valnoj duljini od 265 nm. Za ekstrakciju aminokiselina iz biljaka korištena je 0,1 mol L⁻¹ vodena otopina klorovodične kiseline, a za hidrolizu vezanih aminokiselina dodano je 2 mL vodene otopine 6 mol L⁻¹ klorovodične kiseline. Metodom HPLC odedeno je 16 aminokiselina pri čemu su glutaminska i asparaginska kiselina bile prisutne u najvećem udjelu (4,74 µg/mg i 3,78 µg/mg) u vrsti *Primula saxalitis* Kom.²²

Arvapally i suradnici su kvantitativno odredili nutrijente u hrani koristeći ekstrakciju na čvrstoj fazi i vezani sustav tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa. Optimiranje pripreme uzorka i ekstrakcijskih uvjeta postignuta je metodom dizajniranja eksperimenata. Uzorci voća, povrća i žitarica su homogenizirani i usitnjeni. Najveća

učinkovitost ekstrakcije postignuta je korištenjem 20 mmol L⁻¹ otopine amonijeva formijata u metanolu i vodi u volumnom omjeru 1:1. Ovom metodom su određene različite klase spojeva poput masti, vitamina i aminokiselina.²³

Ismail je uz suradnike u radu predložio metodu UHPLC-DAD (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector*) za određivanje aminokiselina u ribljoj, goveđoj i svinjećoj želatini. Odvage želatina su hidrolizirane s klorovodičnom kiselinom te je dodana gama-aminomaslačna kiselina s vodom kao unutarnjim standardom. Za derivatizaciju je korišten fluor-boratni pufer pH=8,2 dok je derivatizacijski reagens bio 6-aminokinolin-N-hidroksisukcinimidil karbamat (AQC). Apsorbancija je praćena pri maksimumu apsorpcije 260 nm. U uzorcima želatine određeno je 17 aminokiselina.²⁴

Kirkan i Aydogan su korištenjem metode tekućinske kromatografije koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (engl. HILIC, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) analizirali aminokiseline u uzorcima meda. Metoda HILIC je vrlo korisna za separaciju malih polarnih molekula kao što su aminokiseline te je analiza trajala svega 17 minuta. Prije analize napravljena je ekstrakcija aminokiselina. Uzorci meda otopljeni su vodi te im je dodan ACN i mravlja kiselina. Predkolonska derivatizacija napravljena je uz dansil klorid. UV detekcija provedena je pri valnoj duljini 254 nm. Mobilna faza bila je ACN:H₂O u volumnom omjeru 70:30. Metodom HILIC određen je sadržaj 9 aminokiselina u dvije različite vrste meda.²⁵

2.5. Derivatizacijski reagensi

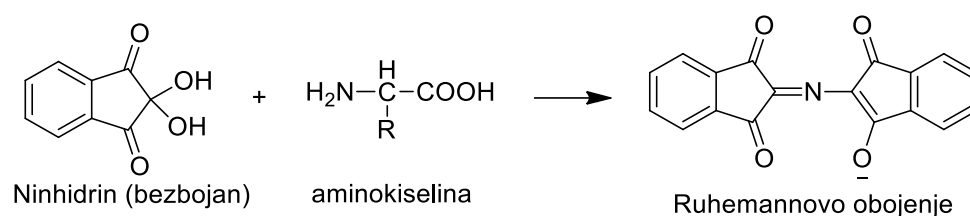
Aminokiseline su polarni spojevi, vrlo teško se zadržavaju na nepolarnim kolonama u kromatografiji obrnutih faza pa se stoga obavezno provodi njihova kemijska derivatizacija. Kemijska derivatizacija je reakcija između analita i derivatizacijskog reagensa koja se najčešće provodi u postupku pripreme uzorka za kromatografsku analizu. Derivatizacijski reagens s analitima tvori kovalentne ili nekovalente produkte koji će biti osjetljiviji na odabranu detekcijsku tehniku u odnosu na analite koji nisu prošli postupak derivatizacije.²⁶

Pri odabiru odgovarajućeg reagensa za derivatizaciju, treba voditi računa o sljedećem:

1. Reakcijom derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita treba nastati stabilan produkt.

2. Reakcija dobivanja produkta između derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita treba biti kvantitativna.
3. Postupak derivatizacije treba biti jednostavan i odvijati se u blagim reakcijskim uvjetima.
4. Kemijska svojstva produkta koji nastaje reakcijom derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita moraju biti kompatibilna s odabranom separacijskom i detekcijskom tehnikom.

S obzirom da se aminokiseline ipak najčešće određuju metodama HPLC-UV ili metodama HPLC uz fluorescencijsku detekciju, kao derivatizacijski reagensi koriste se *o*-ftaldialdehid, fenilizotiocijanat, 9-fluorenilmetil klorformijat i drugi. Navedeni spojevi koriste se i kao alternativa za ninhidrinsko određivanje aminokiselina (slika 7).²⁷



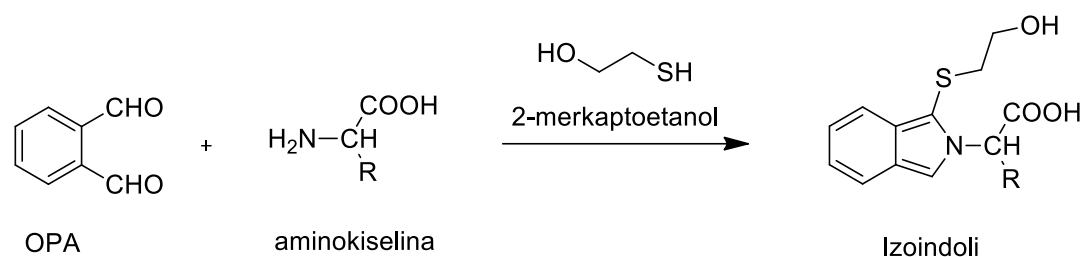
Slika 7. Ninhidrinskom reakcijom nastaje spoj ljubičastog obojenja.²⁷

2.5.1. *o*-ftaldialdehid

o-ftaldialdehid (OPA) je fluorimetrijski reagens za derivatizaciju aminokiselina. OPA reagira s aminokiselinama uz prisutnost 2-merkptoetanela u lužnatoj otopini kako bi nastao fluorescentni derivat. Optimalne valne duljine pobude i emisije za ovakve derivate su 340 i 455 nm. OPA i 2-merkptoetanol reagiraju s primarnim aminima uključujući α -aminokiseline. Iminokiseline poput prolina ne fluoresciraju u reakciji s ovim reagensom dok cistein daje relativno slabu fluorescenciju. Obje aminokiseline mogu dati bolju osjetljivost nakon provedenih modifikacija. Derivatizacija lizina s reagensom OPA također daje nezadovoljavajuću fluorescenciju.²⁸

Prednost ovog reagensa je ta što reagira brzo i reakcija ne zahtjeva zagrijavanje nego se odvija pri sobnoj temperaturi. Derivati aminokiselina i OPA reagensa su visoko osjetljivi, a sam reagens je topljiv u vodi pa ne zahtjeva korištenje organskih otapala. Stabilan je u vodenim

otopinama i može se pohraniti u vodenim otopinama pufera. Uz pomoć reagensa OPA mogu se odrediti pikomolarne količine spojeva koji imaju primarnu amino skupinu.²⁸



Slika 8. Reakcija nastajanja OPA aminokiselinskih derivata.²⁸

Kutlan i Molnar-Perl su pomoću OPA reagensa uspješno kvantificirali 20 aminokiselina i 17 amina u crnom i bijelom vinu, pivu te octu u obliku OPA-3-merkaptopropionskih kiselinskih derivata. Analiza ovih derivata provedena je simultano unutar 53 minute detekcijom fotodiodnim detektorom i fluorescencijskom detekcijom bez prethodnog pročišćavanja ili separacije.²⁹

2.5.2. Fenilizotiocijanat

Fenilizotiocijanat (PITC) reagira s amino skupinama aminokiselina pri sobnoj temperaturi i daje produkt koji se može detektirati UV detektorom pri valnoj duljini apsorpcije od 254 nm.³⁰ Ovaj reagens je također poznat i kao Edmanov reagens i omogućuje razaranje aminokiselina u polipeptidnom lancu i daje informacije o strukturi proteina. Reakcijom fenilizotiocijanata i aminokiselina nastaju feniltiokarbamoil-derivati. Feniltiokarbamoil-aminokiseline su osjetljive na svjetlost i temperaturu okoline.³¹

Nakon vezanja aminokiseline, višak veznog reagensa mora se ukloniti vakuumsom centrifugom kako bi se dobili prihvatljivi uvjeti separacije i kako bi se zaštitila kolona.³² Stabilnost derivata ovisi o temperaturi i vrijednosti pH. Pokazalo se da su sobna temperatura i pH=7,5 optimalni za stabilnost ovih derivata. PITC derivatizirane aminokiseline pri optimalnim uvjetima mogu bi stabilne do 32 h, a ovaj način derivatizacije koristi se najčešće za analizu aminokislina u hidrolizatima čistih proteina i peptida zbog svoje stabilnosti, ponovljivosti i brzine, u određivanju aminokiselina u hrani i u kliničkim ispitivanjima u uzorcima izmeta.³³

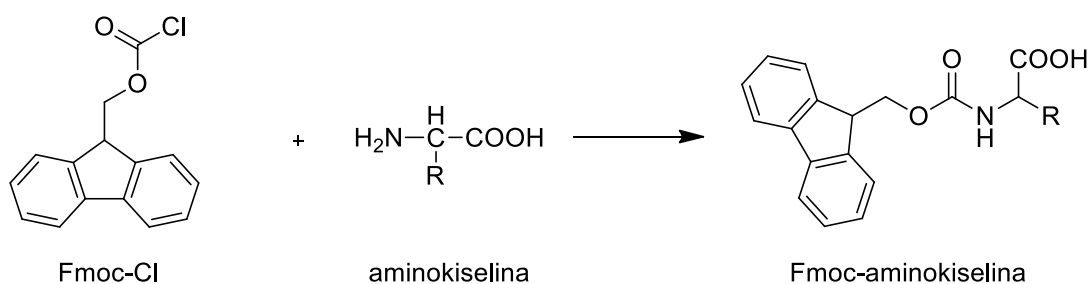
Heinrikson i Meredith su u svome radu objavili rezultate kvantitativne derivatizacije 17 aminokiselina koristeći kao reagens PITC. Reakcija feniltiokarbamilacije aminokiselina trajala

je 5–10 minuta pri sobnoj temperaturi uz javljanje nusprodukata koji su uklonjeni rotacijskim isparivačem pod visokim vakuumom. Derivati su otopljeni u 0,05 mol L⁻¹ amonijevom acetatu pri pH=6,8. Detekcija aminokiselinskih derivata provedena je pri 254 nm. Elucija svih derivata aminokiselina kromatografijom obrnutih faza postignuta je za 30 minuta uz gradijentno eluiranje.³⁴

2.5.3. 9-fluorenilmetil-klorformijat

9-fluorenilmetil-klorformijat (Fmoc-Cl) je derivatizacijski reagens koji se koristi kao zaštitna skupina za amino kraj aminokiselina. Adicijom Fmoc-Cl smanjuje se nukleofilnost ciljnog spoja. Sam proces zaštite ne smije rezultirati time da ometa reakcije na karboksilnom dijelu molekule uslijed steričkih smetnji ili elektronskih utjecaja te ne smije doći do neželjenih reakcija kao niti stereomutacija. Fmoc zaštitna skupina je nestabilna u lužnatom mediju i može se ukloniti korištenjem alkil-amina poput piperidina ili dietilamina. Zaštitna skupina Fmoc se često primjenjuje u sintezi peptida i u sintezi na čvrstoj fazi.³⁵

S aminokiselinama daje stabilne derivate koji fluoresciraju, ali se mogu detektirati i UV detektorom pri 263 nm, valnoj duljini svjetlosti pri kojoj je apsorbanacija najveća. Višak Fmoc-Cl reagensa potrebno je ukloniti, a najčešće se uklanja dodatkom hidrofobnog amina, 1-aminoadamantan hidroklorida. Derivatizacija primarnih i sekundarnih amina s ovim reagensom je vrlo brza i odvija se pri sobnoj temperaturi pri vrijednosti pH=8. Derivatizacija traje do 5 minuta. Prednost ovog reagensa u usporedbi s drugima je ta što reagira i s primarnim i sa sekundarnim aminima za razliku od OPA. Za razliku od dansil-klorida, daje stabilne produkte, dok derivatizacija fenilizotiocijanatom zahtjeva duže vrijeme i dodatne procedure za uklanjanje suviška samog reagensa (slika 9).³⁶



Slika 9. Derivatizacija aminokiseline Fmoc-Cl reagensom.³⁷

Uklanjanje zaštite Fmoc s *N*-kraja amina postiže se dodatkom piperidina, a odvija se prema mehanizmu E1cb.³⁸

Zhou i suradnici su određivali 20 aminokiselina iz korijena biljke bojadisarski vrbovnik (lat. *Radix isatidis*). Kvantitativna analiza provedena je metodom RP-LC/UV (engl. *Reversed phase-Liquid chromatography/Ultra violet*). Korištena je kolona C₁₈ i gradijent mobilne faze acetonitril i natrijev acetat. Derivatizacija je provedena u vodenim uvjetima uz mali udio acetonitrila, te je korišten 0,4 mol L⁻¹ boratni pufer, pH=9,2. Za derivatizaciju je korišten Fmoc-Cl molarne koncentracije 10 mmol L⁻¹ u acetonitrilu te je dodatak njegove množine bio 2,5·10⁻⁶ mol. Derivatizacija je prekinuta nakon 15 minuta. Detekcijska valna duljina bila je 263 nm.³⁹

Horanni i Engelhardt su određivali aminokiseline u bijelom, zelenom, crnom, oolong i pu-erh čaju. Koristeći metodu HPLC-UV i derivatizaciju aminokiselina s Fmoc-Cl u suvišku, određeno je 19 aminokiselina uz detekciju pri 262 nm. Vrijednost pH kalij boratnog pufera (0,5 mol L⁻¹) iznosila je 8,5. Reagens Fmoc-Cl molarne koncentracije 3 mmol L⁻¹ bio je pripremljen u acetonitrilu. Volumni omjer količina Fmoc-Cl i aminokiselina bio je 4,5:1 ili više ovisno o pojedinoj aminokiselini. Izvijestili su kako su Fmoc-aminokiselinski derivati ostali stabilni pri sobnoj temperaturi nekoliko dana, te su također naveli kako reakcija u vodenom mediju potiče nastajanje Fmoc alkohola koji se značajno zamijetio na kromatogramu. Također su u svome radu spomenuli pentan i 1-aminoadamantan kao sredstvo za uklanjanje suviška reagensa Fmoc-Cl. Kao nedostatak korištenja derivatizacijskog reagensa Fmoc-Cl navode nastajanje mono- i disupstituiranih derivata aminokiselina (tirozin i histidin) s više od jedne funkcionalne skupine.⁴⁰

Za razliku od Horanni i Engelhardta, Gawande i Branco su istražili derivatizaciju amina i aminokiselina u vodenom mediju koristeći Fmoc-Cl u manjem suvišku. U modelnoj reakciji navode kako je Fmoc-Cl dodan u suvišku u odnosu na anilin u molarnom omjeru 1:1,2 mmol. Zabilježili su kako reakcija traje 20 sati te pri temperaturi od 60 °C ima iskorištenje od 90%. Također su usporedili zaštitu anilina u destiliranoj vodi i vodi iz slavine te su došli do zaključka kako nema značajnije razlike u rezultatima.⁴¹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i metode karakterizacije pripremljenih spojeva

3.1.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u sintezi nabavljene su od različitih proizvođača (Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Acros Organics, Kemika) čistoće veće od 98 %. Otapala koja su korištena u sintezi spojeva su p.a. (*pro analysi*) čistoće, a za pripravu modelnih otopina, kromatografiju i spektrometriju masa čistoće *HPLC-grade*.

U svim eksperimentima korištena je voda pročišćena MiliQ[®] sustavom do 18,2 MΩ cm⁻¹ (Merck, Milipore). Standardni spojevi *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-glutaminska kiselina, *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-fenilalanin, *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-serin i *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-1-adamantan pripremljeni su kao dio ovog diplomskog rada, dok je 9-fluorenmetanol nabavljen u 99 % čistoći od Sigmee Aldrich.

3.1.2. Instrumenti

- Shimadzu uređaj tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza, Shimadzu Scientific Instruments (SSI) North America, SAD
- Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom Agilent 6420, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, SAD
- NMR, Bruker, SAD
- Analitička vaga, Sartorius Croatia - Libra elektronik d.o.o.
- Rotacijski isparivač, RV 10 digital V, IKA, Njemačka
- Magnetna mješalica
- Vorteks mješalica

3.1.3. Spektrometrija masa

Osnovni spektri masa korišteni za identifikaciju pripremljenih spojeva snimljeni spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom Agilent 6420 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Uzorci su otopljeni u acetonitrilu ili pak smjesi vode i acetonitrila i injektirani direktno na MS detektor u mobilnoj fazi 50 % ACN uz 0,1 % FA, protok 0,2 mL min⁻¹. Primijenjena energija ionizacije iznosila je 135,0 V, temperatura plina za sušenje (dušik) 300 °C, protok 8 L min⁻¹, tlak nebulizatora 30 psi, napon na kapilari 4,0 kV, a napon na detektoru (Delta EMV) 400 V. Rezultati su prikazani kao ovisnost relativnog intenziteta izražena u postocima i omjera mase/naboja (m/z). Snimanja i obrada podataka provedeni su u programu instrumenta (Agilent MassHunter software).

3.1.4. Eksperimenti NMR

Spektri NMR snimljeni su na Bruker 600 spektrometru, pri frekvencijama 600,13 MHz (¹H) i 300,13 MHz (¹³C) te na Bruker 300 spektrometru pri frekvencijama 150,92 MHz (¹H) i 75,47 MHz (¹³C). Spektri su snimljeni u DMSO-d₆ pri sobnoj temperaturi. Kemijski su pomaci izraženi u ppm jedinicama u relativnom odnosu prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutarnjem standardu. Spektri su asignirani na temelju 1D (¹H i APT) eksperimenata.

3.2. Priprava standardnih spojeva

3.2.1. Opći sintetski protokol

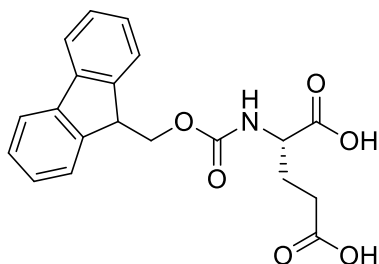
Pojedina aminokiselina (odvaga i broj molova prikazani u **tablici 1.**) otopljena je u 10 mL vode te je u otopinu dodano 2 ekvivalenta krutog K₂CO₃ kako bi se vrijednost pH podesila na 9. Smjesi je dodano 1,2 ekvivalenta Fmoc-Cl (odvaga i broj molova prikazani u **tablici 1.**) koji je otopljen u 5 mL acetonitrila. Reakcijska smjesa ostavljena je na miješanju dva sata na sobnoj temperaturi uz povremenu provjeru i održavanje vrijednosti pH otopine istom dodatkom K₂CO₃. Po završetku je u reakcijsku smjesu dodana 10 %-tna limunska kiselina do vrijednosti

pH=5, acetonitril je uparen, a produkt je ekstrahiran dodatkom EtOAc. Organski sloj ispran je vodom i zasićenom otopinom NaCl. Nakon sušenja nad Na₂SO₄, otapalo se upari, a produkt se prekrizalizira iz EtOAc/heksan. Svi pripremljeni spojevi okarakterizirani su spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Tablica 1. Mase i množine pojedine aminokiseline i pojedini dodatak Fmoc-Cl u odnosu na svaku aminokiselinu.

| | Aminokiseline | | Dodatak Fmoc-Cl | |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| | Masa/mg | <i>n</i> /mol | Masa/mg | <i>n</i> /mol |
| L-Glutaminska kiselina | 55 | 0,37·10 ⁻³ | 114 | 0,44·10 ⁻³ |
| L-Fenilalanin | 56 | 0,39·10 ⁻³ | 105 | 0,41·10 ⁻³ |
| L-Serin | 54 | 0,51·10 ⁻³ | 159 | 0,61·10 ⁻³ |

3.2.2. Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-glutaminske kiseline (Fmoc-Glu)



$$M(C_{20}H_{19}NO_6) = 369,12 \text{ g mol}^{-1}$$

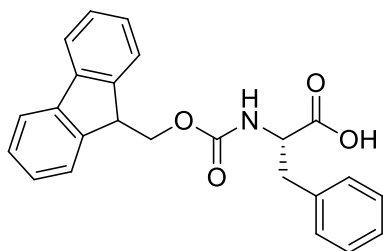
$$[M+H]^+ m/z 370,1$$

Prinos: 107,10 mg ($\eta=78\%$) produkta u obliku bijelog praha.

¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta=1,82 - 1,75$ (m, 1H, β -CH₂ Glu), 1,98 (qd, 1H, β -CH₂ Glu), 2,33 – 2,28 (m, 2H, γ -CH₂ Glu), 3,99 (td, 1H, α -CH Glu), 4,23 (t, 1H, CH Fmoc), 4,29 (t, 2H, CH₂ Fmoc) 7,33 (t, 2H, CH Fmoc), 7,42 (t, 2H, CH Fmoc), 7,65 (d, 1H, NH), 7,72 (d, 2H, CH Fmoc), 7,89 (d, 2H, CH Fmoc), 12,40 (bs, 2H, COOH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): $\delta=26,1$ (β -CH₂ Glu), 30,1 (γ -CH₂ Glu), 46,6 (C Fmoc), 53,0 (α -CH Glu), 65,6 (CH₂ Fmoc), 120,1 (CH Fmoc), 125,3 (CH Fmoc), 127,0 (CH Fmoc), 127,6 (CH Fmoc), 140,7 (C Fmoc), 143,8 (C Fmoc), 156,1 (CO Fmoc), 173, 6 (CO Glu), 173, 6 (CO Glu).

3.2.3. Sinteza N-(fluorenilmetoksigarbonil)-L-fenilalanina (Fmoc-Phe)



$$M(C_{24}H_{21}NO_4) = 387,15 \text{ g mol}^{-1}$$

$$[M+H]^+ m/z 388,2$$

Prinos: 93,3 mg ($\eta=71\%$) produkta u obliku bijelog praha. Produkt je dodatno pročišćen kromatografijom obrnutih faza na semipreparativnoj koloni Zorbax XDB C₁₈ (250 × 9,4 mm, 5 μm) uz UV detekciju pri 263 nm i gradijentno eluiranje uz eluens A: 0,1% mravlja kiselina (FA) u Mili Q vodi i eluens B: acetonitril u vremenskim točkama prikazanim u **tablici 2**. Protok je podešen na 1 mL min⁻¹.

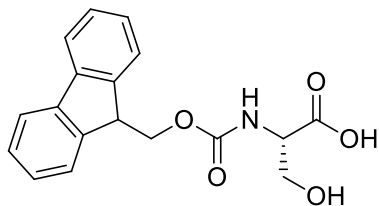
Tablica 2. Kromatografski uvjeti semipreparativne analize Phe-Fmoc.

| Vrijeme/min | Eluens A | Eluens B |
|-------------|--------------|--------------|
| | $\varphi/\%$ | $\varphi/\%$ |
| 0,01 | 60 | 40 |
| 17,00 | 0 | 100 |
| 22,00 | 0 | 100 |
| 22,10 | 60 | 40 |
| 25,00 | 60 | 40 |

¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta=2,86$ (dd, 1H β -CH₂ Phe), 3,07 (dd, 1H β -CH₂ Phe), 4,15 – 4,11 (m, 1H, α -CH Phe), 4,16 (d, 1H, CH Fmoc), 4,19 (d, 2H CH₂ Fmoc), 7,19 (dd, 1H, CH Phe) 7,26 (d, 4H, 2 CH Phe, 2 CH Fmoc), 7,29 (ddd, 2H, CH Phe), 7,40 (td, 2H, CH Phe), 7,63 (dd, 2H, CH Fmoc), 7,70 (d, 1H, NH), 7,87 (d, 2H, CH Fmoc), 12,75 (bs, 1H, COOH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆): $\delta=36,3$ (β -CH₂ Phe), 46,4 (C Fmoc), 55,3 (α -CH Phe), 65,4 (CH₂ Fmoc), 120,0 (CH Fmoc), 125,1 (CH Fmoc), 126,2 (CH Phe), 126,9 (CH Fmoc), 127,5 (CH Fmoc), 128,0 (CH Phe), 129,0 (CH Phe), 137,9 (C Phe), 140,5 (C Fmoc), 143,6 (C Fmoc), 155,8 (CO Fmoc), 173, 2 (CO Phe).

3.2.4. Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-L-serina (Fmoc-Ser)



$$M(C_{18}H_{17}NO_5) = 327,11 \text{ g mol}^{-1}$$

$$[M+H]^+ m/z 328,2$$

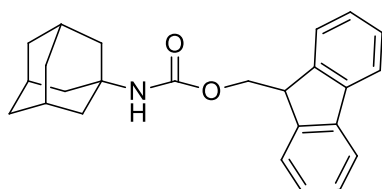
Prinos: 70 mg ($\eta=42\%$) produkta u obliku bijelog praha. Produkt je očišćen na kromatografijom na koloni silikagela u sustavu diklormetan, metanol, octena kiselina [ψ (DCM, MeOH, CH₃COOH)=90:10:0,5]. $R_f=0,34$.

Produkt je dodatno pročišćen kromatografijom obrnutih faza na semipreparativnoj koloni Zorbax XDB C₁₈ (250 x 9,4 mm, 5 μ m) uz UV detekciju pri 263 nm i gradijentno eluiranje uz eluens A: 0,1% mravlja kiselina (FA) u Mili Q vodi i eluens B: acetonitril u vremenskim točkama prikazanim u **tablici 2**. Protok je podešen na 1 mL min⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta=3,67$ (d, 2H, β -CH₂ Ser), 4,02-4,07 (m, 1H, α -CH Ser), 4,23 (t, 1H, CH Fmoc), 4,29 (dd, 2H, CH₂ Fmoc), 4,90 (bs, 1H, OH Ser), 7,33 (t, 2H, CH Fmoc), 7,33-7,43 (m, 2H, CH Fmoc i NH), 7,74 (dd, 2H, CH Fmoc), 7,89 (d, 2H, CH Fmoc), 12,64 (bs, 1H, COOH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): $\delta=46,6$ (C Fmoc), 56,7 (α -CH Ser), 61,3 (β -CH₂ Ser), 65,7 (CH₂ Fmoc), 120,1(CH Fmoc), 125,3 (CH Fmoc), 127,1 (CH Fmoc), 127,6 (CH Fmoc), 140,7 (C Fmoc), 143,8 (C Fmoc), 156,1 (CO Fmoc), 172, 1 (CO Ser).

3.2.5. Sinteza N-(fluorenilmetoksikarbonil)-1-adamantana (Fmoc-Ad)



$$M(C_{25}H_{27}NO_2) = 373,49 \text{ g mol}^{-1}$$

$$[M+H]^+ m/z 374.4$$

Prinos: 25 mg ($\eta=20\%$) produkta u obliku bijelog praha. Sinteza je provedena po općem sintetskom protokolu, osim što je amino-komponenta u ovom slučaju bio 1-aminoadamantan

hidroklorid (Ad) (60 mg, 0,33 mmol). Fmoc-Cl dodano je 1,2 ekvivalenata više (102 mg, 0,4 mmol). Obrada produkta provedena je na isti način kao i u slučaju Fmoc-aminokiselina, osim što produkt nije istaložen nego je pročišćen kromatografijom obrnutih faza na semipreparativnoj koloni Zorbax XDB C₁₈ (250 × 9,4 mm, 5 μm) uz UV detekciju pri 263 nm i gradijentno eluiranje uz eluens A: 0,1 % mravlja kiselina (FA) u Mili Q vodi i eluens B: acetonitril u vremenskim točkama prikazanim na **tablici 2**. Protok je podešen na 1 mL min⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ=1,59 (s, 6H, Ad), 1,70-2,12 (m, 9H, Ad), 4,17 (bs, 3H, CH₂, CH, Fmoc), 6,98 (s, 1H, NH), 7,23-7,47 (m, 4H, CH Fmoc), 7,71 (d, 2H, CH Fmoc), 7,86 (d, 2H, CH Fmoc).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ=28,5 (CH Ad), 28,9 (CH Ad), 35,7 (CH₂ Ad), 45,5 (C Fmoc), 46,6 (C Ad), 86,8 (CH₂ Fmoc), 120,2 (CH Fmoc), 121,4 (CH Fmoc), 127,2 (CH Fmoc), 128,0 (CH Fmoc), 137,5 (C Fmoc), 139,4 (C Fmoc), 142,2 (CO Fmoc).

3.3. Razvoj metode HPLC-UV za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata

Analiza Fmoc-Ak derivata metodom RP-HPLC-UV provedena je na uređaju Shimadzu HPLC (Shimadzu Scientific Instruments (SSI) North America, SAD). Uređaj se sastoji od kvaterne pumpe, detektora DAD, komunikacijskog modula, degazera, ručnog injektorskog sustava, rezervoara mobilne faze, pretkolone i kolone.

S ciljem postavljanja optimalnih kromatografskih uvjeta eluiranja i postizanja visoke rezolucije za što bolju separaciju ciljanih analita i definiranje vremena zadržavanja pojedinog analita napravljena je kvalitativna analiza pripremljenih standarda. Za kvalitativnu analizu pripremljena je smjesa Fmoc-Glu, Fmoc-Phe, Fmoc-Ser, Fmoc-Cl i Fmoc-Ad masene koncentracije 1 mg mL⁻¹ u ACN. Smjesa je prije injektiranja razrijeđena u 30% ACN u volumnom omjeru 1:1 kako bi sastav otapala u uzorku odgovarao sastavu početne mobilne faze u kromatografskoj analizi. Osim toga, kako bi se odredilo vrijeme zadržavanja Fmoc-OH kao nusprodukta derivatizacijske reakcije, Fmoc-OH pripremljen je kao 1 mg mL⁻¹ otopina u ACN i razrijeđen prije injektiranja volumnom omjeru 1:1 u 30% ACN. Ispitano je nekoliko gradijentnih ispiranja s različitim postotkom acetonitrila u početnim uvjetima i kolona da bi se postigla visoka rezolucija i dobro odvajanje svih analita.

Tablica 3. Uvjeti eluiranja za određivanje aminokiselina metodom HPLC.

| Vrijeme/min | Eluens A | Eluens B |
|-------------|-----------|-----------|
| | $\phi/\%$ | $\phi/\%$ |
| 0,01 | 70 | 30 |
| 6,00 | 60 | 40 |
| 12,00 | 0 | 100 |
| 20,00 | 0 | 100 |
| 20,10 | 70 | 30 |
| 25,00 | 70 | 30 |

Za kromatografsku analizu ciljanih spojeva kao najbolja pokazala se analitička kolona Zorbax C₁₈ (75 mm×4,6 mm, 3,5 μm; Phenomenex, SAD) uz primjenu gradijentne elucije navedene u **tablici 3**. Eluens A je bila smjesa Mili Q vode i mravlje kiseline ψ (1000:1 v/v), a eluens B je bio ACN. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min⁻¹ pri tlaku od oko 50 bara. Volumen injektiranih uzoraka bio je 20 μL.

Za detekciju i kvantitativno određivanje ciljanih analita korišten je detektor DAD koji istovremeno detektira apsorpciju svih valnih duljina u ultraljubičastom i vidljivom području. Iz kromatograma su dobiveni UV spektri pri čemu je odabrani maksimum apsorpcije valne duljine analita 263 nm.

3.4. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju glutaminske kiseline s Fmoc-Cl

Kako bi se istražili optimalni uvjeti za derivatizaciju glutaminske kiseline s Fmoc-Cl pripremljena je serija modelnih otopina.

3.4.1. Smjesa otapala za derivatizaciju

Derivatizacijska reakcija provedena je u smjesi koja je sadržavala 600 μL pufera, 550 μL vode i 850 μL acetonitrila. Ukupni volumen modelnih otopina iznosio je 2 mL.

3.4.2. 0,2 mol L⁻¹ boratni pufer, pH 10,2 (pufer 1)

Boratni pufer (0,2 mol L⁻¹) pripremljen je otapanjem 1,2 g H₃BO₃ u 75 mL vode. pH otopine podešen je na 10,2 dodatkom 2 mol L⁻¹ otopine NaOH, a odmjerna tikvica nadopunjena je vodom do ukupnog volumena od 100 mL. Puferska otopina čuvana je u hladnjaku do upotrebe.

3.4.3. 0,4 mol L⁻¹ boratni pufer pH 8,1 (pufer 2)

0,4 mol L⁻¹ boratni pufer pripreman je otapanjem 5,5 g KCl u 100 mL vode. U takvu otopinu dodano je 4,9 g H₃BO₃. Alikvot od 25 mL je podešen na pH 8,1 dodatkom 2 mol L⁻¹ NaOH te nadopunjeno s vodom do 50 mL.⁴² Puferska otopina je čuvana u hladnjaku do upotrebe.

3.4.4. Priprema standardnih otopina za derivatizaciju

Pripremljene su standardne otopine derivatizacijskog reagensa Fmoc-Cl masene koncentracije 5 mg mL⁻¹ i 10 mg mL⁻¹ u acetonitrilu. Osnovna otopina glutaminske kiseline pripremljena je u masenoj koncentraciji 1 mg mL⁻¹ u vodi, radna otopina razrijeđena je vodom do 0,54 mg mL⁻¹. 1-aminoadamantan hidroklorid pripremljen je u množinskoj koncentraciji 7,48 mg mL⁻¹ u smjesi vode i acetonitrila volumnog udjela 1:1.

3.4.5. Ispitivanje stabilnosti derivatizacijskog reagensa u puferskim otopinama

Kako bi se ispitala stabilnost derivatizacijskog reagensa u smjesi otapala za derivatizaciju pripremljena je serija modelnih otopina bez aminokiselina sastava koji je naveden u **tablici 4**. Slijepi uzorak i sve modelne otopine stavljene su na vortex 5 minuta. Neposredno prije injektiranja, otopine su profiltrirane preko filtera (0,45 μm) i injektirane na uređaj HPLC-UV s gradijentom otapala iz **tablice 3**. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL.

Tablica 4. Sastav reakcijskih smjesa za određivanje stabilnosti Fmoc-Cl u puferским otopinama.

| | Volumen/mL | | | | |
|--------------------------|--|---------|---------|------|------|
| | Fmoc-Cl ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) u ACN | Pufer 1 | Pufer 2 | ACN | Voda |
| Blank 1 | - | 600 | - | 850 | 550 |
| Blank 2 | - | - | 600 | 850 | 550 |
| Modelna otopina 1 | 600 | - | - | 1400 | - |
| Modelna otopina 2 | 600 | - | - | - | 1400 |
| Modelna otopina 3 | 600 | 600 | - | 250 | 550 |
| Modelna otopina 4 | 600 | - | 600 | 250 | 550 |

3.4.6. Optimiranje dodatka derivatizacijskog reagensa

Optimalni dodatak derivatizacijskog reagensa ispitan je derivatizacijom poznate množine glutaminske kiseline ($n=0,001 \text{ mmol}$) u modelnim otopinama uz korištenje dvije različite koncentracije Fmoc-Cl u ACN, 5 mg mL^{-1} ($600 \mu\text{L}$, $n=0,012 \text{ mmol}$) i 10 mg mL^{-1} ($600 \mu\text{L}$, $n=0,024 \text{ mmol}$). Dodatak reagensa prikazan je u **tablici 5**.

Tablica 5. Sastav reakcijskih smjesa za određivanje optimalnog dodatka derivatizacijskog reagensa.

| | Volumen/mL | | | |
|------------------------------|---|--|--|---------|
| | L-Glutaminska kiselina ($\gamma=0,54 \text{ mg mL}^{-1}$) u H ₂ O | Fmoc-Cl ($\gamma=5 \text{ mg mL}^{-1}$) u ACN | Fmoc-Cl ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) u ACN | Pufer 2 |
| Modelna otopina 5 | 300 | 600 | - | 600 |
| Modelna otopina 6 | 300 | - | 600 | 600 |

Svaka modelna otopina stavljena je na miješanje 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta reakcija je zaustavljena dodatkom 500 μL otopine 1-aminoadamantan hidroklorida masene koncentracije $7,48 \text{ mg mL}^{-1}$ ($n=0,02 \text{ mmol}$) u smjesi vode i acetonitrila 1:1. Smjesa je ostavljena na miješanju još dvije minute. Neposredno prije injektiranja, smjesa je profiltrirana preko $0,45 \mu\text{m}$ filtera i razrijeđena u omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen od $20 \mu\text{L}$ injektiran je na HPLC-UV po gradijentu iz **tablice 3**.

3.4.7. Optimiranje vremena derivatizacije

Optimalno vrijeme derivatizacije glutaminske kiseline ispitano je u modelnim otopinama uz poznati dodatak glutaminske kiseline ($n=0,001 \text{ mmol}$) prema **tablici 6**.

Tablica 6. Sastav reakcijskih smjesa za određivanje optimalnog vremena derivatizacije.

| | Volumen/mL | | | Vrijeme derivatizacije/min |
|---------------------------|--|--------|---|----------------------------|
| | L-Glutaminska kiselina ($\gamma=0,54 \text{ mg mL}^{-1}$) u H ₂ O | Pufer2 | Fmoc-Cl ($\gamma=5 \text{ mg mL}^{-1}$) u ACN | |
| Modelna otopina 7 | 300 | 600 | 600 | Odmah po dodatku Fmoc-Cl |
| Modelna otopina 8 | 300 | 600 | 600 | 2 |
| Modelna otopina 9 | 300 | 600 | 600 | 5 |
| Modelna otopina 10 | 300 | 600 | 600 | 10 |

Odmah po dodatku Fmoc-Cl ($n=0,012 \text{ mmol}$), odnosno nakon 2, 5, odnosno 10 minuta miješanja na sobnoj temperaturi u svaku je modelnu otopinu dodano 500 μL otopine 1-aminoadamantan hidroklorida masene koncentracije $7,48 \text{ mg mL}^{-1}$ ($n=0,02 \text{ mmol}$) u smjesi vode i acetonitrila (1:1 v/v). Miješanje je nastavljeno još dvije minute. Neposredno prije injektiranja uzorka, smjesa je profiltrirana preko filtera (0,45 μm) i razrijeđena u volumnom omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen uzorka od 20 μL injektiran je u uređaj HPLC-UV s gradijentom otapala za eluiranje iz **tablice 3**.

3.4.8. Priprema kalibracijskih otopina Fmoc-Glu

Iz osnovne otopine Fmoc-Glu masene koncentracije 5 mg mL^{-1} u smjesi vode i acetonitrila (50:50 v/v) pripremljeno je pet kalibracijskih otopina masenih koncentracija od 50, 150, 250, 500 i 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u smjesi otapala za derivatizaciju. Ukupni volumen svake kalibracijske otopine je 1 mL. Prije injektiranja na u uređaj za HPLC-UV s gradijentnim eluiranjem iz **tablice 3** svaka otopina za kalibraciju je dodatno razrijeđena u volumnom omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen injektiranog uzorka bio je 20 μL . Otopine za kalibraciju

pohranjene su u hladnjak i injektirani ponovno nakon 24 h kako bi se provjerila njihova stabilnost.

Kalibracijski pravac za Fmoc-Glu konstruiran je kao ovisnost površine ispod kromatografskog pika Fmoc-Glu i masene koncentracije. Masena koncentracija, a time i broj molova Fmoc-Glu derivata nastalog u derivatizacijskim reakcijama dobiveni su uvrštavanjem površine ispod kromatografskog pika nastalog derivata u izračunatu jednadžbu pravca.

3.5. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju aminokiselina u smjesi

Nakon razvoja metode na glutaminskoj kiselini, derivatizacijska reakcija provedena je na modelnim otopinama smjese aminokiselina, glutaminske kiseline, serina i fenilalanina.

3.5.1. Priprema standardnih otopina za derivatizaciju

Pripremljena je standardana otopina derivatizacijskog reagensa Fmoc-Cl masene koncentracije 10 mg mL^{-1} u acetonitrilu. Aminokiseline su pripremljene prema podacima u **tablici 7**, glutaminska kiselina i serin otopljeni su u vodi, a fenilalanin u smjesi vode i acetonitrila (1:1 v/v). 1-aminoadamantan hidroklorid pripremljen je u koncentraciji $14,5 \text{ mg mL}^{-1}$ u smjesi vode i acetonitrila (1:1 v/v).

Tablica 7. Masene koncentracije aminokiselina za derivatizaciju u smjesi.

| Aminokiselina | Masena koncentracija $\gamma/\text{mg mL}^{-1}$ |
|------------------------|---|
| L-Glutaminska kiselina | 1,48 |
| L-Serin | 1,66 |
| L-Fenilalanin | 1,04 |

3.5.2. Derivatizacijska reakcija aminokiselina u smjesi

Množina od 0,001 mmola svake pojedine aminokiseline derivatizirano je dodatkom $600 \text{ }\mu\text{L}$ Fmoc-Cl u acetonitrilu (10 mg mL^{-1} , $n=0,024 \text{ mmol}$) prema vrijednostima u **tablici 8**.

Tablica 8. Sastav otopine za derivatizaciju aminokiselina u smjesi.

| | Volumen/mL | | | |
|---|---|---|---|--|
| | L-Glutaminska kiselina ($\gamma=1,48 \text{ mg mL}^{-1}$) u H ₂ O | L-Serin ($\gamma=1,66 \text{ mg mL}^{-1}$) u H ₂ O | L-fenilalanin ($\gamma=1,04 \text{ mg mL}^{-1}$) u H ₂ O/ACN 1:1 | Pufer 2 ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) u ACN |
| Modelne otopine 11, 12, 13 | 100 | 100 | 100 | 600 |

Modelna otopina 11 injektirana je u uređaj HPLC odmah po dodatku Fmoc-Cl, modelna otopina 12 nakon 2 minute, a modelna otopina 13 tek 5 minuta nakon dodatka Fmoc-Cl. Nakon isteka vremena u svaku je modelnu otopinu dodano 500 μL otopine 1-aminoadamantan hidroklorida masene koncentracije $14,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ($n=0,04 \text{ mmol}$) u smjesi vode i acetonitrila (1:1 v/v). Miješanje je nastavljeno još dvije minute. Neposredno prije injektiranja, smjesa je profiltrirana preko $0,45 \mu\text{m}$ filtera i razrijeđena u volumnom omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen injektiranog uzorka iznosio je $20 \mu\text{L}$ a sa uređaja HPLC-UV gradijentno je eluiran otapalom sastava danim u **tablici 3**.

3.5.3. Priprema serije kalibracijskih otopina za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata u smjesi

Osnovne otopine sintetiziranih standarada pripremljene su kao $3,7 \text{ mg mL}^{-1}$ otopina Fmoc-Glu u smjesi vode i acetonitrila (50:50 v/v), $2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ otopina Fmoc-Phe u acetonitrilu, $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ otopina Fmoc-Ser u acetonitrilu. Radna smjesa masene koncentracije 1 mg mL^{-1} je pripravljena razrjeđivanjem osnovne otopine Fmoc-aminokiselina u acetonitrilu. Korištene su otopine za kalibraciju masenih koncentracija pojedinog analita 50, 100, 150, 250, 500 i $700 \mu\text{g mL}^{-1}$, a pripremljene su razrjeđenjem radne smjese u smjesi otapala za derivatizaciju. Prije injektiranja u uređaj HPLC-UV s gradijentom otapala iz **tablice 3** svaki kalibrant je dodatno razrijeđen u volumnom omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen injektiranog uzorka bio je $20 \mu\text{L}$. Otopine za kalibraciju su pohranjene u hladnjak i ponovno izmjerene nakon 24 h kako bi se njihova stabilnost.

Kalibracijski pravac konstruiran je za svaki pojedini analit kao ovisnost površine ispod kromatografskog pika tog analita i njegove masene koncentracije. Masena koncentracija, a time i množina aminokiselinskih derivata nastalih u derivatizacijskim reakcijama dobiveni su uvrštavanjem površine ispod kromatografskog pika pojedinog nastalog derivata u pripadajuću jednadžbu pravca.

3.6. Određivanje sadržaja Na-glutamata u dodatcima jelima

Dodatci jelima dvaju različitih proizvođača su nabavljeni u trgovini. Svaki od dva uzorka stavljen je u sušionik na sušenje preko noći na 50 °C kako bi se uklonila vlaga. 100 mg suhog uzorka otopljeno je 10 mL H₂O i stavljeno na miješanje na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon 30 minuta otopina je profiltrirana preko filtera (0,45 µm) i pohranjena u hladnjaku do analize.

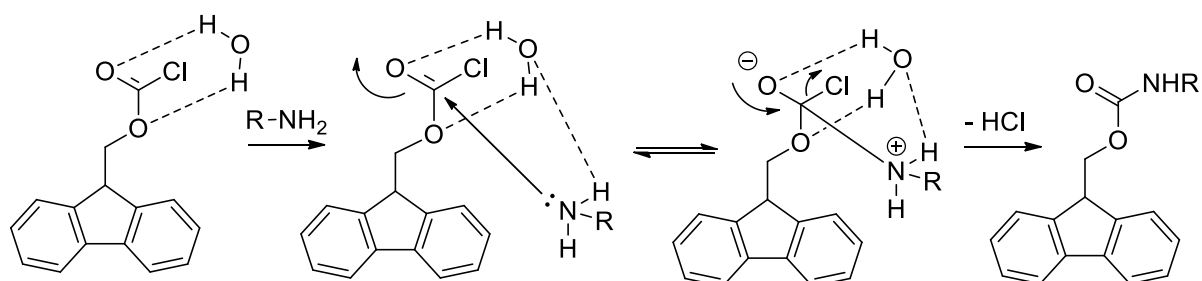
Svaki uzorak derivatiziran je s Fmoc-Cl. Alikvot od 100 µL je pomiješan sa 200 µL vode, otopini je dodano 600 µL pufera 2 i 600 µL Fmoc-Cl masene koncentracije 10 mg mL⁻¹ u acetonitrilu ($n=0,024$ mmol). Smjesa je promiješana na sobnoj temperaturu 2 minute, a potom je dodano 500 µL otopine 1-aminoadamantan hidroklorida masene koncentracije 14,5 mg mL⁻¹ ($n=0,04$ mmol) u smjesi vode i acetonitrila (1:1 v/v). Miješanje uzorka smjese nastavljeno je još dvije minute. Neposredno prije injektiranja, smjesa je profiltrirana preko filtera (0,45 µm) i razrijeđena u volumnom omjeru 1:1 sa smjesom vode i acetonitrila (70:30 v/v). Volumen od 20 µL injektiran je u uređaj HPLC-UV i gradijentno eluiran prema sastavu otapala iz **tablice 3**. Uzorak svakog dodatka jelima napravljen je u dva replikanta.

Masena koncentracija, a time i broj molova aminokiselinskih derivata nastalih u derivatizacijskim reakcijama dobiveni su uvrštavanjem površine ispod kromatografskog pika nastalog derivata u jednadžbu pravca koji opisuje ovisnost površine ispod kromatografskog pika Fmoc-Glu i njegove masene koncentracije. Prema broju molova nastalog derivata Fmoc-Glu izračunat je udio glutaminske kiseline u uzorku.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

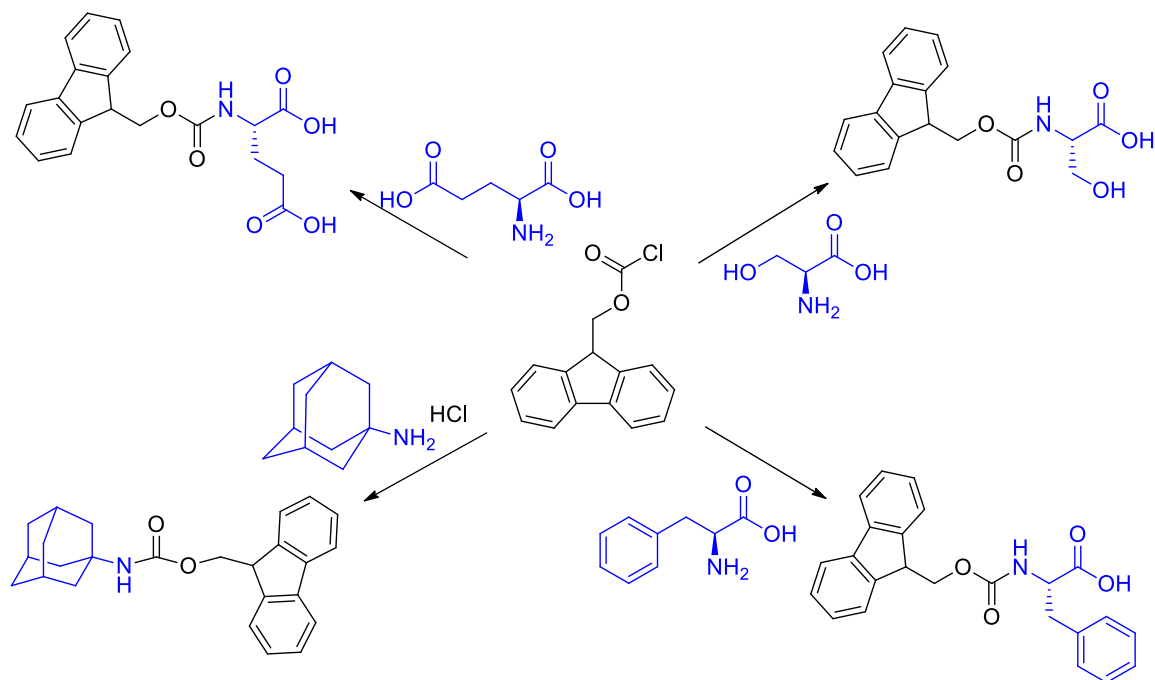
4.1. Priprava standardnih spojeva

Priprava standardnih spojeva Fmoc-Glu, Fmoc-Ser, Fmoc-Phe i Fmoc-Ad provedena je korištenjem standardnih metoda peptidne sinteze.⁴¹ Pojedina aminokiselina prevedena je u *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-derivat korištenjem malog suviška Fmoc-Cl (1,2 ekvivalenta) u odnosu na množinu aminokiseline, u lužnatim reakcijskim uvjetima tijekom dva sata. Mehanizam reakcije nalazi se na **slici 10**.



Slika 10. Mehanizam derivatizacije amina Fmoc-Cl reagensom.⁴¹

Produkti su dobiveni u dobrom prinosu, a po potrebi su dodatno pročišćeni preparativnom metodom HPLC. Fmoc-Ad pripremljen je po istom postupku, samo što je kao amino komponenta korišten 1-aminoadamantan hidroklorid. Iskorištenje je bilo lošije, no kako je bilo potrebno izolirati Fmoc-Ad samo kako bi se mogla provesti identifikacija u analitičkom protokolu, sintetski protokol nije optimiran. Nastali Fmoc-Ad nije čišćen na stupcu silikagela, nego je pročišćen preparativnom metodom HPLC. Svi produkti su okarakterizirani spektroskopskim i spektrometrijskim metodama. Dobiveni Fmoc-Glu, Fmoc-Ser, Fmoc-Phe i Fmoc-Ad korišteni su kao analitički standardi za kvalitativnu i/ili kvantitativnu analizu aminokiseline (slika 11).



Slika 11. Sinteza standardnih spojeva Fmoc-Glu, Fmoc-Ser, Fmoc-Phe i Fmoc-Ad.

4.2. Razvoj metode HPLC-UV za određivanje Fmoc-aminokiselinskih derivata

Fmoc-aminokiselinski derivati su određeni metodom HPLC-UV obrnutih faza. Fmoc-derivati osim što fluoresciraju, mogu se detektirati i UV detektorom praćenjem pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije Fmoc-derivata 263 nm.

Kao stacionarna faza za razdvajanje ciljanih analita kao najbolja se pokazala analitička kolona Zorbax C₁₈, dok je kao mobilna faza korištena smjesa eluensa A (smjesa Mili Q vode i mravlje kiseline (1000:1 v/v) i eluensa B (ACN). Analiti su eluirani gradijentnim načinom eluiranja, stoga je bilo potrebno odrediti optimalni sastav eluensa A i eluensa B tijekom gradijentne elucije kako bi se postigla dobra rezolucija i separacija. Isprobani su sustavi s više i manje ACN u početnim uvjetima i kao najbolji se pokazao gradijentni način eluiranja prikazan u **tablici 3**. Fmoc-Glu, Fmoc-Ser, Fmoc-Phe, Fmoc-Cl, Fmoc-OH i Fmoc-Ad uz navedene uvjete dobro su odvojeni. Kod polarnijih analita (Fmoc-Ser, Fmoc-Glu, Fmoc-OH) uočeno je proširenje kromatografskih pikova kod otapanja uzorka u čistom acetonitrilu. Taj je problem riješen razrijeđenjem uzorka u 30% acetonitrilu prije injektiranja, čime sastav uzorka odgovara sastavu mobilne faze u početnoj točki gradijenta i čime je postignut simetrični izgled svih

pikova u kromatogramu bez pojave taloženja analita. Vremena zadržavanja analita pod opisanim kromatografskim uvjetima prikazana su u **tablici 9**.

Tablica 9. Vremena zadržavanja analita pod opisanim kromatografskim uvjetima.

| Analit | <i>t_R</i>/min |
|---------------|---------------------------------|
| Fmoc-Ser | 11,27 |
| Fmoc-Glu | 12,04 |
| Fmoc-OH | 13,51 |
| Fmoc-Phe | 15,43 |
| Fmoc-Cl | 17,13 |
| Fmoc-Ad | 19,46 |

4.3. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju glutaminske kiseline s Fmoc-Cl

Za derivatizaciju aminokiselina korišten je reagens Fmoc-Cl. U reakciji s aminokiselinama nastaju Fmoc-derivati koji su manje polarni od aminokiselina i zadržavaju se na kromatografskoj koloni u uvjetima kromatografije obrnutih faza. Osim toga, Fmoc-derivati mogu se za razliku od većine aminokiselina pratiti UV detektorom. Optimiranje uvjeta za djelotvornu derivatizaciju uključivalo je odabir otapala za derivatizaciju i omjera pojedinih otapala pri kojem neće doći do taloženja dodatkom bilo kojeg reagensa, odabir pufera i određivanje optimalne vrijednosti pH, ispitivanje stabilnosti reagensa u puferским otopinama, odabir optimalne količine dodatka Fmoc-Cl te optimiranje vremena derivatizacije. Isto tako, ispitano je i korištenje 1-aminoadamantan hidroklorida za uklanjanje suviška reagensa Fmoc-Cl.

4.3.1. Smjesa otapala za derivatizaciju i stabilnost derivatizacijskog reagensa

Derivatizacijska reakcija aminokiselina s Fmoc-Cl provodi se u lužnatim reakcijskim uvjetima. Aminokiseline se najčešće određuju u vodenim uzorcima, topljive su u vodi i u derivatizacijsku reakciju obično se dodaju otopljene u vodi. S druge pak strane, derivatizacijski reagens je loše topljiv u vodi, dobro topljiv u acetonitrilu, stoga je prije svega trebalo naći optimalni sastav

otapala za pripravu modelnih otopina. Odabrano je da ukupni volumen modelne otopine za derivatizacijsku reakciju bude 2 mL.

Fmoc-Cl hidrolizira na Fmoc-OH već u vodi, stupanj hidrolize je veći pri višim vrijednostima pH.⁴² Fmoc-Cl ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) razrijeđenjem u vodi (modelna otopina 2) taloži i nije injektiran u uređaj HPLC. Razrijeđenjem Fmoc-Cl ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) u 30% ACN taloženja nema. U modelnoj otopini 1 u kojoj je Fmoc-Cl ($\gamma=10 \text{ mg mL}^{-1}$) razrijeđen ACN do ukupnog volumena od 2 mL osim signala Fmoc-Cl javlja se i signal Fmoc-OH što znači da do hidrolize dolazi tijekom kromatografske analize zbog prisutstva vode u mobilnoj fazi, no odazivi Fmoc-Cl su ponovljivi stajanjem uzorka na sobnoj temperaturi kroz 2 sata (**Tablica 10.**)

Tablica 10. Odziv detektora za Fmoc-Cl i Fmoc-OH u modelnoj otopini 1.

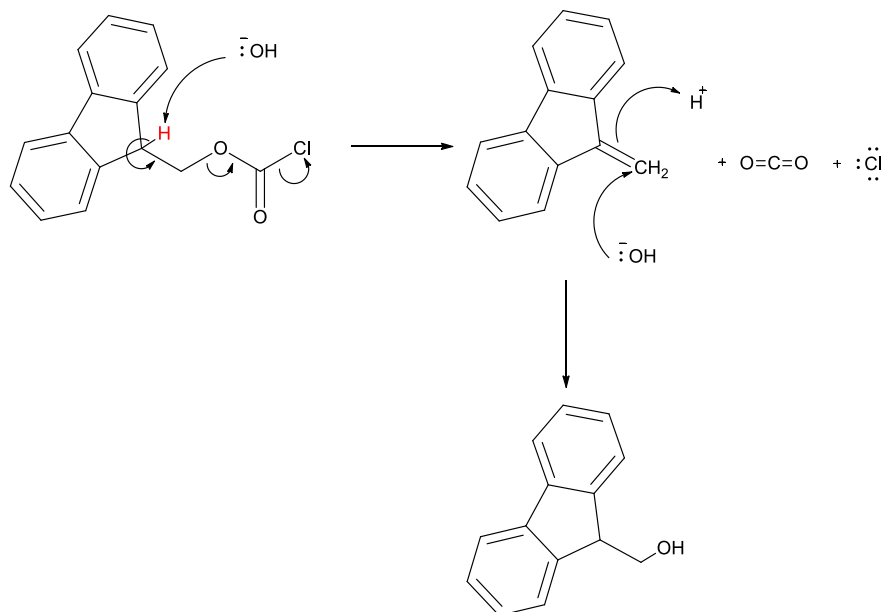
| Vrijeme/min | Odziv detektora/mAu | Odziv detektora/mAu |
|-------------|---------------------|---------------------|
| | Fmoc-Cl | Fmoc-OH |
| 0 | $4,14 \cdot 10^7$ | $1,48 \cdot 10^7$ |
| 120 | $4,18 \cdot 10^7$ | $1,52 \cdot 10^7$ |

Vrijednost pH pufera uvelike je utjecala na stabilnost derivatizacijskog reagensa pri manjoj i višoj masenoj koncentraciji Fmoc-Cl (modelna otopina 3 i 4). Korištenjem $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ boratnog pufera vrijednosti pH=10,2 većina derivatizacijskog reagensa hidrolizira na Fmoc-OH što je navedeno u **tablici 11.**

Tablica 11. Odzivi detektora za Fmoc-Cl i Fmoc-OH u modelnim otopinama 3 i 4.

| | Odziv detektora/mAu | Odziv detektora/mAu |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Fmoc-Cl | Fmoc-OH |
| Modelna otopina 3, pH=10,2 | $3,22 \cdot 10^7$ | $3,34 \cdot 10^7$ |
| Modelna otopina 4, pH=8,1 | $4,22 \cdot 10^7$ | $2,21 \cdot 10^7$ |

Stoga je za derivatizacijske reakcije odabran $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ boratni pufer vrijednosti pH=8,1 kod kojeg je hidroliza manje izražena. Mehanizam hidrolize Fmoc-Cl prikazan je na slici 12.



Slika 12. Mehanizam hidrolize Fmoc-Cl u lužnatom mediju.

Derivatizacijske reakcije su u daljnjem radu provedene u sastavu otapala koje čini 57,5 % vode (od toga je dodatak pufera 2 30 %) i 42,5 % ACN (što uključuje dodatak Fmoc-Cl otopljenog u ACN). Signala slijepe probe otapala za derivatizaciju nije bilo i Fmoc-Cl se nije prenosio u sljedeću kromatografsku analizu.

4.3.2. Optimiranje dodatka derivatizacijskog reagensa i vremena derivatizacije

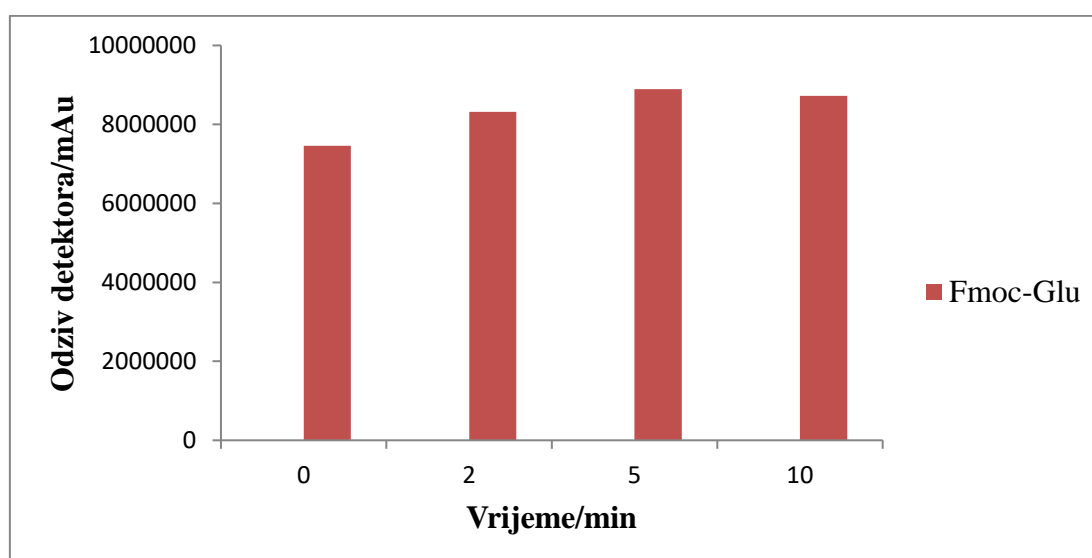
Kako Fmoc-Cl hidrolizira već u vodi, a u lužnatim reakcijskim uvjetima još više, u derivatizacijsku reakciju mora biti dodan u velikom suvišku³⁸ s obzirom na dodatak aminokiseline, kako bi osigurali da je množina nastale Fmoc-aminokiseline ekvimolarna množini dodane aminokiseline. Kako bi se ispitao optimalni dodatak derivatizacijskog reagensa, pripravljene su modelne otopine 5 i 6 u kojima su dodane dvije različite masene koncentracije Fmoc-Cl (5 mg mL^{-1} i 10 mg mL^{-1}) za derivatizaciju poznate množine glutaminske kiseline. U modelnoj otopini 5 dodano je 12 molarnih ekvivalenata, odnosno u modelnoj otopini 6 dodano je 24 ekvivalenata Fmoc-Cl više u odnosu na glutaminsku kiselinu. Nakon 5 minuta miješanja na sobnoj temperaturi, reakcija je zaustavljena dodatkom 1,7 ekvivalenata (u odnosu na Fmoc-Cl) 1-aminoadamantan hidroklorida u smjesi ACN/ H_2O . Aminoadamantan reagira sa neizreagiranim Fmoc-Cl u nekoliko minuta i nastaje nepolarni Fmoc-Ad koji se u modelnoj otopini eluira na kraju kromatografske analize. Na taj način se

spriječava prekrivanje velikog signala Fmoc-Cl u dijelu kromatograma gdje se eluiraju Fmoc-aminokiseline. Osim toga, zamijećeno je da su kromatogrami čišći, odnosno pretpostavlja se da dodatak 1-aminoadamantana sprečava dodatni raspad Fmoc-Cl. UV detektor ne detektira 1-aminodamantan hidroklorid s obzirom da isti nema kromoforu. Fmoc-Ad taloži u modelnoj otopini te se prije injektiranja uklanja filtracijom. U tako pripremljenim otopinama odziv nastale Fmoc-Glu bio je otprilike podjednak (**tablica 12**), stoga je odlučeno da se derivatizacija provodi sa 12 molarnih ekvivalenata derivatizacijskog reagensa više u odnosu na aminokiselinu.

Tablica 12. Odziv detektora Fmoc-Glu modelnih otopina 5 i 6.

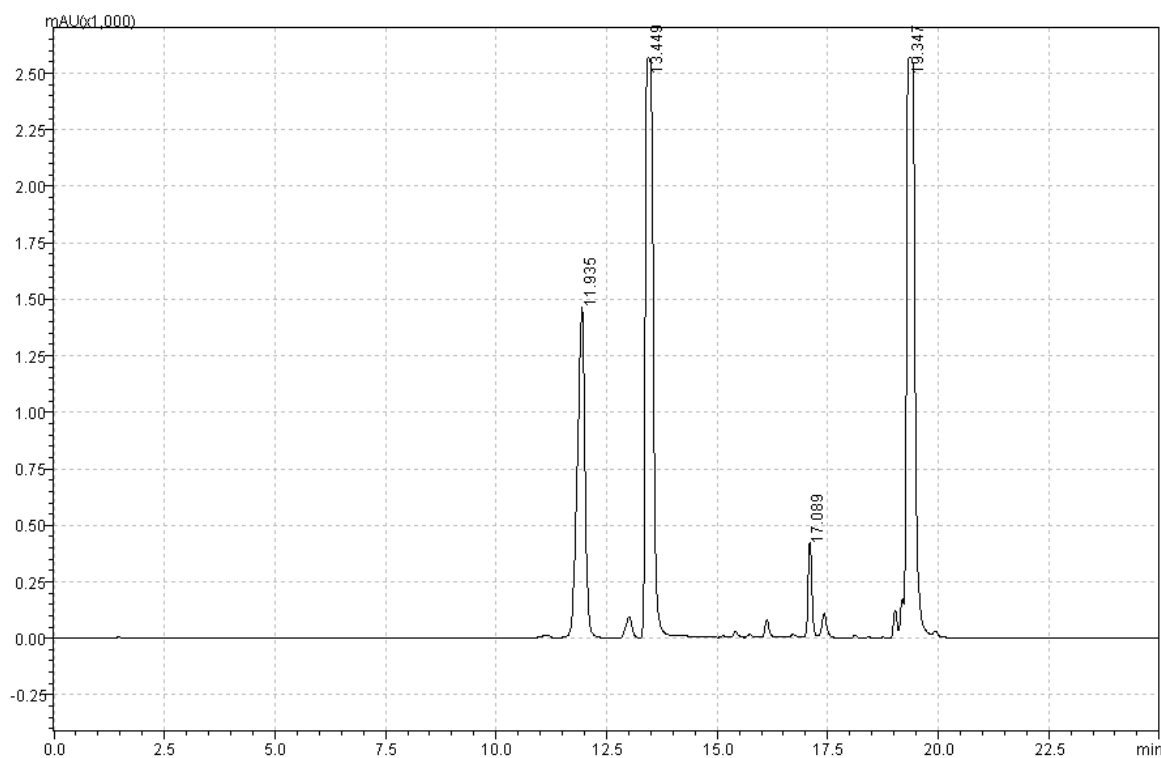
| | Odziv detektora/mAu Fmoc-Glu |
|--------------------------|------------------------------|
| Modelna otopina 5 | $9,02 \cdot 10^6$ |
| Modelna otopina 6 | $8,89 \cdot 10^6$ |

Optimalno vrijeme derivatizacije ispitano je na modelnim otopinama 7, 8, 9 i 10 korištenjem 12 ekvivalenata derivatizacijskog reagensa u suvišku u odnosu na glutaminsku kiselinu. Reakcija je u pojedinim modelnim otopinama zaustavljena dodatkom 1-aminoadamantan hidroklorida odmah nakon dodatka Fmoc-Cl nakon 2, 5, odnosno 10 minuta. Prinos derivatizacijske reakcije bio je najveći nakon 5 minuta što je vidljivo na slici 13.



Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti prinosa Fmoc-Glu o vremenu kod modelnih otopina 7, 8, 9 i 10.

Reakcija derivatizacije daje najveći prinos kada se koristi 12 ekvivalenata derivatizacijskog reagensa više u odnosu na aminokiselinu u otapalu koje čini 57,5 % vode (od toga je dodatak boratnog pufera 30 %) i 42,5 % ACN miješanjem na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Kromatogram tako pripremljenog uzorka prikazan je na **slici 14**, na x osi kromatograma je prikazano vrijeme u minutama, a na y osi apsorbancija u mAu.

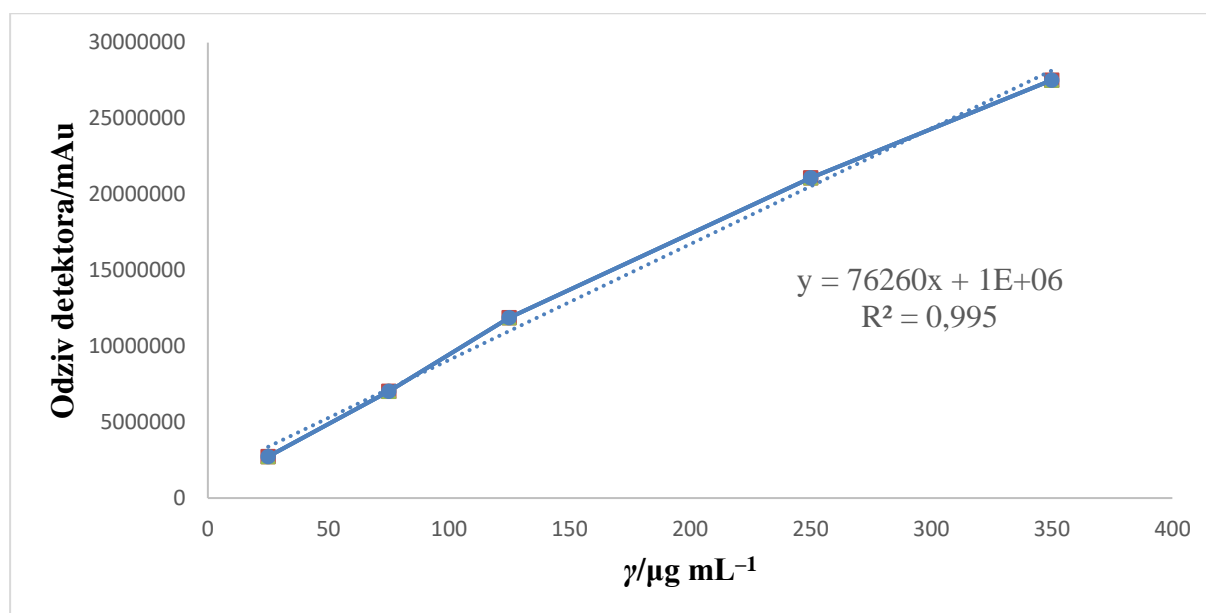


Slika 14. Kromatogram modelne otopine 9 na kojoj su optimirani uvjeti za derivatizaciju glutaminske kiseline (t_R Fmoc-Glu 11,9 min, t_R Fmoc-OH 13,4 min, t_R Fmoc-Cl 17,1 min, t_R Fmoc-Ad 19,3 min).

4.3.3. Ekvimolarnost derivatizacijske reakcije

Derivatizacijska reakcija smatra se učinkovitom ako je kvantitativna ili ekvimolarna, odnosno ako je broj molova analita koji se derivatizira jednak broju molova nastalog derivata. Kako bi utvrdili da je optimirana derivatizacijska reakcija glutaminske kiseline kvantitativna, pripremljena je serija kalibracijskih otopina Fmoc-Glu pripremljenih u istom sastavu otapala u kojem su se pripremale modelne otopine u koncentracijama od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kalibracijske otopine bile su stabilne u hladnjaku tijekom 24 h. Kalibracijski pravac konstruiran je za Fmoc-

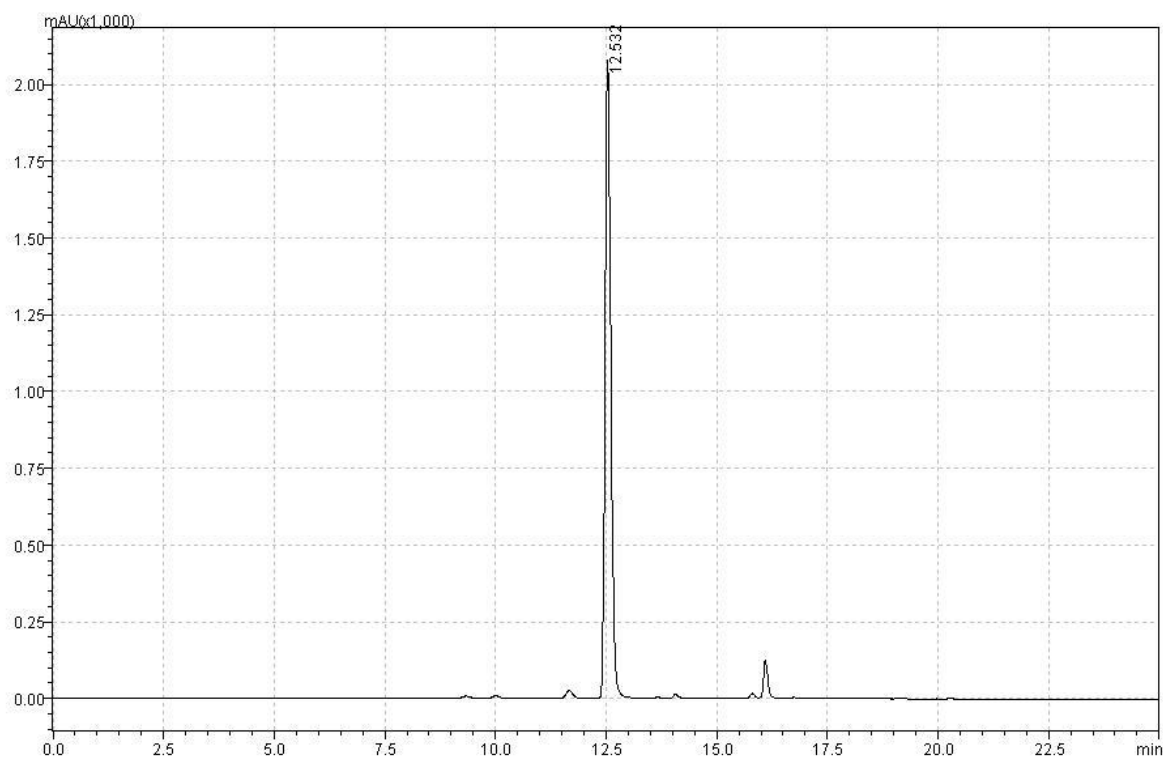
Glu kao ovisnost površine ispod kromatografskog pika Fmoc-Glu i masene koncentracije iste (slika 15).



Slika 15. Ovisnost masenih koncentracija kalibracijskih otopina Fmoc-Glu i njihovih površina.

Iz kalibracijskog pravca je određena jednadžba pravca iz koje je vidljiv nagib i odsječak na y-osi. Također je određen i koeficijent korelacije, 0,995 te se na temelju rezultata može zaključiti zadovoljavajuća linearnost u rasponu od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Iz jednadžbe pravca serije kalibracijskih otopina Fmoc-Glu dobivena je masena koncentracija $\gamma=97,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ iz koje je izračunata masa nastalog produkta. Preko izračunate mase i poznate molarne mase Fmoc-Glu, dobivena je množina produkta $n(\text{Fmoc-Glu})=0,0011 \text{ mmol mol}$, što odgovara početnoj množini aminokiseline, odnosno ekvimolarno je dodanoj množini reaktanta za derivatizaciju, $n(\text{Glu})=0,0010 \text{ mmol}$.



Slika 16. Kromatogram kalibranta Fmoc-Glu (t_R 12,5 min) $\gamma=250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

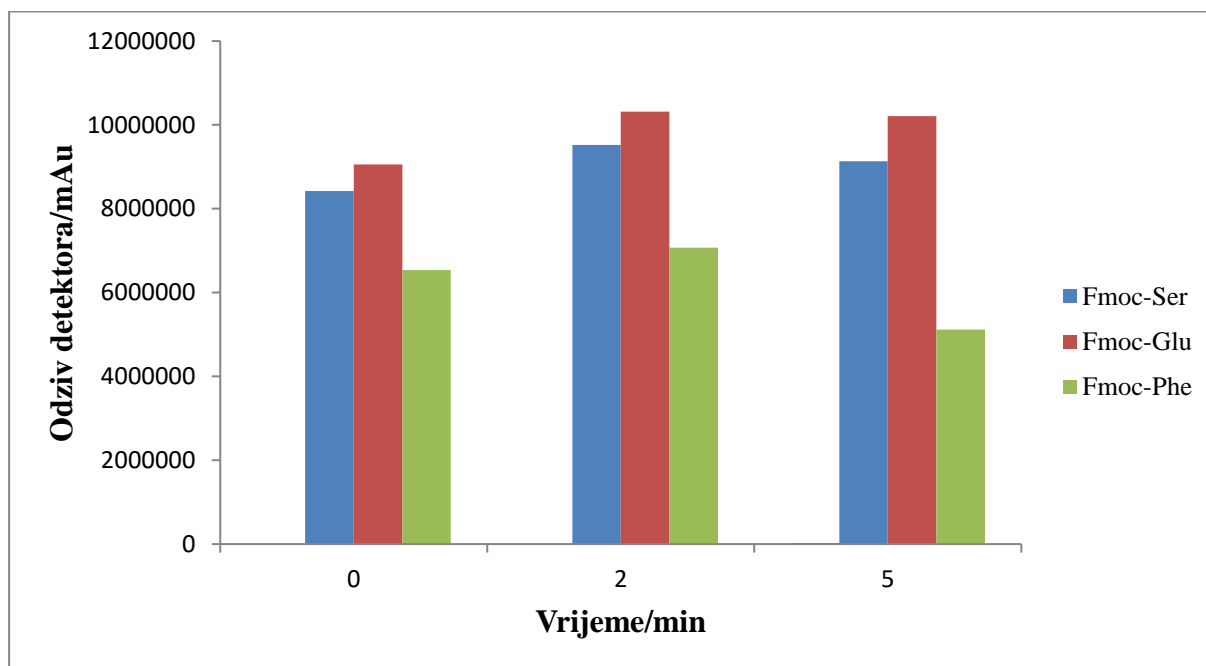
4.4. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju aminokiselina u smjesi

Na glutaminskoj kiselini optimirani su uvjeti za njenu derivatizaciju s Fmoc-Cl. Kako bi se ispitalo vrijede li isti uvjeti za derivatizaciju smjese aminokiselina, u modelnu otopinu su osim glutaminske kiseline dodani i serin kao polarnija aminokiselina, te fenilalanin kao nepolarnija aminokiselina u odnosu na glutaminsku kiselinu. Ukupni volumen modelnih otopina bio je 2 mL. Svaka aminokiselina dodana je u modelnu otopinu u množini $n=0,001$ mmol. Kada se derivatizacijski reagens dodavao u množini 12 puta većoj u odnosu na poznati dodatak pojedine aminokiseline, masena koncentracija Fmoc-Cl bila je prevelika i Fmoc-Cl je taložio u modelnim otopinama čiji je većinski udio voda. Stoga je Fmoc-Cl dodavan u modelne otopine u množini $n=0,024$ mmol. Množina dodanog 1-aminoadamantan hidroklorida za zaustavljanje derivatizacijske reakcije iznosila je $n=0,04$ mmol. Tako su pripravljene modelne otopine 11, 12, 13 u kojima je mijenjano vrijeme derivatizacijske reakcije. Modelna otopina 11 injektirana je u uređaj HPLC odmah po dodatku Fmoc-Cl, modelna otopina 12 nakon 2 minute, a modelna otopina 13 nakon 5 minuta iza dodatka Fmoc-Cl.

Prinosi derivata aminokiselina u prethodno opisanim pripremljenim modelnim otopinama prikazani su u **tablici 13**.

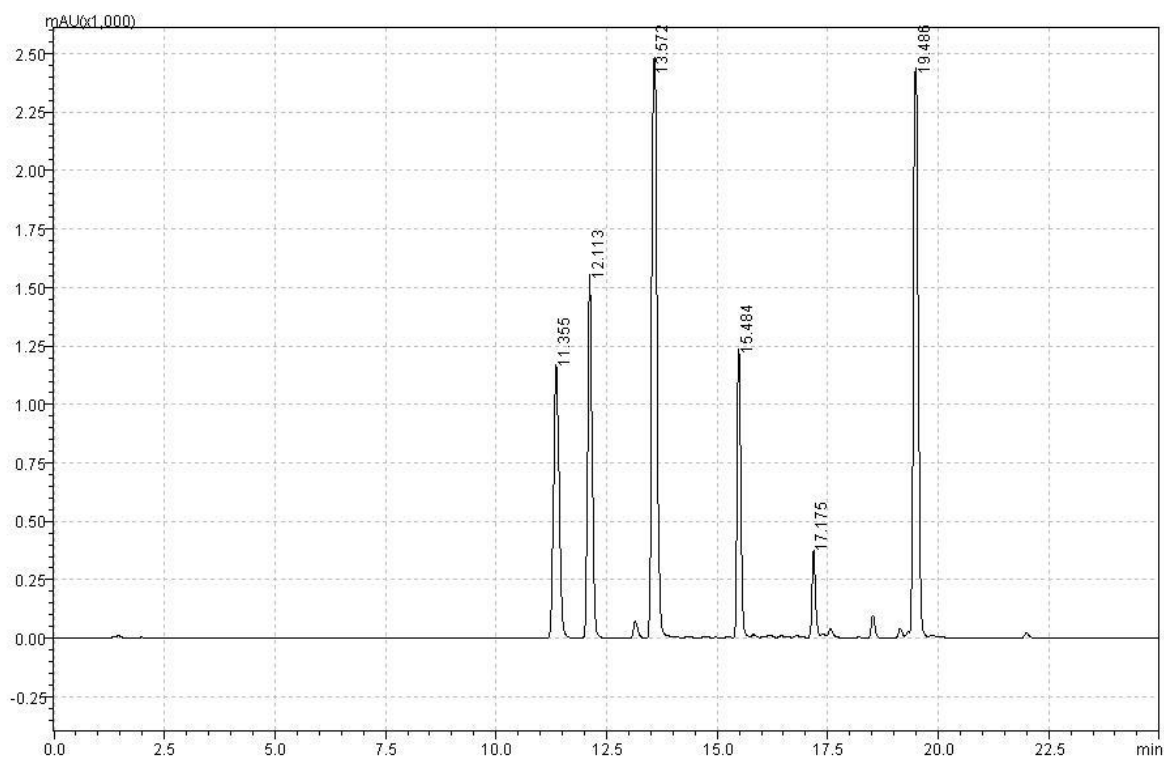
Tablica 13. Odzivi površina za aminokiselinske derivate u modelnim otopinama 11, 12 i 13.

| Odziv detektora/mAu | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Vrijeme/min | Fmoc-Ser | Fmoc-Glu | Fmoc-Phe |
| 0 | $8,42 \cdot 10^6$ | $9,06 \cdot 10^6$ | $6,54 \cdot 10^6$ |
| 2 | $9,52 \cdot 10^6$ | $10,32 \cdot 10^6$ | $7,07 \cdot 10^6$ |
| 5 | $9,13 \cdot 10^6$ | $10,21 \cdot 10^6$ | $5,12 \cdot 10^6$ |



Slika 17. Grafički prikaz prinosa derivata aminokiselina u ovisnosti o vremenu kod modelnih otopina 11, 12 i 13.

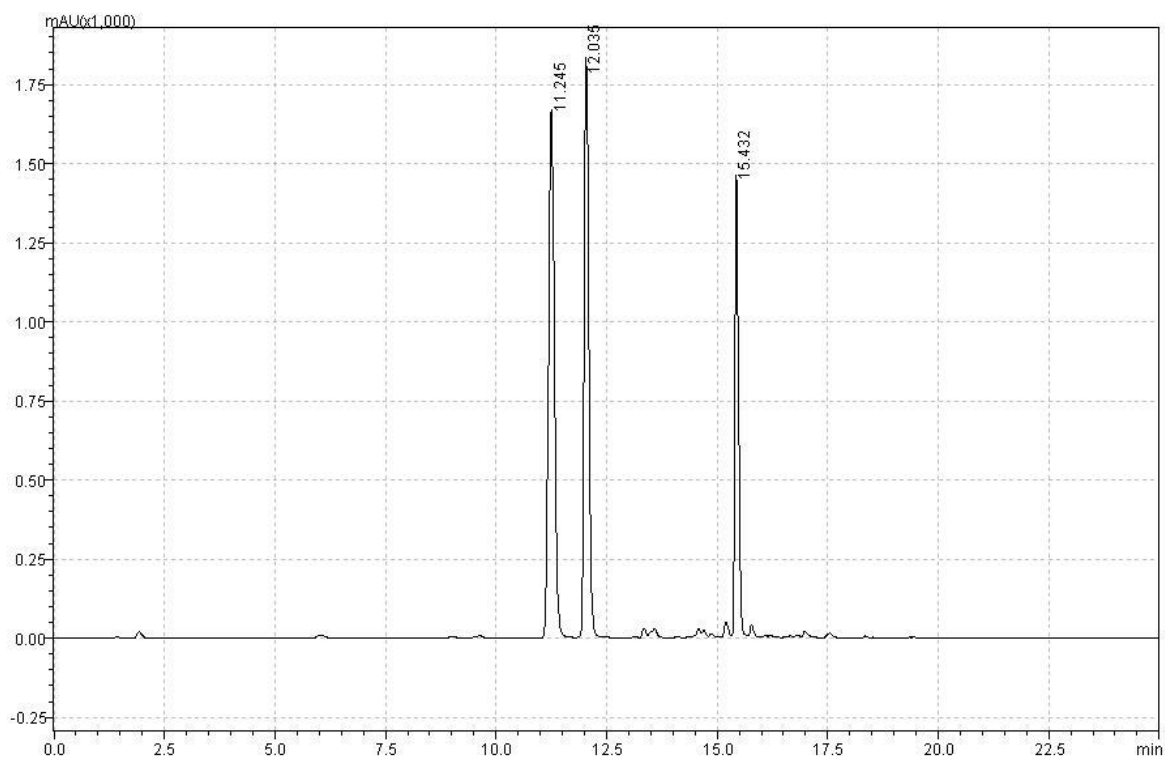
Prinos Fmoc derivata bio je najveći u modelnoj otopini 12 u kojoj je derivatizacijska reakcija zaustavljena 2 minute nakon dodatka Fmoc-Cl. Kromatogram modelne otopine 12 je prikazan na slici 18.



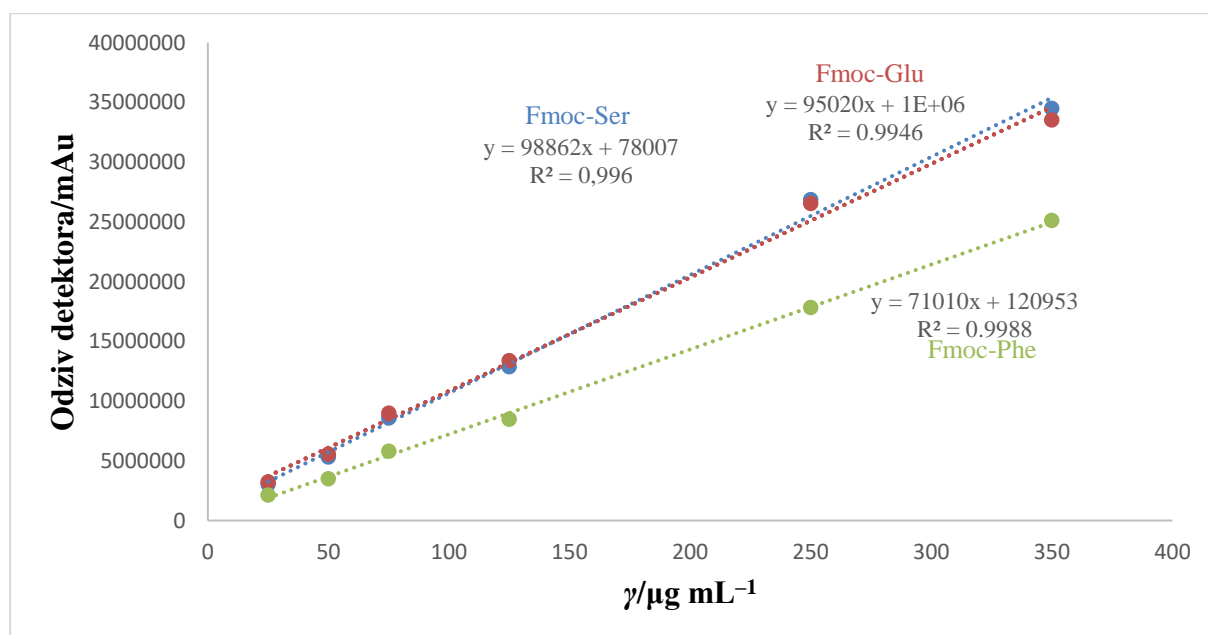
Slika 18. Kromatogram modelne otopine 12 (t_R Fmoc-Ser 11,4 min, t_R Fmoc-Glu 12,1 min, t_R Fmoc-OH 13,6 min, t_R Fmoc-Phe 15,5 min, t_R Fmoc-Cl 17,2 min, t_R Fmoc-Ad 19,5 min).

4.4.1. Ekvimolarnost derivatizacijske reakcije smjese aminokiselina

Kako bi utvrdili da je optimirana derivatizacijska reakcija smjese aminokiselina kvantitativna, pripremljena je serija kalibracijskih otopina Fmoc-Ser, Fmoc-Glu i Fmoc-Phe, pripremljenih u istom sastavu otapala u kojem su se pripremale modelne otopine u koncentracijama od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kalibracijske otopine bile su stabilne čuvanjem u hladnjaku tijekom 24 h. Kalibracijski pravac konstruiran je za svaki pojedini analit kao ovisnost površine ispod kromatografskog pika pojedinog analita i masene koncentracije istog. Postignuta je linearnost svih triju serija uzorka u određenom koncentracijskom rasponu te je iz pojedinih kalibracijskih pravaca izračunat korelacijski faktor za svaki kalibrant u smjesi kako je prikazano na slici 20. Iz kalibracijskog pravca je određena jednadžba pravca iz koje je vidljiv nagib i odsječak na y-osi. Također je određen i koeficijent korelacije za pojedini analit i može se zaključiti da je linearnost u rasponu od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zadovoljavajuća za daljnju analizu.



Slika 19. Kromatogram kalibranta smjese aminokiselina (t_R Fmoc-Ser 11,2 min, t_R Fmoc-Glu 12,0 min, t_R Fmoc-Phe 15,4 min), $\gamma=250 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 20. Kalibracija Fmoc-aminokiselinskih derivata u smjesi.

Iz jednadžbe pravca serije kalibracijskih otopina Fmoc-Ser, Fmoc-Glu i Fmoc-Phe izračunata je masena koncentracija pojedinih Fmoc-aminokiselina i prikazana u **tablici 15**.

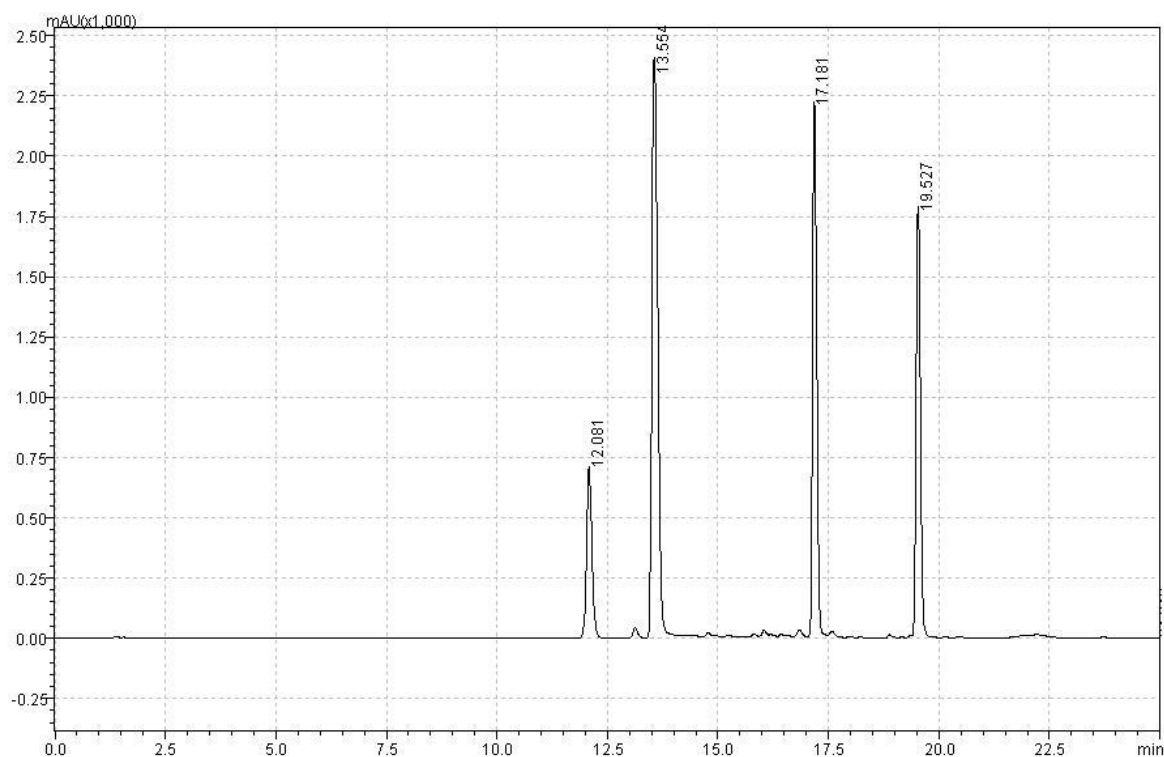
Tablica 15. Masene koncentracije pojedinih Fmoc-aminokiselina.

| Fmoc-aminokiselina | $\gamma/\mu\text{g mL}^{-1}$ | n/mmol |
|--------------------|------------------------------|--------|
| Fmoc-Ser | 88,62 | 0,0011 |
| Fmoc-Glu | 94,74 | 0,0010 |
| Fmo-Phe | 97,92 | 0,0010 |

Iz masenih koncentracija pojedinih Fmoc-aminokiselina iz modalne otopine 12 izračunate su mase istih. Preko izračunate mase i poznate molarne mase svake Fmoc-aminokiseline, dobivena je množina svake Fmoc-aminokiseline. Množine su prikazane u **tablici 15**. Dobivene množine Fmoc-aminokiselina odgovaraju početnoj množini pojedine aminokiseline, odnosno postignuta je ekvimolarnost prema početnim množina aminokiselina za derivatizaciju koja je iznosila 0,001 mmol.

4.5. Određivanje sadržaja Na-glutamata u dodacima jelima

Korištenom metodom određena je množina Na-glutamata u dodacima jelima koja je potom uspoređena s deklariranom vrijednosti. Dodaci jelima nabavljeni su od dva različita proizvođača. Svaki uzorak je osušen u sušioniku kako bi se uklonili ostaci vlage, a Na-glutamat potom je ekstrahiran otapanjem uzorka u vodi. Svaki uzorak pripremljen je u dva replikanta. Alikvot ekstrakta derivatiziran je po optimiranom protokolu za smjesu aminokiselina, s većom množinom Fmoc-Cl ($n=0,024$ mmol) s obzirom da možemo pretpostaviti da uzorak sadrži i neke druge amine koje Fmoc-Cl može derivatizirati. Derivatizacija je za svaki uzorak bila prekinuta nakon 2 minute, dodatkom 1-aminoadamantan hidroklorida, a profiltrirani uzorak injektiran u uređaj HPLC pod istim uvjetima kao i modelne otopine. Iz kromatograma (slika 21) je očitana površina dobivenog Fmoc-derivata.



Slika 21. Kromatogram jednog od derivatiziranih uzoraka za određivanje Na-glutamata u dodatku jelima. (t_R Fmoc-Glu 12,1 min, t_R Fmoc-OH 13,6 min, t_R Fmoc-Cl 17,2 min, t_R Fmoc-Ad 19,5 min)

Dobivena masena koncentracija Fmoc-Glu iz uzorka je izračunata uvrštavanjem vrijednosti površine kromatografskog pika u baždarni pravac kalibracijske serije za Fmoc-Glu i iznosila je $\gamma(\text{Fmoc-Glu})=73,29 \mu\text{g mL}^{-1}$. Iz omjera ukupnog volumena smjese i alikvota i masenih koncentracija, dobivena je masena koncentracija Na-Glu $\gamma(\text{Na-Glu})=1,34 \text{ mg mL}^{-1}$ što znači da uzorak sadrži 13,4 % Na-glutamata što odgovara udjelu kojeg navodi (deklarira) proizvođač (15 %). Drugi proizvođač nema deklarirani sadržaj Na-glutamata, a dobivena masena koncentracija bila je $\gamma(\text{Fmoc-Glu})=6,73 \mu\text{g mL}^{-1}$. Kao i za prvog proizvođača izračunata je masena koncentracija Na-Glu $\gamma(\text{Na-Glu})=0,12 \text{ mg mL}^{-1}$. Uzorak sadrži 1,2 % Na-glutamata.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu razrađena je metoda HPLC za određivanje aminokiselina uz detekciju ultraljubičastim zračenjem, a za derivatizaciju aminokiselina korišten Fmoc-Cl. Osim sinteze standardnih spojeva i optimiranje kromatografskih uvjeta za analizu Fmoc-derivata aminokiselina, u ovom radu su optimirani uvjeti za postizanje kvantitativnosti derivatizacijske reakcije (ekvimolarnost nastalog produkta s poznatim dodatkom aminokiseline) kroz dvije serije modelnih otopina. U prvoj seriji na derivatizaciji glutaminske kiseline optimirani su derivatizacijski uvjeti uz poznati dodatak glutaminske kiseline (optimalni suvišak derivatizacijskog reagensa, vrijeme derivatizacije, stabilnosti nastalih derivata, optimalni pH reakcijske smjese, dodatak 1-aminoadamantana hidroklorida koji se dodaje za uklanjanje suviška Fmoc-Cl). Kroz drugu seriju modelnih otopina ispitana je derivatizacija aminokiselina u smjesi gdje su osim glutaminske kiseline u smjesu dodani i serin kao polarnija, te fenilalanin kao nepolarnija aminokiselina u odnosu na glutaminsku kiselinu. Razvijena metoda je podešena za istovremenu derivatizaciju smjese te tri aminokiseline prema njihovom poznatom dodatku. Za razvoj HPLC metode i derivatizaciju glutaminske kiseline:

1. Kod razvoja metode pri kromatografskoj analizi, najboljom stacionarnom fazom za razdvajanje ciljanih analita pokazala se analitička kolona Zorbax C₁₈, dok je kao mobilna faza korištena smjesa eluensa A (smjesa Mili Q vode i mravlje kiseline (1000:1 v/v), i eluensa B (ACN) pri čemu je postignuto optimalno razdvajanje svih analita prema definiranim kromatografskim uvjetima unutar 25 minuta pri sobnoj temperaturi.
2. Za derivatizacijsku reakciju Glu $\gamma=0,54 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljene u vodi je korišten Fmoc-Cl reagens $\gamma=5 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljen u ACN.
3. Derivatizacijske reakcije provedene su u sastavu otapala koje čini 57,5% vode (od toga je dodatak pufera 30%) i 42,5% ACN (što uključuje dodatak Fmoc-Cl otopljenog u ACN).
4. Pri većim vrijednostima pH pufera dolazi do izraženije hidrolize derivatizacijskog reagensa. Optimalni pH boratnog pufera ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) bio je 8,1.
5. Optimalna množina derivatizacijskog reagensa korištena za derivatizaciju Glu bila je 12 puta veća u odnosu na dodatak glutaminske kiseline.

6. Optimalno vrijeme trajanja derivatizacije glutaminske kiseline s Fmoc-Cl je 5 minuta.
7. Na temelju kalibracijskog pravca je određen koeficijent korelacije koji iznosi 0,995 što ukazuje na dobru linearnost u zadanom radnom području od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
8. Početna množina dodane Glu bila je 0,001 mmol, dok je konačna množina produkta izračunata iz kalibracijskog pravca i odnosi množina su ekvimolarni.
9. Korištenje 1-aminoadamantana hidroklorida za uklanjanje suviška Fmoc-Cl reagensa pokazalo se korisnim za uklanjanje signala Fmoc-Cl iz dijela kromatograma u kojem se eluiraju aminokiselinski Fmoc-derivati i zbog sprječavanja dodatnog raspada Fmoc-Cl.

Za derivatizaciju smjese aminokiselina:

1. Za derivatizaciju aminokiselina u smjesi ($n=0,001$ mmol Ser, Glu i Phe) korišten Fmoc-Cl $\gamma=10$ mg mL^{-1} pripremljen u ACN. Korišten je isti pufer pH=8,1.
2. Optimalno definirano vrijeme derivatizacije aminokiselina u smjesi je 2 minute.
3. Optimalna množina dodanog Fmoc-Cl za derivatizaciju bila je 0,024 mmol. Pripremljene su kalibracijske otopine svake aminokiseline u smjesi u rasponu od 25 do 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te su pojedini korelacijski faktori za svaku kalibracijsku seriju bili zadovoljavajući.
4. Konačne množine za Fmoc-Ser, Fmoc-Glu i Fmoc-Phe bile su redom 0,0011 0,0010 i 0,0010 mmol što upućuje na to da je uspostavljen ekvimolarni odnos s početnom množinom od 0,001 mmol za Ser, Glu i Phe.

Metoda je primijenjena i na realne uzorke. Ispitan je sadržaj Na-glutamata u dodatcima jelima dva različita proizvođača. Sadržaj natrijevog glutamata i nađeni udio glutaminske kiseline dobiven ovom metodom odgovara masenom udjelu deklariranom na pakiranju (1,2 % i 13,4 %).

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN - acetonitril

Ad - 1-aminoadamantan hidroklorid

DAD - detektor diodnih zraka

ECF - etil kloroformat

EtOAc - etil acetat

FA - mravlja kiselina

FAA - trifluoroacetilacetona

FID - plamenoionizacijski detektor

Fmoc-Ad - *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-1-adamantan

Fmoc-Cl - 9-fluorenilmetil klorformijat

Fmoc-Glu - *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-*L*-glutaminska kiselina

Fmoc-OH- 9-fluorenilmetanol

Fmoc-Phe - *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-*L*-fenilalanin

Fmoc-Ser - *N*-(fluorenilmetoksikarbonil)-*L*-serin

GC - plinska kromatografija

GC-FID - plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom

GC-MS - plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

GC-TOF-MS - plinska kromatografija-detektor vremena leta-spektrometrija masa

H₂O - voda

H₃BO₃ - borna kiselina

HPLC - visokotlačna tekućinska kromatografija

HPLC-UV - visokotlačna tekućinska kromatografija uz ultraljubičastu detekciju

K₂CO₃ - kalijev karbonat

KCl - kalijev klorid

MS - masena spektrometrija

Na₂SO₄ - natrijev sulfat

NaCl - natrijev klorid

NaOH - natrijev hidroksid

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

OPA - *o*-ftaldialdehid

Phe - fenilalanin

PITC - fenilizotiocijanat

RP-LC/UV - tekućinska kromatografija obrnutih faza s ultraljubičastom detekcijom

Ser - serin

TOF-MS - detektor vremena leta-masena spektrometrija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2002.
2. *Amino Acid Analysis of Food and Feedstuffs*, Biochrom, Cambridge.
3. W. W. Fish, *Food Nutri. Sci.* **3** (2012) 863–871.
4. Y. Ding, Ho. Yu, S. Mou, *J. Chromatogr. A* **982** (2002) 237–244.
5. H. Yoshida, M. Terashima, Y. Takahashi, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 1090–1094.
6. E. Curis, I. Nicolis, C. Moinard, S. Osowska, N. Zerrouk, S. Benazeth, L. Cynober, *Amino Acids* **29** (2005) 177–205.
7. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4355560_EN.htm
(datum pristupa 7.1.2020.)
8. S. Yamaguchi, K. Ninomiya, *J. Nutr.* **130** (2000) 921–926.
9. S. Yamamoto, M. Tomoe, K. Toyama, M. Kawai, H. Uneyama, *Am. J. Clin. Nutr.* **90** (2009) 844–849.
10. T. Luo, Y. Dong, S. He, J. Yang, Y. Dong, *Electrophoresis* **39** (2018) 1410–1416.
11. H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P. J. Oefner, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 445–452.
12. F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley & Sons, Chichester, 2004, str. 145–161.
13. G. del Campo, J. Zuriarrain, A. Zuriarrain, I. Berregi, *Food Chem.* **196** (2016) 1031–1039.
14. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, David Harris, Belmont, 2007, str. 761–785.
15. F. Settle, *Handbook Of Instrumental Techniques For Analytical Chemistry*, Prentice Hall, New Jersey, 1997, str. 125–143.
16. M. Y. Khuhawar, S. A. Majidano, *Chromatographia* **63** (2011) 701–708.
17. Michael Guilhaus, *J. Mass Spectrom.* **30** (1995) 1519–1532.
18. G. Noctor, G. Bergot, C. Mauve, D. Thominet, C. Lelarge-Trouverie, J. L. Prioul, *Metabolomics* **3** (2007) 2.
19. S. D. Sarker, L. Nahar, *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, Elsevier, Amsterdam, 2015, str. 405–425.
20. I. R. Dean, *Extraction techniques in analytical sciences*, Wiley, Newcastle, 2009.

21. <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
(datum pristupa 26.9.2020.)
22. L. Slobodianiuk, L. Budniak, S. Marchyshyn, A. Sinichenko, O. Demydiak, *Biointerface Research In App. Chem.* **11** (2021) 8969–8977.
23. M. Arvapally, A. Asati, N. K. Nagendla, M. K. R. Mudiam, *Food Chem.* **341** (2020) 128173.
24. A. M. Ismail, M. S. A. Sani, A. Azid, N. N. M. Zaki, S. Arshad, N. A. Tukiran, S. A. S. Z. Abidin, M. S. Samsudin, A. Ismail, *SN Appl. Sci.* **3**, 79 (2021)
25. E. Kirkan, C. Aydogan, *Chromatographia* (2021) <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03991-z>
26. M. Vogel, A. Büldt, U. Karst, *Fresen. J. Anal. Chem.* **366** (2000) 781–791.
27. C. Lennard, *Fingerprint Techniques*, Elsevier, Canberra, 2005, str. 414–423.
28. K. S. Lei, D. G. Drescher, *Int. J. Biochem.* **9** (1978) 457–465.
29. D. Kutlan, I. Molnar–Perl, *J. Chromatogr. A* **987** (2003) 311–312.
30. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26922#/26922>
(datum pristupa 21.1.2020.)
31. P. Kwanyuen, J. W. Burton, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **87** (2010) 127–132.
32. P. Fürst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, P. Stehle, *J. Chromatogr. A* **499** (1990) 557–569.
33. G. Sarwar, H. G. Botting, *J. Chromatogr. A* **615** (1993)1–22.
34. R. L. Heinrikson, S. C. Meredith, *Anal. Biochem* **136** (1984) 65–74.
35. V. V. Sureshababu, N. Narendra, *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, str. 1–97.
36. A. Fabiani, A. Versari, G. P. Parpinello, M. Castellari, S. Galassi, *J. Chromatogr. Sci.* **40** (2002) 14–18.
37. J. Ziegler, S. Abel, *Amino Acids* **46** (2014) 2799–2808.
38. W. Li, N. M. O’Brien–Simpson, M. A. Hossain, J. D. Wade, *Aust. J. Chem.* **73** (2020) 271–276.
39. W. Zhou, X. Y. Zhanga, G. L. Duana, *J. Chin. Chem. Soc.* **58** (2011) 509–515.
40. R. Horanni, U. H. Engelhardt, *Food Compost. Anal.* **31** (2013) 94–100.
41. M. B. Gawande, P. S. Branco, *Green Chem.* **13** (2011) 3355.

42. A. Jámbor, Molnár-Perl I., *J. Chromatogr. A* **15** (2009) 3064–3077.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marin Belajević

Datum rođenja: 22. ožujka 1997.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

2003.-2011. Osnovna škola Vladimira Nazora, Mirkovci-Vinkovci

2011.-2015. Srednja škola Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015.-2018. Preddiplomski studij Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku-Odjel za kemiju, Osijek

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. 21. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2019. Simpozij studenata kemičara na Kemijskom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta u Zagrebu

2019. Internacionalna škola kromatografije na Fakultetu Kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu

