

## SCELTA DI UN METODO IN HPLC PER LA DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE AMINOACIDICA APPLICABILE A CAMPIONI LARVALI DI PICCOLI PELAGICI

Falco, F.<sup>1,2</sup> Stincone, <sup>1</sup>P. Cuttitta, A<sup>1</sup> Cammarata, M<sup>2</sup>. Torri, M.<sup>1,2</sup>. Maneiro, I<sup>1</sup>. Armeri, G.M.<sup>1</sup> De Luca, B<sup>1</sup>. Patti, C<sup>1</sup>. Bennici, C<sup>1</sup>. and Mazzola, S.<sup>1</sup>



1-Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del consiglio Nazionale delle ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3-91021, (Torretta Granitola, Tp), Italia;

2-Università degli Studi di Palermo, Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, via Archirafi 18, 90123 Palermo (Pa).

## Sommario

Abstract .....	3
Introduzione sugli aminoacidi .....	4
Aminoacidi macromolecole organiche .....	4
Determinazione in HPLC .....	6
Materiali e metodi .....	11
Il sistema HPLC .....	11
Il Protocollo .....	11
Metodo 1.....	12
Metodo 2.....	14
Risultati .....	16
Conclusione .....	18
Ringraziamenti .....	19
Bibliografia .....	20

## Abstract

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto una metodologia per la determinazione degli aminoacidi, con una sensibilità tale da essere applicabile anche per la determinazione di queste molecole biochimiche nei tessuti larvali dei piccoli pelagici.

Al fine di effettuare una buona valutazione tra i metodi riportati in letteratura, per la determinazione degli aminoacidi, è stata effettuata una ricerca bibliografica dei principali metodi riportandone vantaggi e svantaggi.

La scelta del metodologia è stata effettuata considerando la strumentazione in nostro possesso, i tempi e i costi di gestione, nonché la sensibilità del metodo, la versatilità e la riproducibilità del dato. Inoltre, per verificare l'applicabilità del metodo ai campioni di piccoli pelagici, sono stati preparati degli standard a concentrazione nota verificandone la sensibilità.

Il protocollo previsto nel metodo è stato modificato secondo le nostre esigenze e successivamente applicato alla matrice di nostro interesse verificandone la validità.

Dal suddetto studio è emerso che la metodologia più idonea da utilizzare è risultata essere la tecnica cromatografica: HPLC-RP (High Performance Liquid Chromatography- Reverse Phase), che prevede come agente derivatizzante l'OPA (Orto-phthaldehyde) in pre-colonna, il rilevamento degli aminoacidi permesso attraverso l'uso di un detector a fluorescenza. In questo report sono stati riportati i dati ottenuti dal confronto di due metodi, apparentemente molto simili ma con una sensibilità applicativa diversa.

I metodi vengono di seguito elencati, verranno denominati rispettivamente metodo1 e metodo 2.

Metodo 1: Shimadzu New 3/2008;

metodo 2: Zhaolai *et al.*,2014;

Gli standard sono stati determinati con il metodo pubblicato nei quaderni applicativi della Shimadzu (Shimadzu New3/2008), e con il metodo di Zhaolai *et. al.*,2014.

Di seguito verranno riportati le differenze di profilo ottenute attraverso l'uso dei due metodi.

## Introduzione sugli aminoacidi

### Aminoacidi macromolecole organiche

Gli aminoacidi sono composti che contengono una funzione acida e una amminica. Generalmente con il termine aminoacidi si intendono gli alfa aminoacidi, tra i quali 20 sono definiti geneticamente codificati o proteino-genici, cioè quelli che attraverso le nostre applicazioni abbiamo tentato di determinare.

Gli aminoacidi sono dei composti polifunzionali organici appartenenti ad acidi carbossilici e nella struttura di un  $\alpha$ -amminoacido (Fig.1) riscontriamo la presenza di:

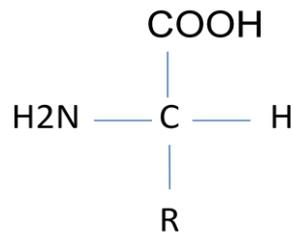


Figura 1: formula generale di un L-aminoacido

- un atomo di carbonio chirale (asimmetrico)
- un gruppo amminico  $-\text{NH}_2$
- il gruppo carbossilico  $-\text{COOH}$
- il residuo laterale (gruppo  $-\text{R}$ ), che è di natura eterogenea;

Nel caso in cui il gruppo laterale  $\text{R} = \text{H}$ , si ha la glicina, l'amminoacido più semplice; tale gruppo può essere, alifatico o aromatico più o meno complesso.

Sulla base del gruppo R gli aminoacidi possono essere suddivisi in gruppi fondamentali:

gruppi R alifatici: non polari: glicina, alanina, prolina, ramificati (valina, leucina, isoleucina);

gruppi R aromatici fenilalanina, tirosina, triptofano;

gruppi R polari non carichi: serina, treonina, solforati (cisteina, metionina), asparagina, glutammina;

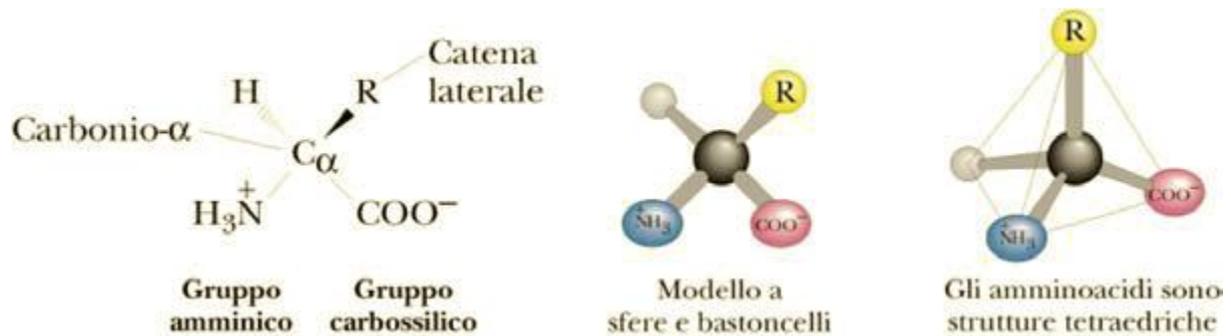
gruppi R carichi positivamente (con + di un gruppo amminico): lisina, arginina, istidina;

gruppi R carichi negativamente (con due gruppi carbossilici): aspartato, glutammato.

Gli aminoacidi possono unirsi attraverso legami peptidici per formare delle catene più o meno lunghe di molecole che prendono il nome di polipeptidi. I legami peptidici sono permessi dalla presenza di due gruppi chimici caratteristici, il gruppo amminico ed il gruppo carbossilico ( $\text{NH}_2^+$  e  $\text{COOH}$ ) che consentono la polimerizzazione. Questi due gruppi reagiscono in maniera testa coda perdendo una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$ , formando un legame carboamidico covalente. In realtà il legame carboaminico è un ibrido di risonanza che presenta un parziale

(~ 40%) carattere di doppio legame tra carbonio ed azoto. Di conseguenza l'azoto non ha il doppietto a sua disposizione per legami con  $H^+$  e non può accettare protoni e il legame C-N non può ruotare liberamente.

Il carbonio  $\alpha$  al quale questi gruppi sono legati è detto asimmetrico o chirale (Fig. 2). Tra gli aminoacidi naturali, eccetto la alanina, il carbonio  $\alpha$  è detto centro di simmetria ad esso generalmente sono legati 4 differenti gruppi. Il carbonio  $\alpha$  può assumere due diverse configurazioni che costituiscono due immagini speculari non sovrapponibili dette forme enantiomeriche D ed L, nomenclatura sviluppata da Fisher e determinata sulla base della D gliceraldeide (Fig.3). (Lepri e Cincinelli, 2010; Czerwenka e Lindner, 2005 ).



È stato trovato che la naturale composizione aminoacidica delle proteine è costituita da enantiomeri L e D (Fig. 3), che si trovano facilmente nelle piante, in cellule batteriche in e diversi antibiotici (Hasegawa *et al.*, 2011).

Figura 2: il Carbonio  $\alpha$  rappresenta il centro della struttura

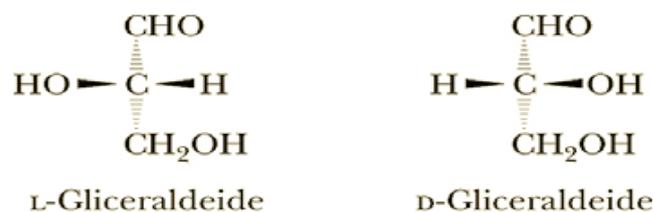


Figura3: forme enantiomeriche (D - L) di Gliceraldeide

Gli enantiomeri aminoacidici hanno identiche proprietà chimiche e fisiche, ma possiedono diverse attività biologiche. In generale, l'analisi dei peptidi si basa sulla determinazione della composizione aminoacidica in idrolizzati peptidici e si compone di due fasi: aminoacidi liberi e aminoacidi rilasciati attraverso idrolisi (Zahradnicková *et al.*, 2008).

Numerosi metodi analitici sono stati sviluppati per la separazione enantiomerica e la determinazione di peptidi e aminoacidi. Come riportato da Bączek e Radkowska (2007), la

scelta del metodo analitico per la risoluzione enantiomerica diretta di aminoacidi dipende principalmente dalla struttura chimica degli aminoacidi (es. lunghezza della catena peptidica, sequenza peptidica etc.) nonché dalle apparecchiature disponibili e dalla loro sensibilità nei confronti dell'analita (Martens e Bhushan, 1989). Esistono diverse tecniche per separare i singoli aminoacidi, si tratta per lo più di tecniche cromatografiche quali GC (gas cromatografia), TLC (cromatografia su strato) e HPLC (cromatografia ad alta prestazione) la complessità e le differenze metodologiche presenti all'interno di quest'ultima tecnica cromatografica, ne determinano la scelta.

L'evoluzione delle colonne, tecnologicamente complesse, la modifica delle fasi stazionarie e lo sviluppo dei moderni sistemi di HPLC-RP, avvenuti nell'ultima decennio, hanno dimostrato che questa tecnica risulta essere la più idonea alla separazione di singoli aminoacidi (Papadoyannis and Theodoridis, 2010; Silverman and Christenson, 1996; Matthew and van Holde, 1995).

### **Determinazione in HPLC**

Numerose pubblicazioni suggeriscono che le analisi HPLC per la determinazione di molecole aminoacidiche, possono essere migliorate dal processo di derivatizzazione, consentendo a queste molecole di essere rese visibili attraverso un gruppo fluorogeno che si forma grazie alla reazione con Orto -phthaldehyde (OPA) in presenza di 3 mercaptopropionico acido o del 2 mercaptoethanolo portando alla formazione di un derivato isoindole.

Con il termine **derivatizzazione** si indica quel processo chimico attraverso cui i gruppi funzionali di molecole vengono sostituiti da altri gruppi funzionali; la derivatizzazione in HPLC può essere effettuata attraverso reazioni **pre-colonna** o **post-colonna**.

I reagenti derivatizzanti sono divisi fondamentalmente in quattro gruppi.

- Reagenti non fluorescenti, usati in UV-VIS (benzoyl chlorides e sulfonylbenzene).
- Reagenti fluorogeni generalmente non fluorescenti, ma che reagiscono con bersagli di composti che formano molecole cicliche coniugate fluorescenti.
- Reagenti fluorescenti, che hanno un gruppo aromatico (fluoroforo) altamente fluorescente e un gruppo reattivo.
- Reagenti con proprietà redox, principalmente usati in elettrochimica.

La derivatizzazione è anche usata per separazioni enantiomeriche.

Nella separazione pre-colonna i diastereoisomeri vengono formati prima dell'iniezione, usando reagenti chirali enantiomerici puri.

Per rivelare le molecole amminiacidiche in HPLC, esistono diverse metodologie, che variano a seconda del tipo di reagente derivatizzante utilizzato, ma soprattutto dal rivelatore.

Il rivelatore UV-VIS che viene comunemente usato ha una scarsa sensibilità e selettività soprattutto per le analisi in traccia, mentre il rivelatore a fluorescenza, introdotto agli inizi

degli anni 90' è molto sensibile e soprattutto selettivo per il metodo in HPLC e l'elettroforesi capillare.

In letteratura esistono molteplici studi che presentano metodi in HPLC, che usano diversi reagenti derivatizzanti per la rivelazione fluorimetrica.

Un sensibile sistema per l'analisi di aminoacidi che prevede l'utilizzo dell'agente derivatizzante OPA (o-phthalaldehyde) e del rilevatore a fluorescenza (Mauris et al., 1988 ; Brückner *et al.*,1995), messo a punto e poi archiviato, comporta l'inserimento di un fluorogeno nella molecola aminoacidica, procedimento divenuto indispensabile per la determinazione degli aminoacidi. L'OPA, non rappresenta l'unico reagente fluorogeno usato per le analisi sopra citate, infatti, in commercio sono disponibili diversi reagenti per la rilevazione fluorimetrica di aminoacidi e proteine come ad esempio: (FMOC-Cl) 9 fluorenimetil cloroformato, (PIT) fenilisocianato, il (dansyl-Cl) dimetilaminonafalene-5sulfonil clorid., agenti che possono essere utilizzati sia per la derivatizzazione pre-colonna che post-colonna.

Da uno studio di valutazione effettuato da Furst *et al.*, (1990) sono stati determinati vantaggi e svantaggi dell'utilizzo dei diversi fluorogeni con derivatizzazione pre-colonna, come riportati in Tabella 1

Scelta di un metodo in HPLC per la determinazione della composizione aminoacidica applicabile a campioni larvali di piccoli pelagici

---

Parametri	OPA (metodo automatizzato)	FOMC-Cl	PITC	Dansyl-Cl
Limite di sensibilità, pmol (segnale del rumore = 2.5)	0.8	1.0	5.0	1.5
Errore del metodo (C.V.,%) (basato su determinazioni dupliate)	1.0-4.7	1.1-5.9	3.6-7.0	1.7-4.5
Riproducibilità (C.V%)	0.4-2.2	1.9-4.6	2.6-5.5	1.5-4.1
addotti stabili	N	S	S	S
Problemi con aminoacidi	Asp. Trp	His, Trp	Orn, Trp, His, (CYS) <sub>2</sub>	His, Asn

Tabella 1: Derivatizzazione pre-colonna

Altre determinazioni di aminoacidi possono essere effettuate con agenti derivatizzanti post-colonna come si evince nella Tabella 2 (Rigas, 2013), dove sono stati riportati vantaggi e svantaggi, considerando anche il tipo di rilevatore utilizzato: UV-Vis o fluorescenza.

Aminoacidi	Reagenti Derivatizzante	T.(°C)	Commento	Cromatografia	Rilevatore	Limite di rilevament	Referenza
Gruppo di aminoacidi primari e secondari	Ninidrina /Ildrintatin/sulfolane	130	È richiesto il monitoraggio di due lunghezze d'onda. per la cys si richiede ossidazione ad acido cisteico	Scambio cationico	UV-Vis a 570nm per amin	Sub nanomole	Pickering (1981, 2002)
Asp,Gln,Thr,Cys,Ala,Tyr,Val,Me,Phe,Leu,Lys,His,Trp,Arg	o-phthalaldeide (OPA)/N acetyl-L-cysteina	40	Gli aminoacidi vengono separate usando una soluzione di sodiododecil solfato ad alta conc.	liquida micellare	UV-Vis 335nm	Non riportato	Lopez et al.,2000
Ammino gruppi primari e secondari	Ninidrina /NaBh4/metilcellsolvente	90		scambio cationico	UV-Vis a 570nm per amineprimarie e derivati; 440nm per ammine secondarie e derivati	nanomoli	Hori et al., 1998
Amino agruppi primari e secondari	NQS(1,2 naftoquinone-4- solfonato)	65	A causa dell'instabilità di questo reagente in ambiente alcalino è stato richiesta la miscela con un tampone	scambio ionico	UV-Vis 305 e 480nm	Sub nanomoli	Saurina et al., 1994
Amino gruppi primari e secondari	NaClO/o-ftaldeide/2 mercaptoetanolo	T.a	L'uso di NaClO ossida il reagente e non consente la rilevazione della Pro	scambio cationico	FL Ex440 nm Em445nm	picomoli	Benson et al., 1975 e Ishida et al., 1981
Amino gruppi primari e secondari	NaClO/o-ftaldeide/3 mercaptopropionico acid	68	Buona sensibilità nella determinazione degli aminoacidi secondari.	scambio cationico	FL Ex440 nmEm445nm	10 picomoli	Fiorino et al., 1989

Tabella 2: Derivatizzazione post-colonna

La reazione tra OPA e un tiolo 2β-mercaptoetanol (MERC) produce un derivato fluorescente indolico (Fig. 4) permettendo a piccole quantità di aminoacidi di essere rilevati attraverso i rilevatori a fluorescenza (ExW 340 – EmW 450) (Stoney *et al.*, 1976) o UV-Vis. Secondo Buha *et al.*, (2011) la cromatografia ad alta prestazione con l'uso di un rivelatore a fluorescenza, rappresenta una delle migliori procedure per determinare gli aminoacidi primari, utilizzando l'OPA come agente derivatizzante.

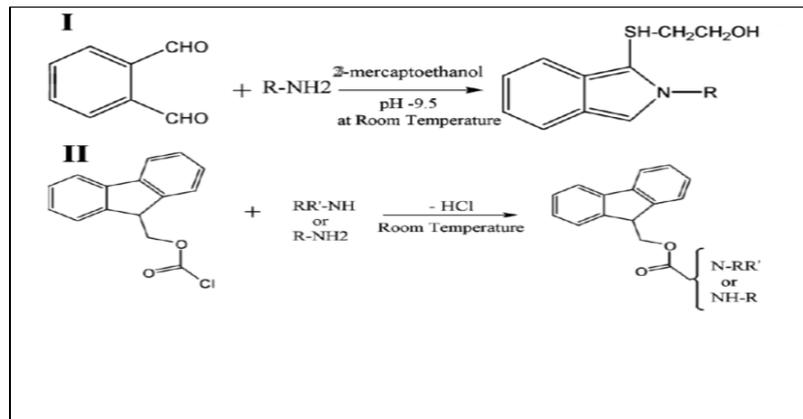


Figura 4: formazione di un derivato indolico dalla reazione tra un aminoacido e l'OPA in presenza di mercaptoetanol.

Tenendo conto di quanto sopra citato, nei laboratori dell' IAMC (Istituto per l'Ambiente Marino Costiero U.O.S di Capo Granitola), sono stati messi a punto due metodi che prevedono l'uso del cromatografo HPLC-RP e l'utilizzo dell'agente OPA pre-colonna come reagente derivatizzante, nonché la fluorescenza come rivelatore. I metodi utilizzati sono ad alta sensibilità, e ciò consente rivelazione di piccolissime concentrazioni di standard aminoacidici, simili a quelli presenti nelle larve dei piccoli pelagici.

(Zhaolai *et. al.*, 2014) indicato: metodo1

(Shimadzu new 3/ 2008) indicato: metodo 2

I risultati ottenuti dal confronto dei due metodi (1 e 2), sono stati riportati nei paragrafi seguenti.

## **Materiali e metodi**

### **Il sistema HPLC**

Per l'applicazione dei due metodi è stato utilizzato un unico sistema HPLC Shimadzu, di cui ne vengono riportate le caratteristiche:

degasatore DGU-20A5;

pompa LC-20AD;

autocampionatore SIL-20A8 con pretrattamento;

termostato colonna CTO-20°;

detector fluorescenza RF-10XLD;

sistema di controllo CBM-20°;

### **Il Protocollo**

Tutti i reagenti chimici usati per le analisi di aminoacidi in HPLC avevano un'alta purezza, e quando previsto, conservati alla temperatura ambiente di circa 25°C.

In particolare gli standard utilizzati per il confronto dei due metodi sono stati acquistati alla Sigma (caratteristiche illustrate nell'allegato 1). Gli stessi sono stati preparati in maniera diversa a secondo del metodo utilizzato; quelle con concentrazioni molto basse, hanno inoltre permesso di quantificare le piccole concentrazioni di aminoacidici presenti nelle larve dei piccoli pelagici.

Per i due metodi i limiti erano diversi, infatti abbiamo tenuto conto del LOD (*Limit Of Detection*), quando riportato dagli autori.

## Metodo 1

### Preparazione degli standard Metodo "Zhaolai *et al.*, 2014"

Usando il metodo 1, sono stati preparati gli standard a diversa concentrazione, tenendo presente LOD che indica il valore di (50 fmol), e del LQD (*Limit Of Quantitation*) di 1nM.

Le concentrazioni preparate, diluendo la soluzione madre di standard aminoacidico in HCl 0.1 N (tabella 3), sono state le seguenti:

Concentrazioni-aminoacidiche
0.3125 nm /ml
0.625 nm /ml
1.25 nm/ml
2.5 nm/ml
5 nm/ml
10 nm /ml

Tabella 3: Concentrazioni più basse ottenute con l'applicazione del metodo1

La relazione di linearità  $R^2$  sono state riportate nella Tabella 4 e fanno riferimento ai 14 aminoacidi che sono stati determinati.

Amminoacido	$R^2$	amminoacido	$R^2$	amminoacido	$R^2$
Asp	0.9915	arg	0.9976	lys	0.9785
Glu	0.9885	ala	0.9643	leu	0.9970
Ser	0.9841	met	0.9844		
His	0.9951	val.	0.9964		
Gly	0.9170	phe	0.9832		
Thr	0.9979	ile	0.8473		

Tabella 4: Valori di  $R^2$  per ogni singolo aminoacido in riferimento alle basse concentrazioni.

Scelta di un metodo in HPLC per la determinazione della composizione aminoacidica applicabile a campioni larvali di piccoli pelagici

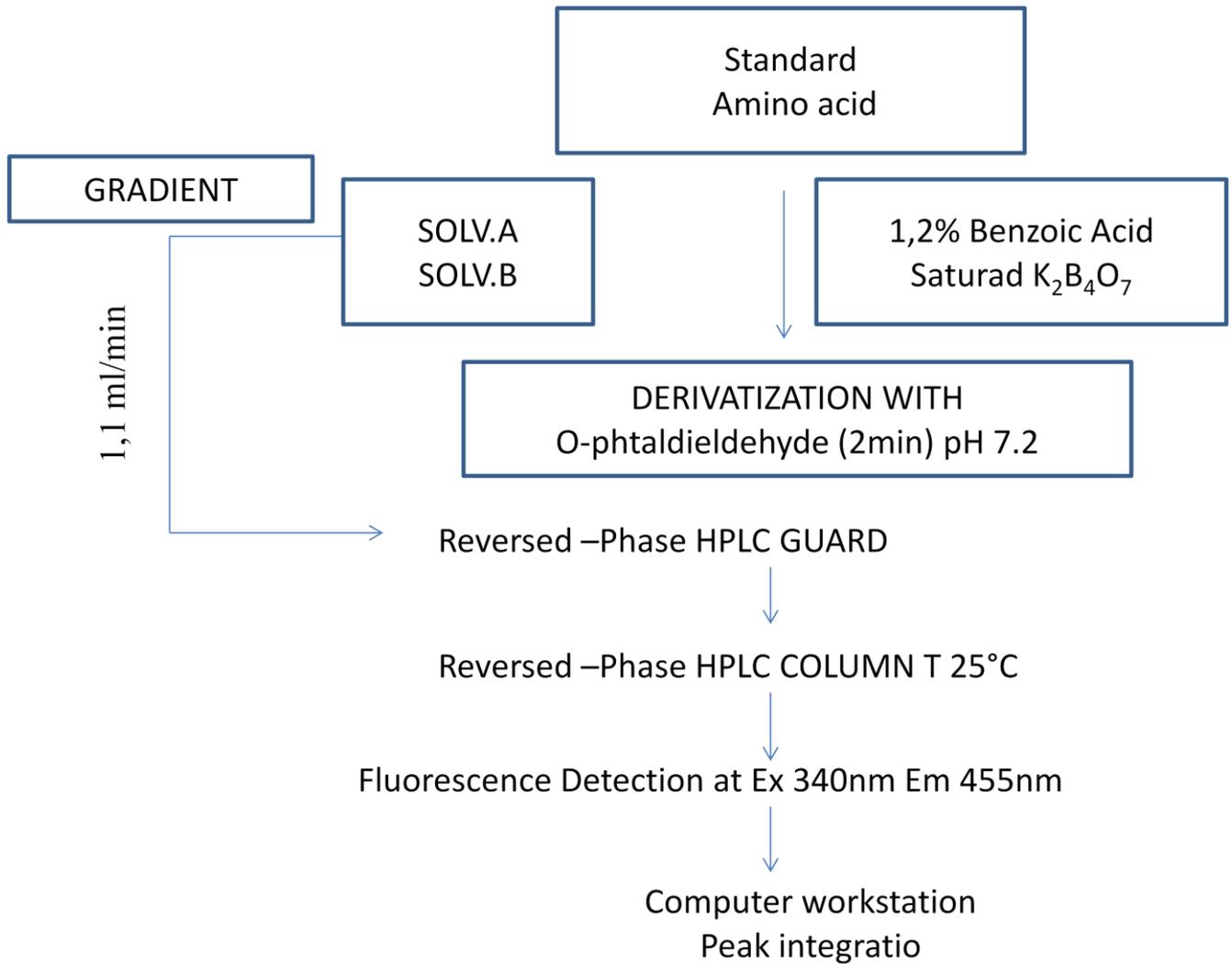


Figura5 Schema di utilizzato nel metodo 1

## Metodo 2

### Preparazione degli standard Metodo 2” Shimadzu New 3/2008”

Gli standard per il metodo 2, sono stati preparati adattandoli alle esigenze del metodo stesso. Quest’ultimo non riportava nessun limite di quantificazione, quindi, è stato necessario ricorrere alle prove di laboratorio per capire che i migliori risultati venivano ottenuti a concentrazioni tra 6.25 e 12.5nm/ml; mentre, le concentrazioni più basse (1.60 nmoli/ml) non presentavano una buona risoluzione. Anche in questo caso gli standard sono stati preparati usando una soluzione madre, contenente i 18 aminoacidi riportati in Allegato 1, diluita con una soluzione di HCl 0.1 N. I dati sono riportati nella tabella 6

Concentrazioni-aminoacidiche
1.60 nm/ml
3.12 nm/ml
6.25 nm/ml
12.5 nm/mL

Tabella 5: Concentrazioni più basse ottenute con l’applicazione del metodo 2;

Nella tabella 6 vengono riportati i valori di  $R^2$  ottenuti dalla relazione tra l’area e le diverse concentrazioni per i singoli aminoacidi. A seguire invece lo schema applicativo del metodo Shimadzu.

amminoacido	$R^2$	amminoacido	$R^2$	amminoacido	$R^2$
asp	0.9985	thr	0.9997	met	0.9807
glu	0.9997	ala	0.9939	ile	0.9807
ser	0.9994	arg	0.8867	phe	0.9975
his	0.994	tyr	0.9801		
gly	0.9959	val	0.9924		

Tabella 6 valori  $R^2$  dei singoli aminoacidi ottenuti con metodo 2

Scelta di un metodo in HPLC per la determinazione della composizione aminoacidica applicabile a campioni larvali di piccoli pelagici

---

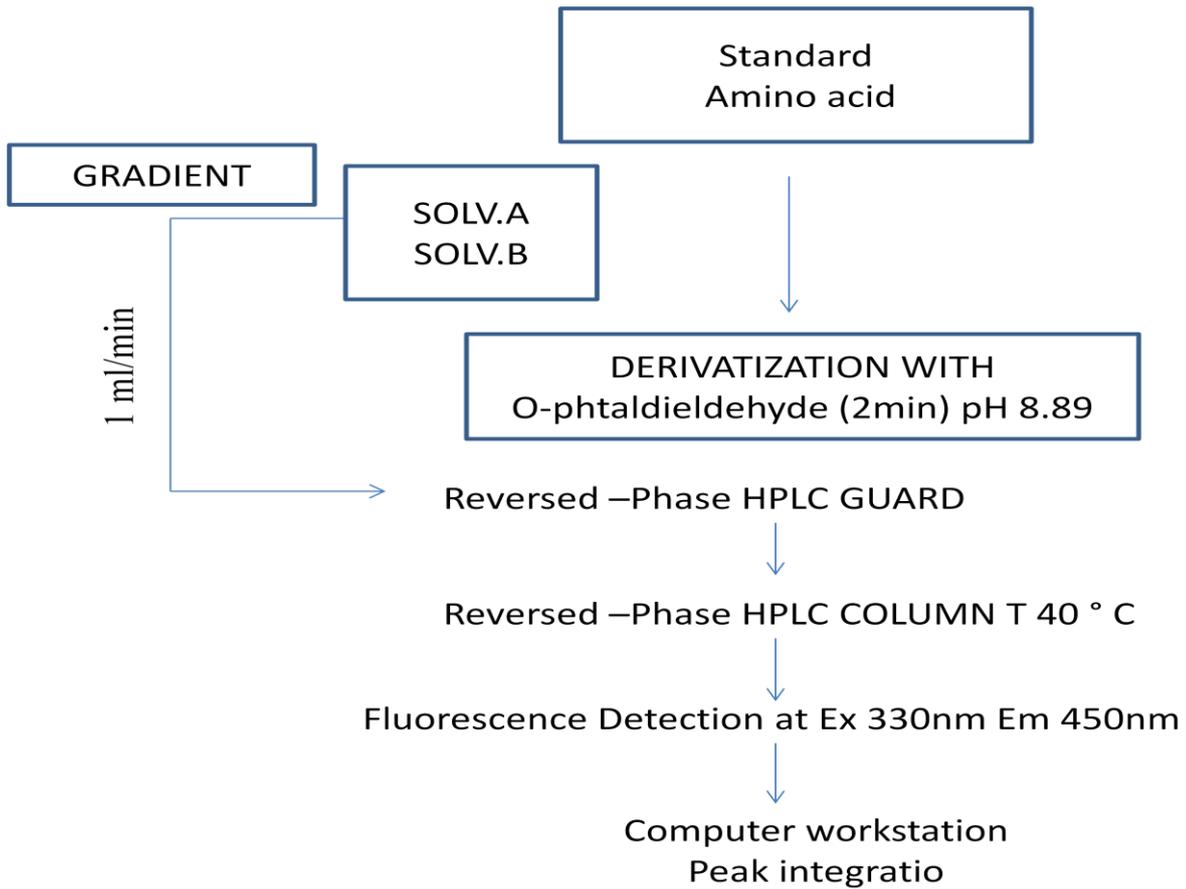


Figura 6: Schema utilizzato nel metodo 2;

## Risultati

Attraverso l'applicazione dei due metodi e utilizzando un unico sistema di HPLC, sono state evidenziate alcune differenze.

Come si evince dalle Figure 5 e 6, in cui vengono rappresentati gli schemi usati nei due metodi, appare evidente che le differenze più rilevanti, facciano riferimento al diverso campo di applicazione riguardante la temperatura e il pH.

La prima variabile riferita al pH, appare importante soprattutto se si tiene in considerazione la teoria sul pKa degli aminoacidi. Se il valore pKa del gruppo funzionale è inferiore al pH della soluzione, quel gruppo esisterà principalmente nella forma deprotonata (base), mentre se il valore di pKa del gruppo funzionale è maggiore al pH della soluzione, quel gruppo esisterà in soluzione, principalmente nella forma protonata (acido), mentre se il valore di pKa del gruppo funzionale è uguale al pH della soluzione, la forma acida e basica del gruppo saranno in rapporto di 1:1 (<http://www.chimica.unipd.it/giulia.licini/pubblica/CO2CTF/11.pdf>). La seconda variabile legata alla Temperatura, che nel metodo 2 viene mantenuta a circa a 40°, rappresenta uno svantaggio per la determinazione degli aminoacidi in quanto la loro stabilità dipende dalla temperatura stessa che a (40 °C) rappresenta il limite oltre il quale queste molecole si volatilizzano.

Inoltre alcune differenze esistono anche a livello di soluzioni: nel metodo 2 il sistema a gradiente è formato da due soluzioni tampone di fosfato 10mM, mentre nel metodo 1 il sistema a gradiente è formato da un solo sale di acetato 100 mM e metanolo.

Ulteriori differenze, sono state annotate soprattutto con il metodo 2 che ha generato una serie di problemi a livello strumentale legati principalmente al fatto che era previsto la formazione di gradiente attraverso l'uso di due tamponi. Essendo le soluzioni usate a concentrazione salina abbastanza esigua, è stato inevitabile il suo accumulo nel sistema HPLC, tra le colonne e nelle pompe. Ad amplificare questo processo di deposito è stata la temperatura del forno, prevista dal metodo a 40°C. Infatti quest'ultima contribuiva ad indurire il sale e a stratificarlo rendendone difficile il suo scioglimento anche ai vari cicli di lavaggio.

I risultati della risoluzione riferita all'eluizione degli standard con i due metodi possono essere osservati nei cromatogrammi riportati in figura 7-8;

Scelta di un metodo in HPLC per la determinazione della composizione aminoacidica applicabile a campioni larvali di piccoli pelagici

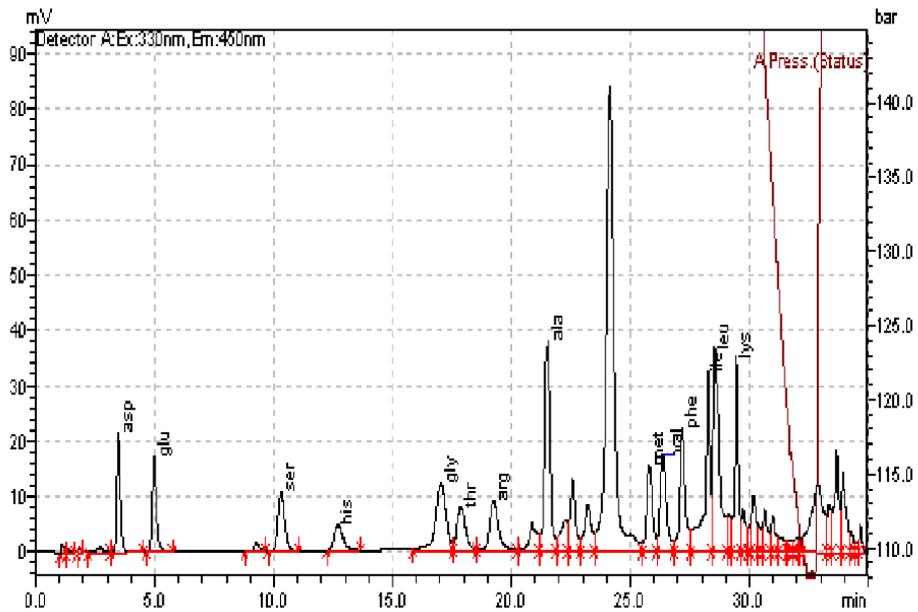


Figura 7: Cromatogramma conc 5 nmoli/ml metodo 1

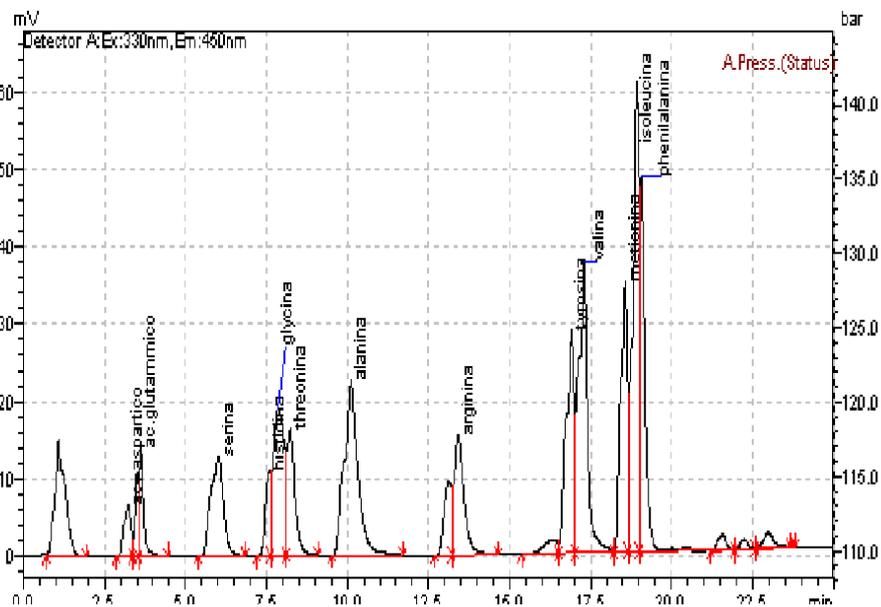


Figura 8: Cromatogramma conc. 6.25 nmoli/ml metodo 2

Dall'analisi dei due cromatogrammi, si nota chiaramente che l'applicazione del metodo 1 ha consentito, a parità di concentrazione, una migliore risoluzione, come si evince dai picchi che risultano sovrapposti con forma non proprio gaussiana.

Inoltre, come si osserva dai grafici, sono stati analizzati gli stessi standard alla stessa concentrazione, con i due metodi ed è stato possibile verificare delle differenze analitiche in termini qualitativi e quantitativi. Infatti, l'applicazione del metodo 1 per la determinazione di

uno standard a concentrazione di 5 moli/ml è stato possibile determinare 14 dei 18 aminoacidi contenuti nello standard, mentre il metodo 2 applicato ad uno standard a concentrazione di 6.5 nmoli/ml ha consentito di determinare 13 su 18 degli aminoacidi presenti nello standard. I metodi 1 e 2 hanno entrambi rilevato (ASP-GLU-SER-HIS-GLY-THR-ARG-ALA-MET-VAL-PHE-ILE), (vedi tabella7) mentre il metodo 1 ha permesso di rilevare anche la LIS e LEU ed il metodo 2 ha rilevato la TYR. La CIS, non è stata rilevata ed è quanto aspettavamo dai dati di letteratura, infatti per quest'ultimo aminoacido metteremo a punto, in seguito, in seguito un trattamento preliminare che ci consentirà la sua eluizione.

Abbreviazione	Aminoacido corrispondente
ASP	Aspartate
GLU	glutamate
SER	Serine
HIS	Histidine
GLY	Glycine
THR	Threonine
ARG	Arginine
ALA	Alanine
TYR	Tyrosine
MET	Methionine
VAL	Valine
PHE	Phenylalanine
ILE	Isoleucine
LEU	Leucine
LYS	Lysine
CYS	Cystine

Tabella 7:Elenco abbreviato dei singoli aminoacidi

## Conclusione

Come già detto nel capitolo precedente, dalla comparazione delle due tecniche applicate agli standard è stato possibile, verificare la differenza analitica sia in termini qualitativi che quantitativi. Con il metodo 1 sono stati determinati 14 dei 18 aminoacidi contenuti nello standard, mentre con il metodo 2 ne sono stati determinati 13 su 18. I metodi 1 e 2 hanno entrambi rilevato la presenza di ASP-GLU-SER-HIS-GLY-THR-ARG-ALA-MET-VAL-PHE-ILE, mentre il metodo 1 ha permesso di rilevare anche la LYS e LEU ed il metodo 2 ha rilevato la TYR.

Nonostante i due metodi dal punto di vista qualitativo risultano entrambi idonei alla determinazione degli aminoacidi anche nella matrice biologica di larve di piccoli pelagici, la scelta è ricaduta sul metodo 1 che presenta picchi molto più definiti rispetto al metodo 2, ad esempio, l'istidina anche se è stata rilevata con il metodo 2 non appare nettamente separata dalla glicina. Un altro vantaggio del metodo 1 è stato quello di garantire una buona ripetibilità

degli standard sottoposti ad analisi. determinando una maggiore precisione dal punto di vista quantitativo fornendo una maggiore sensibilità nella risoluzione delle piccole concentrazioni, come ad esempio ad una concentrazione di 0,3 nmoli/ml.

Un altro svantaggio, non indifferente, legato all'uso del metodo 2 è dato dall'usura strumentale, della colonna e della pre-colonna. infatti si è assistito ad una precipitazione del sale fosfato previsto dal metodo 2, probabilmente dovuta alla differenza di pH tra il solvente e l'acido che veniva usato per dissolvere gli standard.

Tutti questi aspetti negativi ci hanno portato a designare la tecnica messa a punto da Zhaolai et. al., (2014), un ottimo metodo, valido soprattutto per la determinazione di aminoacidi in piccoli pesci pelagici.

## **Ringraziamenti**

Vogliamo ringraziare tutti i colleghi che sono stati di supporto in questo lavoro per la loro collaborazione. Il lavoro nei nostri laboratori è stato supportato dai seguenti progetti di ricerca: Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l'uso di film edibili innovativi a base di pectine (PON01\_02286/1) e "Valutazione dell'impatto della pesca del bianchetto nei litorali siciliani con metodi innovativi diretti e indiretti" (BIANCHETTO); sottoprogetto del Progetto RITMARE(Ricerca Italiana per il Mare) Committente: MIPAAF.Bando: Primo programma nazionale triennale della pesca e dell'acquacoltura - invito D.M. 4 luglio 2011

## Bibliografia

Bączek T and Radkowska M. Predictions of peptide retention in HPLC with the use of amino acids retention data obtained in a TLC system. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* (2007); 30: 2963–2974.

Benson RJ, Hare EP. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1975); 72:619–622

Brückner H, Westhauser T and Godel H. Liquid chromatographic determination of d- and l-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) and N-isobutryl-l-cysteine. Application with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *Journal of Chromatography A* (1995); 711: 201–215.

Buha, S. M., Panchal, A., Panchal, H., Chambhare, R., Kumar, S., Jain, M., & Patel, P. R. HPLC-FLD for the simultaneous determination of primary and secondary amino acids from complex biological sample by pre-column derivatization. *Journal of Chromatographic Science*, (2011); 49(2), 118-123.

Czerwenka Ch and Lindner W. Stereoselective peptide analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2005); 382: 599–638.

Fiorino A, Frigo G, Cucchetti E (1989) *J Chromatogr* 476:83–92

Furst, P., Pollack, L., Graser, T. A., Godel, H, & Stehle, P. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *Journal of Chromatography*, (1990); 499,557-569.

Hasegawa H, Shinohara Y, Masuda N, Hashimoto T and Ichida K. Simultaneous determination of serine enantiomers in plasma using Mosher's reagent and stable isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* (2011); 46: 502–507

<http://www.chimica.unipd.it/giulia.licini/pubblica/CO2CTF/11.pdf>

Ilisz L, Berkecz R and Péter A. Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2008); 47: 1–15.

Ishida Y, Fujita T, Asai K., *J. Chromatography*, (1981); 204:143–148

Lepri L and Cincinelli A. Enantiomers: TLC separations. In *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edn, Cazes J (ed.). Taylor & Francis: New York, (2010)b; 751–753.

López-Grijo S, Torres-Lapasió JR, Baeza-Baeza JJ, Garcia Alvarez-Coque MC (2000) *Anal Chim Acta* 418:153–165.

Martens J and Bhushan R. TLC enantiomeric separation of amino acids. *International Journal of Peptide Protein Research* (1989); 34: 433–444

Matthew CK and Van Holde KE. *Biochemistry*, 2nd edn. Benjamin-Cummings: Menlo Park, CA, (1995); 129-214.

Mauris M, Trigalo F and Azerad R. Resolution of  $\alpha$ -substituted amino acid enantiomers by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthalaldehyde. Application to glutamic acid analogues. *Journal of Chromatography A* (1988); 440: 209–215.

Papadoyannis IN and Theodoridis GA. Amino acids: analysis by HPLC: an introduction. In *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edn, Cazes J (ed.). Taylor & Francis: New York, (2010); 68–74.

Pickering LABORATORIES. *Application Manual Amino Acids*. Mountain View, California USA. Press, INC., 2002.

Pickering M X., Ninhydrin reagent for use in amines and amino acid analyses U.S. (1981): Patent no. 4,274,833.

Rigas, Pantelis G. "tecniche di etichettatura post-colonna in analisi degli aminoacidi mediante cromatografia liquida". *analitica e chimica bioanalytical* 405,25 (2013): 7957-7992.

S. Stoney Simons, Jr., David F. Johnson The structure of the fluorescent adduct formed in reaction of o-Phthalaldehyde and thiols with amines. *Journal of the American Chemical Society* October 27, (1976) 98:22.

Saurina J, Hernandez-Cassou S (1994) *J Chromatogr A* 676:311–319.

Shimadzu New3/2008;

Silverman LM and Christenson, RH. Amino acids and proteins. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 4th edn, Burtis CA, Ashwood ER (eds). W. B. Saunders: Philadelphia, PA, (1996).

Zahradnicková H, Hartvich P, Simek P and Husek P. Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. *Amino Acids* (2008); 35: 445–450

Zhaolai Dai, Zhenlong Wu, Sichao Jia, Guoyao Wu. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, (2014); 964 116–127

Allegato1



3050 Spruce Street  
Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sial.com  
sigma-aldrich.com

**Product**Information

**AMINO ACID STANDARD SOLUTION**  
For calibrating amino acid analyzers

Stock No. **AA-S-18**

Store at 2-8 °C

Amino acids and related compounds are in 0.1 N HCl at the indicated concentrations  $\pm$  4%. Molecular weights are listed to four significant figures.

<u>COMPONENT</u>	<u>MOL. Wt.</u>	<u><math>\mu</math>Moles/mL</u>
L-Alanine	89.09	2.50
Ammonium Chloride	53.49	2.50
L-Arginine	174.2	2.50
L-Aspartic Acid	133.1	2.50
L-Cystine	240.3	1.25
L-Glutamic Acid	147.1	2.50
Glycine	75.07	2.50
L-Histidine	155.2	2.50
L-Isoleucine	131.2	2.50

L-Leucine	131.2	2.50
L-Lysine	146.2	2.50
L-Methionine	149.2	2.50
L-Phenylalanine	165.2	2.50
L-Proline	115.1	2.50
L-Serine	105.1	2.50
L-Threonine	119.1	2.50
L-Tyrosine	181.2	2.50
L-Valine	117.2	2.50

**Storage**  
Store at 2-8 °C

**For laboratory use only.**

**Not for drug, household or other uses.**

Pcs 2/01

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.  
Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.  
Please see reverse side of the invoice or packing slip.