

Ionska kromatografska analiza ugljikohidrata i aminokiselina

Farkaš, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:005250>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Farkaš

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Farkaš

IONSKA KROMATOGRAFSKA ANALIZA
UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Članovi ispitne komisije: doc. dr. sc. Šime Ukić
dr. sc. Petar Kassal

Zagreb, srpanj, 2017.

**Izazivam Vas da budete sanjari,
Izazivam Vas da budete oni
Koji rade nešto
Kako bi ovaj svijet bio
Bolje mjesto
Jer,
Uvijek je prerano
Za odustajanje.**

Zahvaljujem se svome mentoru prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči i voditelju moga završnog rada doc. dr. sc. Šimi Ukiću koji su svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovali ideju i pomogli mi u ostvarenju svega zamišljenoga. Također se želim zahvaliti i asistentu Matiji Cvetniću koji mi je omogućio uvid u stvarnu sliku svega ovoga o čemu sam čitala i pisala.

Želim se zahvaliti svojim roditeljima i sestri, kao i ostatku obitelji, što su me tijekom čitavog školovanja podupirali i poticali moju težnju k visokim ciljevima.

Želim se zahvaliti i svojim prijateljima, Ines, Kristini i Stjepanu, što su bili tu za mene, što su bili stup potpore i ohrabrenja.

Na posljetku, posebna zahvala prijatelju Aleksandru čije su riječi oduvijek bile nepresušan izvor motivacije i neborivi oslonac, što je vjerovao u mene i kada ja sama nisam.

Od srca Vam svima **hvala!**

SAŽETAK

Biomolekule su iznimno važan dio svakoga organizma jer kontroliraju gotovo sve njegove aspekte, od strukture do životnih procesa i energije. Stoga posljednjih godina velik broj analitičara usmjerava pažnju upravo na unaprjeđenje postojećih i razvoj novih metoda i instrumentacije koja će omogućiti analizu biomolekula i dodatno razumijevanje njihovih uloga.

Jedna od zastupljenijih metoda za analizu i odvajanje različitih nabijenih ili ionizirajućih molekula poput aminokiselina, proteina ili ugljikohidrata je ionska kromatografija. Ova metoda odlikuje se brojnim pogodnostima kao što su primjenjivost za simultanu analizu velikog broja molekula, lako povezivanje s drugim tehnikama (primjerice tehnikama detekcije), a u funkciji pročišćavanja omogućava dobivanje izrazito čistih proizvoda u relativno kratkom vremenu izvođenja.

Velik napredak u analizi aminokiselina i ugljikohidrata bilo je uvođenje pulsne amperometrijske detekcije. Pregledom literature pronađene su brojne aplikacije za učinkovito i simultano razdvajanje i određivanje aminokiselina i ugljikohidrata anionskim izmjenjivačkim kolonama uz integriranu pulsnu amperometrijsku detekciju.

Ovaj rad nudi pregled aktualnih metoda analize aminokiselina i ugljikohidrata s detaljnijim osvrtom na pronađene kromatografske aplikacije.

Ključne riječi: ionska kromatografija, aminokiseline, ugljikohidrati, IPAD detekcija

SUMMARY

Biomolecules are an extremely important part of every single organism since they control almost all of its aspects, from structure to metabolic processes and transformation of energy. Because of that, recent researches are driven towards the improvement of existing methods or development of the new ones, followed by development of instrumentation which will make analysis and understanding of biomolecules and the roles they have in organisms easier.

Ion chromatography is one of the most intensively used methods in the analysis of biomolecules such as amino acids, proteins or carbohydrates. This method has a vast variety of advantages which includes simultaneous analysis of a huge number of molecules, simple linkage with other techniques (detection techniques, for example), and, in the purification mode, final products are extremely pure and obtained in short run time.

Great progress has been made in the analysis of amino acids and carbohydrates when pulsed amperometric detection was introduced. By reviewing the literature, many applications have been found for the effective and simultaneous separation and determination of amino acids and carbohydrates on anion exchange columns with integrated pulsed amperometric detection.

This manuscript is a review that summarises current methods for the analysis of amino acids and carbohydrates with emphasis on chromatographic techniques.

Keywords: ion chromatography, amino acids, carbohydrates, IPAD detection

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	UGLJIKOHIDRATI I NJIHOV ZNAČAJ	2
3	AMINOKISELINE I NJIHOV ZNAČAJ	4
4	KROMATOGRAFIJA.....	6
4.1	OSNOVE KROMATOGRAFIJE	6
4.2	PODJELA KROMATOGRAFIJE	7
4.3	IONSKA KROMATOGRAFIJA.....	8
4.3.1	Mehanizam ionske kromatografije	9
4.3.2	Ionski kromatografski sustav.....	12
4.3.3	Prednosti ionske kromatografije	13
5	PREGLED METODA ANALIZE UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA	14
5.1	METODE ANALIZE UGLJIKOHIDRATA	14
5.1.1	Titracija	14
5.1.2	Gravimetrija.....	15
5.1.3	Kolorimetrija	15
5.1.4	Kapilarna elektroforeza.....	16
5.1.5	Plinska kromatografija	17
5.1.6	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti.....	17
5.2	METODE ANALIZE AMINOKISELINA.....	19
5.2.1	Kolorimetrija	20
5.2.2	Fluorimetrija.....	21
5.2.3	Kapilarna elektroforeza.....	21

5.2.4	Plošna kromatografija	22
5.2.5	Plinska kromatografija	22
5.2.6	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti.....	23
6	IC ANALIZA UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA.....	24
6.1	IC DETEKTORI ZA ANALIZU UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA ..	24
6.1.1	Amperometrijska detekcija	24
6.1.2	UV/VIS detekcija.....	26
6.1.3	MS detekcija.....	27
6.2	IONSKE KROMATOGRAFSKE KOLONE.....	28
6.2.1	Kolone za analizu aminokiselina	29
6.2.2	Kolone za analizu ugljikohidrata.....	31
6.3	APLIKACIJE.....	35
6.3.1	Određivanje aminokiselina i ugljikohidrata u staničnim kulturama i fermentacijskim juhama	35
6.3.2	Izravno određivanje slobodnih aminokiselina i šećera u zelenom čaju	39
6.3.3	Simultano određivanje aminokiselina i ugljikohidrata u kulturi <i>Clostridium thermocellum</i>	41
7	ZAKLJUČAK	45
8	LITERATURA.....	46

1 UVOD

Većina analitičkih kemičara su po prirodi inovatori koji teže poboljšanju i napretku. Usljed sve većeg broja otkrivenih spojeva i njihove nepregledne raznolikosti, ove osobine su neprocjenjive u optimizaciji tehnika za identifikaciju i analizu. Razvoj novih metoda ovim je ljudima svakodnevnica, a poseban izazov su biomolekule čija strukturna i konfiguraciona raznovrsnost premašuju granice osjetljivosti i selektivnosti postojećih tehnika.

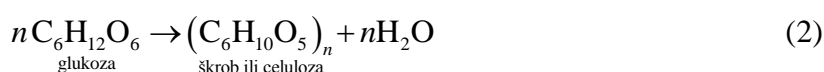
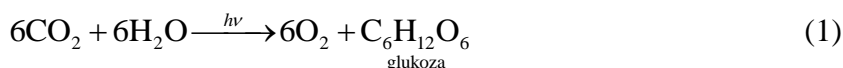
Ugljikohidrati su aldehidi ili ketoni viših polihidroksidnih alkohola ili drugih spojeva čija hidroliza daje ove makromolekule kao produkte. Prirodno su prisutni u biljkama (u kojima se proizvode fotosintetski), životinjama i mikroorganizmima gdje ispunjavaju višestruke strukturne i metaboličke uloge. Poteškoće prilikom detekcije i kvantifikacije ugljikohidrata uglavnom su posljedica sličnosti u njihovoj strukturi i kemijskom ponašanju te velikom broju stereoisomera. Kao rezultat takvih karakteristika, mnoge analitičke metode nisu u mogućnosti razlikovati određene vrste ugljikohidrata, stoga analitičari nastoje povećati specifičnost postojećih i razviti nove, poboljšane metode za lakše, preciznije i točnije određivanje ovih biomolekula. Pretežito korištene bile su plinsko-tekućinska i tekućinska kromatografija.

Aminokiseline su organske molekule niskih relativnih molekularnih masa, koje sadrže minimalno jednu karboksilnu ($-\text{COOH}$) i jednu amino-skupinu ($-\text{NH}_2$) na istom atomu ugljika te su esencijalne komponente biljnih i životinjskih tkiva. Raznolikost aminokiselina leži u prirodi njihovog bočnog ogranka (sporedni lanac, R), dijela koji je glavni uzročnik specifičnosti pojedine aminokiseline. Razvijen je velik broj metoda za kvantifikaciju ukupnog udjela aminokiselina u uzorku, ali težnja da se odredi udio svake pojedine aminokiseline donosi sa sobom slične poteškoće kao i kod kvantifikacije ugljikohidrata - osim bočnog ogranka, malo je toga što razlikuje jednu aminokiselinu od druge. Potrebno je oformiti metodu koja će iskoristiti kemijske i fizikalne odlike željene aminokiseline u korist odvajanja od ostalih. Najučestalije primjenjivane metode bile su tekućinska kromatografija i elektroforeza.

S razvojem i napretkom znanja i instrumentacije, ionska kromatografija pokazala je velik broj prednosti naspram spomenutih metoda analiza ugljikohidrata i aminokiselina, a daljnja unaprjeđenja u tijeku su i dan danas.

2 UGLJIKOHIDRATI I NJIHOV ZNAČAJ

Ugljikohidrati su hidrati ugljika općenite formule $C_xH_{2y}O_y$ i čine najveći dio organske tvari na Zemlji. Gotovo sve biljke i životinje sintetiziraju ugljikohidrate; biljke ih sintetiziraju procesom fotosinteze, složenim nizom reakcija, koristeći svjetlost kao izvor energije za prevođenje ugljikovog dioksida i vode u glukozu i kisik. Molekule glukoze mogu se zatim međusobno povezati u škrob, koji služi za pohranu energije, ili celulozu, koja doprinosi stabilnoj građi skeleta biljaka:¹



Većina živih organizama oksidira pohranjenu glukozu do ugljikovog dioksida i vode prilikom čega dolazi do oslobađanja velike količine energije. Za razliku od biljnog škroba, kod životinja kao rezerva energije služi drugi derivat glukoze, glikogen.

Ugljikohidrati, osim što služe kao izvor energije i za njezinu pohranu, sudjeluju kao intermedijeri u sintezi drugih biomolekula (nukleinskih kiselina DNA i RNA), sastavni su dio mnogih antibiotika i vitamina, izgrađuju strukturalna tkiva kod biljaka, životinja i nekih mikroorganizama, sudjeluju u transportu molekula kroz organizam, međustaničnom prepoznavanju i prijenosu signala između stanica, a na površini stanice služe kao mjesta za interakciju s drugim stanicama, bakterijama, virusima i hormonima.

Ugljikohidrati su također nezamjenjiva sirovina u prehrambenoj, farmaceutskoj, drvenoj i tekstilnoj industriji, odnosno u proizvodnji papira, pamučnih vlakana, umjetne svile, alkohola...

Za ugljikohidrate se često koristi i naziv *saharidi*, koji dolazi iz latinskog jezika (*saccharum*, šećer), a odnosi se na slatki okus koji imaju neki jednostavni ugljikohidrati.

Ugljikohidrati se mogu podijeliti obzirom na broj monosaharidnih jedinica na:

- monosaharide: 3-9 ugljikovih atoma; najjednostavniji ugljikohidrati,
- disaharide: hidrolizom nastaju dva monosaharida,
- oligosaharide: hidrolizom daju 3-10 monosaharidnih jedinica,
- polisaharide: hidrolizom daju više od 10 monosaharidnih jedinica.

Nadalje, monosaharidi se klasificiraju prema funkcionalnoj skupini kao aldoze (posjeduju aldehidnu skupinu na C1 atomu i dvije ili više hidroksilnih skupina – polihidroksialdehidi) ili kao ketoze (posjeduju keto skupinu na C2 atomu i dvije ili više hidroksilnih skupina – polihidroksiketoni). Prema broju ugljikovih atoma monosaharidi mogu biti aldotrioze, aldotetroze, aldopentoze, aldoheksoze, i, analogno ketotrioze, ketotetraoze, ketopentoze, ketoheksoze i slično; te na temelju konfiguracije na konfiguracijskom ugljikovom atomu (asimetrično supstituirani ugljikov atom – stereogeni centar, s najvišim rednim brojem) mogu biti D- ili L-izomeri, što se određuje na temelju konfiguracije referentnog spoja za koji je uzet D-(+)-gliceraldehid.

Monosaharidi u vodenim otopinama cikliziraju u piranozne (šesteročlane) ili furanozne (peteročlane) prstene jer je takva struktura energetski stabilnija od otvorenog lanca. Ciklizacija se odvija intramolekularnom adicijom hidroksilne skupine konfiguracijskog C-atoma na ugljikov atom funkcionalne karbonilne skupine pri čemu nastaju poluacetalni (spojevi koji na jedan ugljikov atom imaju vezan atom vodika, alkilnu skupinu, OH skupinu i OR skupinu) i poluketali (spojevi koji na jedan ugljikov atom imaju vezane dvije alkilne skupine, OH skupinu i OR skupinu), a novonastali stereogeni centar naziva se anomernim ugljikom. Viši ugljikohidrati nastaju povezivanjem istovjetnih ili različitih monosaharidnih jedinica O-glikozidnim vezama u takvom prstenastom obliku.

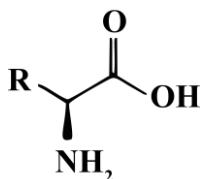
Disaharidi mogu biti reducirajući, ukoliko se dvije monosaharidne jedinice povežu O-glikozidnom vezom nastalom između anomerne OH skupine jedne i bilo koje OH skupine druge monosaharidne jedinice, i nereducirajući, ukoliko se dvije monosaharidne jedinice povežu O-glikozidnom vezom nastalom između anomernih OH skupina obje molekule.

Oligosaharidi se dijele obzirom na broj monosaharidnih jedinica povezanih O-glikozidnom vezom na trisaharide, tetrasaharide, pentasaharide itd.

Polisaharidi se dijele na homopolisaharide, koji su sastavljeni od velikog broja ponavljajućih istovjetnih monosaharidnih jedinica, i na heteropolisaharide, koji su sastavljeni od najmanje dviju različitih vrsta monosaharidnih jedinica koje se ponavljaju ili pravilno ili statistički. Prema ulozi polisaharidi mogu biti strukturni (osiguravaju mehaničku stabilnost stanice, organa i organizama), oni koji vežu vodu (sprječavaju isušivanje tkiva i stanica) i skladišni (pohranjuju energiju).

3 AMINOKISELINE I NJIHOV ZNAČAJ

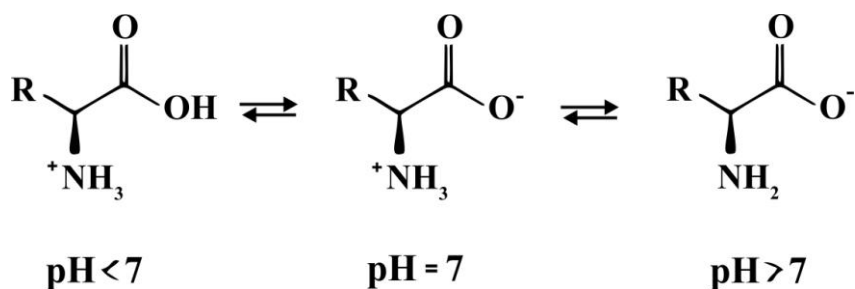
Aminokiseline su prirodni spojevi koji u prirodi rijetko dolaze u slobodnom stanju - uglavnom su međusobno povezane u makromolekule peptida i proteina. Poznato je preko 500 različitih aminokiselina, međutim termin *aminokiselina* se, unatoč velikoj raznolikosti, osim ako nije drugačije naglašeno, odnosi na α -aminokiseline. One sadrže asimetrični ugljikov atom na koji su vezane karboksilna i amino-skupina, vodikov atom i bočni ogranak uobičajene oznake R (slika 1) te se mogu podijeliti obzirom na veličinu, oblik, naboj, sposobnost stvaranja vodikovih veza, hidrofobnost i reaktivnost bočnog lanca na nepolarne (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, metionin i triptofan), polarne s nabijenim bočnim lancem (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, histidin, lizin i arginin) i polarne s nenabijenim bočnim lancem (cistein, serin, treonin, tirozin, asparagin i glutamin). Naravno, postoje i podjele prema drugim kriterijima, npr. kiselosti.



Slika 1. Općenita struktura α -aminokiseline.

Obzirom da posjeduju asimetrični ugljikov atom, aminokiseline mogu imati apsolutnu konfiguraciju S (*sinister*) ili R (*rectus*) koja se određuje prema CIP² pravilu i ovisi o smjeru opadanja prioriteta supstituenata C atoma, te relativnu konfiguraciju koja se određuje usporedbom s konfiguracijom referentnog spoja koji je, kao i kod ugljikohidrata, D-(+)-gliceraldehid. Reakcijom α -COOH skupine jedne i α -NH₂ skupine druge aminokiseline nastaju *peptidi*, a novonastala C-N veza naziva se *peptidnom vezom*. Proteini se sastoje od velikog broja aminokiselina povezanih peptidnim vezama, a izgrađeni su isključivo od L- α -aminokiselina, pri čemu gotovo svi L izomeri imaju S apsolutnu konfiguraciju.

Aminokiseline su u neutralnom mediju (fiziološki pH, oko 7) dominantno u obliku neutralnih dipolarnih iona koji se nazivaju *zwitter ioni* (slika 2), a sadrže protoniranu amino-skupinu (-NH₃⁺) i deprotoniranu karboksilnu skupinu (-COO⁻). Naboj ovih dviju skupina mijenja se s promjenom pH vrijednosti medija: pri niskim vrijednostima pH u otopini je dominantna protonirana amino-skupina (-NH₃⁺), a pri visokim pH vrijednostima deprotonirana karboksilna skupina (-COO⁻).³



Slika 2. Ionizacijski oblici aminokiselina u ovisnosti o pH vrijednosti medija.

pH vrijednost pri kojoj je koncentracija *zwitter iona* maksimalna, a koncentracije aniona i kationa jednake, naziva se *izoelektričnom točkom*, odnosno pI vrijednost, i ona je karakteristična za svaku pojedinu aminokiselinu. Izoelektrična točka je svojstvo na kojem se temelje elektroanalitičke metode odvajanja aminokiselina.

Kao sastavne jedinice proteina, aminokiseline čine drugu najučestaliju komponentu koja izgrađuje stanice, tkiva i mišiće, a mogu se podijeliti na esencijalne (one koje su nužne za funkcioniranje ljudskog organizma, ali se ne mogu u njemu sintetizirati već ih čovjek unosi prehranom) i neesencijalne. Proteine izgrađuje 20 standardnih aminokiselina koje se razlikuju u strukturi bočnog R lanca koji je vezan za α -ugljikov atom. Biološka uloga proteina u organizmu je višestruka: služe za prijenos i pohranu (mioglobin i hemoglobin), kao enzimi za katalizu pojedinih reakcija (kimotripsin, amilaza), sudjeluju u imunološkoj zaštiti (imunoglobulini), osiguravaju mehaničku čvrstoću (kolagen), stvaraju i provode živčane impulse, sudjeluju u kontroli ekspresije gena (represori, aktivatori).

I mnoge neproteinske aminokiseline, baš poput proteinskih, imaju važne uloge u tijelu. Na primjer, u ljudskom mozgu, glutamat (glutaminska kiselina) i gama-amino-maslačna kiselina (GABA) su aktivatori i inhibitori neurotransmitera; glicin se koristi za sintezu porfirina u crvenim krvnim stanicama, a karnitin za transport lipida.

Aminokiseline su preteče za sintezu glukoze, masnih kiselina i ketonskih tijela, te biološki važnih spojeva dušika kao što su hem, fiziološki aktivni amini, glutation, urea, nukleotidi i nukleotidni koenzimi, a ujedno su i izvor metaboličkog goriva. Zbog svoje biološke važnosti, neophodne su u prehrani i općenito se upotrebljavaju kao prehrambeni dodatci te gnojiva. Industrijske primjene uključuju proizvodnju lijekova, biorazgradive plastike i kiralnih katalizatora, a posebno važne u prehrambenoj industriji su glutaminska kiselina, koja se koristi kao pojačivač okusa, i aspartam (aspartil-fenilalanin-1-metil ester) kao oblik nisko kalorijskog umjetnog zaslađivača.

4 KROMATOGRAFIJA

4.1 OSNOVE KROMATOGRAFIJE

Kromatografija je opći pojam koji ujedinjuje razne tehnike fizikalno-kemijske separacije, od kojih je svima zajednička distribucija komponente između pokretne i nepokretne faze. Različite kromatografske tehnike podijeljene su u skladu s fizikalnim stanjem tih dviju faza.

Pojam kromatografija dolazi od grčkih riječi *chroma* i *graphein* za boju, odnosno pisanje, a prvi ga je put 1906. godine upotrijebio M. S. Cvet, ruski botaničar, koji se smatra i začetnikom ove tehnike. Cvet je provodio eksperimente na biljnim pigmentima sa ciljem razdvajanja klorofila i karotenoida u koloni, koristeći kalcijev karbonat kao adsorbens i smjesu petrolnog etera i etanola kao otapalo, a rezultati u obliku obojenih zapisa doveli su do specifičnog naziva koji je u upotrebi i dan danas.⁴

Općenito, kromatografija uključuje sve one tehnike u kojima se raznovrsne komponente u smjesi razdvajaju zbog razlike u brzinama migracije, odnosno zbog razlike u distribucijskom ponašanju između nepokretne i pokretne faze. U jednostavnim uvjetima, kretanje tvari u uzorku koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi je usporeno, jer one imaju tendenciju da provode više vremena u ovoj fazi. S druge strane, spojevi s relativno velikim afinitetom za pokretnu fazu putuju kroz sustav mnogo brže, što u konačnici rezultira odvajanjem različitih komponenata u smjesi.

Kromatografija danas postoji u toliko različitih oblika da je gotovo nemoguće dati sažetu, a opet sveobuhvatnu definiciju. Takva definicija treba objašnjavati da ono što se naziva pokretnom fazom može biti plin, tekućina ili superkritični fluid te da može sadržavati elektrolite i ostale modifikatore potrebne za proces razdvajanja. Isto tako treba obuhvatiti mnogobrojne oblike nepokretne faze: krutine, gelove, tekućine imobilizirane na krutim tvarima, premaze na stjenkama kapilara, pa čak i one slučajeve kod kojih se nepokretne faze uopće ne pojavljuju. Adekvatna definicija treba prenijeti ideje o različitim interakcijama ovih faza: u koloni, kao tanki sloj na ploči, kao papirnate trake suspendirane u rezervoaru otapala itd. Doista, izazov adekvatnog definiranja bilo koje od brojnih podvrsta kromatografije izrazito je velik - bolji pristup je da se umjesto toga razviju znanja i razumijevanje zajedničkih pojmova koji povezuju sve grane metodologije kromatografije.⁵

Kromatograf je analitički instrument za provođenje kromatografskih procesa. Kromatografski sustav čine pokretna i nepokretna faza te ispitivana tvar, *analit*, koja je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza.

Pokretna faza je solvent ili plin koji teče preko nosača; *nepokretna faza* je sloj ili prevlaka na nosaču koji stupa u interakciju s analitom; *nosač* je kruta površina na koju je vezana ili prevučena nepokretna faza.

Elucija je, u kontekstu kolonske kromatografije, proces ispiranja sastojaka koji prolaze kroz kolonu propuštanjem nove količine otapala. *Eluens* je otapalo koje ulazi u kolonu, a *eluat* je produkt elucije, pokretna faza koja izlazi iz kolone. *Gradijentna elucija* obuhvaća promjenu sastava pokretne faze tijekom kromatografskog procesa, a *izokratična* provedbu procesa uz konstantan sastav eluensa.

Kromatogram je grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka, odnosno zapis koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja.

Kromatografska zona, mrlja ili krivulja je, u praksi, niz signala koji nastaju kao posljedica različitih puteva kretanja čestica istog analita; u teoriji, dakle to je skup čestica (molekula, iona) neke tvari koje se uravnotežavaju između pokretne i nepokretne faze, dajući, u idealnim slučajevima Gaussov profil raspodjele na pokretnoj fazi. Parametar koji omogućuje kvalitativnu analizu je R_F vrijednost za plošnu kromatografiju (udaljenost koju je komponenta prešla od startne fronte otapala), a *vrijeme zadržavanja*, t_R , za kolonsku kromatografiju (vrijeme koje je komponenta provela u koloni). Kvantitativnu analizu omogućava površina ili visina kromatografske krivulje.⁶

4.2 PODJELA KROMATOGRFIJE

Kromatografske tehnike mogu biti klasificirane na osnovi prirode nepokretne faze na:

- i. Plošnu kromatografiju: nepokretna faza nanosena je na ravnu plohu ili u pore papira, pokretna faza prolazi kroz nepokretnu uslijed kapilarnih sila ili gravitacije; papirna kromatografija (PC) - filter papir se koristi kao nosač; tankoslojna kromatografija (TLC) - staklena ploča, plastična ploča ili komad metalne folije djeluje kao oslonac za nepokretnu fazu koja je primijenjena u obliku tankog sloja prevučenog na te materijale.
- ii. Kromatografiju na koloni: nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju se pokretna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije.

Podjela postoji i na temelju sastava pokretne faze odnosno njenom fizikalnom stanju na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Ovisno o fizikalnom stanju pokretne i nepokretne faze, kromatografske tehnike dijele se na: plinsko-tekućinsku kromatografiju, plinsko-čvrstu kromatografiju, tekućinsko-tekućinsku kromatografiju, tekućinsko-čvrstu kromatografiju.

Različite kromatografske tehnike također su klasificirane ovisno o silama ili interakciji između otopljenog uzorka i nepokretne faze:

- a. Razdjelna kromatografija: kod plinske kromatografije temelji se na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi;
- b. Adsorpcijska kromatografija: razdvajanje je temeljeno na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari koja čini nepokretnu fazu;
- c. Ionska izmjenjivačka kromatografija: različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni, pri čemu je nepokretna faza ionski izmjenjivač;
- d. Kromatografija isključenjem: do razdvajanja dolazi isključenjem zbog razlike u veličini, obliku ili naboju čestica uzorka;
- e. Afinitetna kromatografija: za mehanizam separacije se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganada nepokretne faze.⁷

4.3 IONSKA KROMATOGRFIJA

Naziv *ionska kromatografija*, IC, odnosi se na bilo koju od brojnih modernih metoda za kromatografsko odjeljivanje iona. Takva razdvajanja vrše se na koloni napunjenoj čvrstim ionskim izmjenjivačkim materijalom.⁸

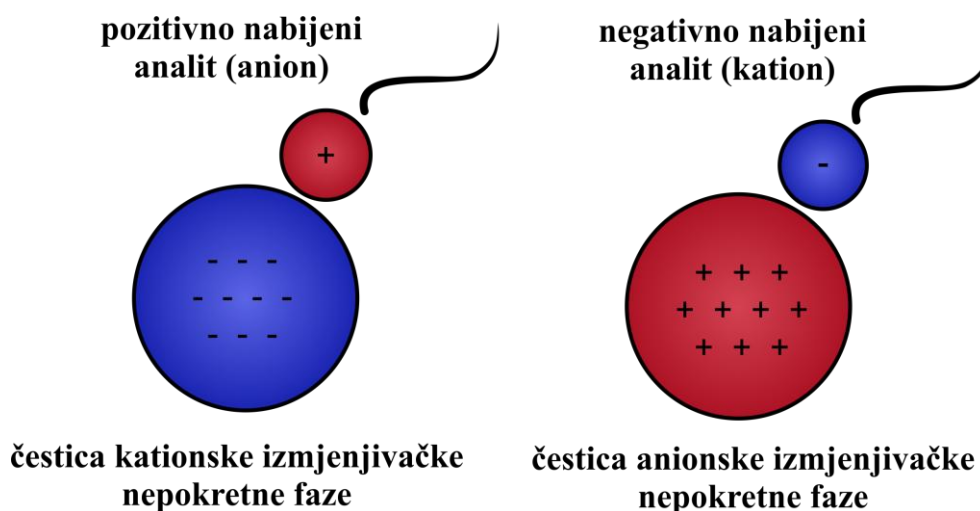
Ionska kromatografija se smatra nezamjenjivim alatom u modernom analitičkom laboratoriju. Složene smjese aniona i/ili kationa tom se metodom obično mogu brzo odijeliti i analizirati u relativno kratkom vremenu. Više koncentracije iona u uzorku mogu zahtijevati razrjeđenje uzorka prije uvođenja u instrument za provedbu ionske kromatografije, dok je granica kvantifikacije iona nekoliko ppb-a ($\mu\text{g/L}$). Iako se većinski koristi za separaciju i određivanje anorganskih i relativno malih organskih iona, veći organski anioni i kationi također se mogu odrediti.

Moderna ionska kromatografija je razvijena na čvrstim temeljima dugotrajnog rada i razvoja klasične ionske izmjenjivačke kromatografije. Veza između starije kromatografije s ionskom izmjenom i suvremene ionske kromatografije je slična onoj između izvorne tekućinske kromatografije (LC) i kasnije tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), u kojoj se koriste automatski detektori – rezultat je drastično poboljšanje učinkovitosti separacije.

4.3.1 Mehanizam ionske kromatografije

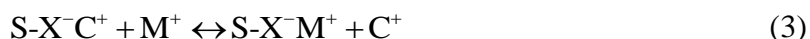
Kod ionske izmjenjivačke kromatografije pokretna faza je kapljevitna, a nepokretna faza je obično izrađena od inertnog organskog matriksa kemijski deriviranog ionizirajućim funkcionalnim skupinama (fiksirani ioni) koji nose pomične suprotno nabijene ione. Ioni koji postoje u stanju ravnoteže između pokretne i nepokretne faze nalaze se u jednom do dva moguća oblika, anioni ili kationi, i nazivaju se *protuionima*. Izmjenjivački matrični protuioni mogu uključivati protone (H^+), hidroksidne skupine (OH^-), jednovalentne atomske ione (Na^+ , K^+ , Cl^-), dvovalentne atomske ione (Ca^{2+} , Mg^{2+}), i poliatomske anorganske ione (SO_4^{2-} , PO_4^{3-}), kao i ione organskih baza (NR_2H^+) i kiseline (COO^-).

Kationi se razdvajaju na kolonama ispunjenim kationskim, a anioni na kolonama ispunjenim anionskim izmjenjivačkim smolama. Razdvajanja bazirana na vezanju analita na pozitivno ili negativno nabijene skupine koje se pričvršćuju na nepokretnu fazu i koje su u ravnoteži sa slobodnim protuionima u pokretnoj fazi odvijaju se prema razlikama u ukupnom površinskom naboju (slika 3).



Slika 3. Ionski izmjenjivači.

Pojednostavljenim općenitim jednažbama, proces kationskog izmjenjivačkog kromatografskog odjeljivanja može se prikazati kao:



U ovom se procesu kation eluensa M^{+} zamjenjuje kationom analita C^{+} koji se veže za negativni naboj X^{-} na površini nepokretne faze, gdje je slovo S oznaka za smolnu podlogu; odnosno za anionsku izmjenjivačku kromatografiju kao:



gdje se anion eluensa B^{-} zamjenjuje anionom analita A^{-} koji se veže na pozitivno nabijeni ion X^{+} na površini nepokretne faze.

Molekule se znatno razlikuju u svojim svojstvima i stoga pokazuju različite stupnjeve interakcije s nabijenom kromatografskom podlogom prema razlikama u ukupnom naboju, gustoći i distribuciji elektrostatskog naboja. Neto površinski naboj svih molekula s ioniziranim skupinama vrlo je ovisan o pH vrijednosti, stoga pH pokretne faze treba biti odabran tako da je ukupni naboj tvari od interesa u smjesi suprotan onome matričnih funkcionalnih skupina, čime se osigurava pojava istisnuća protuiona i dolazi do vezanja iona od interesa za matriks.

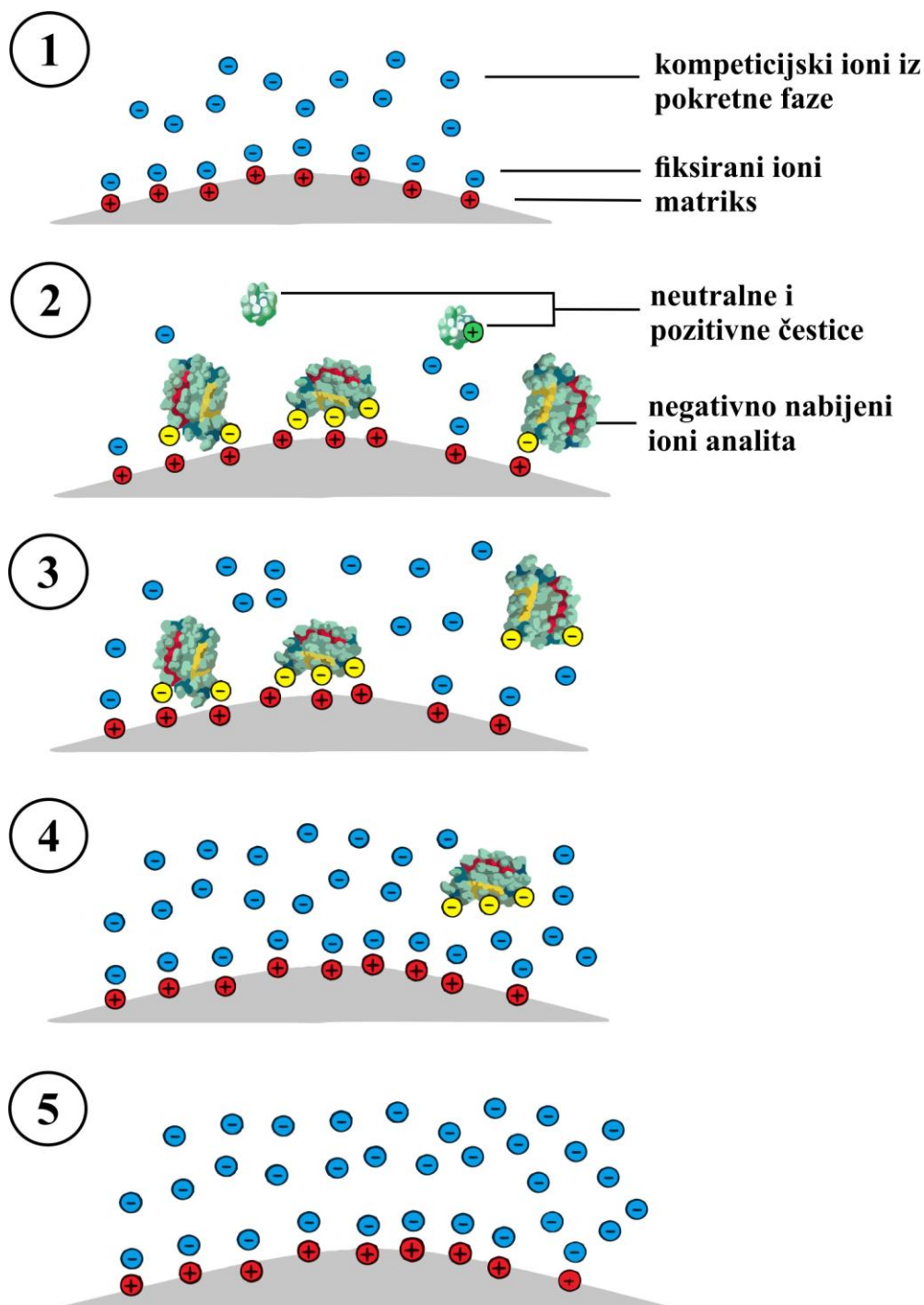
Adsorbirani analit može se eluirati promjenom pH vrijednosti pokretne faze jer dolazi do promjene neto naboja adsorbirane tvari, tako da njena sposobnost vezanja za nepokretnu fazu nestaje. Štoviše, povećanje koncentracije slično nabijenih čestica unutar pokretne faze može rezultirati ispiranjem vezanih komponenti analita.

Tijekom anionske izmjenjivačke kromatografije (slika 4), analit s negativnim nabojem može se zamijeniti dodatkom kompetitivnih negativno nabijenih iona. Pokretna faza ili sredstvo za ispiranje sadrži konkurentne ione te kontinuirano protječe kroz kolonu pod utjecajem gravitacije (slika 4-1).

Uzorak se nanosi na vrhu kolone i prolazi u korito ionskog izmjenjivačkog materijala; analit od interesa nosi negativni naboj i može se vezati za pozitivna mjesta na izmjenjivačkoj smoli, dok će neutralne i pozitivne čestice ostati nevezane u pokretnoj fazi (slika 4-2).

Sredstvo za ispiranje se potom kontinuirano propušta; frakcije se prikupljaju u pravilnim razmacima na izlazu iz kolone. Jakost vezanja aniona analita za nepokretnu fazu ovisit će o pH vrijednosti, ali i o ionskoj jakosti pokretne faze. Povećanjem ionske jakosti, primjerice dodavanjem disocirajuće soli, smanjiti će broj aniona analita koji su vezani za pozitivna mjesta (slika 4-3).

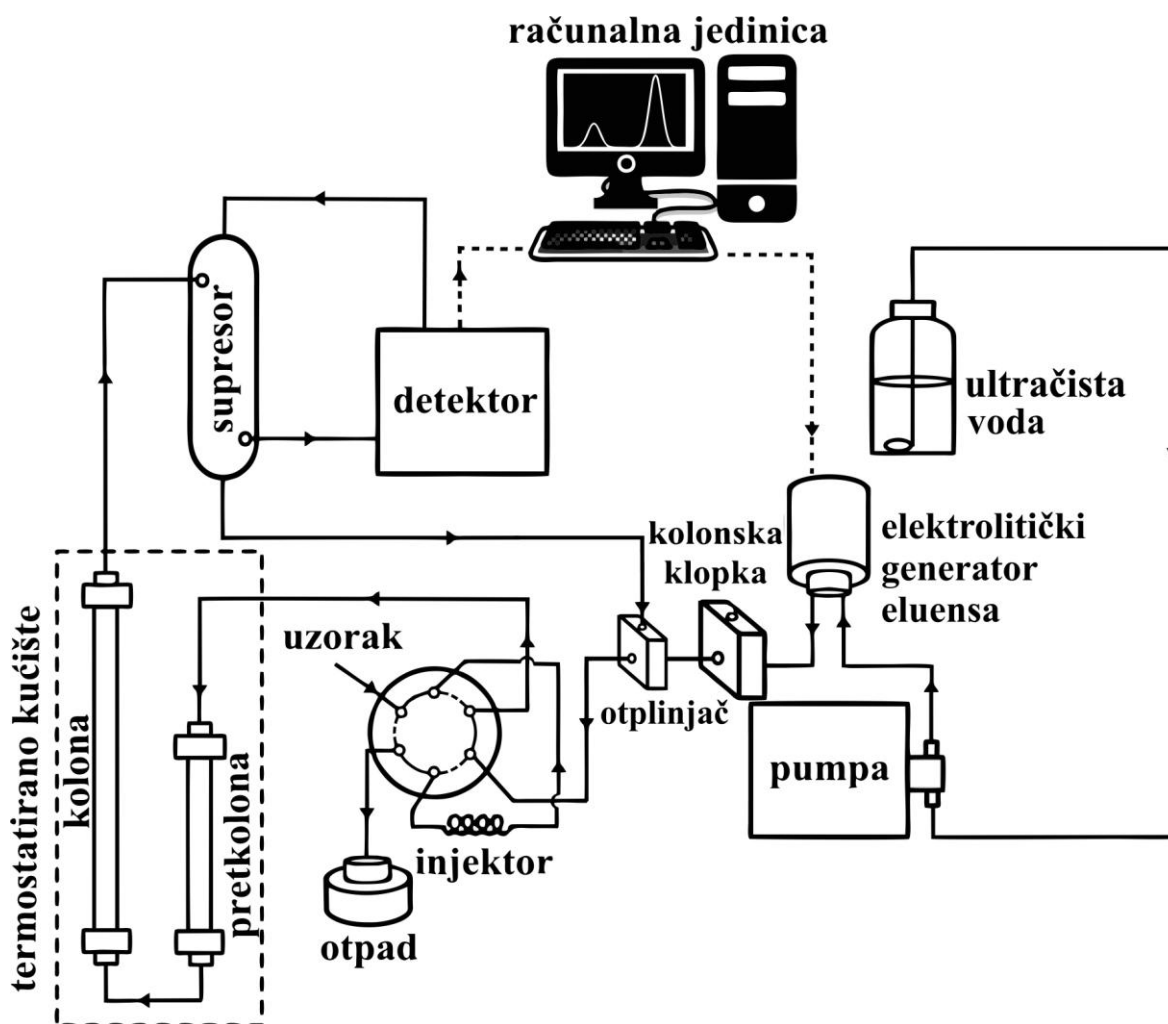
Afinitet interakcije između iona soli koja se dodaje i funkcionalnih skupina na kraju će onemogućiti postojanje interakcija između nabijenih čestica analita i funkcionalnih skupina, što rezultira ispiranjem i postupnim povećanjem koncentracije soli u pokretnoj fazi (slika 4-4). Naposljetku više neće biti vezanih aniona analita u izmjenjivačkoj koloni (slika 4-5).



Slika 4. Ionsko kromatografsko razdvajanje.

4.3.2 Ionski kromatografski sustav

Na Slici 5. prikazana je općenita shema ionskog kromatografskog sustava. Računalna jedinica elektrolitičkim putem generira eluens željene koncentracije prolaskom ultračiste vode koja se crpi iz spremnika visokotlačnom pumpom s prigušivačem pulsova i zatim potiskuje dalje kroz sustav.



Slika 5. Shema ionskog kromatografskog sustava.

Ako sustav sadrži jedinicu za generiranje eluensa u pravilu odmah nakon nje mora se nalaziti kolonska klopka koja uklanja smetajuće ionske vrste i reducira povećanje pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon kolonske klopke, iz eluensa se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi u otplinjaču. U injektorskoj jedinici dolazi do uvođenja uzorka u tok, koji struja pokretne faze nosi kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu unutar kojih dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka.

Pretkolona i kolona najčešće se nalaze u termostatiranom kućištu. Na izlasku iz kolone može se nalaziti supresor koji omogućava smanjenje pozadinskog šuma kao i pojačanje samog signala analita te detektor za mjerenje odziva (poglavlje 6.1). Signal detektora prikuplja se i obrađuje u računalnoj jedinici.

Analiti se kvalitativno i kvantitativno određuju pomoću sustava za detekciju. Svaki detektor opisuje se prema kriterijima osjetljivosti, linearnosti, razlučivosti (volumen detektorske ćelije) i šuma (granica detekcije).

4.3.3 Prednosti ionske kromatografije

Određivanje ionskih vrsta u otopini je klasičan analitički problem. Dok u području analize kationa postoji niz brzih i osjetljivih analitičkih metoda na raspolaganju (AAS, ICP, polarografija i druge), nedostatak odgovarajućih osjetljivih metoda za analizu aniona predstavlja izrazito veliki problem. Konvencionalne kemijske metode kao što su titracije, fotometrija, gravimetrija, turbidimetrija i kolorimetrija zahtijevaju naporan rad i mnogo vremena uz konstantne poteškoće. Nasuprot tome, kromatografija, pa time i IC, nudi superiornu brzinu, osjetljivost, selektivnost, simultano određivanje i stabilnost separacijskih kolona.⁹

5 PREGLED METODA ANALIZE UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA

5.1 METODE ANALIZE UGLJIKOHIDRATA

Kod kvalitativne i kvantitativne analize smjesa ugljikohidrata teškoće su sveprisutne uslijed strukturne i kemijske sličnosti većine tih spojeva, posebice stereoizomera. Dodatno, analiza je zahtjevna jer se radi o izrazito polarnim spojevima koji nemaju odgovarajuće kromofore. Specifičnost analitičkog postupka može se poboljšati razdvajanjem komponenata smjese kromatografskim tehnikama prije samog određivanja.

Brojne metode koje se koriste za određivanje ugljikohidrata temelje se na činjenici da su mnogi od njih redukcijaska sredstva koja mogu reagirati s drugim komponentama kako bi se dobio talog ili obojeni kompleks koji se može kvantificirati. Nereducirajući ugljikohidrati mogu se odrediti korištenjem istih metoda, ako su prethodno hidrolizirani kako bi postali reducenski.

5.1.1 Titracija

Lane-Eynon postupak¹⁰ je titracijska metoda za određivanje reducirajućih šećera u uzorku. Otopina uzorka dodaje se iz birete u kipuću vodenu otopinu koja sadrži poznatu količinu bakrovog sulfata i metilen-plavo indikator. Reducirajući šećeri reagiraju s bakrovim sulfatom. Kada sav bakrov sulfat prisutan u otopini izreagira, daljnje dodavanje reducirajućih šećera uzrokuje promjenu boje indikatora iz plave u bijelu. Prati se volumen otopine uzorka potreban za postizanje točke završetka titracije. Reakcija nije stehiometrijska, što znači da je potrebno pripremiti kalibracijske krivulje, što se postiže praćenjem točke završetka titracije s nizom standardnih otopina koje sadrže poznate koncentracije pojedinih ugljikohidrata.

Nedostaci ove metode su ovisnost rezultata o preciznom praćenju vremena reakcije, temperature i koncentracije reagensa koji se koriste i stoga ti parametri moraju biti pažljivo kontrolirani. Također, ne mogu se razlikovati različite vrste reducirajućih ugljikohidrata, ne može se izravno utvrditi koncentracija nereducirajućih ugljikohidrata, a i druge vrste molekula koje djeluju kao redukcijaska sredstva mogu izazvati značajne smetnje pri određivanju.

5.1.2 Gravimetrija

Metoda Munsona i Walkera primjer je gravimetrijske tehnike određivanja reducirajućih šećera u uzorku. Oksidacija ugljikohidrata u prisustvu topline i suviška bakrovog sulfata i tartarata pod strogo kontroliranim uvjetima uz alkalne vrijednosti pH dovodi do formiranja taloga bakrova oksida:



Količina taloga je izravno proporcionalna koncentraciji reducirajućih šećera u početnom uzorku i može se odrediti gravimetrijski (filtracijom, sušenjem i vaganjem) ili titrimetrijski (ponovnim otapanjem taloga i titracijom s prikladnim indikatorom). Ova metoda pati od istih nedostataka kao Lane-Eynon metoda (poglavlje 5.1.1.) no pokazuje veću ponovljivost i točnost.¹¹

5.1.3 Kolorimetrija

Anthroneova metoda

Ugljikohidrati reagiraju s Anthroneovim reagensom (10H-antracen-9-on) u kiselim uvjetima (konc. H₂SO₄), pri čemu se dobiva plavo-zeleno obojenje. Uzorak se pomiješa sa sumpornom kiselinom i Anthroneovim reagensom i zagrijava do završetka reakcije. Otopina se ohladi i mjeri se apsorbancija pri 620 nm. Odnos između apsorbancije i količine ugljikohidrata prisutne u izvornom uzorku je linearan. Ova metoda omogućuje određivanje i reducirajućih i nereducirajućih ugljikohidrata zbog prisutnosti jake oksidirajuće sumporne kiseline. Reakcija također nije stehiometrijska.^{12,13}

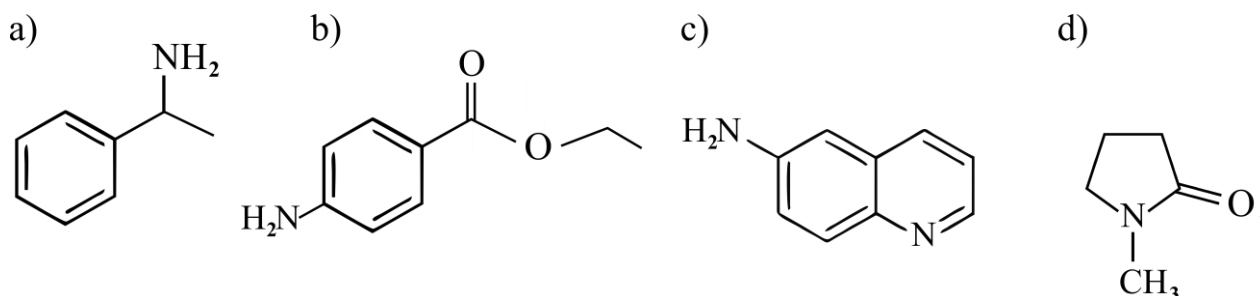
Metoda s fenolom i sumpornom kiselinom

Metoda s upotrebom fenola i sumporne kiseline se široko koristi za određivanje ukupne koncentracije ugljikohidrata u hrani. Bistroj vodenoj otopini uzorka koji se analizira dodaju se fenol i H₂SO₄. Otopina poprima žuto-narančastu boju, a apsorbancija pri 420 nm proporcionalna je koncentraciji ugljikohidrata u uzorku. Sumporna kiselina osigurava prevođenje svih nereducirajućih ugljikohidrata u reducirajuće, tako da ova metoda određuje ukupne ugljikohidrate. Postupak također nije stehiometrijski.^{14,15}

5.1.4 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska metoda kod koje dolazi do razdvajanja nabijenih čestica uslijed različitog djelovanja električnog polja na njihovu pokretljivost. Analiza ugljikohidrata CE metodom povlači za sobom određene poteškoće jer su oni većinom neutralni, ali polarni spojevi koji ne tvori kromofore. No, ugljikohidrati se razdvajaju bez potrebe za derivatizacijom i detektiraju izravnim ili neizravnim UV praćenjem pri 195 nm.¹⁶ Neizravnom detekcijom moguće je poboljšati nizak odziv te pri spomenutoj valnoj duljini detektirati fruktozu, glukozu, maltozu, maltotriozu, galaktozu, laktozu i saharozu.^{17,18}

Modifikacija strukture ugljikohidrata derivatizacijskim procesima može poboljšati osjetljivost i selektivnost CE razdvajanja. Među derivatizacijskim spojevima nalaze se (slika 6) feniletilamin (200 nm), 4-amino-etil ester benzojeve kiseline (306 nm), 6-aminokvinolon (245 nm), N-metil-2-pirolidinon (NMP) i slični spojevi.^{19,20} Granica detekcije se može spustiti do 1,1 ppb pomoću pufera boratne kiseline uz vrijednost pH 9,7.²¹



Slika 6. Strukture derivatizacijskih reagenasa za analizu ugljikohidrata UV detekcijom:
a) feniletilamina, b) 4-amino-etil estera benzojeve kiseline,
c) 6-aminokvinolina i d) N-metil-2-pirolidinona.

Iako ju je teško provesti, kombinacija CE-MS se također koristi. U ovom slučaju, hlapljive organske baze, kao što je dietilamin, kombinirane su s elektrosprejnom ionizacijom (ESI) čime se omogućava otkrivanje deprotoniranih ugljikohidrata: moguće je razdvojiti i kvantificirati 15 različitih ugljikohidrata uz granicu detekcije u rasponu 0,5-3,0 mg/L.²²⁻²⁴ I druge metode detekcije u kombinaciji s CE primjenjuju se za otkrivanje nederivatiziranih ugljikohidrata. To su, primjerice, metode elektrokemijske detekcije²⁵⁻²⁷ ili čak infracrvena spektrometrija Fourierovom transformacijom (FTIR).²⁸

5.1.5 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija, GC, se opsežno primjenjuje za određivanje ugljikohidrata u hrani. Obzirom na veliku raznolikost ugljikohidrata u pogledu strukture, veličine i funkcionalnosti te njihove niske hlapljivosti, GC se uglavnom primjenjuje za proučavanje mono-, di- i trisaharida.²⁹⁻³¹ Međutim, oligosaharidi stupanja polimerizacije do 7 uspješno se određuju uz temperaturno programiranje do maksimalno 360 °C.³² Trimetilsilil oksimi i eteri su najviše korišteni derivati za ovakvu analizu.^{33,34} Ipak, acilirani derivati su preferirani za otkrivanje blisko srodnih vrsta, kao što su aldohexoze (manoza, galaktoza, glukoza) ili šećerni alkoholi (manitol, galaktitola, sorbitol).³⁵

Općenito se za odvajanje šećera GC metodom koriste nepokretne faze od dimetil polisiloksana s određenim postotkom polarnih fenilnih skupina uz krajnje temperature u rasponu 300-320 °C. Od detektora najčešće je korišten plameni ionizirajući detektor (FID).³⁶ U novije vrijeme, raste upotreba masenih spektrometara koji pružaju nekoliko prednosti u odnosu na FID, a najvažnija je veća sigurnost u identifikaciji ugljikohidrata zahvaljujući određivanju molekularne mase i ponovljivosti fragmentacije.³⁷ Uobičajeni put se sastoji od korištenja oba postupka: GC-MS postupak za identifikaciju ugljikohidrata i GC-FID za njihovu kvantifikaciju.^{38,39}

Iako GC daje izvrsne rezultate, nedostatak mu je neizostavna priprema uzorka kao i mogućnost primjene samo za relativno male ugljikohidrate. Također postoji mogućnost gubitka uzorka, uglavnom zbog derivatizacije i/ili nepotpune hidrolize. Ostale tehnike, kao što su CE ili HPLC nemaju ovih ograničenja.

5.1.6 Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

HPLC je trenutno glavna analitička tehnika koja se koristi za analizu ugljikohidrata jer pruža znatne prednosti: iako je manje osjetljiva od GC, HPLC tehnika je brža, ne zahtjeva modifikaciju uzorka (osim za fotometrijsku detekciju), omogućuje analizu većih ugljikohidrata i svestranija je zahvaljujući različitim mehanizmima odvajanja i detektorima.

Kod kromatografije normalnih ili kromatografije reverznih faza prilikom analize ugljikohidrata veliku primjenu imaju sustavi s nepokretnom fazom sastavljenom od silikatnih čestica vezanih uz tri-aminopropilsilan. Ovaj poseban slučaj separacije normalne faze zove se *hidrofilna interakcijska tekućinska kromatografija (HILIC)*.⁴⁰

Kromatografija ionske izmjene se može provoditi pomoću anionske ili kationske smole. Posebno velik uspjeh u analizi ugljikohidrata pronašla je anionska izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti (HPAEC). Za razdvajanje se najčešće koriste kvarterne amonijeve smole u vrlo lužnatoj sredini jer omogućuju ionizaciju ugljikohidrata. Osim monosaharida i disaharida, ovom metodom se također mogu analizirati oligosaharidi, pa čak i polisaharidi.⁴¹ Različite metode razvijene su za određivanje u skladu sa stupnjem polimerizacije ugljikohidrata, ali analiza je moguća tek nakon hidrolize uzorka do jednostavnih monosaharida i disaharida.⁴²

Kationski metalni ioni, kao što su Ca^{2+} ili Ag^+ , također se koriste za izdvajanje mono- i oligosaharida iz različitih uzoraka.⁴³ Mehanizam se osniva na stvaranju slabih kompleksa između metalnih iona i hidroksilnih skupina ugljikohidrata. Ovaj postupak razdvajanja, koji se naziva *izmjenjivačka kromatografija liganda* (eng. *Ligand Exchange Chromatography*)^{44,45}, dopušta potpuno odvajanje monosaharidnih enantiomera kao što su glukoza, manoza ili galaktoza⁴⁶ te šećernih alkohola.⁴⁷ Međutim, kolone za izmjenjivačku kromatografiju liganada nisu izrazito robusne s obzirom da metali mogu biti isprani sa smole prilikom analize kompleksnih uzorak, a i razlučivanje oligosaharida je često neznatno uslijed slabije interakcije s metalnim ionima.

Vrlo često upotrebljavana tehnika je i kromatografija isključenjem po veličini (eng. *size-exclusion chromatography*, SEC). Temelji se na prodiranju tvari kroz smolu s određenom veličinom pora i strukturom. Polisaharidi kao velike molekule ne mogu prodrijeti u trodimenzionalnu mrežu unutar smole te se prvi ispiru iz kolone, dok monosaharidi prodiru lako, zadržavaju se u strukturi te će im stoga trebati više vremena za eluiranje.⁴⁸

Pri analizi ugljikohidrata tekućinskom kromatografijom parametar o kojemu ovisi priprema uzorka je i odabrana vrsta detekcije. Ako se upotrebljava fotometrijska detekcija (UV-VIS ili fluorescencija), potrebna je derivatizacija. Reakcije derivatizacije mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: prva se sastoji u uvođenju kromofora koji reagiraju s hidroksilnim skupinama, a druga uključuje reakciju karbonilnih skupina s aminima. Jedan od najvažnijih reagensa je 1-fenil-3-metil-5-pirazolon koji može reagirati s ugljikohidratima u blagim pH uvjetima bez uobičajenih zahtjeva kiselog katalizatora, čime se izbjegava degradacija i neželjena izomerizacija te omogućava osjetljivo praćenje UV apsorbancije na 245 nm.^{49,50} Drugi reagensi koji se koriste su p-nitrobenzoil klorid (260 nm) ili fenilizocijanat (240 nm).^{51,52}

Nastojanje izbjegavanja derivatizacije dovodi do upotrebe drugih detektora. Detekcija pomoću indeksa loma (RI) je široko korištena. Ovaj detektor nije selektivan, nekompatibilan je s gradijentom pokretne faze, niske je osjetljivosti za promjene koncentracija analita, a izrazito osjetljiv na promjenu brzine protoka i temperature. Ipak, ovaj detektor pruža mogućnost lake eliminacije signala pokretne faze i nije zahtjevan za održavanje.⁵³ Detektori raspršenja svjetlosti (eng. *Evaporative light scattering detector*, ELSD) također su korišteni kako bi se poboljšala osjetljivost. Idealni su za nehlapljive komponente, a podržavaju gradijent eluensa jer otapalo ispari neposredno prije detekcije.^{54,55} Dokazano je da se ovi detektori mogu upotrijebiti i s HPAEC metodom separacije ugljikohidrata.⁵⁶

Iako su ove dvije vrste detektora prihvatljive za mnoge aplikacije u analizi ugljikohidrata, najšire korištena je elektrokemijska metoda detekcije. Naime, pulsna amperometrijska detekcija (PAD) se smatra idealnom kod HPLC analize ugljikohidrata.⁵⁷ Koristi zlatnu elektrodu i radi bolje u lužnatom mediju, što ju čini vrlo pogodnim za analize uz HPAEC separacijske kolone. U analizi nederivatiziranih ugljikohidrata PAD pruža bolju osjetljivost od RI i fotometrijskih detektora uz granicu detekcije ispod 10 ppb.⁵⁸

Spajanje MS detektora s HPLC kolonama također je sve prisutnije. Korištenje HPLC-MS za analizu ugljikohidrata ima nekoliko prednosti: može potvrditi identifikaciju saharida i koristiti se u određivanju nepoznatih ugljikohidrata te smanjuje vrijeme potrebno za izolaciju i čišćenje. Ovo spajanje nije lako obzirom na tehnološku nekompatibilnost alkalnih uvjeta, isparavanja i ionizacije. Soli inhibiraju ispravno formiranje iona zbog svoje niske hlapljivosti. Stoga je nužno upotrijebiti uređaj za destiliranje između kolone i detektora ESI-MS. Upotrebom kvadrupolnih analizatora moguće je određivanje ugljikohidrata visokih molekularnih masa (> 2000 Da).⁵⁹ HPLC se također može kombinirati s masenom spektrometrijom izotopa (IRM); ova tehnika može mjeriti udio ¹³C atoma u šećerima.⁶⁰

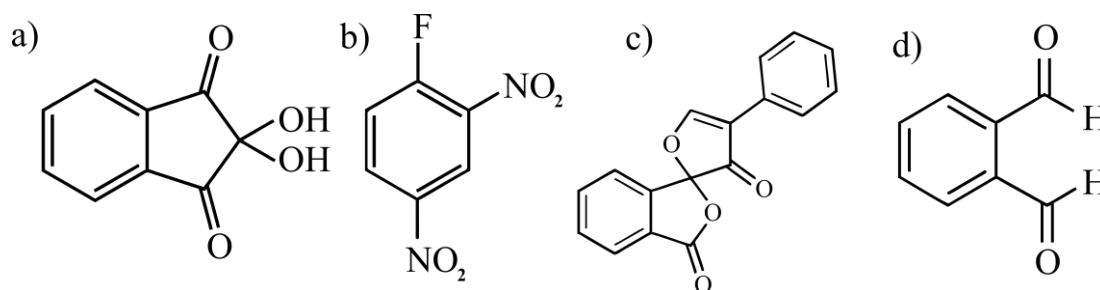
U manjoj mjeri koristi se HPLC uz FTIR.⁶¹ Atomska emisijska spektrometrija induktivne plazme (ICPAES) također može biti povezana kao detektor ugljika.⁶²

5.2 METODE ANALIZE AMINOKISELINA

Postoji više metoda kvantitativnog određivanja aminokiselina no one u pravilu daju samo informacije o ukupnom sadržaju aminokiselina i nisu u stanju razlikovati pojedinačne aminokiseline. Za određivanje pojedinih aminokiselina teoretski bi trebalo koristiti postupak koji omogućava korištenje kemijskih ili fizikalnih svojstava specifičnih za analiziranu aminokiselinu.

U praksi je to obično teško postići i metode uglavnom pokazuju promjenjive razine specifičnosti.

Najkorisnije i najčešće upotrebljavane metode uključuju razdvajanje različitih aminokiselina prikladnom kromatografskom ili elektroforetskom tehnikom, nakon čega slijedi kvalitativno ili kvantitativno određivanje svake komponente pomoću jednog od općih kolorimetrijskih ili fluorimetrijskih postupaka.⁶¹⁻⁶⁹ Budući da ne postoje aminokiselinski kromofori, ovim vidovima detekcije nužno prethodi odgovarajuća derivatizacija amino-skupina. Kao derivatizacijska sredstva poželjni su reagensi koji će veoma brzo dati produkt drugačijeg obojenja poput ninhidrina (1,2,3-indantrion monohidrat), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzola, fluorescamina i o-ftaldialdehida (OPA) (slika 7).



Slika 7. Strukture derivatizacijskih sredstava: **a)** ninhidrina (1,2,3-indantrion monohidrat), **b)** 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen, **c)** fluorescamina i **d)** o-ftaldialdehida (OPA).

5.2.1 Kolorimetrija

Najjednostavniji način za određivanje aminokiselina je reakcija s ninhidrinom. Ninhidrin reagira i s primarnim i sa sekundarnim aminokiselinama dajući ljubičasto obojeni produkt koji apsorbira u UV području. Reakcija zahtjeva toplinu, a potrebno je dodati i redukcijsko sredstvo (npr. natrijev borhidrid) za stabilizaciju boje⁷²⁻⁷⁴. Primarne aminokiseline se detektiraju pri 570 nm, dok je apsorpcijski maksimum sekundarnih na 440 nm. Ako se trebaju utvrditi i primarne i sekundarne, uobičajena je apsorpcijska valna duljina od 500 nm, međutim, dolazi do smanjene osjetljivosti mjerenja.

Sangerov reagens, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (slika 7b), također se upotrebljava za kolorimetrijsku detekciju aminokiselina⁷⁵. On reagira i s primarnim i sa sekundarnim aminokiselinama, a derivati se detektiraju pri 420 nm. Detekcija aminokiselina ovim reagensom moguća je pri nešto višim koncentracijama. Reagens također reagira s tiolima i alkoholima, ali nastali spojevi su relativno nestabilni pa ne predstavljaju smetnju pri određivanju aminokiselina.

5.2.2 Fluorimetrija

Fluorescamin reagens se koristi za osjetljivije određivanje aminokiselina fluorescentnom spektroskopijom obično pri tankoslojnoj kromatografiji (TLC)^{76,77}. Aminokiseline se detektiraju na temelju emisije svjetlosti duljine 470 nm uz prateću ekscitaciju pri 390 nm. Granice detekcije su u niskom rasponu 10^{-14} - 10^{-16} M.

OPA se također uspješno primjenjuje za detektiranje smjesa aminokiselina⁷⁸⁻⁸⁰. Reagira s primarnim aminokiselinama u prisutnosti merkaptetanola ili drugih tiola kako bi se proizveli visoko fluorescentni izoindolski derivati (valna duljina pobude 340 nm, a emisije 455 nm). Reakcija se odvija brzo pri sobnoj temperaturi.

5.2.3 Kapilarna elektroforeza

Činjenica da različite aminokiseline nose različit ukupni naboj pri određenim pH vrijednostima omogućava njihovu separaciju iz smjese korištenjem nisko ili visokonaponske elektroforeze⁸¹⁻⁸³. Separacija se brže postiže uz visoki napon, a budući da soli i slični spojevi koji mogu biti prisutni u uzorku sveukupno manje utječu na kvalitetu elektroferograma nego pri nižim naponima moguća je analiza uzoraka aminokiselina bez prethodne pripreme, za razliku od elektroforeze pri niskim naponima koja izričito zahtjeva uklanjanje interferirajućih supstanci koristeći, primjerice, kromatografske metode.

Premda separacija elektroforezom može biti provedena koristeći pufere širokog raspona pH vrijednosti, u praksi se uobičajeno koriste oni čija je pH vrijednost 2,0 ili 5,3^{84,85}. Pri pH 2,0, sve će aminokiseline nositi pozitivan naboj, dok će kod bazičnih aminokiselina taj naboj biti najviše pozitivan te će one najbrže putovati prema negativno nabijenoj katodi; pokretljivost, naravno, ovisi i o veličini i obliku molekula aminokiselina. Pri pH 5,3 migracija će se odvijati u smjeru obiju elektroda jer će različite aminokiseline nositi različiti naboj te su osobito korisne za razdvajanje kiselih od bazičnih aminokiselina.⁸⁶

Dvodimenzionalna tehnika⁸⁷ uključuje inicijalnu separaciju visokonaponskom elektroforozom pri pH 2,0 nakon koje slijedi kromatografija. Korisna je za razdvajanje sličnih aminokiselina i kraćih peptida te ne zahtjeva uklanjanje soli ili ekscesivno pročišćavanje uzorka⁸⁸.

5.2.4 Plošna kromatografija

Papirna je kromatografija još uvijek uvelike korištena metoda⁸⁹ unatoč činjenici da tankoslojna kromatografija, s već postojećim i lako dostupnim komercijalnim podlogama, nudi niz prednosti kao što su veća brzina i mogućnost naknadnog eluiranja pojedine aminokiseline za daljnje pročišćavanje i analizu. Prilikom identifikacije aminokiselina analiziranih papirnom kromatografijom poželjna je usporedba s aminokiselinskim standardom pri barem tri različita sastava otapala ne bi li se utvrdio identitet aminokiseline s određenom točnošću. Priroda prisutnih aminokiselina ključni je faktor pri odabiru otapala. Općenito, veći udio vode povećat će R_F vrijednosti svih aminokiselina, a unos male količine amonijaka povećat će R_F vrijednost bazičnih aminokiselina. Locirajući reagensi (reagensi koji se koriste za vizualizaciju) mogu se primijeniti nanošenjem u obliku sprejanja ili umakanjem.

Kod tankoslojne kromatografije kao nosač koriste se papir, silikagel i celuloza. Točke se obično detektiraju prskanjem ploče s otopinom 0,1% ninhidrina otopljenog u acetonu uz desetminutno zagrijavanje pri 1051 °C. Alternativna metoda razvoja je korištenje ninhidrina koji sadrži kadmij acetat. Kvantifikacija skeniranjem denzitometrijom je također moguća.⁸⁹

Mogućnost razdvajanja papirnom i tankoslojnom kromatografijom može biti povećana ukoliko se koriste dvodimenzionalne tehnike. Kombinacija TLC i elektroforeze poboljšava razdvajanje aminokiselina.⁹¹

5.2.5 Plinska kromatografija

Aminokiseline same po sebi nisu dovoljno hlapive za plinsko-tekućinsku kromatografiju pa je potrebna derivatizacija^{92,93}. Najveći problem je nedostatak kolona čija će razlučivost biti dovoljno dobra za razdvajanje derivata toliko raznolike skupine spojeva. Razvoj kapilarnih kolona s kondenziranim silikatnim materijalom znatno je unaprijedilo taj nedostatak.⁹⁴ Još jedna mana je izbor kompaktnog detektora: često je potrebno podijeliti plinsku fazu u dva dijela i za svaki dio koristiti drugačiji detektor.

Plameni ionizacijski detektor, koji je najčešće korišten, nije specifičan samo za aminokiseline te će detektirati i druge komponente uzorka, osim kada je prije derivatizacije jako dobro pročišćen.⁹⁵ Također, relativni odziv detektora varira za svaku aminokiselinu pa je potrebno imati kalibracijske krivulje.

5.2.6 Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Dvije su mogućnosti analize aminokiselina tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti:

- 1) pretkolonska derivatizacija aminokiselina i naknadno razdvajanje kromatografijom obrnutih faza;
- 2) razdvajanje na HPLC kolonama uz postkolonsku derivatizaciju aminokiselina.

Pretkolonska derivatizacija

U pretkolonskoj derivatizaciji aminokiseline se derivatiziraju prije injektiranja, a zatim se reakcijski produkti razdvoje na koloni i detektiraju. Prednosti ove metode su smanjena stopa potrošnje reagenasa odabirom malih reakcijskih sustava, omogućeno povećanje osjetljivosti korištenjem skupljih reagenasa koji daju niže pozadinske doprinose, a čak i ako ostane neizreagiranog reagensa za derivatizaciju, sve dok se on odvaja u koloni neće uzrokovati probleme. S druge strane, nedostatak je što se reagens izravno miješa s uzorkom te na učinkovitost reakcije lako utječe matrica uzorka. Stoga se pretkolonska derivatizacija može smatrati prikladnom za ograničenu paletu uzoraka. Najčešće korišteni reagensi su OPA, fenil-izotiocijanat, fluorescamin i denzil klorid. U mnogim slučajevima, kromatografija obrnutih faza koristi se za odvajanje reakcijskih produkata, koja je unatoč tome što nije dobro prilagođena za odvajanje visoko hidrofilnih tvari poput aminokiselina, moguća zbog derivatizacije hidrofobnim funkcionalnim skupinama uzoraka prije uvođenja u kolonu.

Postkolonska derivatizacija

Postupak postkolonske derivatizacije uključuje odvajanje aminokiselina u koloni i miješanje s derivatizacijskim reagensom prije nego aminokiseline dopiju do detektora. Prednosti ove metode su što može biti automatizirana, nudi izvrsne kvantitativne performanse i odličnu ponovljivost, a budući da se komponente odvoje prije derivatizacije, na reakcijsku učinkovitost matrica ima znatno manji učinak, što pak omogućava korištenje metode za širok spektar uzoraka. Nasuprot tome, nedostaci uključuju poteškoće u povećanju osjetljivosti i visoku potrošnju reagenasa koji stalno teče pa je ograničena u smislu da ne smije dopuštati detekciju neizreagiranog reagensa. Trenutno postoje dvije vrste reagenasa za uporabu: ninhidrin i o-ftaldialdehid. Prvi se koristi pri kolorimetrijskoj, a drugi fluorescentnoj detekciji.

6 IC ANALIZA UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA

6.1 IC DETEKTORI ZA ANALIZU UGLJIKOHIDRATA I AMINOKISELINA

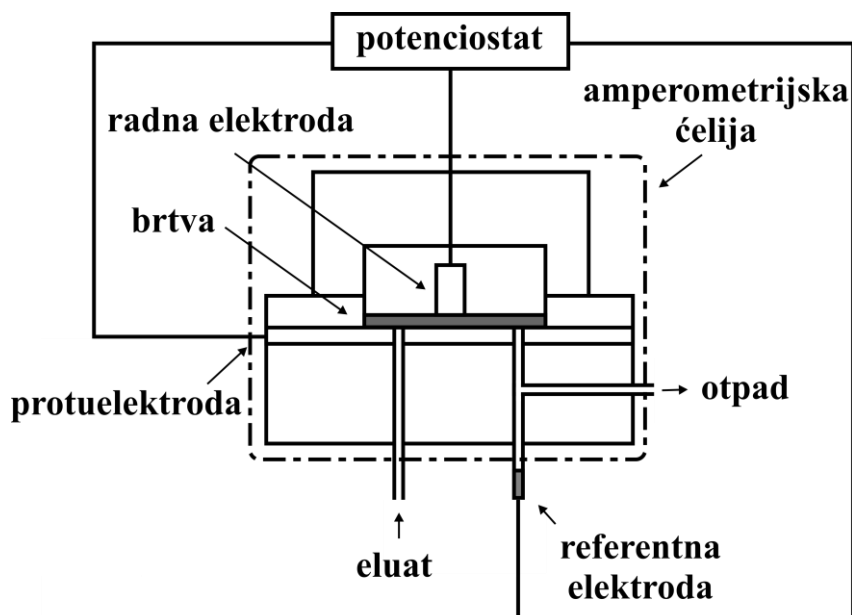
Kao i kod drugih LC tehnika, za detekciju ugljikohidrata i aminokiselina koriste se UV/Vis, fluorometrijski, amperometrijski i maseni detektori. Neovisno o vrsti detekcije svaki dobar detektor mora pokazivati nisku razinu šuma i povlačenja signala, visoku osjetljivost, brz odziv, široko linearno dinamičko područje, mali mrtvi volumen, dizajn protočnih ćelija koji će sprječavati ponovno miješanje separiranih analita, neosjetljivost na promjenu vrste otapala, protoka i temperature, jednostavno i pouzdano rukovanje, mogućnost optimizacije za različite spojeve, nedestruktivnost obzirom na uzorak.

6.1.1 Amperometrijska detekcija

Amperometrija je elektrokemijska metoda detekcije pri kojoj je jakost struje direktno proporcionalna koncentraciji određivane tvari koja generira struju.

Amperometrijska detekcija može biti pulsna, integrirana ili 3D i uglavnom se koristi za detekciju aminokiselina, amina i drugih organskih komponenti. Općenito služi za analizu otopina tvari s pK vrijednostima iznad 7, koje se, zahvaljujući maloj disocijaciji, teško ili gotovo nikako ne mogu detektirati konduktometrijski.

Konvencionalni amperometrijski detektori koriste troelektrodnu detektorsku ćeliju koja se sastoji od radne elektrode, referentne elektrode i protuelektrode (slika 8). Između referentne i radne elektrode uspostavi se razlika potencijala, uslijed čega na površini radne elektrode dolazi do redoks reakcije. Struja elektrona (*Faradayjeva struja*), koja nastaje kao produkt redoks reakcije, uravnotežuje se sa strujom koja teče u suprotnom smjeru na protuelektrodi. Jakost struje elektrokemijske reakcije čini signal detektora, a potencijal izmjeren na referentnoj elektrodi služi za korekciju uspostavljene razlike potencijala. U ovisnosti o kemijskim i elektrokemijskim svojstvima analita primjenjuju se različite radne i protuelektrode, kao i različiti radni potencijali.⁹⁷



Slika 8. Amperometrijski detektor.

Pulsna amperometrijska detekcija

Povijesno gledano, amperometrija je bila slabo poznata metoda koja je glasila za točnu, preciznu, i specifičnu tehniku određivanja. Specifičnost proizlazi iz činjenice da samo neki spojevi prolaze redoks reakcije pod uvjetima određenim pH vrijednošću medija i naponom izvora. Ostali spojevi neće dati odgovor ili će pod spomenutim uvjetima reagirati toliko slabo da neće ometati izvorni analit.

Prije je problem stvarala površina radne elektrode koju je, uslijed oksidacije ili redukcije spojeva, trebalo podvrgavati čišćenju. Mehaničko čišćenje stvaralo je varijacije u iznosu površine. Osim toga, prilikom dugotrajnih i učestalih analiza, površina je bivala sve više istrošena pa je odgovor analita postajao smanjen, što je rezultiralo lošim mjerenjima.

Danas se koriste zlatne radne elektrode koje se čiste *valnim oblikom* napona. Valni oblik je niz različitih naponskih vrijednosti koji se u velikom broju koraka primjenjuju na radnoj elektrodi za detekciju analita, čišćenje elektrode, i ujednačavanje površine. Cijeli proces traje nekoliko milisekundi. Konstantno čišćenje i detektiranje naziva se *pulsiranje*, a proces je poznat kao pulsna amperometrijska detekcija (PAD). Pulsiranje valnog oblika osigurava da je površina uvijek čista, a rezultati ponovljivi. Budući da čišćenje skida gornji sloj atoma, jednokratna elektroda mora biti zamijenjena otprilike svaka dva tjedna.⁹⁸

Integrirana pulsna amperometrijska detekcija, IPAD

Integrirana pulsna amperometrijska detekcija (IPAD) je novija varijanta pulsne amperometrijske detekcije, a izrazito je korisna za amine i spojeve koji sadrže sumpor jer je njihova oksidacija na metalnim elektrodama katalizirana formiranjem metalnih oksida.⁹⁹ Dok se kod PAD-a jakost struje mjeri nakon pulsa i kratke stanke kako bi se omogućilo da struja punjenja padne, kod IPAD-a struja se integrira kontinuirano tijekom cijelog ciklusa u kojem se elektroda oksidira, a zatim i tijekom ciklusa u kojem se elektroda oksidira pa zatim reducira natrag u izvorno stanje. Prednost IPAD-a je da je, oduzimanjem naboja od formiranja oksida i redukcije, utjecaj na baznu liniju značajno smanjen. Ima širok linearni raspon i vrlo nisku granicu detekcije. Najvažnija prednost IPAD metode je da ne zahtijeva derivatizaciju analita.

3D amperometrijska detekcija

3D amperometrija je jedna od najmodernijih amperometrijskih detekcijskih metoda pri kojoj se primijenjeni potencijal mijenja u prethodno određenom intervalu, a rezultat detekcije može se prikazati u trodimenzionalnom sustavu: struja, potencijal, vrijeme zadržavanja. Pokazuje napredak naspram konvencionalne amperometrije jer omogućuje kontinuirano protjecanje struje u cijelom valnom periodu, a ne samo za vrijeme predefiniranog razdoblja unutar vala kada je struja integrirana. Kompletan set podataka omogućuje, između ostalog, postkromatografsko integriranje struje. Budući da različiti kemijski spojevi oksidiraju različito pri određenim vrijednostima napona, suptilne razlike u količini struje generirane preko valova mogu pružiti dodatne informacije o identitetu i čistoći tvari koja se analizira. Te razlike mogu se odrediti uspoređivanjem površina signala koji su dobiveni kao integrali kroz različite vremenske periode unutar oblika vala. Odnos tih vršnih područja pruža prikladan analitički pristup za uspoređivanje identiteta između nepoznatih i standardnih signala. Slično tome, mjera za čistoću je opseg odstupanja od omjera određenih za standarde. Odnos 3D i konvencionalne amperometrije je na neki način sličan odnosu detekcije PDA i UV/VIS detektorom (vidi poglavlje 6.1.2).¹⁰⁰

6.1.2 UV/VIS detekcija

UV/VIS metode detekcije zasnivaju se na Lambert-Beerovom zakonu koji opisuje karakterističnu apsorbanciju upadnog snopa zračenja, A , u homogenoj sredini.

Zakon kaže da promjena intenziteta zračenja pri prolazu kroz neku otopinu ovisi o debljini prolaznog sloja analizirane otopine, b [cm], koncentraciji tvari koja je u stanju apsorbirati dio ulaznog zračenja, c [mol dm⁻³], te molarnom apsorpcijskom koeficijentu, ε [dm³ mol⁻¹ cm⁻¹], karakterističnom za pojedini medij:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = b \cdot c \cdot \varepsilon \quad (6)$$

Oznaka I_0 predstavlja intenzitet upadnog, a I intenzitet propuštenog zračenja. Sama metoda se zasniva na mjerenju apsorpcije elektromagnetskog zračenja u području valnih duljina od 190 do 800 nm. Kod molekula koje apsorbiraju UV/VIS zračenje određene valne duljine dolazi do pobuđivanja vanjskih, valentnih elektrona. Pri tome se gubi apsorbirani dio intenziteta zračenja, koji je proporcionalan količini tvari koja ga apsorbira.

Detektor s nizom dioda

Detektor s nizom dioda (engl. *Photo Diode Array Detector*, PDA) dodao je novu dimenziju IC analizama, prvenstveno iz razloga što omogućuje dobivanje dodatnih kvalitativnih informacija. Naime, u svakom trenutku elucije dobiva se cjelokupni snimljeni UV/VIS spektar, a ne samo apsorbancija pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije. U procesu mjerenja, polikromatsko zračenje prolazi kroz tekući uzorak gdje se odvijaju interakcije, a zatim se simultano mjeri apsorbancija pri svim valnim duljinama UV/VIS područja; svaka od dioda je zadužena za mjerenje apsorbancije pri određenoj valnoj duljini.

6.1.3 MS detekcija

Masena spektrometrija, MS, je analitička tehnika kojom se analizirani spoj ionizira, a nastali ioni se detektiraju ovisno o odnosu njihove mase, m , i naboja, z . MS detektor bilježi ili inducirani naboj ili struju nastalu uslijed prolaska nabijenih iona. Rezultat je maseni spektar – ovisnost udjela iona o odnosu m/z .

Maseni detektor sastoji se od tri glavne komponente: generatora iona (ionizatora), masenog analizatora koji filtrira ione i detektora koji ih otkriva. U kombinaciji s kromatografskim tehnikama, MS detekcija iznimno je korisno sredstvo određivanja pojedinih analita. Sastojci uzorka separiraju se kromatografijom prije nego dospiju do ionizatora i masenog analizatora gdje se odvijaju dva procesa: nastanak nabijenih molekula ili iona i pokretna faza se uklanja. Zatim se ioni ekstrahiraju iz ionizatora i prolaze do masenog analizatora gdje se filtriraju prema omjeru mase i naboja (m/z) prije same detekcije.

Masena spektrometrija dramatično poboljšava mogućnosti korištenja IC i osigurava povećanu moć otkrivanja koeluiranih komponentni, povećanu osjetljivost, preciznu kvantifikaciju i određivanje sastojaka u tragovima, evaluaciju čistoće komponenata na temelju signala i povećanu učinkovitost te poboljšanu razlučivost kompleksnih uzoraka, a osim toga nudi mogućnost određivanja molekularne mase detektiranih spojeva kao i dodatne informacije o strukturi.¹⁰¹

6.2 IONSKE KROMATOGRFSKE KOLONE

Anionske izmjenjivačke kolone

Anionske izmjenjivačke kolone koriste se i u preparativne i analitičke svrhe. Mogu služiti za separaciju širokog raspona spojeva, od anorganskih aniona, preko aminokiselina i nukleotida, do makromolekula kao što su proteini.

Smole anionskih izmjenjivačkih kolona kao aktivna mjesta najčešće sadrže alkilirana kvarterna aminska kationska mjesta, $-NR_3^+$, nastala, primjerice, reakcijom trimetilamina s polimerom nakon klorometilacije ili stiren-divinilbenzen kopolimera s dimetiletilaminom, koji su stabilni pri pH 2–12. Takve se smole nazivaju jakim anionskim smolama, pri čemu se termini 'jako', odnosno 'slabo', ne odnose na jakost vezanja aniona na funkcionalnu skupinu nego na činjenicu da su jake smole u potpunosti ionizirane u širokom rasponu pH vrijednosti. Kao slabe anionske izmjenjivačke smole koriste se one s manje supstituiranim amino-skupinama (primarni, sekundarni i tercijarni amini) koje su djelomično ionizirane pri pH 2–9.

Kationske izmjenjivačke kolone

Kationske izmjenjivačke kolone služe za odvajanje anorganskih kationa, kationa alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, alkilamina, alkanolamina i biogenih amina, uključujući metilamine, etilamine, diamine, etanolamine i alkanolamine, u različitim matricama uzorka.

Smole kationskih izmjenjivačkih kolona najčešće sadrže $-SO_3^-$ funkcionalna mjesta na koja se mogu vezati kationi analita ili protukationi iz eluensa. Afinitet smola sa sulfonatnim funkcionalnim skupinama ovisi o veličini i naboju kationa; općenito, afinitet raste prema velikim kationima visokih naboja. Smole sa sulfonatnom funkcionalnom skupinom su jake izmjenjivačke smole i stabilne su u pH-rasponu 4–13, dok su one s karboksilnom ili fosfatnom skupinom stabilne pri pH 6–10 i smatraju se slabim izmjenjivačkim smolama.

Ionske izmjenjivačke kolone za posebne primjene

Ionske izmjenjivačke kolone za posebne primjene korisne su za separacije kationa prijelaznih metala i viševalentnih aniona, uključujući polifosfate, polifosfonate, EDTA i NTA za koje se koristi postkolonska derivatizacija i UV/VIS detekcija.

Također, mogu služiti za analizu kelatnih tvari u složenim matricama uzorka, kao što su heksavalentni kationi kroma u prisutnost cijanida i sulfida pri čemu se koristi amperometrijska detekcija te kationi lantanoidnih metala u različitim matricama uzorka, uključujući uzorke vode visoke čistoće i uzorke industrijske vode. Prednosti ovih kolona su precizno i simultano određivanje, visoka osjetljivost i selektivnost u kombinaciji s postkolonskom derivatizacijom.

6.2.1 Kolone za analizu aminokiselina

Dionex AminoPac PA1

Dionex AminoPac PA1 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je anionska izmjenjivačka kolona velike brzine separacije, specijalizirana za analizu aminokiselina s OPA ili ninhidrinskom postkolonskom derivatizacijom. Separacije visokog razlučivanja rezultat su neporoznih čestica smole koja je stabilna u širokom rasponu pH od 0 do 14. Njezine snažne anionske izmjenjivačke značajke proizlaze iz aglomeracije mikročestica MicroBead (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) koje su funkcionalizirane sa kvarternim amonijevim skupinama, što je rezultiralo većim kapacitetom od uobičajenog za neporozne smole. Kolona je kompatibilna s do 5% uobičajenih organskih otapala, a preporučeni eluensi su hidroksidni, boratni i acetatni.

Dionex AminoPac PA1 kolona dobro je prilagođena za kisele i kiselo-labilne aminokiseline i parove aminokiselina koji se ne mogu u potpunosti odvojiti u kationskim izmjenjivačkim kolonama, a osobitu primjenu ima i u analizi fosforiliranih aminokiselina.¹⁰²

Dionex AminoPac PA10

Dionex AminoPac PA10 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je anionska izmjenjivačka kolona punjena hidrofobnom, polimernom, opnastom smolom stabilnom u rasponu pH 0–14. Jedinstvena pH stabilnost omogućava upotrebu eluensa koji pogoduju anodnim oksidacijama aminokiselina na zlatnim elektrodama i 100%-tno je kompatibilna s učestalo primjenjivanim organskim otapalima.

Najčešće se upotrebljava uparena s DionexAAA-DirectAmino Acid analizatorom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), sustavom koji omogućava izravno otkrivanje primarnih i sekundarnih aminokiselina bez potrebe derivatizacije.

Preporučuje za praćenje staničnih kultura i fermentacijskih medija te određivanje sastava aminokiselina u peptidima. Moguća je istovremena detekcija vitamina, aminošećera i ugljikohidrata s aminokiselinama. Dodatne mogućnosti uključuju odvajanje širokog raspona šećera, fosforiliranih aminokiselina i uobičajenih oksidacijskih proizvoda aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su cisteinska kiselina, metionin-sulfon, i metionin sulfoksid.¹⁰³

Metrosep Amino Acids 1 - 100/4.0

Metrosep Amino Acids 1 – 100/4.0 kolona (Methrom, AG, Herisau, SUI) je kationska izmjenjivačka kolona punjena smolom od sulfoniranog polistiren-divinilbenzenilnog kopolimera koja je stabilna u rasponu pH od 1 do 14. Određivanje aminokiselina pomoću ove kolone postiže se fotometrijskom detekcijom nakon postkolonske derivatizacije ninhidrinom. Najčešće se koristi uz citratni ili fenolatni eluens.¹⁰⁴

Shim-pack Amino-Na

Shim-pack Amino-Na kolona (Shimadzu, Kyoto, JPN) je kationska izmjenjivačka kolona koja sadrži čestice od poroznog polistirenskog gela sa sulfonskim funkcionalnim skupinama kao nepokretnu fazu uz učestalu upotrebu natrijeva hidroksida, natrijeva citrata i natrijeva citrata uz dodatak borne kiseline kao pokretne faze.

Standardne metode analize proteina na ovoj koloni zahtijevaju prethodnu hidrolizu proteina otopinom kloridne kiseline ili nekim drugim hidrolitičkim medijem. Ovom kolonom moguće je razdvojiti 17 aminokiselina: asparaginsku kiselinu, serin, treonin, glutaminsku kiselinu, prolin, glicin, alanin, cistein, valin, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin, histidin, lizin i arginin, kao i triptofan za čiju su analizu potrebni posebni uvjeti¹⁰⁵. Ako uzorak sadrži uglavnom ovih 17 aminokiselina, upotrebom ove kolone moguće je odrediti koncentracije slobodnih aminokiselina u hrani i farmaceutskim proizvodima. Međutim, ako uzorak sadrži veće koncentracije i drugih aminokiselina, preporuča se uporaba Li-tipa kolone jer neke nije moguće odvojiti na Na-tipu kolone. Za kvalitetno provedenu analizu potrebno je iz otopine ukloniti nehidrolizirane proteine.¹⁰⁵

Shim-pack Amino-Li

Shim-pack Amino-Li kolona (Shimadzu, Kyoto, JPN) je kationska izmjenjivačka kolona koja sadrži smolu čije su čestice od poroznog polistirenskog gela sa sulfonskim funkcionalnim skupinama. Najčešće korišteni eluensi pri radu s ovom kolonom su litijev hidroksid, litijev citrat i litijev citrat uz dodatak borne kiseline. Pokazala se iznimno korisnom ukoliko se provodi prederivatizacija analita.

Ova kolona imaju drugačiju selektivnost od Shim-pack Amino-Na kolone jer su protuioni na kojima se temelji ionska izmjena kationi litija što omogućuje istovremenu analizu aminokiselina i njihovih srodnih spojeva. Shim-pack Amino-Li kolona preporučuje se za analizu bioloških aminokiselina, a također se koristi za razdvajanje glutamina i glutaminske kiseline. Iako uvjeti Li-kolone značajno nadmašuju Na-tip u pogledu odvajanja aminokiselina, vrijeme analize je dulje.

Kromatografijom obrnutih faza mogu se razdvojiti određene vrste aminokiselina, ali ne i sve slobodne aminokiseline. Kombinacija prederivatizacije i kromatografije obrnutih faza na ovoj koloni omogućuje brzu analizu aminokiselina nastalih hidrolizom proteina.¹⁰⁵

6.2.2 Kolone za analizu ugljikohidrata

Dionex CarboPac PA1

Neporozne opnaste smole koje se koriste u Dionex CarboPac PA1, PA10 i PA100 kolonama osiguravaju veću učinkovitost nego makroporozne smole Dionex CarboPac MA1 kolone.

Dionex CarboPac PA1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je kolona namjenjena razdvajanju mono-, di- i oligosaharida pri visokim pH-vrijednostima mehanizmom anionske izmjene, u kombinaciji s PAD detekcijom. Ova kolona ima izrazito veliku moć razlučivanja pa se preporuča za analizu šećera u matricama hrane.

Jedinstvena MicroBead (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) opnasta struktura Dionex CarboPac PA1 anionske smole sa kvarternim amonijevim funkcionalnim skupinama pokazuje stabilnost u rasponu pH 0-14 te omogućava odličan prijenos tvari, što rezultira brzim uravnoteženjem kod gradijentnih elucija. Ova kolona ne zahtijeva derivatizaciju analita.¹⁰⁷

Dionex CarboPac MA1

Dionex CarboPac MA1 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je anionska izmjenjivačka kolona često korištena za analizu šećernih alkohola pri čemu ne zahtijeva derivatizaciju. Omogućava razdvajanje reducirajućih monosaharida i disaharida obično prisutnih u prehrambenim proizvodima, glikoproteinima i fiziološkim uzorcima. Također, primjena ove kolone omogućava postizanje visoke razlučivosti pri simultanoj analizi fukoze, N-acetil-(D)-glukozamina, N-acetil-galaktozamina, manoze, glukoze, galaktoze i neutralnih oligosaharida. Pruža i mogućnost analize neutralnih monosaharida oslobođenih djelovanjem egzoglukozidaze. Monosaharidi se uklanjaju iz kolone, što omogućuje neposrednu evaluaciju kontaminirajućih egzoglukozidaza.

Koristeći jednostavne hidroksidne eluense, Dionex CarboPac MA1 kolona odvaja analite izokratičnim ili gradijentnim eluiranjem. Niska stopa protoka osigurava malu potrošnju eluensa, a kao značajan ekonomski faktor valja spomenuti i dug životni vijek.

Zbog visokog kapaciteta, CarboPac MA1 kolona može se koristiti za određivanje mnogih drugih ugljikohidrata koji su slabo zadržani na opnastim kolonama za anionsku izmjenu, a uspješno odvaja i alditole često prisutne u prehrambenim proizvodima, fiziološkim tekućinama, tkivima i reduciranim glikokonjugatima saharida kao što su glicerol, arabitol, sorbitol, dulcitol i manitol.¹⁰⁸

Dionex CarboPac PA10

Dionex CarboPac PA10 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) anionska je izmjenjivačka kolona namijenjena za kvantifikaciju kiselih, neutralnih i amino-monosaharida bez derivatizacije te za odvajanje monosaharida i disaharida u uzorcima hrane, lijekova, biljaka i glikoproteina sisavaca. Iako je u prvom redu namijenjena izokratičnim elucijama, postoje i primjene u gradijentnom modu.¹⁰⁹

Kao punilo nalaze se neporozne kuglice prekrivene finim lateksom Dionex MicroBead smole (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Opnasta struktura smole omogućava odličan transfer mase, što rezultira visokim razlučivanjem i velikom brzinom uravnoteženja.¹¹⁰

Dionex CarboPac PA20

Dionex CarboPac PA20 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sastoji se od neporoznih čestica prekrivenih Dionex MicroBead smolom. Omogućava razdvajanje monosaharida i disaharida u visokoj razlučivosti, bez potrebe za derivatizacijom.

Osobito je zanimljiva kao kolona koja daje dobro razlučivanje između šest monosaharida uobičajenih u glikoproteinima sisavaca, a može se koristiti i za određivanje stupnja glikolizacije proteina. Karakterizira je visoka učinkovitost i brza analiza (do 10 minuta), niska potrošnja eluensa te nešto drugačija selektivnost od Dionex CarboPac PA1 ili PA10 kolona. U kombinaciji s AminoTrap kolonom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), CarboPac PA20 kolona najbolji je izbor za analizu sastava glikoproteinskih monosaharida jer omogućava eliminaciju smetajućih aminokiselina.¹¹¹

Dionex CarboPac PA100

Dionex CarboPac PA100 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je jaka anionska izmjenjivačka kolona visokog razlučivanja razvijena za poboljšanu kromatografsku analizu oligosaharida. Nepokretna faza se sastoji od neporoznih kuglica prekrivenih finim slojem Dionex MicroBead lateksa.

U usporedbi s CarboPac PA1 kolonama, unaprijeđena opnasta struktura smole nudi veću učinkovitost kod odvajanja neutralnih i anionskih smjesa oligosaharida. Na PA100 koloni moguća je i analiza veoma malih količina uzoraka (na pikomolskoj razini) bez potrebe za derivatizacijom, a nudi se i mogućnost istovremenog razdvajanja neutralnih i nabijenih oligosaharida, sličnih i izomernih oligosaharida kao i oligosaharida iz terapijskih glikoproteina u ovisnosti o veličini, naboju, razgranatosti i povezanosti.

Kromatografija na ovoj koloni zahtijeva sustave koji mogu podnositi visoke tlakove, a kao detektor koristi se PAD.¹¹²

Dionex CarboPac PA200

Dionex CarboPac PA200 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) je pH stabilna kolona visoke razlučivosti s kratkim vremenom razdvajanja, posebno razvijena za separaciju nabijenih i neutralnih oligosaharida. Punjena je hidrofobnom, polimernom, opnastom anionskom izmjenjivačkom smolom sa kvarternim amino funkcionalnim skupinama, stabilnom u rasponu pH 0–14 što omogućava upotrebu eluensa koji pogoduju anodnoj oksidaciji ugljikohidrata na zlatnim elektrodama. Ne zahtijeva derivatizaciju, razdvajanje je temeljeno na veličini, naboju, stupnju grananja i izomerizaciji analiziranih spojeva. Upotrebljava se za analize ugljikohidrata izdvojenih iz glikoproteina, uključujući monosaharide, disaharide, oligosaharide, polisaharide, šećerne kiseline, šećerne alkohole, šećerne fosfate i šećerne nukleotide, za određivanje biljnih šećera i njihovih derivata, transgalaktooligosaharida u uzorcima hrane te za ispitivanje stupnja glikolizacije polisaharida.¹¹³

Dionex CarboPac PA210-4 μ m

Dionex CarboPac PA210-4 μ m kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) anionska je kolona visoke učinkovitosti i rezolucije za odvajanje mono-, di-, tri-, tetra- i polisaharida te ne zahtijeva derivatizaciju. Sadrži hidrofobnu, polimernu, mikroporoznu anionsku smolu sa kvarternim amino funkcionalnim skupinama stabilnu u cijelom području pH. Čestice smole osiguravaju efikasnije separacije i točniju integraciju pikova uz pouzdanije rezultate.

Ova kolona omogućava izravnu kvantifikaciju nederivatiziranih šećera uključujući glukozu, galaktozu, fruktozu, saharozu, ramnozu, stahiozu, rafinozu, i verbaskozu ionskom kromatografijom s pulsnom amperometrijskom detekcijom.

Zbog generiranih tlakova pri uobičajenim brzinama protoka kromatografski sustavi u koje se implementira ova kolona trebali bi imati sposobnost rada do najmanje 5000 psi. Standardni IC sustavi, s gornjom granicom od 3000 psi, nisu dovoljni pa se preporuča upotreba Dionex High Pressure Ion Chromatography sustava (HPIC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).¹¹⁴

Dionex CarboPac SA10

Dionex CarboPac SA10 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) koristi se za analizu monosaharida i disaharida u uzorcima biogoriva, hrane i pića pri visokim vrijednostima pH. Jedinstvena makroporozna podloga obložena je snažnim anionskim izmjenjivačkim slojem nano-kuglica, stabilnim u cijelom pH području, a koji osigurava visoki kapacitet izmjene i brzu separaciju. Odlično razlučivanje i linearnost ove kolone omogućava vrlo preciznu kvantitativnu analizu ugljikohidrata.

Od specifičnih namjena treba istaknuti analizu šest šećera uobičajeno zastupljenih u uzorcima hrane, odnosno osam monosaharida i disaharida iz uzoraka biogoriva kroz manje od 10 minuta. Također, ova je kolona specijalizirana za analizu slabo ionizirajućih spojeva poput šećernih alkohola.

CarboPac SA10 kolona koristi se u kombinaciji s PAD detekcijom, pri čemu omogućava izravnu kvantifikaciju nederivatiziranih ugljikohidrata s minimalnom pripremom uzorka ili čišćenjem. Sposobna je za odvajanje širokog raspona koncentracija uzorka, a može izdržati tisuće ciklusa injektiranja ukoliko se zadovolje uvjeti visokog pH.¹¹⁶

Dionex CarboPac SA10-4 μ m

Dionex CarboPacSA10-4 μ m kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) omogućava 60 do 80% bolju učinkovitost od standardnih Dionex CarboPac SA10 kolona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a kao neposredan rezultat manje veličine čestica koje ju ispunjavaju.¹¹⁷

Metrosep Carb 2 - 100/4.0

Metrosep Carb 2-100 / 4.0 kolona (Methrom, AG, Herisau, SUI) je anionska izmjenjivačka kolona visokog kapaciteta punjena smolom stiren-divinilbenzenskog kopolimera uz kvarterne amino funkcionalne skupine. Posebno je prikladna za određivanje ugljikohidrata pomoću alkalnog eluensa uz PAD detekciju. Stabilna je u rasponu pH 0-14. Osigurava učinkovito odvajanje glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze, ali je prikladna i za analizu pojedinih šećernih alkohola i oligosaharida.

Preporučeni eluensi za korištenje s ovom kolonom su natrijev hidroksid i natrijev acetat.¹⁰⁴

Hamilton RCX-30 - 150/4.6

Hamilton RCX-30-150 / 4,6 IC kolona (Methrom, AG, Herisau, SUI) je anionska izmjenjivačka kolona na osnovi polistiren divinilbenzenske smole. Dizajnirana je za razdvajanje monosaharida, disaharida, oligosaharida i šećernih alkohola. Preporučeni eluens je natrijev hidroksid.¹⁰⁴

6.3 APLIKACIJE

6.3.1 Određivanje aminokiselina i ugljikohidrata u staničnim kulturama i fermentacijskim juhama

U posljednje vrijeme raste interes karakterizacije aminokiselina i njihovih metaboličkih nusprodukata u kompleksnim medijima poput staničnih kultura i fermentacijskih juha (sadrže hranjive i otpadne tvari, stanice, stanične ostatke...) gdje segmenti matrica utječu na konverziju i kvalitetu željenih produkata. Pri tome se javlja problem detekcije jer su aminokiseline uglavnom loši kromofori dok obično korištena UV detekcija zahtijeva izrazito visoke koncentracije analita.

Uz sve to, mnogi od sastojaka fermentacijskih juha i staničnih kultura su, za razliku od aminokiselina, odlični kromofori pa ometaju njihovu izravnu detekciju mjerenjem UV apsorpcije. Kako bi se ovaj problem zaobišao, u kompaniji Thermo Fisher Scientific razvili su pristup¹²² u kojem se aminokiseline, kao i neke druge biološke molekule (primjerice ugljikohidrati, glikoli, alkoholi, amini te spojevi koji sadržavaju sumpor) oksidiraju, čime je moguća njihova izravna detekcija amperometrijom. Amperometrijska detekcija odličan je odabir za selektivnu analizu tvari jer oksidira analit ostavljajući druge spojeve netaknutim.

Prilikom razvoja metode znanstvenici kompanije Thermo Fisher Scientific su za razdvajanje analita koristili anionsku izmjenjivačku kromatografiju (AE) uz AminoPac PA10 kolonu. Za složene uzorke, koji sadrže mješavine ugljikohidrata i aminokiselina, kao što su stanične kulture i fermentacijski uzorci, direktna integrirana pulsna amperometrijska detekcija (IPAD) omogućuje simultano određivanje ugljikohidrata, glikola, šećernih alkohola (alditoli) i aminokiselina, s malim smetnjama od strane drugih komponenata, pa je upravo stoga ona primijenjena kao detekcijska metoda nakon kromatografskog razdvajanja. Metode temeljene na predkolonskoj i postkolonskoj derivatizaciji često se koriste za procjenu sadržaja aminokiselina u uzorku, no ove tehnike pate od visokih troškova i nisu u stanju istovremeno analizirati i prisutne ugljikohidrate. IPAD detekcija može simultano pratiti sve uobičajene aminokiseline u staničnim kulturama i fermentacijskim juhama, ali uz prethodno razdvajanje uzoraka.

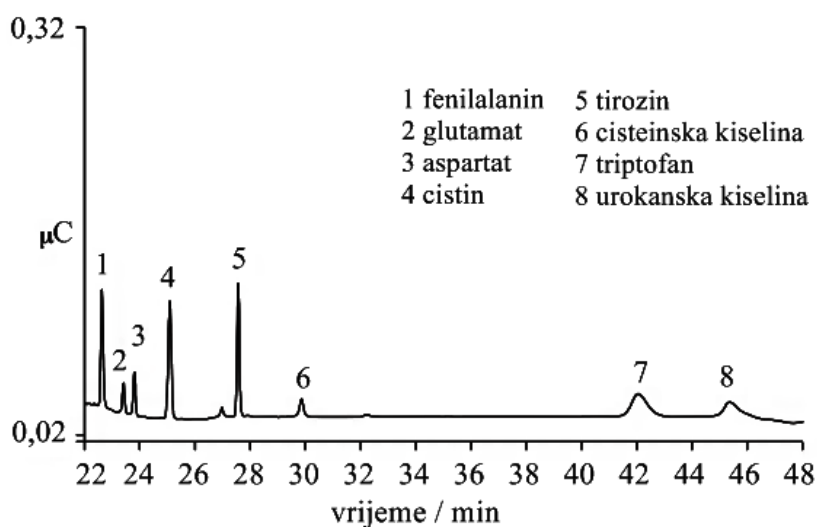
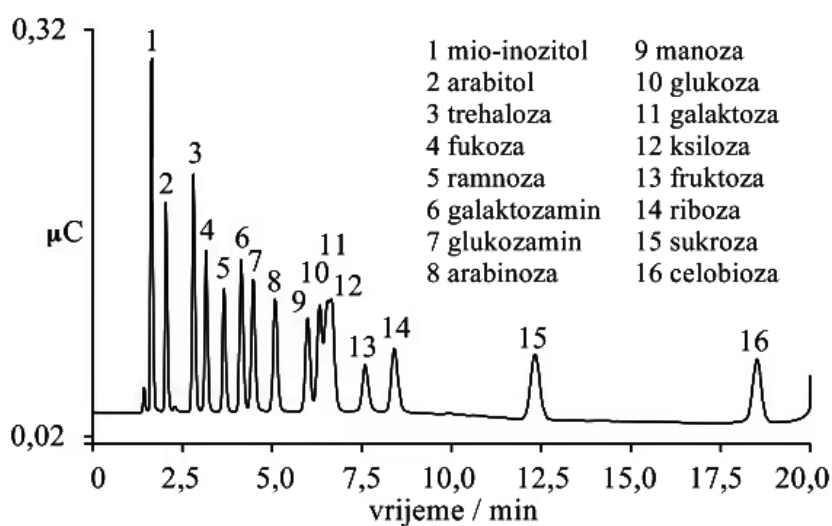
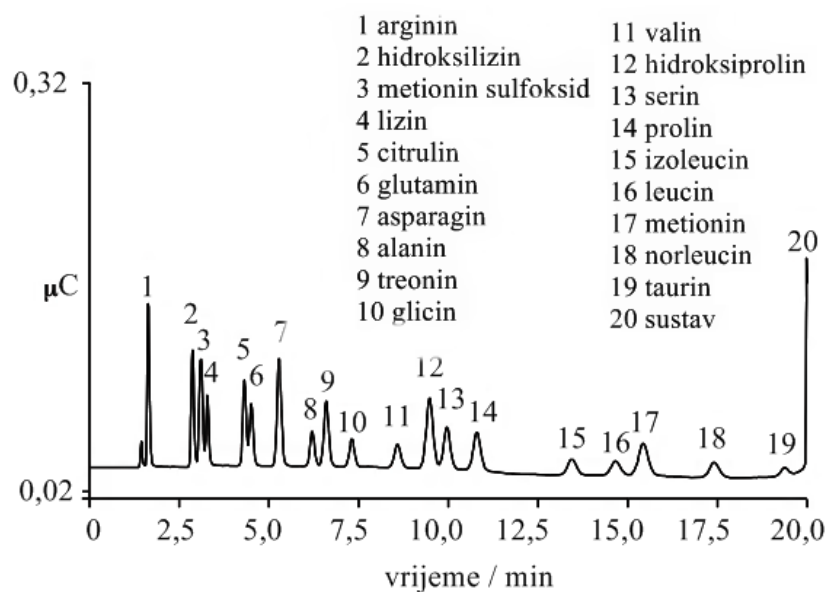
Razvijenu AE/IPAD metodu Thermovi znanstvenici predložili su za analizu uobičajenih aminokiselina u prisutnosti jednostavnih šećera, šećernih alkohola, alkohola i glikola u kvascu i bakterijskim fermentacijskim juhama. Kvašćevi ekstrakt-pepton-dekstrozni (YPD) mediji i tzv. Luria-Bertani (LB) mediji su česti za eukariotske i prokariotske stanične kulture. To su izrazito složeni mediji koji sadrže neke nedefinirane sastojke zbog čega predstavljaju veliki izazov za većinu kromatografskih metoda. YPD i LB mediji sadrže anorganske i organske anionske tvari koje su do sada analizirane razdvajanjem na IonPac AS11 anionskim izmjenjivačkim kolonama praćenim supresiranim konduktometrijskom detekcijom. Prisutni ugljikohidrati i alditoli razdvajani su pomoću CarboPac PA1 ili MA1 kolona. Thermovi znanstvenici predložili su, kao što je već prethodno spomenuto, da se za razdvajanje aminokiselina i ugljikohidrata iz staničnih kulturama i fermentacijskih juha upotrijebi AminoPac PA10 kolona.

Simultano određivanje ugljikohidrata i uobičajenih aminokiselina ovisi naravno o vrsti prisutnih ugljikohidrata, no ograničavajući se na ugljikohidrate najčešće prisutne u fermentacijskim juhama, ova metoda omogućuje simultanu analizu svih aminokiselina u prisutnosti ugljikohidrata. Kao radna elektroda koristi se zlatna elektroda u kombinaciji s Thermo Fisherovom pH-Ag/AgCl referentnom elektrodom (za ovu priliku korištenom u pH modu). Analiza se provodi koristeći promjenu potencijala (engl. *potential wave form*) navedenu u tablici 1. Eluiranje se provodi pri 30 °C koristeći gradijentno kombiniranje triju otopina:

- i. ultračista voda
- ii. 250 mM otopina NaOH
- iii. 1M otopina natrijeva acetata.

Tablica 1. Promjena potencijala korištena pri određivanju aminokiselina u fermentacijskim juhama i staničnim kulturama.

Vrijeme / s	Potencijal / V	Integracija
0,00	+0,13	
0,04	+0,13	
0,05	+0,33	
0,21	+0,33	<i>početak</i>
0,22	+0,55	
0,46	+0,55	
0,47	+0,33	
0,56	+0,33	<i>kraj</i>
0,57	-1,67	
0,58	-1,67	
0,59	+0,93	
0,60	+0,13	



Slika 9. Rezultati analize aminokiselina i ugljikohidrata u fermentacijskim juhama i staničnim kulturama.

6.3.2 Izravno određivanje slobodnih aminokiselina i šećera u zelenom čaju

Zeleni čaj ne samo da ima poseban okus i aromu već i brojne psihološke i funkcionalne učinke jer sadrži spojeve kao što su polifenoli, kofein, aminokiseline i ugljikohidrati. Od svih vrsta čajeva upravo zeleni čajevi imaju ukupno najveći sadržaj aminokiselina. Od prisutnih aminokiselina bitno je istaknuti slobodni (neproteinski) oblik teanina (5-N-etil-glutamin).

Brojni postupci analize aminokiselina u zelenom čaju temelje se na tekućinskoj kromatografiji s predkolonskom ili postkolonskom derivatizacijom^{118,119}. No ove metode pokazuju svoje nedostatke u relativnoj složenosti reakcijskog sustava, visokim troškovima održavanja kolone za derivatizaciju, niskoj stabilnosti derivata aminokiselina ili interferencijama derivatizacijskih reagensa. Dodatno, analize teanina provedene su i pomoću kapilarne elektroforeze¹²⁰ (CE) i micelarne elektrokinetičke kapilarne kromatografije¹²¹ (MECC) uz UV detekciju. Za teanin nedostaje pogodan kromofor i UV detekcija mora se provoditi pri kratkim valnim duljinama (190-200 nm), zbog čega ove metode imaju slabu osjetljivost te izražen utjecaj interferencija.

Kao novi pristup¹²³ u određivanju aminokiselina i ugljikohidrata Y. Ding i suradnici nedavno su opisali upotrebu ionske izmjenjivačke kromatografije s integriranom pulsnom amperometrijskom detekcijom (IPAD) bez primjene derivatizacije. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na AminoPac PA10 koloni. Želeći izbjeći međusobna koeluiranja, elucija se provodila gradijentno uz ternarni gradijent sastavljen od vode, 0,25 M otopine natrijeva hidroksida i 1,0 M natrijevog acetata. Gradijentni profil eluensa (tablica 2) mogao se podijeliti na tri dijela: prvi, tijekom kojeg se ispiranje provodilo isključivo hidroksidom, a bio je pogodan za eluciju slabo zadržanih aminokiselina, monosaharida i disaharida; drugi, uz gradijent natrijeva acetata što je uzrokovalo eluciju jače zadržanih aminokiselina (kao što su kisele i aromatske aminokiseline) te treći, u kojem se pokretna faza vraćala na početnu koncentraciju hidroksida, a što je služilo za ponovno uravnoteženje kolone prije idućeg injektiranja. Primijenjeni režim potencijala naveden je u tablici 1 i istovjetan prethodnoj aplikaciji. Prilikom detekcije korištena je zlatna radna i Ag/AgCl referentna elektroda.

Opaženo je kako pri višim koncentracijama NaOH ($c > 20$ mM) teanin koeluirao s glutaminom prije šećera, a pri NaOH ($c < 8$ mM), teanin je odvojen od glutamina i eluirao se nakon šećera. Ova promjena rezultat je različitih vrijednosti konstanti ionizacije kiselina ($pK_a(\text{šećera}) > 12$), pa je ionizacija šećera pri nižim koncentracijama NaOH potisnuta.

Taj efekt kompenzira utjecaj niže koncentracije NaOH na vremena zadržavanja šećera. S druge strane, ionizacija aminokiselina koje su imale relativno niske vrijednosti pK_a (osim arginina) nije se promijenila pri nižim koncentracijama NaOH. Tako je s nižom koncentracijom hidroksida vrijeme retencije aminokiselina povećano u odnosu na retenciju šećera. Osim toga, položaj saharoze također se mijenja u odnosu na druge šećere što se može objasniti činjenicom da disaharidi sadrže više hidroksilnih skupina od monosaharida. Kao rezultat, donja početna koncentracija NaOH je korisna za poboljšanje razlučivanja između teanina i glutamina, a također dolazi do učinka odvojene elucije šećera i neutralnih aminokiselina.

Općenito govoreći, aminokiseline u pratnji ugljikohidrata postoje u mnogim stvarnim uzorcima; njihova interferencija može se izbjeći samo ako su količine aminokiselina približno jednake onima šećera. Naime, uzorci koji sadrže veće količine ugljikohidrata i tragove aminokiselina (molarni omjer 50:1) nisu pogodni za spomenutu analizu, pa je potrebno iz uzorka ukloniti ugljikohidrate. Prikladnom se pokazala tehnika uklanjanja ugljikohidrata pomoću kationskog izmjenjivača u vodikovoj formi. Međutim, ova metoda ne predstavlja odgovarajuće rješenje za sve vrste uzoraka jer su i dalje prisutni problemi nemogućnosti kvantifikacije koeluiranih aminokiselina i ugljikohidrata.

Tablica 2. Gradijentni profil eluensa za određivanje aminokiselina i ugljikohidrata u uzorku zelenog čaja.

Vrijeme / min	$c(\text{NaOH}) / \text{mM}$	$c(\text{NaAc}) / \text{mM}$
0,00	5	-
8,00	5	-
16,00	60	-
18,00	80	-
22,00	60	-
30,00	60	40
40,00	60	40
40,10	200	-
42,10	200	-
42,20	5	-
67,00	5	-

6.3.3 Simultano određivanje aminokiselina i ugljikohidrata u kulturi *Clostridium thermocellum*

Lignoceluloza je najobilniji, jeftin i obnovljivi resurs na Zemlji. Stoga se veliki značaj poklanja istraživanju pretvorbe lignocelulozne biomase u regenerativno gorivo čime bi se možda riješio problem budućih energetske potreba. Mikroorganizmi, kao što su bakterije *Clostridium thermocellum*, mogu izravno pretvoriti celulozu u etanol kao gorivo pa imaju važnu vrijednost u području bioenergije. Za poboljšanje samog procesa, analize funkcije gena i optimizacije stanica takvog sustava, znanstvenici teže za kvantitativnim razumijevanjem metabolizma bakterija. Aminokiseline i šećeri su među najvažnijim metabolitima. Analizom promjena koncentracija aminokiselina i ugljikohidrata u mediju kulture različitih fenotipova *C. thermocellum* mogu se otkriti utjecaji okoliša i stanica na metaboličke procese. Dakle, točno i učinkovito određivanje aminokiselina i šećera je vrlo važno.

U radu Yun Fa i suradnika¹²⁴, također je opisana ionska izmjenjivačka kromatografija uz gradijentno eluiranje i IPAD detekciju bez postupka derivatizacije pri analizi aminokiselina i ugljikohidrata u sterilnim medijima i ekstracelularnim medijima kulture tri fenotipa *Clostridium thermocellum*. Dodatno kvalitetu analizi donijela je upotreba 10-ulaznog ventila i kolonske klopke za aminokiseline.

Svi postupci sustava provedeni su pomoću jednog ventila s 10 ulaza i tri pumpe međusobno povezane uskim poli-(eter-eter-eton) cijevnim sustavom (slika 10).

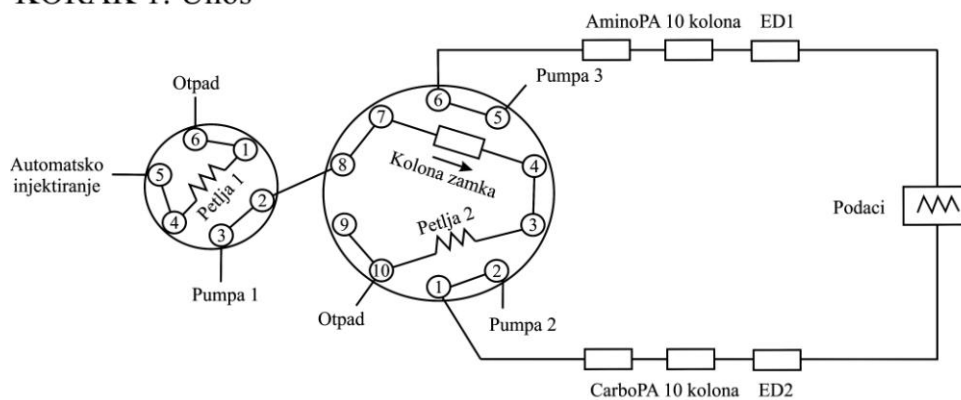
Korak 1 predstavlja unos uzorka, korak 2 je injektiranje aminokiselina i njihova ekstrakcija u koloni zamki te presretanje ugljikohidrata u petlji 2. Korak 3 je faza analiza u kojima se aminokiseline i ugljikohidrati eluiraju iz kolone zamke i petlje 2 u odvojene kolone za anionsku izmjenu i detektiraju. Korak 4 uključuje ponovno uravnoteženje otopine u koloni zamki te objema kolonama za anionsku izmjenu.

Za separaciju su korištene CarboPac PA10, odnosno AminoPac PA10 kolona s prethodećom kolonom zamkom. Korištena je zlatna radna elektroda dok je prilikom detekcije aminokiselina kao referentna elektroda korištena pH elektroda, a prilikom detekcije ugljikohidrata Ag/AgCl elektroda.

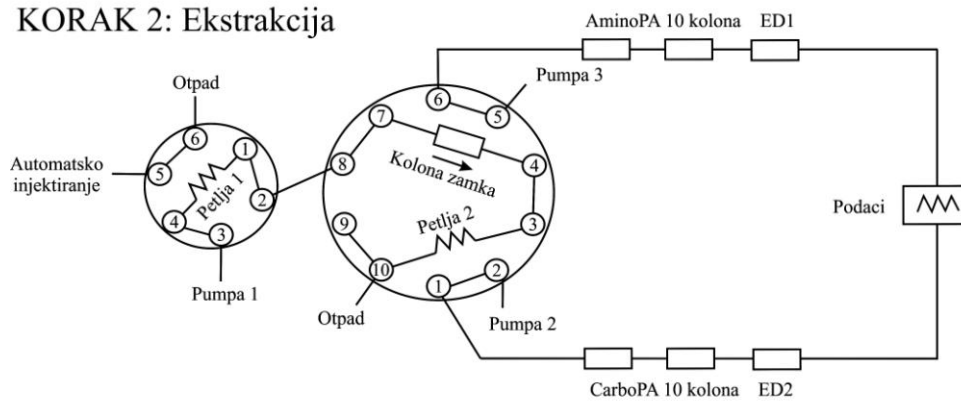
Elucijski gradijent kao i primijenjeni režimi potencijala za analize aminokiselina, odnosno ugljikohidrata prikazani su u tablicama (tablice 3 i 4).

Ovim pristupom uspješno je istovremeno analizirano 17 aminokiselina i 9 ugljikohidrata.

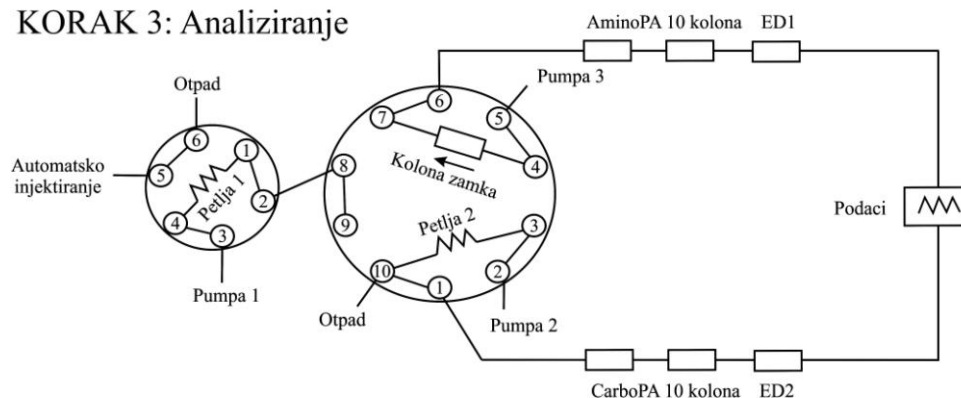
KORAK 1: Unos



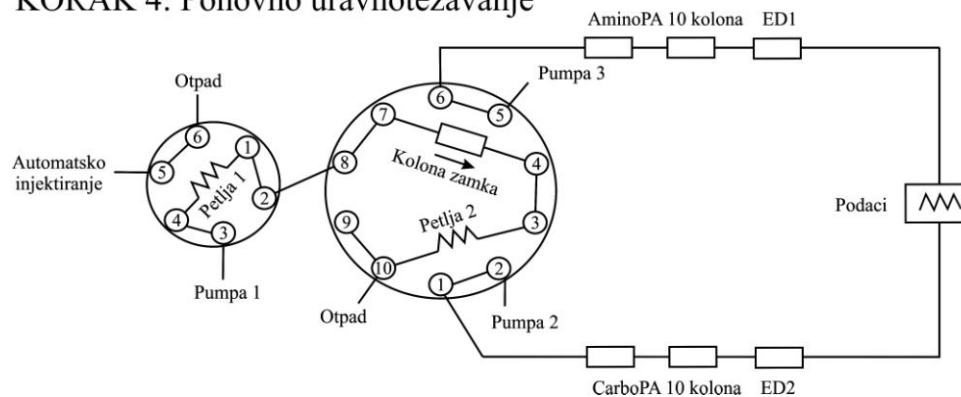
KORAK 2: Ekstrakcija



KORAK 3: Analiziranje



KORAK 4: Ponovno uravnotežavanje



Slika 10. Shema aparature za IC analizu u kulturi *Clostridium Thermocellum*.¹²⁴

Tablica 3. Primijenjeni elucijski gradijent pri IC analizi aminokiselina i ugljikohidrata u kulturi stanica *Clostridium Thermocellum*.¹²⁴

Vrijeme / min	% H ₂ O	% NaOH	% NaAc
Gradijentni uvjeti za aminokiseline			
0	76	24	-
2	76	24	-
8	64	36	-
11	64	36	-
18	40	20	40
21	44	16	40
23	14	16	70
42	14	16	70
42,1	20	80	-
44,1	20	80	-
44,2	76	24	-
60	76	24	-
Gradijentni uvjeti za ugljikohidrate			
0	97	3	-
20	97	3	-
30	60	40	-
40	60	40	-
45	10	70	20
50	10	70	20
50,1	20	80	-
52	20	80	-
52,1	97	3	-
60	97	3	-

Voda, otopina pufera i kiseline koriste se kao sredstva za ispiranje za kationsku izmjenjivačku kromatografiju. Otopina kiseline korisna je za zadržavanje aminokiselina na kationskom izmjenjivaču s vodikovim protuionima. Testirane su mravlja i octena kiselina kao moguća rješenja. Upotrebom octene kiseline kao otopine, leucin i izoleucin koelucirani su kao repovi na signalu metionina. Pomoću mravlje kiseline dobiva se zadovoljavajući kromatogram pa se ona pokazala kao bolji izbor za ovu analizu.

Tablica 4. Primijenjeni režim promjene potencijala pri IC analizi aminokiselina i ugljikohidrata u kulturi stanica *Clostridium Thermocellum*.¹²⁴

Aminokiseline		Ugljikohidrati	
Vrijeme / s	Potencijal / V	Vrijeme / s	Potencijal / V
0,00	+0,13	0,00	+0,1
0,04	+0,13	0,40	+0,1
0,05	+0,28	0,41	-2,0
0,21	+0,28	0,42	-2,0
0,22	+0,61	0,43	+0,6
0,46	+0,61	0,44	-0,1
0,47	+0,28	0,50	-0,1
0,56	+0,28		
0,57	-1,67		
0,58	-1,67		
0,59	+0,93		
0,60	+0,13		

Svi uzorci su dobiveni iz kultura *C. thermocellum* pri 60 °C. Približno 1,0 mg ml⁻¹ unutaršnjeg standarda je bilo dodano uzorcima prije prethodne obrade. Stanice i izvanstanične matrice se delaminiralo centrifugiranjem na 12 000 okretaja u minuti, 10 minuta pri 4°C.

7 ZAKLJUČAK

Ionska kromatografija (IC) je posebna implementacija tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) koja omogućava razdvajanje ioniziranih molekula na temelju njihova naboja. Ova se metoda učestalo koristi u modernim laboratorijima za kemijsku analizu. IC omogućava jednostavniju separaciju sličnih molekula koje je teško razdvojiti drugim tehnikama zbog bliskih svojstava jer se upravo nabojem koji nosi molekula od interesa može lako manipulirati promjenom pH vrijednosti pokretne faze. Razvoj novih tehnika detekcije i napredak u ionskim izmjenjivačkim materijalima dodatno je proširio primjenu ionske kromatografije.

IC ne zahtijeva organska otapala i stoga se često koristi za karakterizaciju biomolekula, kao što su aminokiseline i ugljikohidrati, u prirodnom ili aktivnom obliku, te za pročišćavanje. Aminokiseline i ugljikohidrati sadrže različite funkcionalne skupine koje mogu dovesti do razlika u ukupnom naboju, ovisno o pH vrijednosti otopine, što je primjenjivo za njihovo razdvajanje na kromatografskoj koloni.

IC je brža, točnija i preciznija u analizi nabijenih čestica od većine postojećih analitičkih metoda. Upravo stoga dolazi do njene sve intenzivnije primjene, ne samo u analizi voda (što je jedna od njenih prvotnih namjena) već i analizi kompleksnih matrica kao što su fermentacijske juhe i stanične kulture. Povećana primjena potencira nova istraživanja što uključuje potragu za superiornijim nepokretnim i pokretnim fazama, razvoj detekcijskih i softverskih sustava te unaprjeđenje tehnika pripreme uzoraka.

Stoga ne iznenađuje što ionska kromatografija nezaustavljivo preuzima primat naspram konvencionalnijih analitičkih metoda.

8 LITERATURA

1. L.G. Wade Jr.: Carbohydrates and Nucleic Acids, u Adam Jaworski (ur.): Organic Chemistry, 8. izd., Pearson Education, Boston, 2013.
2. P. Vollhardt, N. Schore: Organic Chemistry Structure and Function, 6. izd., W.H. Freeman, New York, 2011.
3. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry, 5. izd., W.H. Freeman, New York, 2002.
4. J. Russell, R. Cohn: Mikhail Tsvet, VSD, New York, 2012.
5. H. Small: Ion Chromatography, Springer US, 2. izd., New York, 1989.
6. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler: Chromatographic Separations, u Sandra Kiselica (ur.): Fundamentals of Analytical Chemistry, 9. izd., Brooks/Cole, 2014.
7. D. Harvey: Chromatographic and Electrophoretic Methods, u K.A. Peterson (ur.): Modern Analytical Chemistry, 1. izd., McGraw-Hill, 2000.
8. J.S. Fritz, D.T. Gjerde: Ion Chromatography, 3. izd., WILEY-VCH, Weinheim, 2000.
9. J. Weiss: Handbook of Ion Chromatography, 3. izd., WILEY-VCH, Weinheim, 2004.
10. H. B. Yildiz, S. Kiralp, L. Toppare, Y. Yagci: Immobilization of glucose oxidase in conducting graft copolymers and determination of glucose amount in orange juices with enzyme electrodes, *Int. J. of Biol. Macromol.* **37** (2005) 174–178
11. D.T. Gordon, K. Okuma: Determination of Total Dietary Fiber in Selected Foods Containing Resistant Maltodextrin by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study, *J. AOAC Int.* **85** (2002) 435–444
12. A. Leyva, A. Quintana, M. Sanchez, E.N. Rodriguez, J. Cremata, J.C. Sanchez: Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation, *Biologicals* **36** (2008) 134–141
13. A.S. Grandy , M.S. Erichb, G.A. Porter: Suitability of the anthrone-sulfuric acid reagent for determining water soluble carbohydrates in soil water extracts, *Soil Biol. Biochem.* **32** (2000) 725–727
14. T.Masuko, A. Minamib, N. Iwasakib, T. Majimab, S-I. Nishimurac, Y.C. Leea: Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format, *Anal. Biochem.* **339** (2005) 69–72

15. M.B. Hall: Efficacy of reducing sugar and phenol–sulfuric acid assays for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs, *Anim. Feed Sci. and Technol.* **185**, (2013) 94–100
16. P.J. Oefner, A.E. Vorndran, E. Grill, C. Huber, G.K. Bonn: Capillary zone electrophoretic analysis of carbohydrates by direct and indirect UV detection, *Chromatographia* **34** (1992) 308–316
17. M.A. Dominguez, J. Jacksen, A. Emmer, M.E. Centurion: Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples, *Microchem. J.* **129** (2016) 1–4
18. B. Lagane, M. Treilhou, F. Couderc: Capillary electrophoresis: theory, teaching approach and separation of oligosaccharides using indirect UV detection, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **28** (2000) 251–255
19. S. Cortacero-Ramirez, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, M. Hernainz-Bermudez de Castro, A. Fernandez-Gutierrez: Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection, *Food Chem.* **87** (2004) 471–476
20. D.J. Harvey: Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography, electrophoresis and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **879**, (2011) 1196–1225
21. S. Xiao, D. Chen-Xu, L. Ling-Jun, S. You-Rui, S. Zhi-Wei, Y. Jin-Mao: Separation of Derivatized Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis, *Chin. J. Anal. Chem.* **36** (2008) 280–284
22. C. Campa, A. Coslovi, A. Flamigni, M. Rossi: Overview on advances of capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: A Tabulated review, *Electrophoresis* **27** (2006) 2027–2050
23. C.W. Klampfl, W. Buchberger: Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection, *Electrophoresis* **22** (2001) 2737–2742
24. M. Larsson, R. Sundberg, S. Folestad: On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, *J. Chromatogr. A* **934** (2001) 75–85
25. R.P. Baldwin: Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19** (1999) 69–81

26. X. Cheng, S. Zhang, H. Zhang, Q. Wang, P. He, Y. Fang: Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode, *Food Chem.* **106** (2008) 830–835
27. P.L. Weber, S.M. Lunte: Capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection of carbohydrates and glycopeptides, *Electrophoresis* **17** (1996) 302–309
28. M. Kölhed, B. Karlberg: Capillary electrophoretic separation of sugars in fruit juices using on-line mid infrared Fourier transform detection, *Analyst* **130** (2005) 772–778
29. C. Rumpel, M-F. Dignac: Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction–acetylation, *Soil Biol. Biochem.* **38** (2006) 1478–1481
30. J.L. Garcia Banos, A. Olano, N. Corzo: Determination of mono and disaccharide content of eternal formulations by gas chromatography, *Chromatographia* **52** (2000) 221–224
31. E. de la Fuente, M.L. Sanz, I. Mart´inez-Castro, J. Sanz: Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* **1135** (2006) 212–218
32. N.G. Carlsson, H. Karlsson, A.S. Sandberg: Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Agric. and Food Chem.* **40** (1992) 2404–2412
33. S. Tisza, P. Sass, I. Molnar-Perl: Optimization of the simultaneous determination of acids and sugars as their trimethylsilyl(oxime) derivatives by gas chromatography-mass spectrometry and determination of the composition of six apple varieties, *J. Chromatogr. A* **676** (1994) 461–468
34. M.A. Adams, Z. Chen, P. Landman, T.D. Colmer: Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives, *Anal. Biochem.* **266** (1999) 77–84
35. G.L. Sasaki, L.M. Souza, R.V. Serrato, T.R. Cipriani, P.A.J. Gorin, M. Iacomini: Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis, *J. Chromatogr. A* **1208** (2008) 215–222
36. E.A. Nonato, F. Carazza, F.C. Silva, C.R. Carvalho, Z. de L. Cardeal: A Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Some Secondary

- Compounds of Brazilian Sugar Can Spirits by Gas Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 3533–3539
37. P.M. Medeiros, B.R.T. Simoneit: Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1141** (2007) 271–278
 38. A. Chaintreau, D. Joulain, C. Marin, C-O. Schmidt, M. Vey: GC-MS Quantitation of Fragrance Compounds Suspected To Cause Skin Reactions, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 6389–6403
 39. P.R. Patwardhan, D.L. Dalluge, B.H. Shanks, R.C. Brown: Distinguishing primary and secondary reactions of cellulose pyrolysis, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 5265–5269
 40. T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka: Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008) 2533–2542
 41. V. Morales, N. Corzo, M.L. Sanz: HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups, *Food Chem.* **107** (2008) 922–928
 42. S. Willför, A. Pranovich, T. Tamminen, J. Puls, C. Laine, A. Suurnäkki, B. Saake, K. Uotila, H. Simolin, J. Hemming, B. Holmbom: Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides–A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques, *Ind. Crops Prod.* **29** (2009) 571–580
 43. W. Liang Qian, Z. Khan, D.G. Watson, J. Fearnley: Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* **21** (2008) 78–83
 44. S.C. Moldoveanu, V. David: Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis, Elsevier, Waltham, MA, USA, 2016.
 45. V.A. Davankov: Ligand Exchange Chromatography, Moskva, 2000.
 46. M.G. Schimdt, G. Gübitz: Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle, *Anal. Bioanal. Chem.* **400** (2011) 2305–2316
 47. M. Stefansson, D. Westerlund: Ligand-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates, *J. Chromatogr. A* **720** (1996) 127–136

48. Z. Guadalupe, O. Martínez-Pinilla, Á. Garrido, J.D. Carrillo, B. Ayestarán: Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC), *Food Chem.* **131** (2012) 367–374
49. Y. Lv, X. Yang, Y. Zhao, Y. Ruan, Y. Yang, Z. Wang: Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection, *Food Chem.* **112** (2009) 742–746
50. R. Nakao, T. Ito, M. Yamaguchi, K. Suzuki: Simultaneous analysis of FDG, CIDG and Kryptofix 2.2.2 in [¹⁸F]FDG preparation by high-performance liquid chromatography with UV detection, *Nucl. Med. Biol.* **35** (2008) 239–244
51. A. Kiyoshima, K. Kudo, N. Nishida, N. Ikeda: HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis, *Forensic Sci. Int.* **125** (2002) 127–133
52. K. Rao Anumulal, P.B. Taylor: Quantitative Determination of Phenyl Isothiocyanate Derivatized Amino Sugars and Amino Sugar Alcohols by High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Biochem.* **197** (1991) 113–120
53. J.L. Chávez-Servín, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater: Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection, *J. Chromatogr. A* **1043** (2004) 211–215
54. P. Shanmugavelan, S. Yeon Kim, J. Bong Kim, H. Woong Kim, S. Muk Cho, S. Na Kim, S. Young Kim, Y. Sook Cho, H. Ran Kim: Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD, *Carbohydr. Res.* **380** (2013) 112–117
55. C. Ma, Z. Sun, C. Chen, L. Zhang, S. Zhu: Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD, *Food Chem.* **145** (2014) 784–788
56. P. Forgo, A. Kiss, M. Korózs, S. Rapi: Thermal degradation and consequent fragmentation of widely applied oligosaccharides, *Microchem. J.* **107** (2013) 37–46
57. X. Cheng, L.A. Kaplan: Simultaneous Analyses of Neutral Carbohydrates and Amino Sugars in Freshwaters with HPLC-PAD, *J. Chromatogr. Sci.* **41** (2003) 434–438
58. T.R.I. Cataldi, D. Nardiello: Determination of Free Proline and Monosaccharides in Wine Samples by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD), *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3737–3742

59. D. Yang, B.Chen: Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 3022–3027
60. H.T.S. Boschker, T.C.W. Moerdijk-Poortvliet, P. van Breugel, M. Houtekamer, J.J. Middelburg: A versatile method for stable carbon isotope analysis of carbohydrates by high-performance liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008) 3902–3908
61. A. Edelmann, J. Diework, J. Rodriguez Baena, B. Lendl: High-performance liquid chromatography with diamond ATR-FTIR detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in red wine, *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003) 92–97
62. E. Paredes, M.S. Prats, S.E. Maestre, J.L. Todolí: Rapid analytical method for the determination of organic and inorganic species in tomato samples through HPLC–ICP-AES coupling, *Food Chem.* **111** (2008) 469–475
63. Y.V. Tcherkas, A.D. Denisenko: Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chrom. A* **913** (2001) 309–313
64. A.M. Gonzalez Paramas, J.A. Gomez Barez, C. Cordon Marcos, R.J. Garcia-Villanova, J. Sanchez Sanchez: HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen), *Food Chem.* **95** (2006) 148–156
65. L.A. Baumes, M. Buaki, J. Jolly, A. Corma, H. Garcia: Fluorimetric detection and discrimination of α -amino acids based on tricyclic basic dyes and cucurbiturils supramolecular assembly, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 1418–1421
66. E. Poboyy, W. Czarkowska, M. Trojanowicz: Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorimetric detection, *J. Biochem. Biophys. Methods* **67** (2006) 37–47
67. H. Dan-Qun, Z. Guo-Ping, H. Chang-Jun, D. Jia-Le, Z. Yu-Chang, L. Zhen, L. Xiao-Gang, F. Huan-Bao, Z. Su-Yi: A Colorimetric Sensor Array for Identification of Natural Amino Acids, *Chin. J. Anal. Chem.* **38** (2010) 1115–1120
68. L-F. Yuan, Y-J. He, H. Zhao, Y. Zhou, P. Gu: Colorimetric detection of D-amino acids based on anti-aggregation of gold nanoparticles, *Chin. Chem. Lett.* **25** (2014) 995–1000

69. J. Peng, J. Ling, X-Q. Zhang, L-Y. Zhang, Q-E. Cao, Z-T. Ding: A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid, *Sens. Actuators B Chem.*, **221** (2015) 708–716
70. K. Velugula, J.P. Chinta: Silver nanoparticles ensemble with Zn(II) complex of terpyridine as a highly sensitive colorimetric assay for the detection of Arginine, *Biosens. Bioelectron.* **87** (2017) 271–277
71. L. Kuang, L. Zhang, A-Z Xu, Z-M. Li, R-P. Liang, J-D. Qiu: Bio-dots assembly-induced aggregation of gold nanoparticles for highly sensitive and selective colorimetric detection of methionine, *Sens. Actuators B Chem.* **244** (2017) 1031–1036
72. S-W. Sun, Y-Ch. Lin, Y-M. Wenga, M-J. Chen: Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification, *J. Food Compost. Anal.* **19** (2006) 112–117
73. L.B. James: Amino Acid Analysis: Reduction of Ninhydrin with Titanous Chloride, *J. Chromatogr. A* **284** (1984) 97–103
74. M. Friedman: Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 385–406
75. F. Wang, X. Chen, Q. Chen, X. Qin, Z. Li: Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl-2,3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by precolumn derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, *J. Chromatogr. A* **883** (2000) 113–118
76. R. Zhu, W.Th. Kok: Postcolumn derivatization of peptides with fluorescamine in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* **814** (1998) 213–221
77. S. Pravadali-Cekic, A. Jones, A.A. Kazarian, B. Paull, A. Soliven, H. Ritchie , M. Camenzuli, G.R. Dennis, R.A. Shalliker: Using reaction flow chromatography for the analysis of amino acid: Derivatisation with fluorescamine reagent, *Microchem. J.* **121** (2015) 141–149
78. L. Bennett, S. Sudharmarajan, G. Smithers: A novel method for total protein analysis of protein mixtures using enzyme hydrolysis and derivatisation with o-phthaldialdehyde e Application to dairy products, *Int. Dairy J.* **55** (2016) 44–51
79. Z. Dai, Z. Wua, S. Jia, G. Wu: Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* **964** (2014) 116–127

80. A. Csámpai, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: o-Phthaldialdehyde derivatization of histidine: stoichiometry, stability and reaction mechanism, *J. Chromatogr. A* **1031** (2004) 67–78
81. M.M. Ali Omar, A.A. Elbashir, O.J. Schmitz: Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food, *Food Chem.* **214** (2017) 300–307
82. X. Xu, Z. Jia, Y. Shu, L. Liu: Dynamic pH junction–sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr. B* **980** (2015) 20–27
83. L-Y. Zhang, M-X. Sun: Capillary electrophoresis of phosphorylated amino acids with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* **859** (2007) 30–36
84. S. Sabbah, G.K.E. Scriba: Separation of dipeptide and tripeptide enantiomers in capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -cyclodextrin and succinyl- β -cyclodextrin: Influence of the amino acid sequence, nature of the cyclodextrin and pH, *Electrophoresis* **22** (2001) 1385–1393
85. K. Včeláková, I. Zusková, E. Kenndler, B. Gaš: Determination of cationic mobilities and pK_a values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* **25** (2004) 309–317
86. F. Süß, C.E. Sängler-van de Griend, G.K.E. Scriba: Migration order of dipeptide and tripeptide enantiomers in the presence of single isomer and randomly sulfated cyclodextrins as a function of pH, *Electrophoresis* **24** (2003) 1069–1076
87. L. Ranjbar, J.P. Foley, M.C. Breadmore: Multidimensional liquid-phase separations combining both chromatography and electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* **950** (2017) 7–31
88. T. Stroink, M.C. Ortiz, A. Bult, H. Lingeman, G.J. de Jong, W.J.M. Underberg: On-line multidimensional liquid chromatography and capillary electrophoresis systems for peptides and proteins, *J. Chromatogr. B* **817** (2005) 49–66
89. A.J. Landua, R. Fuerst, J. Awapara: Paper chromatography of amino acids. Effect of pH of sample, *Anal. Chem.* **23** (1951) 162–168
90. R. Bhushan, J. Martens, S. Batra: Amino Acids: Thin-Layer (Planar) Chromatography, u J. Reedijk: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, Waltham, MA, USA, 2014.

91. G.L. DeVault, M.J. Sepaniak: Two-dimensional capillary electrophoresis-thin layer chromatography separations of amino acid enantiomers using electro-filament transfer, *J. Microcolumn Sep.* **12** (2000) 419–428
92. F. Menestrina, J. Osorio Grisales, C.B. Castells: Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography, *Microchem. J.* **128** (2016) 267–273
93. M.J. Nunes de Paiva, H.C. Menezes, P. Pereira Christo, R.R. Resende, Z. de Lourdes Cardeal: An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* **931** (2013) 97–102
94. J. Pfeiffer, V. Schurig: Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* **840** (1999) 145–150
95. H. Kataoka, H. Tanaka, A. Fujimoto, I. Noguchi, M. Makita: Determination of sulphur amino acids by gas chromatography with flame photometric detection, *Biomed. Chromatogr.* **8** (1994) 119–124
96. D. Fekkes, A. van Dalen, M. Edelman, A. Voskuilen: Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde, *J. Chromatogr. B* **669** (1995) 177–186
97. T. Bolanča, Š. Ukić: Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
98. Dionex Technical Note 21., Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, 1998.
99. V.P. Hanko, W.R. Lacourse, C.O. Dasenbrock, J.S. Rohrer: Determination of sulfur-containing antibiotics using high performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *Drug Dev. Res.* **53**, (2001) 268–280
100. Carbohydrate and Amino Acid Analysis Using 3-D Amperometry, Application Note 179, LPN 1839. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, 2007.
101. Application Note 458, Mass Detection for Chromatographers, Diab Elmashni, Kathryn Preston, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA, 2009.
102. Amino Acid Analysis System, Application Report No. 26, Shimadzu, Tokyo, Japan
103. Aminopac PA10 Product Manual, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, 2004.

104. The column program, Methrom AG, Herisau, Switzerland, 2016. (pristupljeno 10.02.2017.)
105. Product Manual for AAA-Direct Dionex Amino-Acid Analyser, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, 2009. (pristupljeno 10.02.2017.)
106. Shimadzu HPLC Columns, Shimadzu, Tokyo, Japan, (pristupljeno 10.02.2017.)
107. Dionex CarboPac PA1 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
108. Dionex CarboPac MA1 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
109. Technical Note 20, Analysis of Carbohydrates by HighPerformance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
110. Dionex CarboPac PA10 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2012. (pristupljeno 10.02.2017.)
111. Dionex CarboPac PA20 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2011. (pristupljeno 10.02.2017.)
112. Dionex CarboPac PA100 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
113. Dionex CarboPac PA200 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2004. (pristupljeno 10.02.2017.)
114. Dionex CarboPac PA210-4 μ m Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2016. (pristupljeno 10.02.2017.)
115. Dionex CarboPac PA100 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
116. Dionex CarboPac SA10 Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2013. (pristupljeno 10.02.2017.)
117. Dionex CarboPac SA10-4 μ m Coloumn Product Manual, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, 2015. (pristupljeno 10.02.2017.)
118. T. Goto, H. Horie, T. Muakai: Analysis of Major Amino Acids in Green Tea by High-performance Liquid Chromatography Coupled with OPA Precolumn Derivatization, *Tea Reas. J.* **1993** (1993) 29–33

119. W. Bi, C. He, Y. Ma, J. Shen, L.H. Zhang, Y. Peng, P. Xiao: Investigation of free amino acid, total phenolics, antioxidant activity and purine alkaloids to assess the health properties of non-*Camellia* tea, *Acta Pharm. Sin. B* **6** (2016) 170–181
120. H. Horie, T. Mukai, K. Kohata: Simultaneous determination of qualitatively important component in green tea infusions using capillary electrophoresis, *J. Chrom. A* **758** (1997) 332–335
121. J.P. Aucamp, Y. Hara, Z. Apostolides: Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chrom. A* **876** (2000) 325–242
122. Application Note 150, Thermo Fischer Scientific, Sunnyvale CA, 2016
123. Y. Ding, H. Yu, S. Mou: Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *J. Chrom. A* **982** (2002) 237–244
124. Y. Fa, H. Yang, C. Ji, H. Cui, X. Zhu, J. Du, J. Gao: Simultaneous determination of amino acids and carbohydrates in culture media of *Clostridium thermocellum* by valve-switching ion chromatography, *Anal. Chim. Acta* **798** (2013) 97–102

ŽIVOTOPIS

Barbara Farkaš [REDACTED] Osnovnu školu pohađala je u Slatini, nakon čega upisuje program opće gimnazije u Srednjoj školi Marka Marulića Slatina. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija, upisuje 2014. godine. Dobitnica je dviju dekanovih nagrada za najboljeg studenta na godini (2014./15. i 2015./16.).

Za vrijeme fakultetskog obrazovanja odrađuje praksu u Marinada d.o.o (AgroFructus Grupa). U siječnju 2017. godine bila je finalistica MOL-ovog programa *FEMMe*, a od ožujka iste godine član je *Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa* te urednik i dizajner časopisa *Reaktor ideja*.