



VEDELIKKROMATOGRAAFILISE METOODIKA ARENDAMINE JA VALIDEERIMINE AMINOHAPETE METIONIIN, TSÜSTEIIN, TREONIIN JA LÜSIIN MÄÄRAMISEKS LOOMASÖÖDAST

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Eva-Liisa Tiru

Üliõpilaskood: 213045LAAB

Põhijuhendaja: Liina Kruus, METK, teravilja ja söötade labori juhataja

Kaasjuhendaja: Merike Vaher, TalTech, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Eva-Liisa Tiru

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Liina Kruus

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Maksim Ošeka

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu	6
Sissejuhatus	8
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1. Loomasööt	9
1.2. Aminohapped	9
1.2.1. Aminohapete olulisus loomade füsioloogias	10
1.3. Sööda optimeerimine	10
1.3.1. Söödakulu vähendamine	10
1.3.2. Keskkonnamõju	11
1.4. Töös uuritavad aminohapped ja nende keemilised omadused	11
1.5. Aminohapete uurimismeetodid	13
1.5.1. Proovi ettevalmistus	13
1.5.2. Vedelikkromatograafilised meetodid aminohapete määramiseks	14
1.6. Valideerimine	17
1.6.1. Valideerimise parameetrid	17
1.6.2. Valideerimise meetodid ja juhendmaterjalid	18
2. Töö eesmärk	20
3. Eksperimentaalne osa	21
3.1. Materjalid	21
3.1.1. Uuritavad proovid	21
3.1.2. Reagensid	21
3.1.3. Standardid	21
3.2. Meetodid	21
3.2.1. Metoodika arendamine	21
3.2.2. Metoodika valideerimise katsete kirjeldus	25
3.2.3. Andmeanalüüs	26
4. Tulemused ja arutelu	27
4.1. Analüüsitulemused	27
4.2. Metoodika valideerimise tulemused	28
Kokkuvõtte	33
Abstract	34
Tänuavaldused	35

Kasutatud kirjandus	36
Lisad	40
Lisa 1. Sigade täissööda esimesel päeval analüüsitud proovi LC-UV kromatogramm	40

Annotatsioon

Tööstusloomade tervise parandamine ning loomakasvatusega seotud keskkonnajalajälje vähendamine on võimalik sööda toitainelise sisalduse optimeerimisega, mille üheks osaks on aminohappelise sisalduse optimeerimine vastavalt liigile ja kasvufaasile. Tarbija jaoks tähendab loomasööda väärtuse tõstmine kvaliteetsemat toitu – liha, piima, mune ja teisi loomseid saadusi. Sööda tootmine on ka konkurentsipõhine valdkond, mille eesmärk on valmistada võimalikult kõrge kvaliteediga ja lisandväärtusega sööta. Sööda parandamiseks ja kvaliteedi tagamiseks on vaja sööta pidevalt kontrollida.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on töötada välja vedelikkromatograafiline meetodika aminohapete metioniin, tsüsteiin, treoniin ja lüsiin määramiseks taimsest loomasöödast ning see valideerida. Meetodika valideerimise eesmärgiks on kindlustada selle usaldusväärtus rutiinanalüüside teostamiseks.

Praktilise töö käigus viidi läbi katseid erinevate olemasolevate meetodika modifitseerimise teel ning sobiva meetodika leidmisel see valideeriti. Meetodika valideerimiseks määratud parameetrid olid kalibratsioonikõver, lineaarne ala, tuvastamispiir, määramispiir, kordustäpsus ja saagis. Katsete teostamiseks kasutati Tšehhi ringtesti MPZ ÚKZÚZ raames väljastatud viit taimset loomasöödaproovi. Katsed teostati Maaelu Teadmuskeskuse (METK) teravilja ja söötade laboris.

Töö olulisema valideerimistulemusena leiti meetodika saagis uuritavate aminohapete jaoks. Metioniini keskmiseks saagiseks väljatöötatud meetodikat rakendades oli $63 \pm 3\%$, tsüst(e)iini saagiseks $79 \pm 8\%$, treoniini saagiseks $97 \pm 8\%$ ning lüsiini saagiseks $89 \pm 3\%$. Meetodikat on võimalik rakendada proovide analüüsiks, korrigeerides tulemust saagise suhtes.

Käesolev lõputöö jaotub teoreetiliseks ning eksperimentaalseks osaks. Teoreetilise osa kirjanduslikus ülevaates kirjeldatakse loomasööta, sööda optimeerimist, uuritavaid aminohappeid ja meetodeid aminohapete määramiseks. Teises osas tuuakse välja töö eesmärk. Kolmandas osas loetletakse töös kasutatud materjalid ning selgitatakse lahti valminud meetodika. Neljandas osas esitatakse analüüsi- ja valideerimistulemused ja arutletakse nende üle. Töö koosneb 40 leheküljest, üheksast tabelist ja neljast joonisest.

Lühendite loetelu

AOAC – Ametlik Analüütiliste Keemikute Ühing (inglise keeles *Association of Official Analytical Chemists*)

ACN – atsetonitriil

DTDPA – 3,3'-ditiopropaanhape (inglise keeles *3,3'-dithiodipropionic acid*)

EAA – asendamatu aminohape (inglise keeles *essential amino acid*)

EMA – Euroopa Ravimiamet (inglise keeles *European Medicines Agency*)

FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (inglise keeles *United States Food and Drug Administration*)

FMOC – 9-fluoreenülmetüülkloroformaat

HCl – soolhape

HILIC – hüdrofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafia (inglise keeles *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia (inglise keeles *high-performance liquid chromatography*)

ICH – Inimravimite Tehniliste Nõuete Ühtlustamise Rahvusvaheline Nõukogu (inglise keeles *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IEC – ioonvahetuskromatograafia (inglise keeles *ion-exchange chromatography*)

IS (ISTD) – sisestandard (inglise keeles *internal standard*)

ISO - Rahvusvaheline Standardimisorganisatsioon (inglise keeles *International Organization for Standardization*)

IUPAC – Rahvusvaheline Puhta ja Rakenduskeemia Liit (inglise keeles *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LOD – tuvastamis- või avastamispiir (inglise keeles *limit of detection*)

LOQ – määramis- või kvantifitseerimispiir (inglise keeles *limit of quantification*)

MeOH – metanool

MPA - 3-merkaptopropaanhape (inglise keeles *3-mercaptopropionic acid*)

MS – massispektromeetria (inglise keeles *mass spectrometry*)

NEAA - asendatav aminohape (inglise keeles *non-essential amino acid*)

OPA – o-ftaalaldehüüd (inglise keeles *o-phthalaldehyde*)

PITC – fenüülisotiotsüanaat (inglise keeles *phenyl isothiocyanate*)

R – saagis (inglise keeles *recovery*)

RSD – suhteline standardhälve (inglise keeles *relative standard deviation*)

RT – retentsiooniaeg (inglise keeles *retention time*)

SD – standardhälve (inglise keeles *standard deviation*)

SANCO – Tervise- ja Tarbijaküsimuste Peadirektoaat (inglise keeles *Directorate-General Health and Consumer Protection*)

UHPLC – ultra-kõrgsurvevedelikkromatograafia (inglise keeles *ultra high-performance liquid chromatography*)

Sissejuhatus

Maaelu Teadmuskeskuse (METK) eesmärgiks on läbi rakendusliku teadus- ja arendustegevuse suurendada Eesti põllumajanduse efektiivsust, konkurentsivõimet ja keskkonnasäästlikkust ning aidata kaasa elurikkuse säilitamisele.

Maaelu Teadmuskeskuse teravilja ja söötade labor on riiklik referentslabor söödalisandite alal ning Põllumajandus- ja Toiduameti poolt volitatud labor ametlikuks sööda järelvalveuuringuteks, mille tõttu on aminohapete määramiseks sobiva meetodika arendamine ja juurutamine väga oluline. Huvi aminohapete analüüsi vastu on seotud ka Euroopa roheleppega ja „Talust taldrikule“ strateegiaga, et vähendada läbi loomade teadlikuma söötmise loomakasvatusega seotud keskkonnamõjusid ning parandada liha ja teiste loomsete saaduste kvaliteeti.

Sööda tootmine on konkurentsipõhine valdkond, seetõttu proovivad söodatootjad toota võimalikult kõrge kvaliteediga ning lisandväärtusega sööta. Selleks kontrollitakse pidevalt toodetava sööda kvaliteeti ja vastavust märgistusele.

Käesolevas töös keskendutakse nelja aminohappe – metioniini, tsüsteiini, treoniini ja lüsiini – määramisele, kuna nende sisaldust erinevates söödaliikides kontrollitakse regulaarselt riikliku sööda järelvalve käigus. Töö praktiliseks eesmärgiks on METK-i jaoks sobiva vedelikkromatograafilise meetodika arendamine ja valideerimine, et võtta meetodika kasutusele rutiinanalüüside teostamiseks. Kõik käesolevas töös tehtud katsed viidi läbi Maaelu Teadmuskeskuse teravilja ja söötade laboris.

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade loomasöödast ja sööda erinevatest tüüpidest, aminohapetest, nende olulisusest loomadele ja sööda aminohappelise optimeerimise vajadusest. Lisaks selgitatakse teoreetilises osas proovi ettevalmistuse põhimõtteid aminohapete määramiseks, kirjeldatakse analüüsimeetodeid ning valideerimise parameetreid. Käesoleva töö praktilises osas kirjeldatakse söödaproovi ja vajalike töölahuste ettevalmistamist, analüüsi läbiviimist, selgitatakse ning põhjendatakse meetodika väljatöötamisega kaasnenud muudatusi, esitatakse valideerimistulemused ja tehakse töö tulemustest järeldused.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Loomasööt

Sööta defineeritakse kui töötlemata või töödeldud toodet, mis on mõeldud loomade söötmiseks. Söötasid liigitatakse söödamaterjalideks, segasöödaks, söödalisanditeks ja eri- või ravimsöödaks [1].

Söödamaterjalid on loomade toitumisvajaduste rahuldamiseks ette nähtud taimset või loomset päritolu töötlemata, värsked või konserveeritud tooted või nende tööstuslikult töödeldud tooted, mis on mõeldud loomadele söötmiseks töötlemata või töödeldud kujul, lisaks ka segasöötade koostisosana [2].

Söödamaterjalid saab liigitada taimseteks, mineraalseteks ja loomseteks. Lisaks võib söödamaterjal sisaldada söödalisandeid, millega rikastatakse loomade söödaratsioone. Taimsete söödamaterjalide alla kuuluvad mitmed taimsed toorained ja neist valmistatud tooted: teravili (näiteks odrakliid, kaerahelbed), õliviljade seemned (rapsikook, päevalilleseemnesrott), kaunviljad (hernejahu, põldoad), mugul- ja juurviljad (kartul, peet), muud seemned ja viljad (õunapulp, tammetõrud), tugi- ja koresöödad (silo, hein) [3].

Segasööt on täis- või täiendsöödana loomade söötmiseks mõeldud vähemalt kahe söödamaterjali segu. **Täissööt** peab olema koostiselt selline, et katta looma päevane toitainevajadus. **Täiendsööt** sobib teiste söötadega kasutamiseks, kuna selles on rohkesti teatud aineid, kuid see ei ole piisav päevase toitainevajaduse katmiseks. Täiendsöötade alla kuuluvad **mineraalsööt**, mille toortuha sisaldus on vähemalt 40%, **erisööt**, mis on ette nähtud teatud eesmärgi rahuldamiseks, olles selgelt eristatav tavasöödast, [2] ja **ravimsööt**, mis on tavasööda ja veterinaarravimite segu [4].

1.2. Aminohapped

Aminohapped on orgaanilised molekulid, mis sisaldavad amino- ning karboksüülhappe funktsionaalrühma ja vastavalt aminohappele spetsiifilist kõrvalahelat, mis annab aminohappele iseloomulikud omadused [5].

Asendamatute aminohapete (EAA) all mõistetakse aminohappeid, mille süsinikskeletti ei suudeta loomarakkudes *de novo* sünteesida või sünteesitakse neid ebapiisavas koguses, võrreldes looma kasvu- ja arenguvajadustega [6]. Kõikide loomsete organismide jaoks on histidiin, isoleutsiin, leutsiin, lüsiin, metioniin, fenüülalaniin, treoniin, trüptofaan ja valiin asendamatud aminohapped, kuid lindude ja noorte imetajate jaoks ka arginiin [7], [8], [9]. Lisaks on kodulindude jaoks asendamatud proliin ja glütsiin [8].

Asendatavaid aminohappeid (NEAA) sünteesitakse loomarakkudes elutegevuseks vajalikul hulgal [6]. Asendatavate aminohapete hulka liigitatakse üldiseltalaniin, asparagiin, asparagiinhape, tsüsteiin, glutamiin, glutamiinhape, glütsiin, proliin, seriin ja türosiin [8], [10].

Mõnikord klassifitseeritakse tsüsteiini, glutamiinhapet, glutamiini, glütsiini, proliini ja türosiini ka poolasendamatuteks, kuna teatud toitumistingimuste puhul või organismi arenguetappides, näiteks vastasündinueas, on nende süntees ebaküllaldane [10].

Mõned neist on olulised metaboolsete radade regulaatorid, mis vastutavad suuremal määral organismi normaalse talitluse säilitamise, kasvu, paljunemise ja immuunsuse eest. Neid liigitatakse funktsionaalseteks aminohapeteks ning nende alla kuuluvad arginiin, tsüsteiin, glutamiin, leutsiin, proliin ja trüptofaan [3].

1.2.1. Aminohapete olulisus loomade füsioloogias

Tööstusloomade kasvukiirus ja piima tootmine sõltuvad toitainete, sealhulgas amino- ja rasvhapete, mineraalide, glükoosi ja muude substraatide kättesaadavusest. Erinevates eluetappides ning vastavalt loomakasvatuse eesmärgist on loomade toitumisvajadused erinevad [11].

Toidust saadavaid aminohappeid kasutatakse põhiliselt substraadina valguliste kudede sünteesiks [10]. Kõik 20 põhilist aminohapet ning nende metaboliidid on vajalikud ka rakkude normaalseks funktsiooniks [8]. Need käituvad signaalmolekulidena, reguleerivad geeniekspressiooni ja osalevad valkude fosforüleerimise kaskaadis. Lisaks on aminohapped ka prekursoriteks hormoonide ning madalmolekulaarsete lämmastikühendite sünteesis [8].

Aminohapete ebanormaalne metabolism häirib homöostaasi terves kehas, pidurdades looma kasvu ja arengut [8]. Asendamatute aminohapete vähesus võib tekitada loomadele mitmeid sündroomseid tervisehäireid: vähenenud söögiisu ja oksendamist; probleeme toitainete imendumisel, transportimisel ning talletamisel; neurotransmitterite sünteesi kahanemist; meeleoluhäireid ning unetust; aneemiat; vähenenud hapniku transporti kehas [7]. Kõrgenenud aminohapete ja nende produktide sisaldus organismis on seotud neuroloogiliste häirete, oksüdatiivse stressi ning südame-veresoonkonna haigustega [8].

1.3. Sööda optimeerimine

Vajadus toita aina suurenevat populatsiooni toob kaasa suundumuse edendada kõrge geneetilise väärtusega kariloomade aretamist ja kasvatamise tehnikaid. Sööda efektiivsuse tõstmine mängib asendamatut rolli loomakasvatuse optimeerimises ning seda tuleb pidevalt uue teadusliku informatsiooni põhjal ajakohastada [9].

1.3.1. Söödakulu vähendamine

Sööt moodustab 50–70% loomakasvatuse kogukuludest [12], sealjuures valgud on kvantitatiivselt kõige kallimad toitained tööstusloomade söödas [10]. Majandusliku surve tõttu peavad loomakasvatavad söötma suurima võimaliku efektiivsusega, hoides samal ajal kulusid võimalikult madalal [12].

Geneetiliselt kindlaksmääratud järjestusega valkude sünteesiks on vaja kõikide vajalike aminohapete üheaegset kättesaadavust, mida organism osaliselt suudab kompenseerida, tootes ise vajalikke puudujäävaid asendatavaid aminohappeid [9]. Kuna asendamatute aminohapete defitsiidi korral valgusüntees peatub, suureneb ebatõhusa toitumise puhul tarbitava sööda kulu [7]. See tingib aga ülejäänud ülekülluses olevate aminohapete degradeerimise ning kehast eritamise, kuna pole mehhanismi aminohapete varude hoiustamiseks, piirates nende otstarbekat kasutamist rakus [9].

Kodulindude ja mäletsejate sööda puhul on esmaseks valgutootmist limiteerivaks aminohappeks metioniin, seejärel lüsiin. Sigade toidus on sageli esmaselt piiravaks lüsiin, järgmisteks treoniin, metioniin, trüptofaan ja valiin [9]. Tsüsteiini tootmine metioniinist toimub maksas transsulfuratsiooni raja kaudu, kuid sööta tsüsteiini lisamisel on võimalik vähendada metioniini kui tsüsteiini prekursori vajadust, rahuldades umbkaudu 50% väävlit sisaldavate aminohapete vajadusest [10].

1.3.2. Keskkonnamõju

Loomakasvatusel on kahjulikud, peamiselt sööda tootmise ja sõnniku ladustamisega seotud keskkonnamõjud [13], peamisteks tööstusliku loomakasvatuse tagajärgedeks on õhu-, vee- ja mullareostus [14].

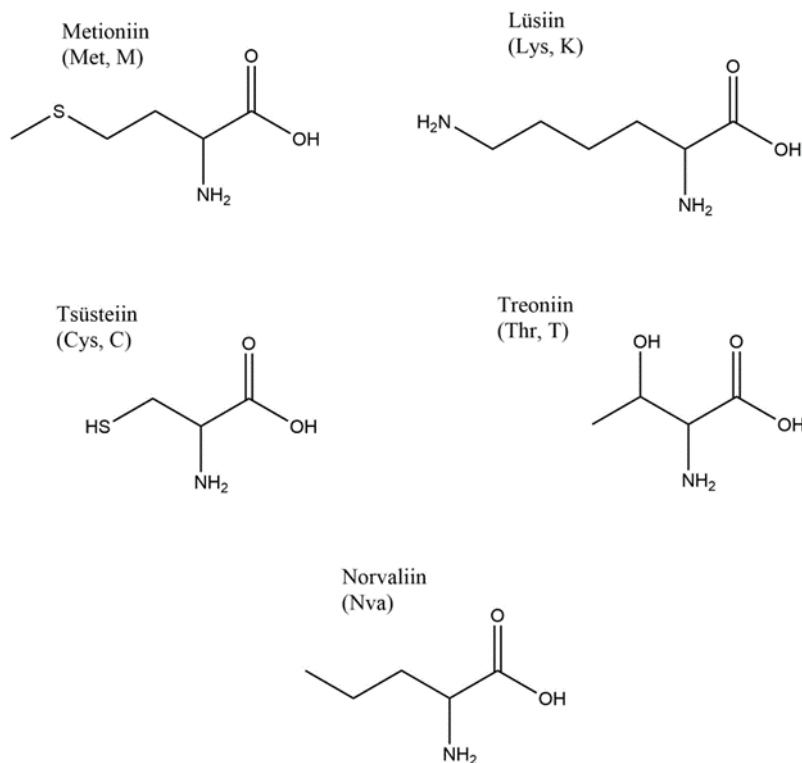
Tööstusloomade lämmastikkeide on peamiselt atmosfääri lenduvate ammoniaagi, dilämmastikoksiidi ja väljaheites sisalduvate nitraatide näol, mis jõuavad põhjavekke, põhjustades veekogude eutrofeerumist [15].

Intensiivse loomakasvatuse korral toidetakse loomi suures osas kõrge valgu- ning energiasisaldusega söödaga [16]. Sööda toorvalgusisalduse vähendamine, keskendudes optimaalsele aminohappesisalduse saavutamisele, on üks viis, kuidas vähendada keskkonnakahjuliku mõjuga sööda koostisosade kasutamist ja sealjuures muuta sõnniku koostist, vähendades kahjulike komponentide heitkoguseid [13]. Sööda efektiivsem formuleerimine aitab lisaks keskkonnamõjude vähendamisele paremini katta loomade toitainelist vajadust ja vähendada loomakasvataja jaoks tootmiskulusid [11].

Mitmed uuringud sigade näitel on kinnitanud, et madalama valgusisaldusega, kuid paremini tasakaalustatud, piisava asendamatute aminohapete kättesaadavusega söötade kasutamisel on võimalik vähendada lämmastikkeid, sealjuures ei muutu sööda kogus, sööda efektiivsus ega pidurdu looma kasv [16].

1.4. Töös uuritavad aminohapped ja nende keemilised omadused

Käesolevas töös analüüsiti järgmisi aminohappeid: metioniini, lüsiini, treoniini ja tsüsteiini, mille keemilised struktuurid on kujutatud alloleval **Joonis 1**. Sisestandardina kasutatud norvaliin on valiini struktuuriisomeer.



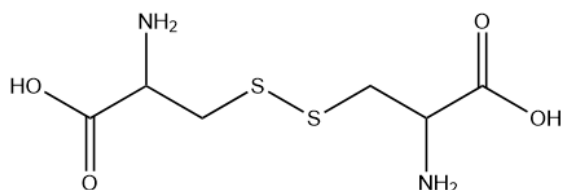
Joonis 1. Analüüsitud aminohapete (metioniin, lüsiin, tsüsteiin, treoniin) ning sisestandardina (IS) kasutatud norvaliini keemilised struktuurid [17], [18], [19], [20], [21] põhjal

Metioniin ja tsüsteiin on mõlemad väävlit sisaldavad, füsioloogilise pH juures neutraalsed aminohapped. Metioniinil ($C_5H_{11}NO_2S$) on α -süsiniku külge funktsionaalrühmana ühendatud metüültioeeter, millel on hüdrofoobsed omadused. Tsüsteiini ($C_3H_7NO_2S$) kõrvalahelas paikneb tiolrühm, mille tõttu paigutatakse see polaarseste aminohapete alla. Treoniinil ($C_4H_9NO_3$) on kõrvalahelas hüdroksüetüülrühm, millel on samuti hüdrofiilsed omadused, ehk treoniini liigitatakse polaarseteks aminohapteks. Lüsiin ($C_6H_{14}N_2O_2$), mida liigitatakse aluseliste aminohapete alla, sisaldab pikka alifaatset alküülahelat, mille otsas on ioniseeritav aminorühm, mistõttu on lüsiinil nii hüdrofoobsed kui hüdrofiilsed omadused [22].

Tabel 1. Töös uuritavate aminohapete molekulaarvalemid ja molaarmassid [17], [18], [19], [20] ning isoelektrilised punktid [22]

Aminohape	Molekulvalem	Molaarmass (g/mol)	Isoelektriline punkt, pI
Metioniin	$C_5H_{11}NO_2S$	149,21	5,7
Tsüsteiin	$C_3H_7NO_2S$	121,16	5,6
Treoniin	$C_4H_9NO_3$	119,12	5,1
Lüsiin	$C_6H_{14}N_2O_2$	146,19	9,7

Töös määratavad aminohapped on vesilahuses füsioloogilise pH juures üldiselt stabiilsed. Erandiks on tsüsteiin, mis oksüdeerib kiirelt disulfidsilla kaudu ühendatud kahest tsüsteiinijäägist koosnevaks tsüstiiniks (MW=240,30 g/mol) [8], 1 mM lahuse puhul toimub 24 h jooksul dimeeristumine juba 65% ulatuses [23]. Tsüstiini struktuur on kujutatud Joonis 2.



Joonis 2. Tsüsteiini dimeer tsüstiin. Kohandatud [24] põhjal

1.5. Aminohapete uurimismeetodid

1.5.1. Proovi ettevalmistus

Vabad aminohapped

Vabad aminohapped ekstraheeritakse proovist lahjendatud soolhappega, seejärel sadestatakse teised kaasa ekstraheerunud lämmastikku sisaldavad makromolekulid ning eemaldatakse filtrimise teel.

Üldaminohapped

Üldaminohapete määramise proovi ettevalmistus hõlmab esmalt valgu peptiidsidemete hüdrolyüsi, et võimaldada individuaalsete aminohapete üksteisest lahutamist ning analüüsimist. Hüdrolyüsi teostatakse happelise, aluselise või harvem ka ensümaatilise töötamise teel [25]. Ükski hüdrolyüsimeetod ei võimalda kõiki aminohappeid täielikult ning terviklikult eraldada, kuna peptiidsidemest vabanenud aminohappejääkide vabanemine ning hävimine toimuvad üheaegselt [26].

Kõige laialdasemalt, ka Euroopa Komisjoni määruses (EÜ) nr 152/2009 [27] kirjeldatud söötade proovivõtu- ja analüüsimeetodikate juhendis ametlikuks sööda kontrolliks, kasutatakse happelist hüdrolyüsi, kus peptiidsidemed lõhutakse vedelik- või gaasifaasis happe toimel. Selle meetodika kohaselt on võimalik järgmiste aminohapete analüüs: tsüst(e)iin, metioniin, lüsiin, treoniin,alaniin, arginiin, asparagiinhape, glutamiinhape, glütsiin, histidiin, isoleutsiin, leutsiin, fenüülalaniin, proliin, seriin, türosiin ja valiin.

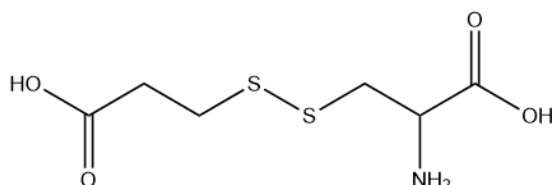
Happelise hüdrolyüsi ajal lõhutakse asparagiini ning glutamiini kõrvalahelas olev amiidside, mistõttu nende sisalduse määramine proovis on võimalik ainult asparagiinhappe ja asparagiini summana ning glutamiinhappe ja glutamiini summana [28].

Happelise hüdrolüüsi puhul on probleemiks osade happelises keskkonnas ebastabiilsete aminohapete saagise vähenemine. Kõige suurema saagisekaoga on trüptofaan, seriin, metioniin, tsüsteiin ja treoniin [25], millest viimased kolm on käesolevas töös uurimisobjektideks. Trüptofaani määramine toimub eraldi aluselise eeltötluse teel, kuna see hävineb happelise hüdrolüüsi tingimustes [29].

Tsüsteiini ja metioniini degradeerumine hüdrolüüsiprotsessi ajal toimub hapniku toimel tekkivate oksüdatsiooniproductide tõttu. Metioniin võib osaliselt oksüdeeruda metioniinsulfoksiidiks või metioniinsulfooniks, tsüsteiin aga vävli oksohapeteks (tsüsteiinsulfiin-, -sulfeen-, või -sulfoonhappeks). Nii vävli sisaldavad aminohapped kui ka nende oksüdeerunud vormid võivad reageerida ka türosiiniga ja trüptofaaniga. Treoniini kaod võivad tekkida vastavate α -ketohapete tekkimisel [25].

(EÜ) nr 152/2009 määruse kohaselt eelneb proovi hüdrolüüsile metioniini ning tsüsteiini oksüdeerimine vastavalt metioniinsulfooniks ning tsüsteiinhappeks. Türosiini määramine toimub oksüdeerimata proovi hüdrolüüsist. Kõiki teisi eelnevalt loetletud aminohappeid on võimalik määrata nii oksüdeeritud kui oksüdeerimata proovides [27].

Oksüdatsiooniprotsessi läbiviimiseks vajaliku suure töömahu ning ajakulu vähendamiseks on otsitud alternatiivseid võimalusi tsüst(e)iini määramiseks, mille üheks võimaluseks on leitud 3,3'-ditiopropanhappega (DTDPA) moodustuva happelise hüdrolüüsi tingimustes stabiilse derivaadi S-((2-karboksüetüül)tio)tsüsteiin ehk „Cys-X“ kasutamine [28], [30].

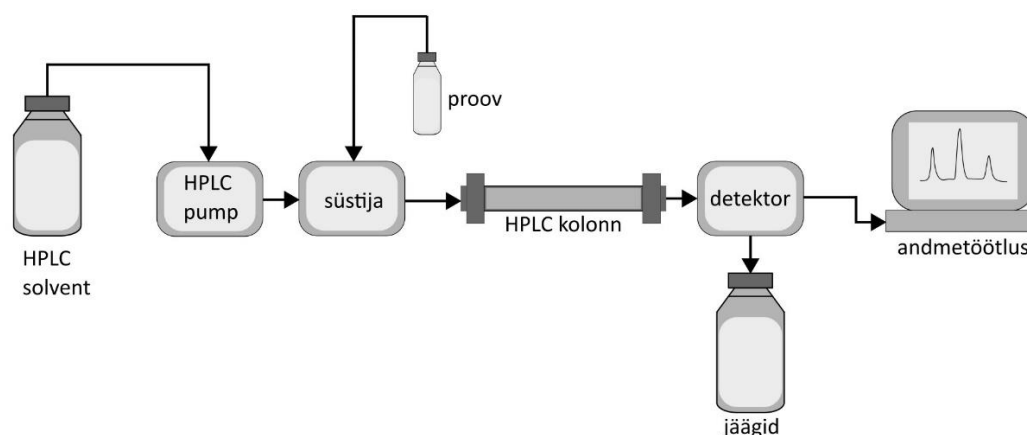


Joonis 3. Tsüst(e)iini ja DTDPA reageerimisel tekkinud disulfiidne derivaat S-((2-karboksüetüül)tio)tsüsteiin Cys-X. Kohandatud [30] põhjal

1.5.2. Vedelikkromatograafilised meetodid aminohapete määramiseks

Kromatograafia on ainete eraldamise ja eristamise tehnika, mis võimaldab lahutada komponente ainesegust [31], [32]. Kromatograafia põhineb ainete jaotumisel statsionaarse ning mobiilse faasi vahel. Statsionaarne faas kromatograafias on tahkes faasis pind või vedelas faasis tahkele pinnale kinnitunud aine. Mobiilseks faasiks on vedelik või gaas, mis kannab proovi läbi statsionaarse faasi. Vastavalt uuritavale proovile võib mobiilne faas jääda isokraatseks või muutuda gradiendina, olla polaarne või apolaarne. Statsionaarne faas interakteerub ainetega segus vastavalt polaarsusele, afiinsusele, molekuli suurusele ja laengule. Statsionaarse faasiga tugevamalt interakteerunud molekulid liiguvad mobiilse faasiga kaasa aeglasemalt, liikumiskiiruse erinevus tekitab aineosakeste üksteisest eraldumise [31].

Aminohapete eraldamiseks kasutatakse põhiliselt pöördfaasivedelikkromatograafiat ning ioonvahetuskromatograafiat [33], aga võimalik on kasutada ka hüdrofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafiat, gaasikromatograafiat, aga ka kapillaarelektroforeesi [34]. Derivatiseeritud või derivatiseerimata aminohappeid tuvastatakse molekulide absorptsiooni, fluorestsentsi või mass-spektromeetri abil [34].



Joonis 4. HPLC süsteemi üldine skeem. Kohandatud [35] põhjal

Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)

Kõrgsurvevedelikkromatograafia hõlmab väikese koguse vedela proovi süstimist 3 – 5 µm suurusega osakestega täidetud kolonni, milles komponendid eralduvad teineteisest 10 – 400 atm [32] rõhuga pumbatavas mobiilses faasis [36]. Ultra-kõrgsurvevedelikkromatograafilistes (UHPLC) kolonnides kasutatakse väiksema suurusega täidismaterjali ning on võimalik rakendada veelgi suuremat, ligi 1000 atm suurust rõhku, võimaldades suuremat efektiivsust ajaühiku kohta [37].

HPLC abil ainete eraldamine toetub peamiselt kolmele keemiliste ühendite omadusele, milleks on polaarsus, elektrilaeng ning molekuli suurus [38]. Polaarsuse põhjal jaotuvad HPLC süsteemid kaheks: normaalfaasikromatograafia ja pöördfaasikromatograafia.

Normaalfaasivedelikkromatograafia puhul on kasutusel polaarne statsionaarne faas ja vähempolaarne mobiilne faas, esmalt elueeruvad statsionaarse faasiga nõrgemalt interakteeruvad hüdrofoobsed ühendid, alles seejärel hüdrofiilsed ühendid [39]. Statsionaarse faasina kasutatakse tavaliselt silikageeli ning mobiilse faasina hekseeni, diklorometaani, kloroformi, dietüületrit või nende segusid [36].

Pöördfaasivedelikkromatograafias kasutatakse apolaarset statsionaarset faasi ning polaarset mobiilset faasi, seetõttu elueeruvad hüdrofoobsed ühendid kauem kui hüdrofiilsed proovi komponendid. Statsionaarse faasina on enamasti kasutusel silikageel, mille külge on seotud apolaarsed alküülahelad (tavaliselt 18 või 8 süsinikuaatomiga), mobiilse faasina kasutakse vett või vees lahustuvaid orgaanilisi lahendajaid, põhiliselt metanooli ja atsetonitriili [39].

Kuna enamik aminohappeid ei ole kromoforsed ega fluorestseeru, on nende vedelikkromatograafilise eraldamise järgseks detekteerimiseks fluorestsents- ja UV-detektoritega vajalik derivatiseerimine [33], lisaks on derivatiseerimata proovide puhul on keeruline saada head piikide lahutust [40]. Pöördfaasivedelikkromatograafias toimub derivatiseerimine kolonneelselt [26]. Peamiste derivatiseerivate reagentidena on kasutusel o-ftaalaldehüüd (OPA), 9-fluoreenüülmetüülkloroformaat (FMOC) ja fenüülisotiotsüanaat (PITC) [28]. Kasutades detektorina massispektromeetrit (MS), on võimalik edukalt ka derivatiseerimata proove kõrge selektiivsusega ja tundlikkusega kvantifitseerida [40], tandemmassispektromeetriaga (MS/MS) on võimalik eristada ka aminohapete D- ja L vorme [41].

Ioonvahetuskromatograafia (IEC)

Ioonvahetuskromatograafia (IEC) põhineb lahustunud analüüsi ionide ja vastaslaengut omavate rühmadega statsionaarse faasi külgetõmbel. Manipuleerides mobiilse faasi omadusi, on võimalik selektiivselt vabastada molekule statsionaarse faasi küljest, millega kaasneb analüüdi elueerumine [31].

Katioon-ioonvahetajat ehk kationiidi kasutakse positiivselt laetud ionide sidumiseks ning eraldamiseks negatiivselt laetud statsionaarsel faasil, seevastu anioonset ionvahetajat ehk anioniidi kasutatakse negatiivselt laetud ionide sidumiseks positiivse statsionaarse faasiga, võimaldades selle eraldamist ülejäänud proovist [38].

Aminohapete eraldamine toimub katioon-ioonvaheti ehk kationiidi abil. Proov sisestatakse puhvri madala pH väärtuse juures kolonni. Aminohapped omavad sellel pH-l positiivset laengut ja on seetõttu kationiidiga seotud. Tõstes järjest elueerimiseks kasutatava puhvri pH-d ning soolakontsentratsiooni, läheneb aminohappe pH aina enam isoelektrilisele punktile, millega kaasneb molekuli funktsionaalrühmade laengu muutus. Jõudes isoelektrilisse punkti, saavutab aminohape summarse null-laengu, mistõttu kaob ioonne side kationiidiga ning see elueerub kolonnist [42].

Hüdrofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafia (HILIC)

Hüdrofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafia on kõrgsurvevedelikkromatograafia liik. Seda peetakse alternatiiviks klassikalisele pöördfaasi-HPLC-le, peamiselt aga polaarsete aminohapete uurimisel. HILIC meetodika korral kasutatakse statsionaarse faasina hüdrofiilset kolonni ja hüdrofoobset mobiilset faasi, mis on segatud vähese koguse vee või mõne teise polaarsete solvendiga, et tagada osaline hüdrofiilsete ainete lahustuvus [34].

Metoodika võimaldab paremini eraldada hüdrofiilseid ning amfiilseid aminohappeid kui klassikalise pöördfaasikromatograafiaga. Pöördfaasi-HPLC kolonnist elueeruvad polaarsete aminohapped vähese retentsiooni tõttu kiiresti välja, mis võib teha nende lahutamise raskeks [43].

HILIC-MS kasutatakse derivatiseerimata aminohapete analüüsiks, kuid selle meetodika puhul võivad olla probleemideks halb korratavus ja kolonni pikk tasakaalustamisaeg, võrreldes teiste HPLC meetodikatega [40].

1.6. Valideerimine

Analüütilise meetodika valideerimine on protsess tõestamiseks, et meetodika on sobiv mingisuguse kindla analüütilise protsessi läbiviimiseks [44]. Valideerimine on vajalik mistahes uue või muudetud meetodika puhul, tagamaks, et see on võimeline andma usaldusväärseid ja korratavaid tulemusi ka siis, kui analüüsi teostatakse laborisisesele teise isiku või teise labori poolt samade töövahenditega [45].

Valideerimist viiakse läbi, et tagada lubatud varieeruvuse piirid meetodika rakendamiseks kindlatel tingimustel [46]. Valideerimine peaks algama analüüdi stabiilsuse ja meetodika selektiivsuse hindamisest, kuna kõik teised valideerimisparameetrid tuginevad nendele [47].

1.6.1. Valideerimise parameetrid

Peamisteks valideerimisnäitajateks, mida analüütilise meetodi puhul hinnatakse, on selektiivsus, kordustäpsus, õigsus, täpsus, saagis, lineaarsus, tundlikkus, määramis- ja tuvastamispiir ning robustsus.

Selektiivsus (ingl. k. *selectivity*) näitab analüütilise meetodi võimet korrektselt määrata analüüti teiste segajate olemasolul ehk kui selektiivne on meetod analüüdi suhtes [45]. Selektiivsus sõltub nii kromatograafilistest parameetritest kui ka detektorist, mida kasutatakse aine tuvastamiseks [44]. **Spetsiifiline** meetod analüütika valdkonnas on IUPAC-i kohaselt meetod, mis on absoluutselt selektiivne [44].

Kordustäpsus (ingl. k. *precision*) iseloomustab mõõtetulemuste kokkulangevust samade proovide korduva mõõtmise tulemusel kindlatel tingimustel [46]. Kordustäpsust väljendatakse tavaliselt absoluutse või suhtelise standardhälvena, dispersiooni või variatsioonikordajana. Kordustäpsusega iseloomustatakse mõõtmisüsteemi juhuslikku viga [47]. Kordustäpsuse mõõtmisel eristatakse päevasisest ja päevadevahelist kordustäpsust. **Päevasisene kordustäpsus** ehk **korduvus** (*repeatability* või *within-run precision*) on lühikese perioodi vältel ühe mõõtja tehtud kordusmõõtmiste seeria, kasutades üht analüsaatorit [46]. Korduvuse määramiseks analüüsitakse eraldi ettevalmistatud proove ning katsed teostatakse ühe päeva jooksul [47]. **Päevadevahelise kordustäpsuse** (*intermediate precision* või *between-run precision*) määramiseks analüüsitakse laborisisesele proove pikema ajavahemiku jooksul, tavaliselt mitme kuu [47] või päeva jooksul [46].

Õigsus (ingl. k. *trueness*) iseloomustab lõpmatu arvu mõõtmistulemuste keskmise väärtuse erinevust tõelisest väärtusest [48]. Seda kasutatakse, iseloomustamaks süstemaatilist mõõtmisviga [45]. Praktikas hinnatakse õigsust piisavalt suure hulga mõõtmiste keskmiste ja tõeliste väärtuste asemel kasutatud referentsisalduste põhjal [47].

Täpsus (ingl. k. *accuracy*) iseloomustab ühe mõõtetulemuse lähedust tõelisele väärtusele – see näitab määratud väärtuse kõrvalekallet tegelikust väärtusest. Meetodi valideerimiseks on vajalik hinnata nii süstemaatilist kui ka juhuslikku viga, mistõttu hinnatakse täpsust õigsuse ja kordustäpsuse kaudu [48]. Täpsus, kordustäpsus ja õigsus on omavahel lähedaselt seotud, kuid

iseloomustavad erinevaid asju, näiteks võib meetod olla küll hea kordustäpsusega (väike juhuslik viga), aga vähese õigsuse tõttu ebatäpne (suur süstemaatiline viga) [46].

Saagis (ingl. k. *recovery*) iseloomustab proovi ettevalmistamise etapi tõhusust: proovi ettevalmistamise käigus saadud analüüdi proportsiooni [47]. Saagis iseloomustab määratud kontsentratsiooni suhet võrdlusväärtusega [44]. Kuigi alati on soovitud saada võimalikult 100% lähedane saagis, ei ole tegelikult minimaalset kehtestatud väärtust, seega sobiv analüütiline meetodika, millel on madal saagis, võib samuti olla määramiseks kõlblik [44]. Sisestandardi (IS) lisamine aitab proovi ettevalmistusega seotud saagist korrigeerida. Kalibratsioonikõverat esitatakse kui analüüdi ja IS signaalide suhte sõltuvust analüüdi ja IS kontsentratsioonide suhtega [47].

Lineaarsus (ingl. k. *linearity*) on parameeter, millega iseloomustatakse meetodi võimet saada tulemus, mis on lineaarses alas ehk kindlas kontsentratsioonide vahemikus analüüdi kontsentratsiooniga proportsionaalne [45].

Tundlikkus (ingl. k. *sensitivity*) on analüütilise mõõteseadme vastuse muutus, mis vastab mõõdetava analüüdi koguse, näiteks kontsentratsiooni muutusele [48]. Tundlikkus pole alati meetodi valideerimisel oluline parameeter, kuid meetodika optimeerimisel ja instrumendi rutinsel jälgimisel võib olla seda kasulik jälgida [47].

Tuvastamispiir (ingl. k. *limit of detection – LOD*) on vähim analüüdi kontsentratsioon proovis, mida on usaldusväärselt võimalik tuvastada baasjoone mürast [45].

Määramispiir (ingl. k. *limit of quantification – LOQ*) on vähim analüüdi kontsentratsioon proovis, mida on võimalik kvantifitseerida aktsepteeritava õigsuse ja kordustäpsusega [45].

Robustsus (ingl. k. *robustness*) on analüütilise meetodi stabiilsus meetodi parameetrite, näiteks pH, mobiilse faasi koostise, voolutuskiiruse, kolonni temperatuuri, proovi ettevalmistuse muutuste suhtes [45], [47].

1.6.2. Valideerimise meetodid ja juhendmaterjalid

Valideerimise ulatus sõltub kindlast kasutusala või spetsiifilisest rakendusest [48]. Tihtipeale on ebavajalik kõikide valideerimisparameetrite kindlakstegemine, selle asemel on võimalik rakendada osalist valideerimist [47]. Osaline valideerimine läbiviimine on otstarbekas, kui analüüsiks kasutatakse standardmeetodit, varasemalt valideeritud osaliselt muudetud või kitsa kasutusvaldkonnaga meetodikat [47]. Mõned valideerimisparameetrid võidakse ligikaudselt kindlaks teha meetodika väljatöötamise või rakendamise etapi ajal [48].

Analüütilise meetodika valideerimist saab jagada laborisisese (*single-laboratory*) ja laboritevahelise (*interlaboratory*) lähenemise järgi. Kui arendatud meetodika hakkab leidma laiahaardelist kasutust näiteks publitseeritud standardmeetodina, siis on laboritevaheline valideerimine sobiv viis viia läbi valideerimist. Laborites, kus leitakse, et nende spetsiifilise analüüsi tarbeks pole sobivat standardit ja arendatav meetodika oleks selles laboris vajalik, tehakse laborisisest valideerimist, kindlustamaks, et meetodika toimib [48].

Meetodi valideerimise protsetuurid ja aktsepteerimise kriteeriumid olid pikka aega ainult laborisese kindluse saamiseks ja nende läbiviimine ei olnud reguleeritud. Nüüdseks on saadaval mitmeid ametlikke raamjuhiseid, kuid vastavalt valideeritavale metoodikale on lubatud laboril neid modifitseerida [49].

Meetodi täpsuse valideerimiseks on soovitatud mitut erinevat lähenemisviisi. Esiteks on võimalik määrata analüüsi täpsust, kasutades sertifitseeritud võrdlusmaterjali, millega laboris saadud tulemusi võrreldakse. Teise võimalusena saab võrrelda valideeritava meetodi tulemusi teise meetodiga. Kui referentsmaterjali pole saadaval, siis on võimalik määrata meetodi täpsust proovi spaikimise teel. Spaikimisel lisatakse proovimatriksile kindel kogus teadaoleva sisaldusega uuritavat analüüti. Sel juhul tuleb spaikimiskatseid läbi viia üle terve lineaarse ala [49].

Levinumate analüütilise keemia meetodite valideerimisjuhendite hulka kuuluvad ICH, AOAC, Eurachem, IUPAC, EMA, FDA, SANCO poolt välja antud soovitused [47].

2. Töö eesmärk

Uurimistöö probleem

Söödast aminohapete sisalduse määramise meetodika loomine on Maaelu Teadmuskeskuse jaoks oluline, kuna METK-i teravilja ja söötade labor on Põllumajandus- ja Toiduameti ametlik labor sööda järelvalveanalüüsideks ja kuulub ka Euroopa Liidu referentslaborite nimistusse söödalisandite alal.

Rutiinanalüüside läbiviimiseks on ideaalne meetodika võimalikult lihtne ning vähese ajakuluga, lisandväärtust annab meetodikale keskkonnasäästlikkus. Üheks suurimaks väljakutseks aminohapete vedelikkromatograafilisel kvantifitseerimisel on proovi ettevalmistamisest tulenevad saagisekaod. Peptiidsidemete hüdrolüüsamise eesmärk on vabastada individuaalsed aminohapped peptiidahelast, et neid oleks võimalik eraldada ja seejärel detekteerida, kuid pikaajaline töötlemine hüdrolüüsiva reagentiga kõrge temperatuuri juures võib põhjustada osa aminohapete samaaegset degradeerumist.

Suureks murekohaks on väävlit sisaldavad aminohapped metioniin ja tsüsteiin, mille kaod on harilikult kõige suuremad. Klassikaliste meetodite, ka (EÜ) nr 152/2009 määruses kirjeldatud meetodika kohaselt, on metioniini ja tsüsteiini määramiseks ette nähtud hüdrolüüsieelne oksüdeerimine persipelghappega. Reaktsioon kestab 16 tundi ning peab olema kindalt ajastatud, sest oksüdatsioon on vaja õigeaegselt järgmise reagenti lisamisega peatada. Klassikaliste meetodite põhiselt on ettevalmistusele ning analüüsile kuluv aeg harilikult kolm tööpäeva. Reagentikulu vähendamine oli teine aspekt, mis oli meetodika arendamise ajendiks reaktsioonimahtude vähendamise ning alternatiivsete lahjenduste teel.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on arendada ja valideerida vedelikkromatograafiline meetodika, millega on söödast rutiinanalüüsina võimalik aminohapete metioniin, tsüsteiin, treoniin ja lüsiin määramine.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Materjalid

3.1.1. Uuritavad proovid

Töös analüüsiti viit Tšehhi ringtesti MPZ ÚKZÚZ raames väljastatud taimset söödaproovi: sigade, kalkunite, munakanade ja pardipoegade täissööta ning pullide täiendsööta.

3.1.2. Reagendid

Aminohapete proovist eraldamiseks ja analüüsimiseks kasutati anhüdriidset dinaatriumfosfaati ($\geq 99,0\%$, Honeywell), naatriumtetraboraatdekahüdraati ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich), atsetonitrilli (ACN) (HPLC klass, $\geq 99,9\%$, Honeywell), metanooli (MeOH) (HPLC klass, $\geq 99,9\%$, Honeywell), soolhapet ($\geq 37\%$, Honeywell), fenooli (99,0–100,5%, Sigma-Aldrich) 3-3'-ditiopropaanhapet (DTDPA) ($>99\%$, Agilent Technologies), ülipuhast vett (MQ) (Millipore), ortofosforhapet (85%, Lach-Ner), naatriumhüdrosiidi (46%, Keemiakaubandus), boraatpuhvrit (0,4 N vesilahus, pH 10,2, Agilent Technologies), OPA-MPA reagenti (o-ftaalaldehüüd (OPA) ja 3-merkaptopropaanhapet (MPA)) (Agilent Technologies).

3.1.3. Standardid

Aminohapete metioniin, treoniin ja lüsiin sisalduse määramiseks kasutati standardainetena ettevõtte Agilent Technologies, Inc (Santa Clara, California, USA) aminohapete valmiskujul multistandardite lahuseid kontsentratsioonidega 10 pmol/ μL , 25 pmol/ μL , 100 pmol/ μL ja 250 pmol/ μL . Tsüst(e)ini määramiseks kasutati standardina L-tsüstiini (Supelco Pharmaceutical Secondary Standard, TraceCERT®), mis derivatiseeriti DTDPA-ga.

Sisestandardina kasutati norvaliini (MW=117,15 g/mol), mis pärines samuti ettevõttest Agilent Technologies, Inc.

3.2. Meetodid

3.2.1. Metoodika arendamine

Proovide ettevalmistus laborisiseselt arendatud metoodika põhjal

Proovide ettevalmistus tugines enamjaolt D'Onofrio *et al.* 2023. aastal publitseeritud metoodikale, mis sobib lemmikloomade kuiv- ja märgtoidust ning söödamaterjalidest aminohapete määramiseks [50], proovi ettevalmistusel viidi mõningad muudatused sisse Agilent Biocolumns'i aminohappeanalüüsi juhendi [51] põhjal.

Juba eelnevalt jahvatatud proovid kaaluti sõltuvalt lämmastiku üldsisaldusest kahes paralleelis 0,35–0,50 g kaupa 12 mL korgiga klaastuubidesse. Klaastuubidesse lisati 1 mL 2% DTDPA lahust, 1,25 mL ülipuhast vett, 500 µL 2,3% fenooli ja 2,5 mL 37% kontsentreeritud soolhapet, et saavutada 6 M HCl kontsentratsiooniga hüdrolüüsisegu.

Järgmiseks hüdrolüüsiti proove kuivatuskapis 110 °C juures 24 tundi. Esmalt keerati klaastuubidele kork õrnalt peale ning tõsteti need umbes 30 minutiks kuivatuskappi, et vältida nende purunemist tekkiva rõhu tõttu. Seejärel keerati korgid tugevalt kinni ning jäeti veel 23,5 tunniks kuivatuskappi.

Pärast hüdrolüüsi tõsteti klaastuubid jahutamiseks kohe jääle. Seejärel filtreeriti proov läbi 0,45 µm süstlafiltri viiali, nii et filtraadi kogus oleks edasiste toimingute jaoks üle 1 mL. Seejärel pipeteeriti automaatpipetiga 1 mL filtraati suuremasse, 15 mL mahuga plastikviaali. Plastikviaal asetati jääle, mille järel lisati sellele aeglaselt tilgutades 350 µL 46% NaOH, et proov neutraliseerida. Segu temperatuur ei tohtinud ületada 40 °C, seega leelist tuli lisada väga ettevaatlikult ning aeglaselt. Neutraliseerimiseks vajaliku NaOH kogus leiti katseliselt, lisades leelist ühele testproovile 10 µL kaupa, mõõtes pH-meetriga pidevalt happesust ning temperatuuri. Selle toimingu järel oli proovi pH 3–4 vahel. Edasistele proovidele rakendati samasugust tehnikat, kuid pH mõõtmist ei tehtud. Neutraliseeritud proovile lisati automaatpipetiga 8,65 mL mobiilset faasi A, et viia lahuse maht 10 mL-ni. Selle toimingu järel oli testproovi põhjal lahuse ligikaudne pH 6.

Järgmiseks tehti proovist veel 4,5-kordne lahjendus, pipeteerides suuremasse viaali 1 mL proovi ning 3,5 mL mobiilset faasi A. Analüüsiks pipeteeriti sellest 900 µL analüüsiviaali, lisades sellele 100 µL norvaliini kontsentratsiooniga 10 nmol/µL. Proovi lõplik lahjendus oli 250-kordne ning norvaliini kontsentratsioon proovis 1 nmol/µL.

Proovide ettevalmistuse arendamisprotsess

Töö arendamise esimese etapina katsetati (EÜ) nr 152/2009 määruses kirjeldatavat proovi ettevalmistust. See eeldas metioniini ja tsüsteiini 16 tunni pikkust oksüdeerimist persipelghappega ning seejärel ülemäärase oksüdatsioonireaktiivi lagundamist naatriumdisulfitiga. Seejärel toimus hüdrolüüs, lisades 25 mL hüdrolüüsisegu. Pärast hüdrolüüsi proov jahutati, filtreeriti läbi filterpaberi koonilisse kolbi, milles proov neutraliseeriti naatriumhüdrosiidiga. Seejärel kanti proov üle 250 mL mõõtkolbi ning täideti jooneni mobiilse faasi A-ga ehk fosfaatpuhvriga.

Määruses kirjeldatav meetodika eeldas hüdrolüüsaadi lahjendamist tsitraatpuhvris (pH=2,2) ja kationvahetuskolonnis eraldamist. METK-is varasemalt kasutusel olev meetodika, mida kasutati antud tööst erineva seadme, kuid samuti pöördfaasi-HPLC peal, kasutas atsetaatpuhvrit (pH=4,2). Antud meetodika puhul oli soov kasutada fosfaatpuhvrit vastavalt Agilenti juhendile (pH=8,2). Nende teadmiste põhjal katsetati, kas proovi pH-l on mõju analüüsitulemustele. Selleks valmistati ette kolm paralleeli, korrigeerides pH väärtused NaOH-ga kolmele erinevale tasemele: 2, 4, ja 10. Proovide piikide pindalade statistilist erinevust ei kontrollitud, kuid tulemused olid väga ligilähedased.

Metioniini ja tsüsteiini oksüdeerimisetapi tõttu oli vaja valmistada kõigi nelja määratava aminohappe jaoks eraldi kalibratsioonistandardid. See ei olnud ideaalne lahendus, kuna plaan oli tulevikus meetodikat rakendada ka teiste aminohapete samaaegseks määramiseks. Soov oli kasutada kvantifitseerimiseks Agilenti multistandardeid, kuid tsüsteiini ja metioniini

oksüdatsiooniproductide tsüsteiinihappe ja metioniinsulfooni retentsiooniaeg oli väga sarnane teiste aminohapetega laboris kasutatava kromatograafilise süsteemi puhul, mistõttu polnud kromatogrammil võimalik piike üksteisest eraldada.

Pärast mitmete proovide ettevalmistamist leiti, et töönädala jooksul on töömahtu ning ajakulu arvestades võimalik teha ainult üks ettevalmistus, mida tehti üle kolme päeva. Samuti oli reagentikulu iga proovi kohta suur, kui arvestada, et analüsaatorisse sisestati sellest ainult 1 mL.

Kirjandusest hakati otsima alternatiivseid meetodeid, kuidas lühendada proovi ettevalmistamiseks vajalikku aega, vähendades loodetavasti sealjuures reagentikulu ning võimaldades kasutada multistandardit. Leiti meetodika, mis võimaldas optimeerida kõiki kolme, lihtsustades tunduvalt analüüsi käiku.

Edasise töö jooksul lähtuti meetodikast, mis sobis lemmikloomatoidust ja söödamerjalidest aminohapete määramiseks [50], võttes kasutusele DTDPDA tsüsteiini derivatiseerimiseks ja viies hüdrolüüsisegu mahu viis korda väiksemaks.

Erinevalt D'Onofrio *et al.* meetodikast, otsustati arendamisetapi käigus sisestandardit hüdrolüüsitavale proovile mitte lisada, kuna see andis sõltuvalt proovist kohati varieeruvaid piigi pindalasid. Itaallaste meetodika kohaselt valmistati 1 nmol/ μ L sisestandardist 10-kordse lahjendusega töölahust, mida lisati proovidele hüdrolüüsietaapi käigus. See kogus asendati ülipuhta veega, et saavutada hüdrolüüsilahuses sarnane 6 M soolhappe kontsentratsioon, mida kasutatakse ka klassikaliste meetodite puhul. Sisestandardit otsustati lisada sarnaselt Agilenti kalibratsioonistandardite valmistamise juhendiga alles vahetult enne analüüsi. Kuumutamiseks kasutati kuivatuskappi, mille temperatuur oli seatud 110 °C juurde, mitte Reacti-Therm™ kuumutusmoodulit, nagu tehti seda lemmikloomatoidu-uuringus.

Itaallaste meetodika kohaselt pipeteeriti analüsaatorisse minevasse viaali 20 μ L hüdrolüsaati, millele lisati 980 μ L vett, jättes neutraliseerimise etapi vahele. Siinkohal otsustati lähtuda (EÜ) nr 152/2009 määrusest ning proovi pH korrigeerida mobiilse faasi A lähedaseks pH-ks ja edasiselt lahjendada proovi samuti puhvril. Proovi lahjendus tehti sarnaselt itaallaste meetodikale ning Euroopa Komisjoni määrusele 250-kordne, kuid lahjendamise protsessi muudeti, et vältida suurt reagentikulu, aga ka suurendada lahjendamisest tulenevaid võimalikke pipeteerimisvigu.

Mobiilsete faaside ja standardite ettevalmistus

Mobiilsete faaside, metioniini, treoniini ja lüsiini kalibratsioonistandardite ning sisestandardi ettevalmistus toimusid vastavalt Agilenti aminohappeanalüüsi juhendile [51]. Cys-X kalibratsioonistandardite valmistamisel juhinduti D'Onofrio *et al.* meetodikast [50].

Mobiilse faasi A valmistamiseks kaaluti 1,4 g anhüdroidset dinaatriumfosfaati (Na_2HPO_4) ning 3,8 g naatriumtetraboraatdekahüdraati $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, mis lahustati 1 L ülipuhtas vees. Saadi mõlema aine 10 mM lahus. Mobiilse faasi pH korrigeerimiseks lisati lahusele esmalt 1,2 mL kontsentreeritud soolhapet, edasi tilgutati hapet, kuni saavutati pH väärtusega 8,2. Seejärel filtreeriti puhver läbi 0,2 μ m pooriga membraanfiltril. Mobiilse faasi B koosnes atsetonitrilist, metanoolist ja veest vahekorras 45:45:10 (v/v/v). Süstimiseks kasutatav süstelahusti valmistati 100 mL mobiilsest faasist A ja 0,4 mL kontsentreeritud ortofosforhappest.

Sisestandardi valmistamiseks kaaluti analüütilisel kaalul 58,58 mg norvaliini, mis lahustati 50 mL 0,1 M soolhappe lahuses. Saadud sisestandardi lahus oli kontsentratsiooniga 10 nmol/μL.

Metioniini, treoniini ning lüsiini kvantifitseerimiseks kasutatud kalibratsioonistandardid valmistati lisades 900 μL Agilenti multistandarditele 100 μL sisestandardit. Lõplikud metioniini, treoniini ja lüsiini kalibratsioonistandardite kontsentratsioonid olid 9 pmol/μL, 23 pmol/μL, 90 pmol/μL ning 225 pmol/μL.

Tsüst(e)iini määramiseks tuli eraldi valmistada Cys-X kalibratsioonilahused, derivatiseerides tsüstiin DTDPa abil. Selleks valmistati tsüstiinist 2,0 μmol/mL ja 10,2 μmol/mL kontsentratsioonidega alglahused, milleks kaaluti vastavalt 12 mg ja 61 mg tsüstiini 25 mL mahuga kolbi, millesse lisati määrgini 0,1 M soolhapet. Viie kalibratsioonistandardi (A-E) valmistamiseks pipeteeriti reagente 12 mL korgiga klaastuubi alloleva **Tabel 2** kohaselt:

Tabel 2. Cys-X kalibratsioonistandardite valmistamine

Standard	Tsüstiini alglahuse kontsentratsioon, μmol/ml	Tsüstiini alglahuse maht, mL	6 M HCl, mL	DTDPA 2% (w/v) 0,2 M NaOH lahuses, mL
A	2,0	0,50	4	1
B	2,0	1,00	4	1
C	10,2	0,25	4	1
D	10,2	0,50	4	1
E	10,2	1,00	4	1

Sarnaselt proovidega hüdrolüüsi Cys-X standardeid 24 h 100 °C juures. Seejärel tehti 100 μL hüdrolüüsaadist 50-kordne lahjendus ülipuhtasse vette. Seejärel pipeteeriti 900 μL standardlahust analüsaatorisse minevatesse viaalidesse, millele lisati 100 μL norvaliini. Lõplikud Cys-X kalibratsioonistandardite kontsentratsioonid olid 3 pmol/μL, 6 pmol/μL, 9 pmol/μL, 17 pmol/μL ja 30 pmol/μL.

Pöördfaasi-kõrgsurvevedelikkromatograafia

Proovide analüüsimiseks kasutati Agilent Technologies 1260 Infinity II LC süsteemi, mis oli varustatud automaatse proovivõtjaga ning diodridetektoriga (DAD – inglise keeles *diode array detector*). Aminohapete eraldamiseks kasutati UHPLC AdvanceBio AAA kolonni (3,0 x 100 mm, 2,7 μm), mis oli ühendatud UHPLC AdvanceBio AAA eelkolonniga (3,0 x 5 mm, 2,7 μm). Voolutusgradienti on iseloomustatud allolevas **Tabel 3**. Kolonni temperatuur oli katsete vältel 40 °C, proove aga säilitati terve katseperioodi vältel autosamplris 4 °C juures. Voolutuskiiruseks määrati 0,42 mL/min, ühe analüüsi pikkuseks oli 25 minutit ning süstemahuks 1 μL. Detekteerimiseks kasutatud UV-lainepikkus oli 338 nm.

Tabel 3. Elueerimisgradient analüüsi vältel, mobiilsete faaside vahekorra sõltuvus ajast

Aeg, min	Mobiilne faas A, %	Mobiilne faas B, %
0	98	2
0,35	98	2
13,4	43	57
13,5	0	100
15,7	0	100
15,8	98	2
25	Analüüsi lõpp	

Aminohapete määramiseks kasutati automatiseeritud derivatiseerimist OPA-ga. Derivatiseerimiseks kasutatud programm oli järgmine:

- 1) Nõelaga tõmmatakse kapillaari 2,5 µL boraatpuhvrit
- 2) Nõelaga tõmmatakse kapillaari 1,0 µL proovi
- 3) Kapillaaris 3,5 µL mahu segamine 5 korda
- 4) Ooteaeg 0,2 minutit
- 5) Nõelaga tõmmatakse kapillaari 0,5 µL OPA reagenti
- 6) Kapillaaris 4,0 µL mahu segamine 10 korda
- 7) Nõelaga tõmmatakse kapillaari 32 µL süstelahustit
- 8) Kapillaaris 20 µL mahu segamine 8 korda
- 9) Süstimine
- 10) Ooteaeg 0,1 minutit
- 11) *Valve bypass*

3.2.2. Meetodika valideerimise katsete kirjeldus

Välja töötatud meetodika valideerimisel laborisisesel meetodil tugineti peamiselt Eurachemi juhendmaterjalile [48]. Valideerimise käigus määrati lineaarsus, tuvastamiskiir (LOD), määramiskiir (LOQ), päevadevaheline kordustäpsus ja saagis.

Kalibratsioonikõvera hindamiseks mõõdeti kõiki kalibratsioonistandardite punkte kaks korda. Seejärel koostati keskmise tulemuse järgi igale uuritavale aminohappele kalibratsioonikõver, milles aminohappe pindala ja sisestandardi pindala suhe oli graafiku y-teljel ja standardühendi suhteline kontsentratsioon x-teljel. Kõikide analüütide korrelatsioonikoefitsendid leiti lineaarset regressiooni kasutades.

LOD ja LOQ arvutamiseks analüüsiti standardainete kõige madalamat kontsentratsioonipunkti 10 korda ning analüüsi tulemustest saadud standardhälbe (SD) põhjal korrutati LOD saamiseks SD 3-ga ning LOQ saamiseks 10-ga.

Saagise ja kordustäpsuse hindamiseks analüüsiti kõiki proove kahe eraldi ettevalmistatud paralleelina kolmel järjestikusel päeval. Päevadevaheline kordustäpsus leiti iga proovi kõikide

aminohapete jaoks eraldi, koondades kolme päeva kahe paralleeli keskmiste tulemuste standardhälbed koondatud standardhälbeks (SD_{pooled}) ja arvutades suhtelise koondatud standardhälbe kolme päeva ühise keskmise sisalduse ning SD_{pooled} põhjal. Saagist iseloomustati analüüdi keskmise sisalduse põhjal, võrdlusmaterjalina kasutatavast Tšehhi ringtesti tulemuste põhjal arvutati suhteline saagiseprotsent (R%).

3.2.3. Andmeanalüüs

Kromatograafilisel eraldamisel ja UV-piirkonnas detekteeritud andmeid analüüsiti ja kvantifitseeriti, kasutades programme Agilent OpenLab CDS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) ja Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Tsüstiin ja tsüsteiin määratakse mõlemad S-((2-karboksüetüül)tio)tsüsteiinina (Cys-X) proovide hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse tsüstiiniks (MW=240,30 g/mol).

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Analüüsitulemused

Töö tulemusena valmis vedelikkromatograafiline meetodika aminohapete määramiseks, mille proovi ettevalmistus ja analüüs tuginesid peamiselt 2023. aastal avaldatud meetodikale lemmikloomade toidust aminohapete kvantifitseerimiseks [50] ja Agilent Biocolumns'i aminohappeanalüüsi juhendile [51].

Huvipakkuvad analüüdid elueerusid 25-minutilise analüüsi vältel 7–14 minuti vahel, kuid pikem analüüsiaeg oli vajalik teiste aminohapete täielikuks kolonnist väljutamiseks. Analüütide piikide keskmised retentsiooniajad on allolevas **Tabel 4**.

Tabel 4. Aminohapete treoniin, Cys-X, metioniin ja lüsiin retentsiooniajad kolonnist väljumise järjekorras

Analüüt	RT, min
Treoniin	7,254
Cys-X	7,441
Metioniin	11,067
Norvaliin	11,295
Lüsiin	13,075

Tabel 5. Aminohapete keskmine sisaldus proovides kolme päeva tulemuste põhjal (n=6), väljendatud pmol/μL

Analüüt	Keskmine sisaldus, pmol/μL				
	Sigade täissööt	Kalkunite täissööt	Pardipoegade täissööt	Pullide täiendsööt	Munakanade täissööt
Treoniin	65,02 ± 0,48	61,68 ± 0,60	53,00 ± 0,42	60,29 ± 0,69	48,37 ± 0,64
Tsüstiin	13,43 ± 0,34	13,86 ± 0,33	13,95 ± 0,80	13,27 ± 0,28	12,48 ± 0,27
Metioniin	16,82 ± 0,26	21,41 ± 1,57	22,66 ± 0,71	13,47 ± 0,31	25,93 ± 0,20
Lüsiin	67,25 ± 2,26	58,05 ± 1,46	44,88 ± 1,30	48,63 ± 1,30	83,37 ± 1,40

Kõikide analüütide tulemused arutati ühikust pmol/μL ümber massiprotsendiks (% (w/w)) proovi kaalutise, proovi niiskusesisalduse ja aminohapete molaarmasside kaudu, nagu söödaanalüüside tulemuste väljendamise puhul tavaks.

Tabel 6. Aminohapete keskmine sisaldus proovides kolme päeva tulemuste põhjal (n=6), väljendatud massiprotsendina % (w/w)

Analüüt	Keskmine sisaldus, % (w/w)				
	Sigade täissööt	Kalkunite täissööt	Pardipoegade täissööt	Pullide täiendsööt	Munakanade täissööt
Treoniin	0,5593 ± 0,0052	0,5654 ± 0,0059	0,4295 ± 0,0041	0,5073 ± 0,0058	0,3424 ± 0,0087
Tsüstiin	0,2329 ± 0,0062	0,2564 ± 0,0054	0,2281 ± 0,0123	0,2253 ± 0,0047	0,1781 ± 0,0032
Metioniin	0,1812 ± 0,0034	0,2459 ± 0,0190	0,2300 ± 0,0080	0,1420 ± 0,0031	0,2299 ± 0,0042
Lüsiin	0,7100 ± 0,0319	0,6531 ± 0,0156	0,4465 ± 0,0143	0,5022 ± 0,0135	0,7242 ± 0,0136

Tabel 5 on esitatud meetodika arendamise käigus kasutatud söödaproovide keskmised analüüsitulemused sarnaselt standarditega ühikutes pmol/μL ning **Tabel 6** on samad andmed esitatud massiprotsendina kuivainest. Kõige suuremate tulemuste varieeruvusega oli sigade täissööda puhul lüsiin, mille keskmine määramise tulemus varieerus 4,5% ulatuses, kalkunite täissööda puhul metioniin (7,7%), pardipoegade täissööda puhul tsüst(e)iin (5,4%). Kõige vähem erinesid tulemused kõikide proovide puhul treoniini määramisel, määramise keskmine varieeruvus erinevates proovides oli 0,9–2,55%.

4.2. Meetodika valideerimise tulemused

Analüüsimetodika välja töötamise järgselt teostati selle valideerimine. Valideerimise käigus määrati lineaarne ala, tuvastamiskiir (LOD), määramiskiir (LOQ), päevadevaheline kordustäpsus ning saagis.

Aminohapete lineaarne ala ning kalibratsioonikõverad määrati standardlahuseid kasutades. Metioniin, treoniin ja lüsiin, mille kalibratsioonikõver loodi multistandardite abil, olid kontsentratsioonivahemikus 9–225 pmol/μL kõrge lineaarsusega ($R^2 > 0,999$). Tsüstiini määramiseks valmistatud Cys-X standard oli kontsentratsioonivahemikus 3–30 pmol/μL samuti kõrge lineaarsusega ($R^2 > 0,999$). Analüütide tuvastamis- ja määramiskiirid arutati kõige väiksema kontsentratsiooniga kalibratsioonistandardite SD järgi, tehes kümme järjestikust analüüsi. Kalibratsiooniparameetrid, LOD ja LOQ on välja toodud **Tabel 7**.

Tabel 7. Analüütide määramise lineaarne ala, kalibratsioonikõver, determinatsioonikordaja R^2 , tuvastamispiir (LOD) ja määramispiir (LOQ)

Analüüt	Lineaarne ala		Kalibratsioonikõver	R^2	LOD		LOQ	
	pmol/ μ L	mg/L			pmol/ μ L	μ g/L	pmol/ μ L	μ g/L
Treoniin	9 – 225	1,1 – 26,8	$y = 0,00081x - 0,00010$	0,99998	0,27	32	0,89	106
Tsüstiin	3 – 30	0,8 – 7,3	$y = 0,00174x - 0,00005$	0,99987	0,11	27	0,38	91
Metioniin	9 – 225	1,3 – 33,6	$y = 0,00102x - 0,00070$	0,99997	0,33	49	1,08	162
Lüsiin	9 – 225	1,3 – 32,9	$y = 0,00178x - 0,00096$	0,99998	0,62	92	2,10	307

Proovide tulemuste põhjal määrati meetodika päevadevaheline kordustäpsus. Päevasisest kordustäpsust otsustati katsepunktide vähesuse tõttu mitte arvutada.

Päevadevaheline kordustäpsus iseloomustab mitme päeva jooksul tehtud analüüside tulemuste varieeruvust. Analüüsi päevadevaheline kordustäpsus leiti iga proovi kõikide aminohapete jaoks eraldi, koondades kolme päeva kahe paralleeli keskmiste tulemuste standardhälbed koondatud keskmiseks standardhälbeks (SD_{pooled}) ja arvutades suhtelise koondatud standardhälbe kolme päeva üldkeskmise sisalduse ning SD_{pooled} põhjal. Päevadevahelise kordustäpsuse määramise tulemused on allolevas **Tabel 8**.

Tabel 8. Päevadevaheline kordustäpsus iga proovi kolme päeva tulemuste põhjal (n=6), väljendatuna suhtelise koondatud standardhälbe kaudu

Analüüt	Päevadevaheline kordustäpsus RSD, %				
	Sigade täissööt	Kalkunite täissööt	Pardipoegade täissööt	Pullide täiendsööt	Munakanade täissööt
Treoniin	0,83	0,84	0,93	0,68	3,09
Tsüstiin	1,74	1,90	6,74	1,21	0,99
Metioniin	1,96	9,93	4,43	2,14	2,30
Lüsiin	4,61	0,75	3,59	1,28	1,27

Täpsus on vedelikkromatogaafias enamasti sõltuv analüüdi kontsentratsioonist, madalamal sisaldusel võib mõõtmise ebatäpsus olla suurem [48]. Aminohapped, mille saagiseprotsendid olid kõige väiksemad (metioniin ja tsüstiin, vt **Tabel 9**), olid ka kõige suurema päevadevahelise tulemuse varieeruvusega. Metioniini ja tsüstiini puhul olid analüüdi üldised kontsentratsioonid madalamad, kui teiste proovide keskmised kontsentratsioonid (12,48–22,66 pmol/ μ L). Treoniini tulemuste puhul

oli märgata, et munakanade sööt, mis oli viiest proovist kõige väiksema treoniinisaldusega (48,37 pmol/ μ L), oli päevadevaheline kordustäpsus kõige väiksem (RSD 3,09%). Võis täheldada, et kõige suuremad päevadevahelise tulemuse varieeruvused olid teatud proovides, mille kindla aminohappe kaks paralleeli olid ettevalmistuse tulemusena erinevad. Analüüdisalduse vähenemist päevade jooksul võis märgata sigade söödaproovi ühe lüsiini paralleeli puhul.

(EL) 2024/771 rakendusmäärus näeb ette, et sama prooviga samas laboris tehtud kahe aminohapete üldsalduse määramise tulemuste erinevus ei tohi erineda lüsiini puhul üle 6%, treoniini ja metioniini puhul üle 8% ning tsüst(e)iini puhul üle 15% [52]. Kõik kordustäpsused peale metioniini määramise tulemuse kalkunite söödas jäid nõuete piiresse. Metioniini määramise kordustäpsus oli selle proovi puhul 9,93%, ebatäpsus oli tingitud kahe paralleeli määramise erinevusest. Viga võis tuleneda proovi ettevalmistusel teostatud hüdrolüüsiitapist, mille käigus metioniin erineval määral degradeerus, aga ka söödaproovi ebahomogeensusest.

Metoodika saagist ja õigsust iseloomustati proovi saagiseprotsendi (R%) abil, kasutades võrdlusena Tšehhi ringtesti tulemusi.

Tabel 9. Aminohapete keskmine sisaldus proovides kolme päeva tulemuste põhjal (n=6) ja Tšehhi ringtesti tulemus, väljendatud massiprotsendina % (w/w), ning metoodika saagised (R%)

Proov		Analüüt			
		Treoniin	Tsüstiin	Metioniin	Lüsiin
Sigade täissööt	Keskmine sisaldus, (n=6), % (w/w)	0,5593 \pm 0,0052	0,2329 \pm 0,0062	0,1812 \pm 0,0034	0,7100 \pm 0,0319
	Ringtesti tulemus, % (w/w)	0,5421 \pm 0,0657	0,3105 \pm 0,0162	0,2901 \pm 0,0225	0,8019 \pm 0,0466
	Saagis, R%	103,2	75,0	62,5	88,5
Kalkunite täissööt	Keskmine sisaldus, (n=6), % (w/w)	0,5654 \pm 0,0059	0,2564 \pm 0,0054	0,2459 \pm 0,0190	0,6531 \pm 0,0156
	Ringtesti tulemus, % (w/w)	0,5528 \pm 0,0570	0,3398 \pm 0,0119	0,3690 \pm 0,0506	0,7239 \pm 0,0539
	Saagis, R%	102,3	75,4	66,6	90,2
Pardipoegade täissööt	Keskmine sisaldus, (n=6), % (w/w)	0,4295 \pm 0,0041	0,2281 \pm 0,0123	0,2300 \pm 0,0080	0,4465 \pm 0,0143
	Ringtesti tulemus, % (w/w)	0,4603 \pm 0,0388	0,2763 \pm 0,0413	0,3801 \pm 0,0330	0,5099 \pm 0,0338
	Saagis, R%	93,3	82,6	60,5	87,6

Pullide täiendsööt	Keskmine sisaldus, (n=6), % (w/w)	0,5073 ± 0,0058	0,2253 ± 0,0047	0,1420 ± 0,0031	0,5022 ± 0,0135
	Ringtesti tulemus, % (w/w)	0,5086 ± 0,0386	0,2432 ± 0,0790	0,2338 ±	0,5258 ± 0,0302
	Saagis, R%	99,7	92,6	60,7	95,5
Munakanade täissööt	Keskmine sisaldus, (n=6), % (w/w)	0,3424 ± 0,0087	0,1781 ± 0,0032	0,2299 ± 0,0042	0,7242 ± 0,0136
	Ringtesti tulemus, % (w/w)	0,4073 ± 0,0434	0,2575 ± 0,0387	0,3531 ± 0,0544	0,8473 ± 0,0543
	Saagis, R%	84,1	69,2	65,1	85,5

Parima saagisega võimaldab meetodika määrata treoniini ja lüsiini. Treoniini saagised jäid proovide lõikes 84,1–103,2% (keskmiselt $97 \pm 8\%$) vahele ning lüsiini saagised olid vahemikus 85,5–95,5% (keskmiselt $89 \pm 3\%$). Tsüstiinile, mida derivatiseeriti hüdrolüüsi ajal DTDPA-ga, arvutati saagiseks 69,2–92,6% (keskmiselt $79 \pm 8\%$). Metioniini saagiseks arvutati 60,5–66,6% (keskmiselt $63 \pm 3\%$), mis oli kõige väiksema, aga ka kõige konstantsema saagikusega aminohappeks tehtud katsete põhjal. Tsüst(e)iin ja metioniin, mille hüdrolüüsieelselt oksüdeerimata määramisel on kirjanduse põhjal suured kaod, olid ootuspäraselt väiksema saagisega kui treoniin ja lüsiin.

(EL) 2024/771 määrus näeb ette, et sama prooviga erinevates laborites ja/või erinevate analüüsijate poolt tehtud kahe aminohappe üldsisalduse mõõtmise tulemus peab jääma treoniini puhul alla 15%, lüsiini ja metioniini puhul 20% ja tsüst(e)iini puhul alla 50%. See määrus sätestab nõuded (EÜ) nr 152/2009 määruses kirjeldatud meetodikale, mille kohaselt toimus metioniini ja tsüst(e)iini hüdrolüüsieelne oksüdeerimine persipelghappega. Käesoleva töö raames arendatud meetodika kohaselt vastavad treoniini, lüsiini ja tsüst(e)iini tulemused nendele nõuetele. Metioniin, mille keskmine tulemus oli ringtesti omast keskmiselt 37% väiksem, nõuetele ei vastanud.

(EL) 2024/771 kehtestab, et aminohapete puhul, mille määramise saagis ei jää 90–110% piiridesse, tuleb analüüsitulemus esitada saagise suhtes korrigeerituna. Korrektsiooniteguri rakendamine võib olla variant, kuidas ka käesoleva töö raames arendatud meetodika rutiinanalüüside jaoks kasutusele võtta.

Töös hinnatud valideerimisparameetrid ja nende määramiseks kasutatud meetodid on piisavalt põhjalikud, et valideerida analüüsimeetodika, mis sobib söodast aminohapete määramiseks, kui on olemas sobilik võrdlusmaterjal. Käesoleva töö raames arendatud meetodika sobib söodast metioniini, tsüsteiini, treoniini ja lüsiini määramise rutiinanalüüside läbiviimiseks, kui määrata saagise põhjal aminohapetele korrektsioonitegurid.

Metoodika edasiseks arendamiseks on töö autoril ja juhendajal huvi suurendada metoodika saagist proovi hüdrolüüsimisel tekkivate kadude vähendamise näol. Potentsiaalne võimalus selle tegemiseks võib olla vaakumhüdrolüüsitubide kasutuselevõtt, mis vähendaks protsessiks kuluvat aega, ning vaakumkeskkond, milles puudub hapnik, võib parandada metioniini ja tsüsteiini saagiseid. Tavalistes klaastubides hüdrolüüsimisel võib saagikust tõsta antioksüdantide lisamine hüdrolüüsisegusse. Samuti on lõpuks soov metoodika valideerida võimalikult paljude teiste aminohapete jaoks.

Kokkuvõte

Tööstusloomade tervise parandamine ning loomakasvatusega seotud keskkonnajalajälje vähendamine on võimalik sööda toitainelise sisalduse optimeerimisega, mille üheks osaks on aminohappelise sisalduse optimeerimine vastavalt liigile ja kasvufaasile. Tarbija jaoks tähendab loomasööda väärtuse tõstmine kvaliteetsemat toitu – liha, piima, mune ja teisi loomseid saadusi. Sööda tootmine on ka konkurentsipõhine valdkond, mille eesmärk on valmistada võimalikult kõrge kvaliteediga ja lisandväärtusega sööta. Sööda parandamiseks ja kvaliteedi tagamiseks on vaja sööta pidevalt kontrollida.

Käesoleva töö eesmärgiks oli laborisiseselt arendada ja valideerida vedelikkromatograafiline meetodika, mis sobiks aminohapete metioniin, tsüsteiin, treoniin ja lüsiin määramiseks loomasöödast. Töös kasutati aminohapete analüüsimiseks UHPLC-DAD süsteemi.

Töö tulemused näitasid, et arendatud meetodika saagised on aminohapete jaoks järgmised: metioniin $63 \pm 3\%$, tsüst(e)iin $79 \pm 8\%$, treoniin $97 \pm 8\%$, lüsiin $89 \pm 3\%$. Järeldati, et meetodika rakendamiseks on vajalik analüüsitud aminohappeid saagise suhtes korrigeerida ehk võtta tulemuste väljastamiseks kasutusele korrigeerimisfaktorid.

Töö eesmärk täitus – töötati välja analüütiline meetodika, mis võimaldaks määrata oksüdeerimata proovidest nelja aminohapet, ning valideeriti see. Sellegipoolest on plaanis meetodikat veel edasi arendada, proovides suurendada aminohapete saagiseid ja seejärel valideerida meetodika ka teiste aminohapete jaoks.

Abstract

Improving the health of industrial animals and reducing the environmental footprint of livestock farming is possible by optimizing the nutritional content of feed, which includes optimizing the amino acid content according to species and growth phase. For the consumer, enhancing the value of animal feed means higher quality food – meat, milk, eggs, and other animal products. Feed production is also a competitive field, aiming to produce the highest quality and value-added feed possible. To improve and ensure the quality of feed, continuous monitoring is necessary.

The aim of this bachelor's thesis is to develop and validate a liquid chromatographic methodology for determining the amino acids methionine, cysteine, threonine, and lysine in plant-based animal feed. The purpose of validating the methodology is to ensure its reliability for routine analysis.

During the practical work, experiments were conducted by modifying various existing methods, and once a suitable methodology was found, it was validated. The parameters determined for method validation included the calibration curve, linear range, detection limit, quantification limit, repeatability, and recovery. The experiments were conducted using five plant-based animal feed samples provided under the Czech proficiency test MPZ ÚKZÚZ. The tests were carried out at the laboratory of cereals and feeds at The Centre of Estonian Rural Research and Knowledge (METK).

As a key validation result of the work, the recovery for the investigated amino acids was determined. The average recovery for methionine using the developed method was $63 \pm 3\%$, for cyst(e)ine $79 \pm 8\%$, for threonine $97 \pm 8\%$, and for lysine $89 \pm 3\%$. The methodology can be applied to sample analysis by adjusting the results based on recovery.

This thesis is divided into theoretical and experimental parts. The literary review of the theoretical part describes animal feed, feed optimization, the investigated amino acids, and methods for determining amino acids. The second part outlines the aim of the work. The third part lists the materials used in the work and explains the methods. The fourth part presents the analysis and validation results and discusses them. The thesis consists of 40 pages, nine tables, and four figures.

Tänuavaldused

Täna lõputöövõimaluse eest Maaelu Teadmuskeskust ning teravilja ja söötade labori juhatajat Liina Kruusi, kelle juhendamisel lõputöö valmis.

Samuti tänan oma kaasjuhendajat Merike Vaherit, kes oli ülikooli poolelt valmis mind toetama.

Täna bakalaureusetöö korrektorit Marju Lina, kes parandas töös keelelised vead.

Kasutatud kirjandus

- [1] „Sööt ja söötmine“, Põllumajandus- ja Toiduamet. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pta.agri.ee/pollumehele-ja-maaomanikule/loomakasvatus/soot-ja-sootmine>
- [2] „Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 767/2009“, *Euroopa Parlament, Euroopa Liidu Nõukogu*. 13. juuli 2009. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R0767-20181226>
- [3] „Komisjoni määrus (EL) nr 68/2013“, *Euroopa Komisjon*. 13. jaanuar 2013. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:02013R0068-20220724>
- [4] „Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EL) 2019/4“. Euroopa Parlament, Euroopa Liidu Nõukogu, 11. detsember 2018. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0004>
- [5] M. J. Lopez ja S. S. Mohiuddin, „Biochemistry, Essential Amino Acids“, StatPearls Publishing. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- [6] G. Wu *et al.*, „Dietary requirements of ‘nutritionally non-essential amino acids’ by animals and humans“, *Amino Acids*, kd 44, nr 4. lk 1107–1113, aprill 2013. doi: 10.1007/s00726-012-1444-2.
- [7] Y. Hou ja G. Wu, „Nutritionally essential amino acids“, *Advances in Nutrition*, kd 9, nr 6, lk 849–851, nov 2018, doi: 10.1093/ADVANCES/NMY054.
- [8] G. Wu, „Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition“, *Amino Acids*. mai 2009. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.
- [9] P. Dalibard *et al.*, „Amino Acids in Animal Nutrition“, Fefana Publication, 2014.
- [10] R. Rezaei, W. Wang, Z. Wu, Z. Dai, J. Wang, ja G. Wu, „Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young Pigs“, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, kd 4, nr 1. 27. veebruar 2013. doi: 10.1186/2049-1891-4-7.
- [11] D. D. Uyeh *et al.*, „Precision animal feed formulation: An evolutionary multi-objective approach“, *Anim Feed Sci Technol*, kd 256, sept 2019, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2019.114211.
- [12] P. Spring, „The challenge of cost effective poultry and animal nutrition: Optimizing existing and applying novel concepts“.
- [13] L. Cappelaere, J. Le Cour Grandmaison, N. Martin, ja W. Lambert, „Amino Acid Supplementation to Reduce Environmental Impacts of Broiler and Pig Production: A Review“, *Frontiers in Veterinary Science*, kd 8. Frontiers Media S.A., 26. juuli 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.689259.

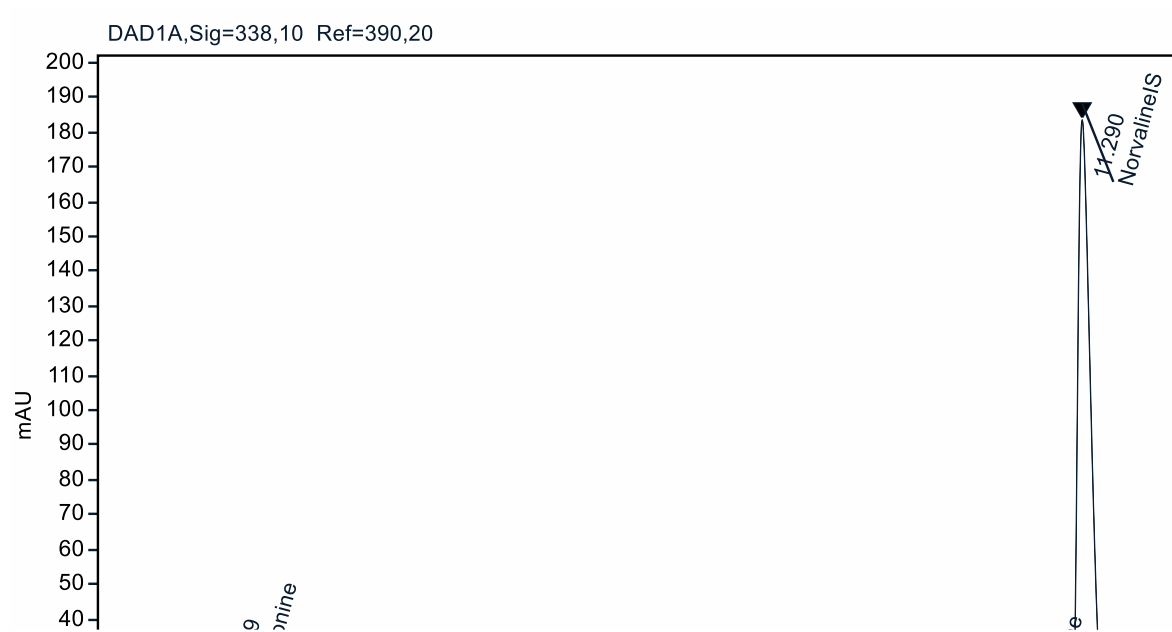
- [14] D. Moran ja E. Wall, „Livestock production and greenhouse gas emissions: Defining the problem and specifying solutions“, *Animal Frontiers*, kd 1, nr 1, lk 19–25, juuli 2011, doi: 10.2527/af.2011-0012.
- [15] P. Samanta, H. Horn, ja F. Saravia, „Impact of Livestock Farming on Nitrogen Pollution and the Corresponding Energy Demand for Zero Liquid Discharge“, *Water (Switzerland)*, kd 14, nr 8, apr 2022, doi: 10.3390/w14081278.
- [16] F. Garcia-Launay, H. M. G. van der Werf, T. T. H. Nguyen, L. Le Tutour, ja J. Y. Dourmad, „Evaluation of the environmental implications of the incorporation of feed-use amino acids in pig production using Life Cycle Assessment“, *Livest Sci*, kd 161, nr 1, lk 158–175, märts 2014, doi: 10.1016/j.livsci.2013.11.027.
- [17] „PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>
- [18] „PubChem Compound Summary for CID 5862, Cysteine“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cysteine>
- [19] „PubChem Compound Summary for CID 6288, Threonine“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Threonine>
- [20] „PubChem Compound Summary for CID 5962, Lysine“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lysine>
- [21] „PubChem Compound Summary for CID 65098, Norvaline“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norvaline>
- [22] K. Timberlake, *General, Organic, & Biological Chemistry: Structures of Life*. Benjamin Cummings, 2001.
- [23] „Rapid Oxidation of Cysteine to Cystine in Aqueous Solutions“, Bielefeld. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://www.xell.ag/oxidation-of-cysteine-to-cystine/technical-notes/>
- [24] „PubChem Compound Summary for CID 67678, Cystine“, National Center for Biotechnology Information. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cystine>
- [25] A. Lamp, M. Kaltschmitt, ja O. Lüdtko, „Improved HPLC-method for estimation and correction of amino acid losses during hydrolysis of unknown samples“, *Anal Biochem*, kd 543, lk 140–145, veebr 2018, doi: 10.1016/j.ab.2017.12.009.

- [26] M. Fountoulakis ja H. W. Lahm, „Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins“, *J Chromatogr A*, kd 826, nr 2, lk 109–134, nov 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00721-3.
- [27] „Komisjoni määrus (EÜ) nr 152/2009“, *Euroopa Komisjon*. 27. jaanuar 2009.
- [28] C. Cooper, N. Packer, ja K. Williams, „Amino Acid Analysis Protocols“.
- [29] S. A. Çevikkalp, G. B. Löker, M. Yaman, ja B. Amoutzopoulos, „A simplified HPLC method for determination of tryptophan in some cereals and legumes“, *Food Chem*, kd 193, lk 26–29, veebr 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.108.
- [30] P. W. Johns, „Determination of Sulfur Amino Acids in Milk and Plant Proteins“, *Food Anal Methods*, 2021, doi: 10.1007/s12161-020-01854-9/Published.
- [31] S. M. Premnath ja M. Zubair, „Chromatography“, StatPearls Publishing. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599545/>
- [32] O. Coskun, „Separation techniques: Chromatography“, *North Clin Istanbul*, kd 3, nr 2, lk 156–160, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.
- [33] L. A. Lestari, A. Rohman, Riswahyuli, S. Purwaningsih, F. Kurniawati, ja Irnawati, „Analysis of amino acids in food using High Performance Liquid Chromatography with derivatization techniques: a review“, *Food Research*, kd 6, nr 3. Rynnye Lyan Resources, lk 435–442, 1. juuni 2022. doi: 10.26656/fr.2017.6(3).442.
- [34] S. Kambhampati, J. Li, B. S. Evans, ja D. K. Allen, „Accurate and efficient amino acid analysis for protein quantification using hydrophilic interaction chromatography coupled tandem mass spectrometry“, *Plant Methods*, kd 15, nr 1, mai 2019, doi: 10.1186/s13007-019-0430-z.
- [35] S. Czaplicki, „Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds“, *Column Chromatography*, InTech, 2013. doi: 10.5772/55620.
- [36] „High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications“, LaboratoryInfo. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [37] T. H. Walter ja R. W. Andrews, „Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation“, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, kd 63. Elsevier B.V., lk 14–20, 1. detsember 2014. doi: 10.1016/j.trac.2014.07.016.
- [38] „HPLC Separation Modes“, Waters. Vaadatud: 15. mai 2024. [Online]. Available at: <https://www.waters.com/nextgen/ee/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/hplc-separation-modes.html>
- [39] F. Salvato, M. C. da C. Gallo de Carvalho, ja A. de Lima Leite, „Strategies for Protein Separation“, *Integrative Proteomics*, InTech, 2012. doi: 10.5772/29363.

- [40] D. O. Qasrawi, E. V. Petrotchenko, ja C. H. Borchers, „Amino acid analysis for peptide quantitation using reversed-phase liquid chromatography combined with multiple reaction monitoring mass spectrometry“, *Anal Bioanal Chem*, kd 415, nr 22, lk 5261–5267, sept 2023, doi: 10.1007/s00216-023-04840-2.
- [41] M. Danielsen, C. Nebel, ja T. K. Dalsgaard, „Simultaneous determination of L- And D-amino acids in proteins: A sensitive method using hydrolysis in deuterated acid and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis“, *Foods*, kd 9, nr 3, 2020, doi: 10.3390/foods9030309.
- [42] J. Csapó, C. Albert, K. Lóki, ja Z. Csapó-Kiss, „Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization“, 2008. [Online]. Available at: <https://cabidigitallibrary.org>
- [43] B. Buszewski ja S. Noga, „Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, kd 402, nr 1. lk 231–247, jaanuar 2012. doi: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [44] F. Raposo ja C. Ibelli-Bianco, „Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines“, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, kd 129. Elsevier B.V., 1. august 2020. doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- [45] S. Kumar Bhardwaj, „A Review: HPLC Method Development and Validation“, 2015.
- [46] V. H. Rajan ja M. V. Rajan, „Development and validation of HPLC method - A Review“, 2015.
- [47] A. Krueve *et al.*, „Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I“, *Analytica Chimica Acta*, kd 870, nr 1. Elsevier, lk 29–44, 2015. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.017.
- [48] „The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics“, 2014.
- [49] S. Chandran ja R. S. P. Singh, „Comparison of various international guidelines for analytical method validation“, *Pharmazie*, kd 62, nr 1. lk 4–14, jaanuar 2007. doi: 10.1691/ph.2007.1.5064.
- [50] F. D’Onofrio, F. Longo, T. Mauti, E. Pagani, P. Baravalle, ja B. Neri, „Determination of eleven total amino acids including cyst(e)ine by HPLC-DAD/FLD in complete dry and wet pet foods and their feed materials“, *Anim Feed Sci Technol*, sept 2023, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115720.
- [51] „Agilent Biocolumns Amino Acid Analysis ‘How-To’ Guide“.
- [52] „Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2024/771“, *Euroopa Komisjon*. 29. veebruar 2024. [Online]. Available at: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2024/771/oj

Lisad

Lisa 1. Sigade täissööda esimesel päeval analüüsitud proovi LC-UV kromatogramm



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Eva-Liisa Tiru

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Vedelikkromatograafilise meetodika arendamine ja valideerimine aminohapete metioniin, tsüsteiin, treoniin ja lüsiin määramiseks loomasöödadest,“ mille juhendaja on Liina Kruus,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

26.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.