

CONFRONTO TRA DIVERSE FASI MOBILI
PER LA DETERMINAZIONE IN HPLC
DI CARNOSINA, ANSERINA, L-ISTIDINA,
3-METIL-L-ISTIDINA

HPLC MOBILE PHASES COMPARISON FOR CARNOSINE,
ANSERINE, L-HISTIDINE AND 3-METHYL-L-HISTIDINE DETECTION

MICHELE DUCCI ⁽¹⁾, ALBERTO NICCOLINI ⁽²⁾,
SARA PACCHINI ⁽²⁾, AUGUSTO DELLA LONGA ⁽¹⁾,
PATRIZIA BUONCRISTIANI ⁽¹⁾, FRANCO MARTELLI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Scopo della ricerca è stato quello di determinare la miglior fase mobile che in condizioni isocratiche ed alla temperatura di derivatizzazione post colonna di 50°C consentisse la separazione dei picchi della carnosina, anserina e dei loro componenti.

Partendo da una fase mobile costituita da 20% acetonitrile e 80% di soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/litro di NaCl, sono state preparate fasi mobili con % di acetonitrile a decrescere (15-10-5) fino al raggiungimento della separazione completa dei picchi.

La fase mobile che ha permesso la totale separazione delle molecole è stata quella costituita dal 5% di acetonitrile. Le rette di regressione di ciascuna molecola hanno mostrato R² di correlazione estremamente elevati (~1) per un intervallo di concentrazione compreso tra 62.5 – 0.5 ng/20µl evidenziando una elevata accuratezza (~100%) ed un aumento della sensibilità per ogni composto a tutte le concentrazioni utilizzate.

Quindi, se l'aumento della temperatura della reazione di derivatizzazione post colonna con o-ftaldeide (OPA) ha prodotto un forte incremento della sensibilità di rilevazione di questi composti ed in particolare modo della l-istidina e della 3-metil-l-istidina (~70%), l'utilizzazione di una diversa fase mobile ha consentito la separazione di tutti i composti e principalmente la carnosina dalla 3-metil-l-istidina che in condizioni isocratiche mostrano tempi di ritenzione molto ravvicinati.

In conclusione la possibilità di poter determinare esigue concentrazioni di questi composti con una adeguata sensibilità ed un'elevata accuratezza può consentire di rilevarli anche in quei compartimenti dell'organismo dove la loro presenza appare molto ridotta.

Parole chiave: dipeptidi istidinici, HPLC, fase mobile.

⁽¹⁾ Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Direttore Prof. Carlo Benvenuti.

⁽²⁾ Collaboratore Esterno.

SUMMARY

This research proposes an high-performance-liquid-chromatography (HPLC) method for a quantitative detection of carnosina, anserine, l-histidine and 3-methyl-l-histidine, with o-phthalaldehyde (OPA) post column derivatisation by isocratic elution.

For this purpose some mobile-phases were prepared with scalar acetonitrile concentrations. The best mobile phase for a complete separation of all molecules was composed of Acetonitrile and 6mM Hydrochloric acid with 0,48 M sodium chloride solution (5%:95% v/v).

The regression lines, obtained by a range of concentration between 62.5 – 0.5 ng/20 μ l for all substances showed a very high values of R² (~1) indicating a very high sensibility and accuracy (~100%) of this new mobile phase in isocratic conditions.

Temperature increase of post column derivatisation (50°C) with (OPA) showed a greater sensibility for l-histidine and 3-methyl-l-histidine detection (~70%) and the new mobile phase in isocratic conditions produced a complete separation for all compound and in particular way between carnosine and 3-methyl-l-histidine.

The high sensibility of this HPLC method can detect histidine dipeptides and correlated compounds l-histidine and 3-methyl-l-histidine in animal tissues where can be present in different and very low concentrations. In addition this very simple and fast method could be used to histidine dipeptides detection in biological compartments where their concentrations could be very low.

Key words: histidine dipeptides, HPLC method, mobile phase.

INTRODUZIONE

La carnosina ed i dipeptidi correlati mostrano numerose attività biologiche incluso l'attività tamponante, la regolazione dell'attività enzimatica e l'inibizione delle reazioni ossidative (Decker e coll., 1999). Queste sostanze sono presenti nel tessuto cardiaco, rene, fegato ed in concentrazioni elevate nel tessuto muscolare di varie specie animali e nell'uomo (Carnegie e coll., 1984; Flancbaum e coll., 1990) e le loro concentrazioni risultano specie specifiche (Schonherr, 2002).

Numerose sono le metodiche in HPLC riportate in letteratura che utilizzano colonne in fase inversa o a scambio ionico e rivelatori UV per la determinazione dei dipeptidi in varie matrici biologiche di diverse specie animali. La derivatizzazione post colonna dei dipeptidi istidinici può essere effettuata con fenilisotiocianato (Kuroda e coll., 2000), ortoftalaldeide (Carnegie e coll., 1983; Plowman & Close, 1988) o ninidrina (Carnegie e coll., 1982). Alcuni di questi metodi mostrano bassa risoluzione, derivati instabili o limiti di determinazione troppo elevati.

In recenti studi (Ducci e coll., 2004 a), confrontando una metodica HPLC in condizioni isocratiche, messa a punto dagli stessi, con una a gradiente di eluizione (Aristoy & Toldra' F. 2004) parzialmente modificata, è stato dimostrato come l'analisi in condizione isocratiche abbia la stessa sensibilità e potere di separazione nei confronti di quella a gradiente per tutti i valori di concentrazione.

L'analisi in condizioni isocratiche, comunque, non ha permesso la separazione

dei picchi della carnosina e della 3-metil-l-istidina, inoltre quest'ultima mostrava una bassa sensibilità alla reazione di derivatizzazione post colonna con OPA a 30°C.

Poiché variando la temperatura della reazione di derivatizzazione post colonna con OPA è stato prodotto un aumento della sensibilità di rilevazione di queste quattro molecole, in particolar modo della 3-metil-l-istidina (Ducci e coll., 2004 c) è apparso necessario ricercare la fase mobile da utilizzare in condizioni isocratiche al fine di ottimizzare la completa separazione delle stesse.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

La soluzione madre è stata ottenuta addizionando 20 mg di carnosina, 20 mg di anserina, 20 mg di l-istidina e 20 mg di 3-metil-l-istidina a 200 ml di acido 5-solfosalicilico (SSA) (concentrazione della soluzione: 1000 ng/20 μ l). Da questa soluzione sono state effettuate diluizioni sequenziali 1:2 fino alla concentrazione di 62,5 ng/20 μ l (volume della camera di iniezione) per valutare il potere separativo delle varie fasi mobili. È stata inoltre allestita una curva di taratura per ogni molecola utilizzando le seguenti concentrazioni 62,5 – 25 – 5 – 1 0,5 ng/20 μ l.

Preparazione delle fasi mobili

◆ Componenti fase mobile in gradiente:

→ **Fase A:** 20% acetonitrile – 80 % soluzione 6 mM HCl

→ **Fase B:** Fase A + 0,8 moli/litro di NaCl

◆ Componenti fasi mobili in isocratica:

1) 20% acetonitrile – 80% soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/l di NaCl

2) 15% acetonitrile – 85% soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/l di NaCl

3) 10% acetonitrile – 90% soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/l di NaCl

4) 5% acetonitrile – 95% soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/l di NaCl

◆ Soluzione derivatizzante con Ortoftaldeide (OPA):

→ Sciogliere in 500 ml di acqua 15,5 grammi di acido borico e 13 grammi di idrossido di potassio

→ Aggiungere 1,5 ml di Brij 35 al 30% w/v e 1,5 ml di mercaptoetanolo

→ Aggiungere 100 mg di OPA disciolti in 2,5 ml di metanolo

◆ Reagenti utilizzati: carnosina, anserina, l-istidina, 3-metil-l-istidina, Acido 5-solfo-salicilico (Sigma); Cloruro di Sodio (Fluka); Acido Borico (Sigma); Idrossido di Potassio (C. Erba reagenti), Brij 35, 2-Mercaptoetanolo (Sigma), Metanolo per HPLC (Merck).

◆ Strumentazione e condizioni di sistema: Bagno termostatico modello W82 (KW Apparecchi scientifici) con selettore della temperatura; HPLC con rivelatore a fluorescenza (Jasko) $\lambda_{\text{ecc}}^1 = 340$; $\lambda_{\text{em}}^2 = 445$; colonna Xpertek: SP-SCX 5 μ a scambio cationico (Cobert Associates, Inc.) Flusso 1ml/min; volume d'iniezione 20 μ l.

RISULTATI

Nella Fig. 1 è riportato il cromatogramma relativo alla separazione dei dipeptidi e loro componenti (soluzione standard) con eluizione a gradiente e derivatizzazione post colonna con ortoftaldeide (OPA) alla temperatura costante di 30°C. Come si può osservare tutti i composti risultano completamente separati e la durata del cromatogramma è inferiore ai 20 minuti.

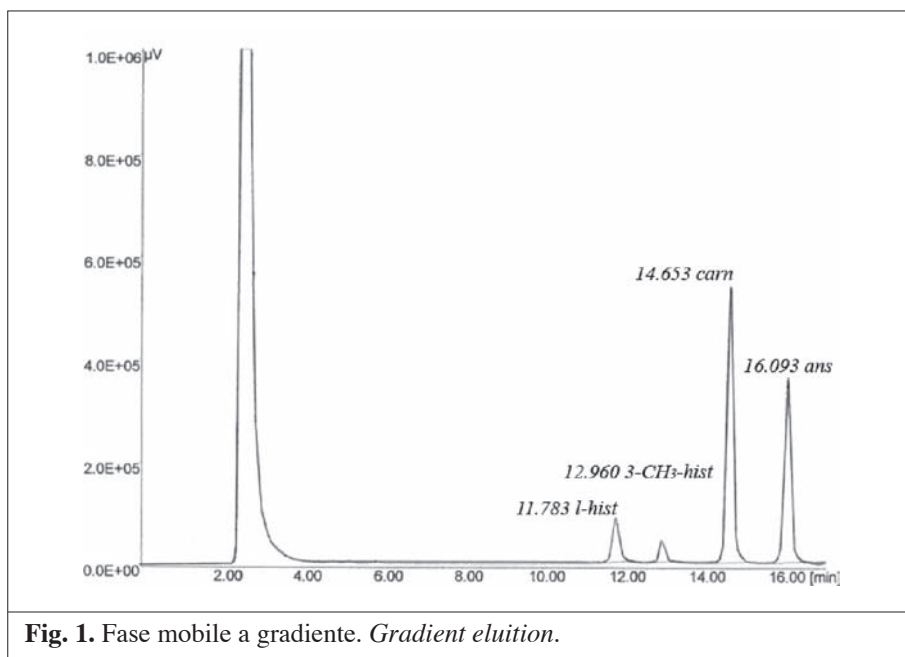


Fig. 1. Fase mobile a gradiente. *Gradient elution.*

Nelle Fig. 2, 3, 4, 5 sono riportati i cromatogrammi ottenuti separando i composti con eluizione in condizioni isocratiche con derivatizzazione post colonna con OPA alla temperatura costante di 50°C. Come si può ben vedere i composti che mostrano un tempo di ritenzione pressoché simile sono la 3 metil l-istidina e la carnosina che con una fase mobile costituita da 80% HCl 6 mM + 0.48 moli/l NaCl e 20% Acetonitrile (v/v) risultano sovrapposti. Negli altri cromatogrammi, appare evidente come con la riduzione progressiva della % di Acetonitrile (20 -15 -10 -5 %) si arrivi alla completa separazione dei picchi dei due composti (Fig. 5).

Nella Fig. 6 sono riportate le curve di taratura dei due dipeptidi e dei loro componenti ottenuti in condizioni isocratiche con fase mobile costituita da: 95% HCl 6 mM + 0.48 moli/l NaCl e 5% Acetonitrile (v/v) con derivatizzazione post colonna alla temperatura costante di 50°C. Come si può osservare tutte le rette di regressione ottenute nell'intervallo di concentrazione tra 62,5 - 0,50 ng/20µl (tre repliche per ogni concentrazione) mostrano un coefficiente di correlazione altamente significativo ($p < 0.001$).

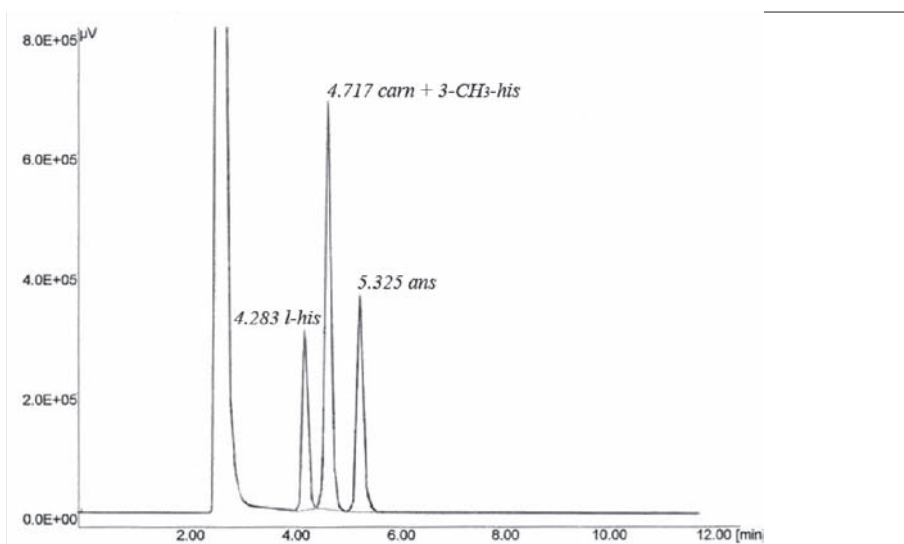


Fig. 2. Fase Mobile in Isocratica 20% Acetonitrile. *Isocratic elution 20% Acetonitrile.*

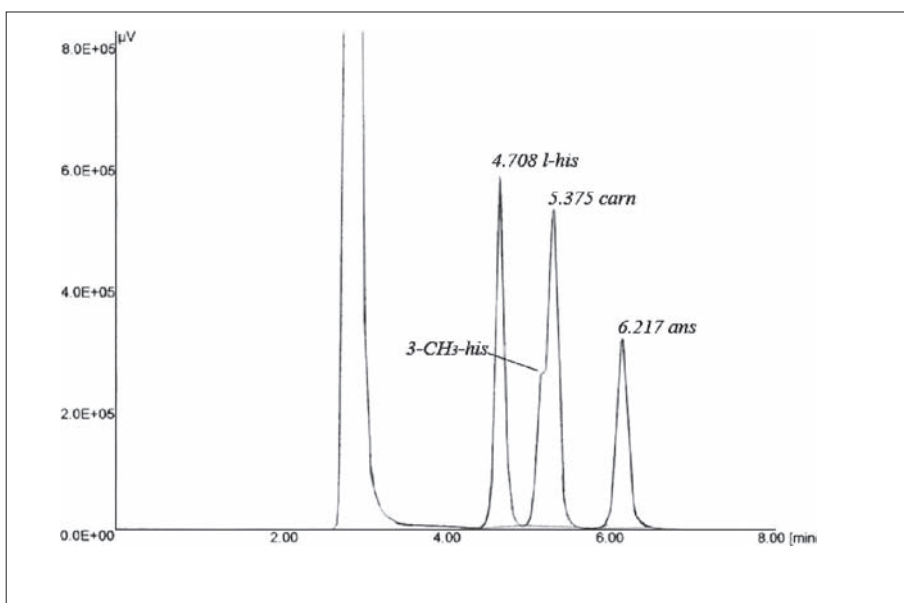


Fig. 3. Fase Mobile in Isocratica 15% Acetonitrile. *Isocratic elution 15% Acetonitrile.*

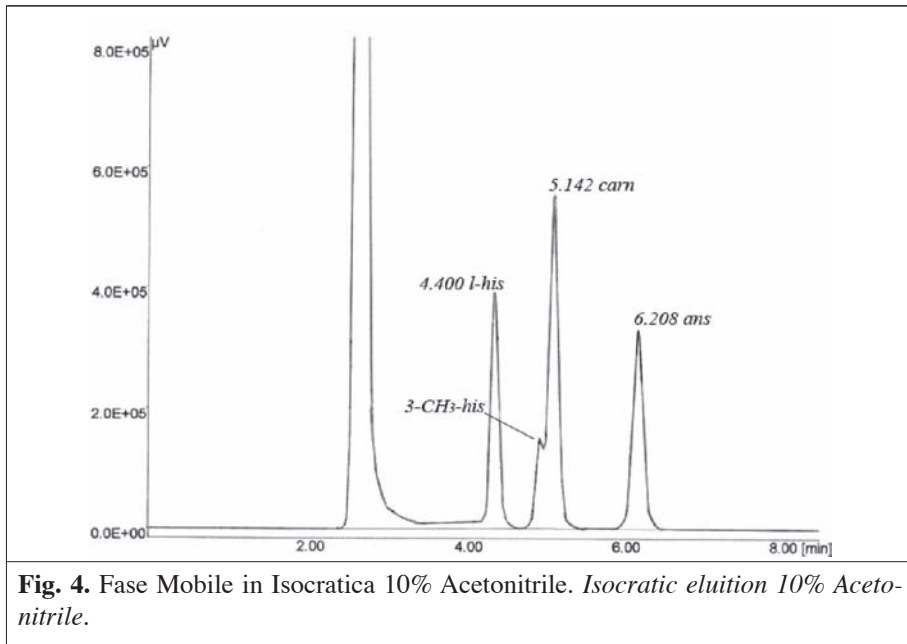


Fig. 4. Fase Mobile in Isocratica 10% Acetonitrile. *Isocratic elution 10% Acetonitrile.*

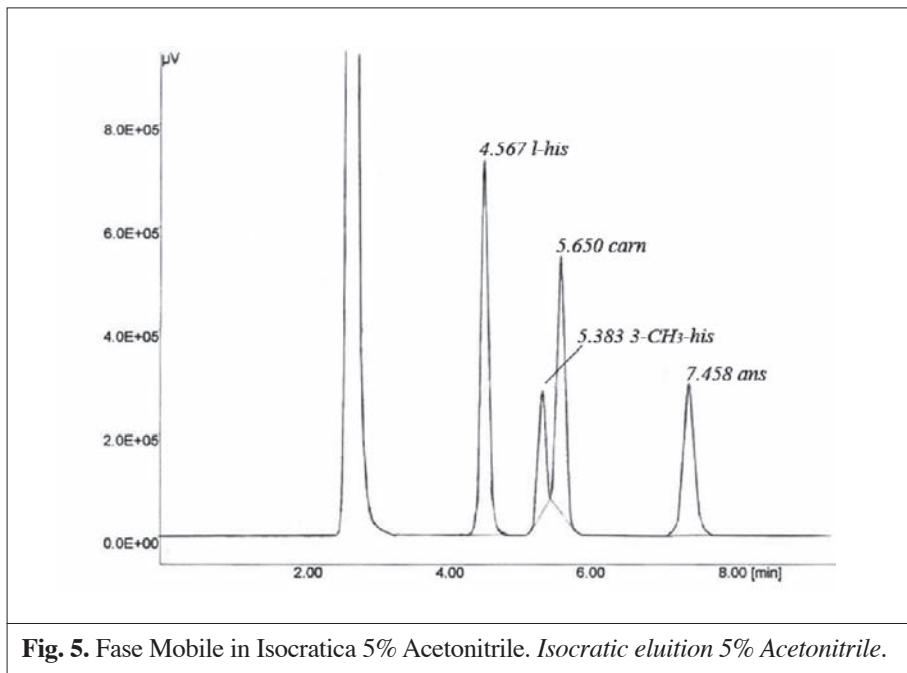


Fig. 5. Fase Mobile in Isocratica 5% Acetonitrile. *Isocratic elution 5% Acetonitrile.*

Nella Tab. I sono riportati l'accuratezza % calcolata utilizzando l'equazione della retta e la variazione percentuale tra la quantità iniettata e quella rilevata tramite l'equazione ($\Delta\%$) per ogni valore di concentrazione. Come si può osservare questi due parametri mostrano per tutti i composti valori che confermano la precisione e la riproducibilità della metodica utilizzata.

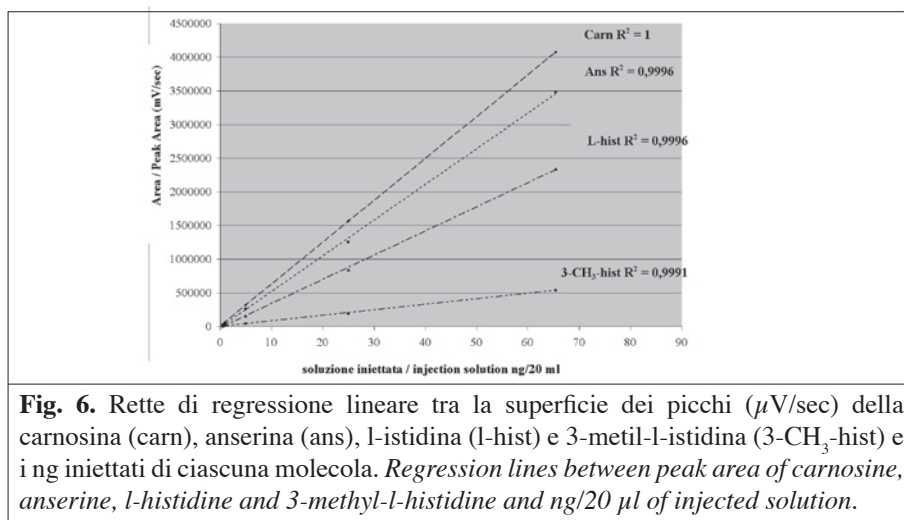


Fig. 6. Rette di regressione lineare tra la superficie dei picchi ($\mu\text{V}/\text{sec}$) della carnosina (carn), anserina (ans), l-istidina (l-hist) e 3-metil-l-istidina ($3\text{-CH}_3\text{-hist}$) e i ng iniettati di ciascuna molecola. *Regression lines between peak area of carnosine, anserine, l-histidine and 3-methyl-l-histidine and ng/20 μl of injected solution.*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questi risultati hanno mostrato che per la determinazione quantitativa in HPLC in condizioni isocratiche, sia dei dipeptidi istidinici che dei loro componenti, con

ng/20 μl	Carn		Ans		l-Hist		3-CH ₃ -l-Hist	
	% Acc	$\Delta\%$	% Acc	$\Delta\%$	% Acc	$\Delta\%$	% Acc	$\Delta\%$
62,50	99,92	-0,08	100,64	0,64	100,64	0,64	100,92	0,92
25,00	100,52	0,52	95,53	-4,47	95,76	-4,24	93,60	-6,40
5,00	101,34	1,34	100,13	0,13	95,42	-4,58	101,23	1,23
1,00	94,58	-5,42	113,17	13,17	106,93	6,93	107,58	7,58
0,50	90,33	-9,67	115,82	15,82	115,14	15,14	98,32	-1,68

Tab. I. Valori medi dell'accuratezza % (% Acc) e Coefficiente di variazione % ($\Delta\%$) di tutti i composti analizzati (Carnosine: Carn; Anserine: Ans; l-Histidine: l-Hist; 3-metil-l-Histidine: 3-CH₃-l-Hist). *Medium values of accuracy (% Acc), Variation % ($\Delta\%$) of all compounds.*

derivatizzazione post-colonna con OPA, alla temperatura di 50°C, è stato necessario variare la percentuale dei componenti della fase mobile fino ad ottenere una completa separazione di queste molecole. Tale necessità è scaturita dal fatto che con l'aumento della temperatura fino a 50°C della reazione di derivatizzazione è possibile rilevare fino al 70% in più di 3-metil-l-istidina e di l-istidina (Ducci e coll., 2004 c) con il conseguente aumento della risposta in termini quantitativi di queste molecole. Gli elevati coefficienti di correlazione relativi alle singole curve di taratura fanno rilevare come le nuove condizioni operative, ottenute variando sia la fase mobile che la temperatura, aumentino in termini di accuratezza, di sensibilità e di riproducibilità la possibilità di rilevare concentrazioni ancora più ridotte di questi composti ed in particolare della l-Istidina e della 3-metil-l-istidina. Inoltre il basso $\Delta\%$ ottenuto per tutte le concentrazioni utilizzate consente di poter rilevare concentrazioni di 0.5ng/20 μ l (25 ng/ml), rendendo possibile la loro determinazione anche in quei compartimenti dell'organismo dove sono presenti in quantità molto ridotte (Ducci e coll., 2004 b).

In conclusione la determinazione quantitativa di queste molecole in HPLC può essere effettuata in condizioni isocratiche con una maggiore accuratezza ed ottenendo una elevata sensibilità alla temperatura di derivatizzazione di 50°C riducendo così i tempi di esecuzione dei cromatogrammi rispetto a quelli ottenuti con gradiente di eluizione e la completa separazione dei picchi.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Famiglia Spisni che ha reso possibile la realizzazione di tale lavoro attraverso il contributo erogato in memoria dell'Emerito Professor Dino Spisni.

BIBLIOGRAFIA

- ARISTOY M.C., TOLDRÀ F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of presence of animal origin proteins in feed for ruminants. *Food Chem.*, 84, 485-491.
- CARNEGIE P.R., COLLINS M.G., ILIC M.Z. (1984). Use of histidine dipeptides to estimate the proportion of pig meat in processed meats. *Meat Sc.*, 10: 145-154.
- CARNEGIE P.R., HEE K.P., BELL A.W. (1982). Ophine (B-alanyl-L-3-methylhistidine "Balanine") and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams. *J. Sc. Food Agric.*, 33: 795-801.
- CARNEGIE P.R., ILIC M.Z., ETHERIDGE M.O., COLLINS M.G. (1983). Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balanine present in fresh meat. *J. Chrom.*, 261: 153-157.
- DECKER E.A., LIVISAY S.A., ZHOU S. (2000). A revaluation of activity of purified Carnosine. *Biochem. (Moscow)*, 65 (7): 766-770.
- DUCCI M., PACCHINI S., NICCOLINI A., MARTELLI F., BUONCRISTIANI P., SIGHIERI C., GAZZANO A. (2004 a). Confronto tra due metodiche HPLC per la determinazione quantitativa di carnosina, anserina. *Congr. Naz. S.I.Di.L.V., Abano Terme (PD)*, VI :149-

150.

- DUCCI M., NICCOLINI A., PACCHINI S., GAZZANO A., MARTELLI F., GADEA J. (2004 b). Determinazione delle concentrazioni di dipeptidi imidazolici, l'istidina e 3-metil-l-istidina nel seme fresco di verro. Congr. Naz. S.I.Di.L.V, Abano Terme (PD), VI: 147-148.
- DUCCI M., PACCHINI S., NICCOLINI A., DELLA LONGA A., GAZZANO A., MARTELLI F. (2004 c). Effetto della variazione di temperatura sulla reazione di derivatizzazione dei dipeptidi istidinici e loro componenti. Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Pisa, 57: 185-191.
- FLANCABAUM L., FITZPATRYK J.C., BROTMAN D.N., MARCOUX A. M., KASZIBA E., FISHER H. (1990). The presence and significance of carnosine in histamine-containing tissues of several mammalian species. Agent Act., 31: 190-196.
- KURODA M., OHTAKE R., SUZUKI E., HARADA T. (2000). –Investigation on the formation and determination of γ -glutamyl- β -alanylhistidine and related isopeptide in the macromolecular fraction of beef soup stock. J. Agric. Food Chem., 48: 6317-6324.
- PLOWMAN J.E., CLOSE E.A. (1988). An evaluation of a method to differentiate the species origins of meat on the basis of contents of anserine and carnosine in skeletal muscle. J. Sci. Food Agric., 45: 69-78.
- SCHONHERR J. (2002). Analysis of products of animal origin in feed by determination of carnosine and related dipeptides by High-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 50: 1945-1950.