

EFFETTO DELLA VARIAZIONE DI TEMPERATURA SULLA REAZIONE DI DERIVATIZZAZIONE POST COLONNA CON ORTOFTALALDEIDE DEI DIPEPTIDI ISTIDINICI E LORO COMPONENTI

TEMPERATURE EFFECT ON POST COLUMN DERIVATISATION REACTION WITH O-PHTHALALDEHYDE OF HISTIDINE DIPEPTIDES AND THEIR COMPONENTS

MICHELE DUCCI ⁽¹⁾, SARA PACCHINI ⁽²⁾, ALBERTO NICCOLINI ⁽²⁾,
AUGUSTO DELLA LONGA ⁽¹⁾, ANGELO GAZZANO ⁽¹⁾,
RYSZARD BOBOWIEC ⁽³⁾, FRANCO MARTELLI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Scopo della ricerca è stato quello di effettuare la derivatizzazione post colonna con ortoftalaldeide (OPA) dei dipeptidi istidinici (carnosina e anserina) e dei loro componenti (l-istidina e 3-metil-l-istidina) a varie temperature in modo da determinare quella alla quale tali sostanze producono la massima risposta in termini quantitativi. Per quanto riguarda i dipeptidi istidinici la temperatura ottimale per la reazione di derivatizzazione con OPA va dai 35°C per la carnosina ai 45°C - 50°C per l'anserina con un aumento rispettivo della superficie dei picchi di circa il 4% e 9% rispetto alla temperatura di 30°C. L'interpolazione dei dati della temperatura e della superficie dei picchi dei due dipeptidi, visto l'andamento non lineare, è stata effettuata rispettivamente con equazione polinomiale di terzo grado ($R^2=0,990$) e quarto grado ($R^2=0,992$). Per la l-istidina e 3-metil-l-istidina la temperatura ottimale risulta quella compresa tra i 55°C e i 60°C ma in questo caso si osserva un incremento costante della superficie del picco con l'aumentare della temperatura ($R^2=0,998$ per la l-istidina e un $R^2=0,999$ per la 3-metil-l-istidina). Per questi ultimi due componenti l'aumento della superficie dei picchi rispetto alla temperatura di 30°C risulta essere molto elevato (~70%). La riproducibilità dei valori delle superfici dei picchi sia dei dipeptidi istidinici che dei loro componenti risulta elevata, con un bassissimo coefficiente di variazione a tutte le temperature utilizzate, mostrando come la reazione di derivatizzazione sia altamente stabile. Questi dati mostrano come l'incremento di sensibilità e quindi della superficie del picco al variare della temperatura di derivatizzazione ed a parità di concentrazione sia ridotto per i dipeptidi istidinici mentre sia notevolmente elevato per i loro componenti. In conclusione questa ricerca mostra come con l'aumentare della temperatura sia possibile aumentare l'efficienza, la sensibilità e l'accuratezza della metodica HPLC usata per la determinazione di questi composti che risultano presenti in molti compartimenti dell'organismo

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

⁽²⁾ Collaboratore Esterno.

⁽³⁾ Faculty of Veterinary Medicine, University School of Agriculture, Lublin, Poland.

in concentrazioni ampiamente variabili in quanto specie specifiche ed anche quantitativamente molto ridotte specialmente per quanto riguarda la 3-metil-L-istidina.

Parole chiave: dipeptidi istidinici, HPLC, temperatura, ortoftalaldeide, derivatizzazione.

SUMMARY

The aim of this research was to make the o-phthalaldehyde (OPA) post-column derivatisation at different temperatures of histidine dipeptides (carnosine, anserine), L-histidine and 3-methyl-L-histidine to establish which temperature is the best to obtain highest sensibility of detection of this compounds.

As regard anserine and carnosine, results showed that the best temperature of derivatisation reaction was between 45°C - 50°C for anserine and between 35-45 °C for carnosine with an increase of peak area of 9% respect to temperature of 30 °C. For L-histidine and 3-methyl-L-histidine this research showed that the optimal temperature was between 55°C - 60°C with an increase of peak area at every temperature of derivatisation reaction ($R^2=0,998$ for L-histidine and $R^2=0,999$ for 3-methyl-L-histidine).

For this latter the increase of peak area respect to temperature of 30 °C was more of 70 %.

The reproducibility of the method (for histidine dipeptides, L-histidine and 3-methyl-L-histidine) was very high with a very low coefficient of variation at all temperatures of derivatisation; it showed that the derivatisation reaction was very stable.

Therefore all data showed that the increase of sensibility (associated to growing of temperature) was very high for histidine and 3-methyl-L-histidine while it was reduced for histidine dipeptides.

In conclusion this research showed that the increase of derivatisation. temperature permitted to obtain an higher sensibility efficiency of HPLC method used for detection of histidine dipeptides that are present in animal tissues at different and very low concentrations.

Key words: histidine dipeptides, HPLC, temperature, o-phthalaldehyde, derivatisation.

INTRODUZIONE

La carnosina (β -alanina-L-istidina) e il suo analogo metilato, l'anserina (β -alanina-L-1-metil-istidina) sono presenti in elevate quantità nei tessuti eccitabili come il tessuto muscolare striato ed il tessuto nervoso di diverse specie animali e nell'uomo (Kohen e coll., 1988) (Penafield e coll., 2004). Queste molecole rappresentano, nella difesa della cellula dallo stress ossidativo, la componente idrosolubile in contrapposizione a quella liposolubile rappresentata dall' α -tocoferolo (Quinn e coll., 1992). Le loro concentrazioni nei tessuti animali risultano specie specifiche e la loro determinazione appare importante anche nella valutazione della presenza di proteine di origine animale negli alimenti destinati a soggetti ruminanti (Schonherr, 2002).

Le metodiche in HPLC in uso per la determinazione dei composti imidazolici hanno utilizzato colonne a scambio ionico e in fase inversa, rivelatori ultravioletto e a fluorescenza sia in condizioni isocratiche che in gradiente di eluizione, risultando

inadeguate per la simultanea determinazione dei dipeptidi e loro componenti (Dunnett & Harris, 1997) (Aristoy & Toldrà, 2004). Altre metodiche HPLC prevedono per l'estrazione di piccolissime quantità di campioni l'utilizzo di colonnine *solid phase extraction* (SPE) (Schonherr, 2002) che risultano però più complesse e costose.

Recenti studi (Ducci e coll., 2004 b), hanno rilevato la necessità di effettuare la reazione di derivatizzazione della carnosina e dell'anserina post colonna con ortofalaldeide (OPA) alla temperatura costante di 30°C ed inoltre in matrici biologiche complesse come il latte e sangue di capra è stata rilevata anche la presenza di 3-metil-l-istidina in due campioni su 12 (Ducci e coll., 2004 a).

Scopo di questa ricerca è stato quello di effettuare la derivatizzazione post colonna con OPA di questi composti e dei loro componenti a varie temperature in modo da determinare la temperatura ottimale alla quale tali sostanze producono la massima risposta in termini quantitativi.

MATERIALI E METODI

Soluzione standard di carnosina (62,5 ng/20 μ l), anserina (62,5 ng/20 μ l), l-istidina (125 ng/20 μ l), 3-metil-l-istidina (125 ng/20 μ l) erano ottenute a partire da soluzioni madre costituite da 20 mg di ciascuna sostanza disciolti in 200 ml di acido 5-solfosalicilico al 5% (1000 ng/20 μ l).

Strumentazione e condizioni di sistema:

Bagno termostatico modello W82 (KW apparecchi scientifici) con selettore della temperatura; HPLC con rivelatore a fluorescenza (Jasko) λ_{ex} = 340; λ_{ecc} = 445; colonna Xpertek: SP-SCX 5 μ a scambio cationico (Cobert Associates, Inc.). Flusso 1ml/min; volume d'iniezione 20 μ l.

-Fase mobile isocratica: 5% acetonitrile – 95% soluzione 6 mM HCl + 0,48 moli/litro di NaCl.

-Derivatizzazione: post-colonna con OPA (flusso 0,5 ml/min) effettuata alle temperature di: 20 – 25 – 30 – 35 – 40 – 45 – 50 – 55 – 60 – 65 – 70 °C.

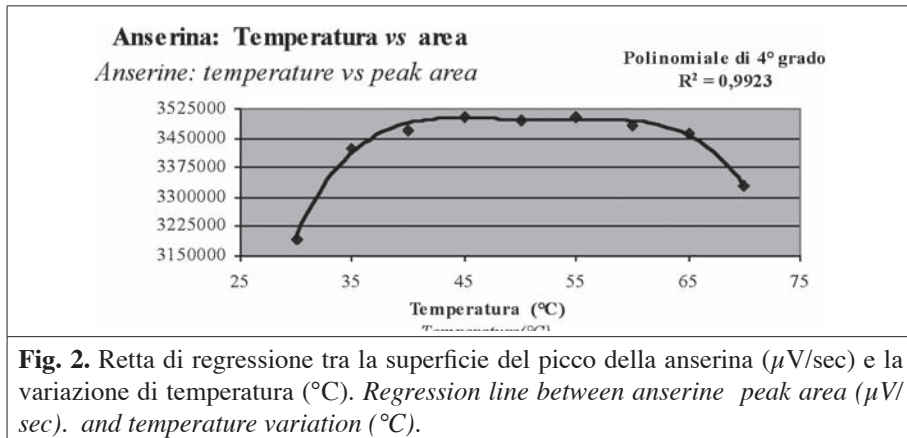
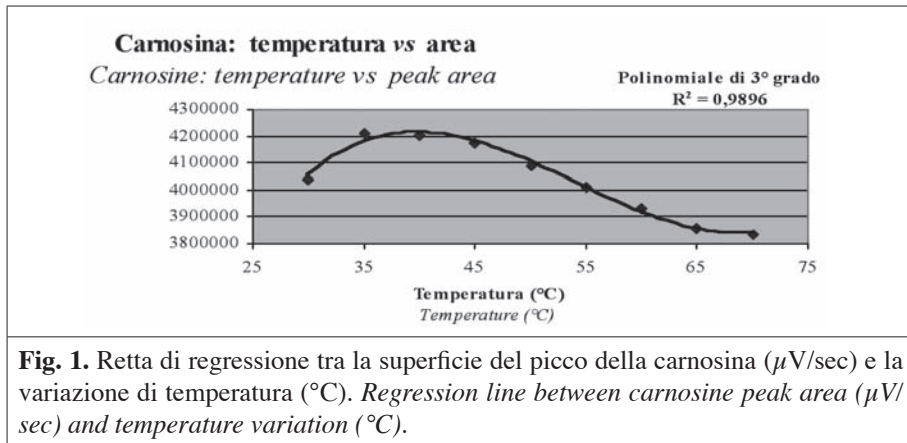
Per ogni punto di temperatura venivano effettuate tre determinazioni.

Analisi statistica: media, DS, CV%, rette di regressione di vario grado.

RISULTATI

Nelle Fig. 1, 2, 3, 4 sono riportate le rette di correlazione dei quattro componenti tra la superficie espressa in μ V/sec e la variazione di temperatura.

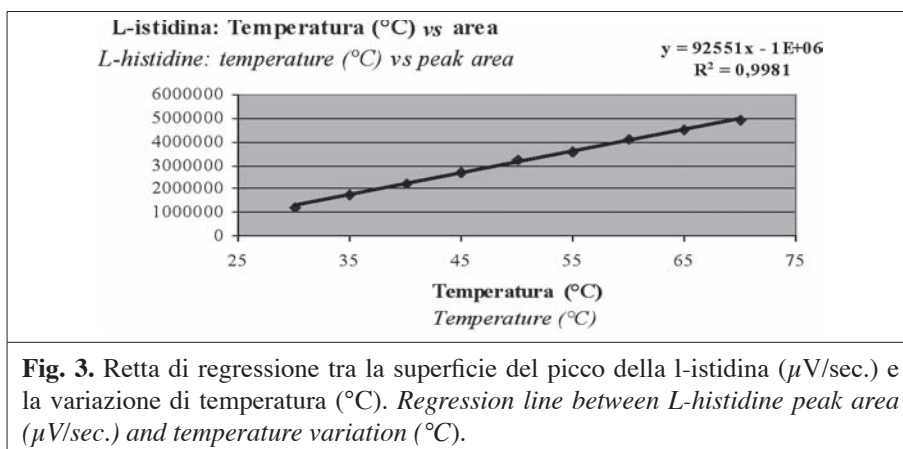
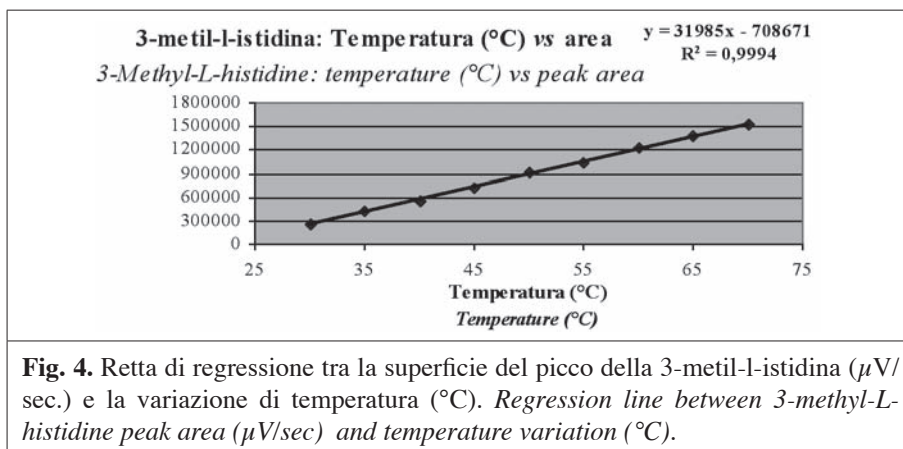
Per quanto riguarda i dipeptidi istidinici la temperatura ottimale per la reazione di derivatizzazione va dai 35°C per la carnosina ai 45° - 50°C per l'anserina; per la l-istidina e 3 metil-l-istidina si osserva un incremento costante della superficie del picco



vs la temperatura con un R di correlazione altamente significativo.

Nella Tab. I. sono riportate le singole percentuali di incremento della superficie rispetto alla temperatura di 30°C. Come si può osservare per i dipeptidi istidinici la temperatura ottimale di derivatizzazione con OPA è compresa tra 35°C e 40°C mentre per la l-Istidina e 3-metil l-istidina la temperatura ottimale potrebbe essere tra i 55°C e i 60°C anche se è rilevabile un incremento costante alle temperature superiori.

Nella Tab. II sono riportate le % di variazione della superficie di ciascuna sostanza iniettata per tre volte sempre alla stessa concentrazione ed alla stessa temperatura per ogni punto di temperatura considerato. Come si può osservare il CV% risulta estremamente basso per tutti i componenti ed a tutte le temperature; inoltre con la temperatura di 50°C questo parametro tende ad essere pressoché simile per tutte le sostanze.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Da questi risultati appare evidente che il parametro temperatura è di fondamentale importanza per la reazione di derivatizzazione post colonna con OPA di questi dipeptidi e dei loro componenti. Infatti l'incremento di temperatura mostra come vi sia un aumento in termini quantitativi della reazione di derivatizzazione e quindi della possibilità di rendere determinabile una maggiore quantità di questi composti presenti nei campioni da analizzare. Ciò porta ad un aumento della sensibilità del metodo ed allo stesso tempo ad una maggiore precisione in termini di reale presenza di questi composti nelle varie matrici biologiche. Si osserva anche che l'effetto temperatura è maggiore per la l-istidina e per la 3-metil-l-istidina che mostrano

Tab. I. % di incremento della superficie dei picchi di ciascuna sostanza rispetto alle singole temperature utilizzate per la derivatizzazione post-colonna con OPA. % increase of each substance respect to every derivatisation temperature.

| Temperatura (°C) di derivatizzazione <i>Derivatisation temperature (°C)</i> | % incremento vs 30°C carnosina <i>Increase % vs 30 °C Carnosine</i> | % incremento vs 30°C anserina <i>Increase % vs 30 °C anserine</i> | % incremento vs 30°C l-Istidina <i>Increase % vs 30 °C l-histidine</i> | % incremento vs 30°C 3-metil-istidina <i>Increase % vs 30 °C 3-methyl-l-histidine</i> |
|--|--|--|---|--|
| 30 | | | | |
| 35 | 4,07 | 6,77 | 30,25 | 39,22 |
| 40 | 3,96 | 8,03 | 45,15 | 54,15 |
| 45 | 3,31 | 8,95 | 54,89 | 64,63 |
| 50 | 1,24 | 8,69 | 62,10 | 71,87 |
| 55 | -0,69 | 8,93 | 66,21 | 75,46 |

un costante incremento lineare a tutte le temperature utilizzate raggiungendo rispetto alla temperatura di 30°C incrementi superiori al 70%. Inoltre la fase mobile utilizzata in questo studio garantisce una completa separazione tra tutti e quattro i componenti e specialmente per la carnosina e la 3-metil-l-istidina che con temperature di derivatizzazione superiori a 30°C non risultano separate con le altre fasi mobili precedentemente utilizzate. Un altro dato importante è il bassissimo coefficiente di variazione ottenuto per questi composti a tutte le temperature utilizzate e questo mostra come la reazione di derivatizzazione sia altamente riproducibile. In conclusione questa ricerca mostra come con la metodica HPLC sia possibile aumentare, l'efficienza, la sensibilità in termini di minima quantità rilevabile l'accuratezza e la separazione di questi composti che risultano presenti in molti compartimenti dell'organismo in concentrazioni ampiamente variabili e specie specifiche ed anche quantitativamente molto ridotte (Ducci e coll., 2004 a-c). Potrebbe quindi essere utile in base alla

Tab. II. % coefficiente di variazione medio (%V) per ogni punto di temperatura utilizzata per la derivatizzazione post colonna con OPA. *Average coefficient variation(%V) of each derivatisation temperature.*

| Temperatura (°C) di derivatizzazione <i>derivatisation temperature</i> | %V Carnosina %V Carnosine | % V Anserina %V Anserine | % V l-Istidina %V l-histidine | % V 3-metil-l-istidina %V 3-methyl-l-histidine |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|--|---|
| 30 | 0,95 | 2,78 | 3,18 | 7,81 |
| 35 | 0,38 | 0,33 | 1,21 | 2,38 |
| 40 | 0,53 | 0,90 | 1,64 | 3,33 |
| 45 | 1,19 | 1,54 | 3,80 | 3,80 |
| 50 | 1,56 | 1,26 | 1,92 | 2,26 |
| 55 | 1,22 | 1,08 | 1,05 | 2,00 |

matrice biologica da analizzare valutare la temperatura di derivatizzazione più idonea per poter rilevare le maggiori quantità sia della carnosina e dell'anserina che della l-istidina e per la 3-metil-l-istidina.

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., TOLDRA' F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chem.*, 84: 485-491.
- DUCCI M., PACCHINI S., NICCOLINI A., GAZZANO A., INNOCENTI E., BOBOWIEC R. MARTELLI F. (2004 a). Determinazione delle concentrazioni di dipeptidi imidazolici, l-istidina e 3-metil l-istidina nel latte e sangue di capra. *Congr. Naz. S.I.Di.L.V.*, Abano Terme 10-12 Nov., VI: 147-148.
- DUCCI M., PACCHINI S., NICCOLINI A., MARTELLI F., BUONCRISTIANI P., SIGHIERI

- C., GAZZANO A. (2004 b). Confronto tra due metodiche HPLC per la determinazione quantitativa di carnosina, anserina, l-istidina e 3 metil l-istidina. Congr. Naz. S.I.Di.L.V., Abano Terme 10-12 Nov., VI: 189-190.
- DUCCIM., NICCOLINI A., PACCHINI S., GAZZANO A., MARTELLI F., GADEA J. (2004). 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 10-12 nov., VI: 149-150.
- DUNNETT M., HARRIS R.C. (1997). High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J. Chrom. B.*, 688 : 47-55.
- KOHEN R., YAMAMOTO Y., CUNDY K., AMES B.N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 85: 3157-3179.
- PENAFIELD R., RUZAF A C., MONSERRAT F., CREMADES A. (2004) Gender related differences in carnosine, anserine, and lysine content of murine skeletal muscle. *Amino Acids*, 26(1): 53–58.
- QUINN P.J., BOLDYREV A.A., FORMAZUYK V.E. (1992). Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.*, 13 (5): 379-444 .
- SCHONHERR J. (2002). Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by High-performance-liquid-chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1945-1950.