

Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma II. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása származékképzés után⁺

*Staffan Folestad**, *Anna Tivesten** és *Csapó János***

*Marine Research Institute, Reykjavik, Izland

**PANNON Agrártudományi Egyetem Állattenyésztési Kar, Kaposvár

Érkezett: 1993. január 12.

Az utóbbi időben több módszert fejlesztettek ki az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására fordított fázisú folyadékkromatográfiával (RCP). Ezek közül kiemelést érdemelnek az o-ftálaldehiddel (OPA) és a tiolokkal végzett meghatározások. Az o-ftálaldehid és az aminosavak reakcióját széles körben használják az aminosavanalízis során, mert a reakció kivitelezése nagyon egyszerű, a származék intenzív fluoreszcenciával rendelkezik és elektrokémiai detektálásra is alkalmas. Sokfajta tiolt alkalmaztak keresve azon származékokat melyek stabilabbak mint amit a merkaptó etanollal kaptak. A királis tiolok használatára aminosav enantiomerek szétválasztásánál Aswad (1984) tette az első javaslatot, aki az OPA-t és az N-acetil-L-ciszteint (NAC) alkalmazta a D- és L-aszparaginsav szétválasztására. A reagenst később Lam (1986) használta, aki az OPA-NAC származékokból komplexeket képzett rézzel az aminosav enantiomerek szétválasztására réz-prolin rendszerben. Nimura és Kinoshita (1986) ugyanezen származékok segítségével kifejlesztettek egy egyszerű szétválasztási rendszert 13 aminosav enantiomerre. A NAC mellett még lehetőség van a BOC-al védett cisztein alkalmazására is, mint azt Buck és Krummen (1984) kimutatták. Néhány évvel ezelőtt a királis 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- β -glukopizanozil-izotiocianátot (GITC) alkalmazták a D- és L-aminosavak elválasztására (Nimura et al., 1980). Jó elválasztást kaptak a fordított fázisú rendszerben (Kinoshita et al., 1981), amely lehetővé tette a fehérjeépítő aminosavak enantiomerjeinek egy lépésben történő szétválasztását és meghatározását (Nimura et al., 1984). Az elválasztott származékokat 250 nm-en UV-abszorpcióval detektálták.

Mi a GITC kereskedelmi forgalomban kapható tiol analógját, a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -glukopiranozidot (TATG) alkalmaztuk az OPA-val történő reakcióval az aminosav enantiomerek oszlop előtti származékképzésére. A kísérletek célja az volt, hogy olyan diasztereomereket szintetizáljunk amelyek könnyen szétválaszthatók, ezt követően detektálhatók mind fluoreszcens detektorokkal, mind elektrokémiailag.

+ A munkát az Országos Tudományos Kutatási Alap támogatta, a szerzők ezúton is köszönik az Alap segítségét.

Anyagok és módszerek

2.1. A készülék

Az alkalmazott Varian 5500 LC gradiens képzésre alkalmas rendszerrel, Varian 9090 mintaadagolóval és gázműködtetésű, 25 µl-es hurokkal ellátott (belső átmérő 0.25 mm) Valco injektorral rendelkezett. Shimadzu RF-535 fluoreszcenciás detektort használtunk a származékok mennyiségének mérésére; a gerjesztési és az emissziós hullámhossz 325 és 420 nm volt. Az elválasztás folyamatának és az automatikus mintaadagoló munkájának ellenőrzésére, a mintafelvitelre és a kromatogramok tárolására a Varian DS651 vezérlő rendszert alkalmaztuk. Az automatikus mintaadagolóhoz szükséges ampullákat (1,8 ml) és a mikroampullákat (120 µl) a Varian cégtől (Solna, Sweden) szereztük be. A fluoreszcenciás detektáláson kívül a származékokat Waters 460 elektrokémiai detektorral és lézer alapú fluoreszcenciás detektorral is mértük. A He-Cd lézer (Likonix 4210 NB) kimenő energiája 1,5 mV volt 325 nm-en.

2.2. Vegyszerek

Az acetonitrilt, a metanolt és a tetrahidrofuránt a Rathburn (Walkerburn, U.K.) cégtől, az aminosav standardokat, az o-ftálaldehidet (OPA) és a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-glukopiranozidot (TATG) a Sigmától (St.Louis, Mo) vásároltuk. Az elúciós puffereket mono- és dinátrium-hidrogén-foszfátból állítottuk elő. A pH-t nátrium-hidroxiddal állítottuk be.

2.3. Származékképzés

A reakciót 120 µl-es mikroampullában végeztük, melyet 1,8 ml-es térfogatú, teflonbevonatú belső zárólappal és kupakkal ellátott ampullába helyeztünk. Az automatikus mintaadagolót úgy programoztuk, hogy a 90 µl borát pufferben (0,4 M; pH=9,5) oldott mintát (szabad aminosavak vagy nitrogén áramban bepárolt fehérje hidrolizátum) keverjen össze 15 µl reagenssel (8 mg OPA és 44 mg TATG feloldva 1 ml metanolban). Ezt követően az oldatot 100 µl levegő átbuborékolásával jól összekevertük, majd 6 percig állni hagytuk. E reakcióelegyből - az injektáló apparátus előzetes átöblítése után - 25 µl-t injektáltunk az analitikai oszlopra. Az injektálást befejezve a rendszert 100 µl aceton:víz 70:30 arányú elegyével háromszor átöblítettük.

2.4. Fehérjehidrolízis

A különböző fehérjetartalmú mintákból (mikroszkopikus fossziliák, fosszilis csontőrlemények, porráőrölt és 40 °C-on kíméletesen Soxhlet készülékben zsírtalanított élelmiszerek és takarmányok) a

fehérjetartalomtól függően 1-4 mg-ot mértünk be egy 120 µl-es mikroampullába, majd az ampullákat a Waters cégtől beszerzett, zárószeleppel ellátott hidrolízis edénybe helyeztük. A minta mennyiségtől és a mintaszámtól függően 70-200 µl konstans forráspontú (6 M) sósavat pipettáztunk a minták mellé és a rendszert vizsugárszivattyúval történő evakuálás után (kb. 4-5 perc) a mintákat 24 órán át 110 °C-on hidrolizáltuk. A hidrolízis befejezése után a maradék sósavat nitrogénnel kapillárison keresztül történő lefúvatással eltávolítottuk és a maradékot 0,4M pH=9,5 borát pufferben oldottuk fel, mely oldat most már kész volt a származék képzésére.

2.5. Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása

Az enantiomerek szétválasztását fordított fázisú (250x4.6 mm belső átmérő, 5 µm részecskeméret, Kromasil oktil (C₈) töltet) analitikai oszloppal végeztük. Az oszlop élettartamának megnövelésére a mintaadagoló és az analitikai oszlop közé egy biztonsági oszlopot (RP8, Newguard, 25x3.2 mm belső átmérő, 7 µm részecskeméret, Brownlee), a pumpa és a mintaadagoló közé pedig egy tisztítóoszlopot (C₈, 36x4.5 mm belső átmérő, 20 µm részecskeméretű Rsil) csatlakoztattunk. Az enantiomerek szétválasztására egy két komponensből álló gradiens rendszert alkalmaztunk, melynek összetétele az alábbi volt: **A**: 40 % metanol foszfát pufferben (95 mM, pH=7,05); **B**: acetonitril. Az áramlás sebessége 1 ml/perc volt; a gradiens pedig az alábbiak szerint változott az idő függvényében:

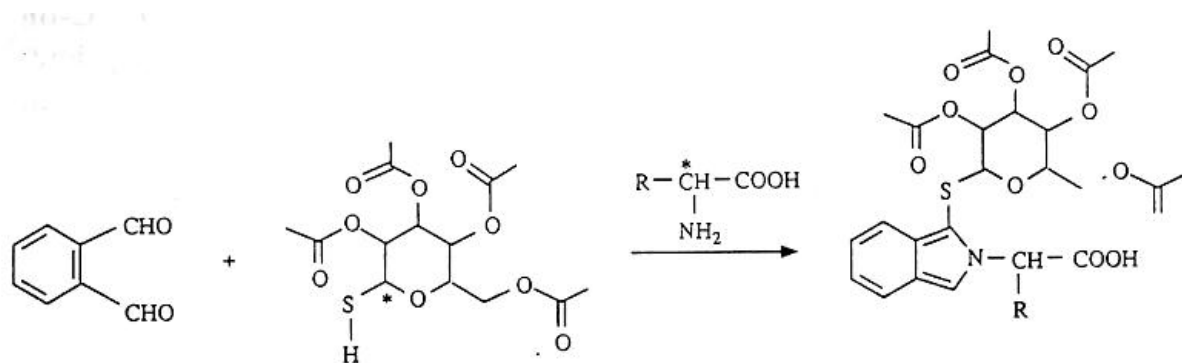
Idő (perc)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	95	5
35	83	17
55	72	28
56	67	33
74	67	33
75	62	38

3. Eredmények és következtetések

3.1. Származékképzés

Az aminosavak reakciója az OPA/TATG-vel (1. ábra) hasonló módon megy végbe ahhoz, amint az OPA/merkaptóetanol és az aminosavak közti reakció esetében tapasztalták. Az L-alanin, L-lizin, L-metionin, L-aszparaginsav, L-hisztidin, L-szerin, L- és D-treonin reakciósebességét tanulmányozva megállapítottuk, hogy a reakció a treonin kivételével kevesebb mint három perc alatt végbemegy, a treonin esetében azonban legalább 6 perc szükséges a reakció tökéletes lejátszódásához.

Összehasonlító vizsgálatokat a TATG és az egyéb tiolok között nem végeztünk. A gyors reakció az OPA, a nagytömegű TATG molekula és az aminosavak között alátámasztja Simons és Johnson (1978) megállapítását, kik szerint a sztérikus tömeg növekedése nem jár feltétlenül a reakció sebességének csökkenésével.



1. ábra: Az aminosavak reakciója az OPA/TATG-vel

Az OPA reagens aminosav analízisnél történő használatakor komoly probléma, hogy a képzett származék meglehetősen instabil. Allison et al. (1984) beszámoltak arról, hogy a glicin, az ornitin és a lizin OPA/merkaptotanol származéka fluoreszcenciájának csak 25%-a marad meg 40 perc után. Ezzel szemben az OPA/TATG származék egészen stabilnak bizonyult. Az alanin, az arginin, a glicin és a szerin származékok nem mutattak fluoreszcencia csökkenést még másfél órával a reakció befejeződése után sem. Tíz órás tárolás után szobahőmérsékleten a fluoreszcenciának még mintegy 68%-át mértük lizin és 37%-át ornitin esetében.

A kereskedelmi forgalomban kapható TATG reagens kromatográfiás tisztaságát ellenőrizve megállapítottuk, hogy abban fluoreszcenciás szennyeződések nincsenek. Mégis elektrokémiai detektálásnál a reagenstől hidrofilebb szennyeződések voltak megfigyelhetők, melyek azonosíthatatlan csúcsokat eredményeztek az aminosav származékok kromatográfiája során. Ezek a csúcsok csak töredékei az aminosav csúcsoknak és közvetlenül a kromatogram elején megjelenve nem zavarják az aminosavak egymástól való elválasztását.

Az OPA/TATG reagens optikai tisztaságát L-tirozinnal történő származékképzéssel ellenőriztük. Standard addíciós módszert használva a D-tirozinhoz tartozó csúcs 0.1 %-a volt az L-tirozinhoz tartozónak. Ezek az eredmények azt is jelzik, hogy nemcsak a reagens nagy optikai tisztaságú, hanem a származékképzés során a racemizáció mennyisége is elhanyagolható.

3.2 Detektálás

Az OPA/TATG származékok fluoreszcenciás spektruma nagyon hasonló ahhoz, amit az OPA/merkaptotanol származékok esetében kaptak, bár kissé közelebb van az emissziós hullámhosszokhoz. A gerjesztési maximum 342 nm, az emissziós maximum pedig 410 nm volt. A származék ezért alkalmas a He-Cd lézer által történő gerjesztésre, és így alkalmas mikrooszlopos folyadékromatográfiás meghatározásra. Az elektrokémiai meghatározás szempontjából lényeges félhullám potenciál nagyobb mint az OPA/merkaptotanol esetében; értéke 0,65-0,75 V között van.

A leucin OPA/TATG származékának fluoreszcenciás és elektrokémiai jelét vizsgálva megállapítottuk, hogy a kimutathatóság határa fluoreszcens detektor esetében 2 pmol, elektrokémiai detektor esetében pedig 1 pmol.

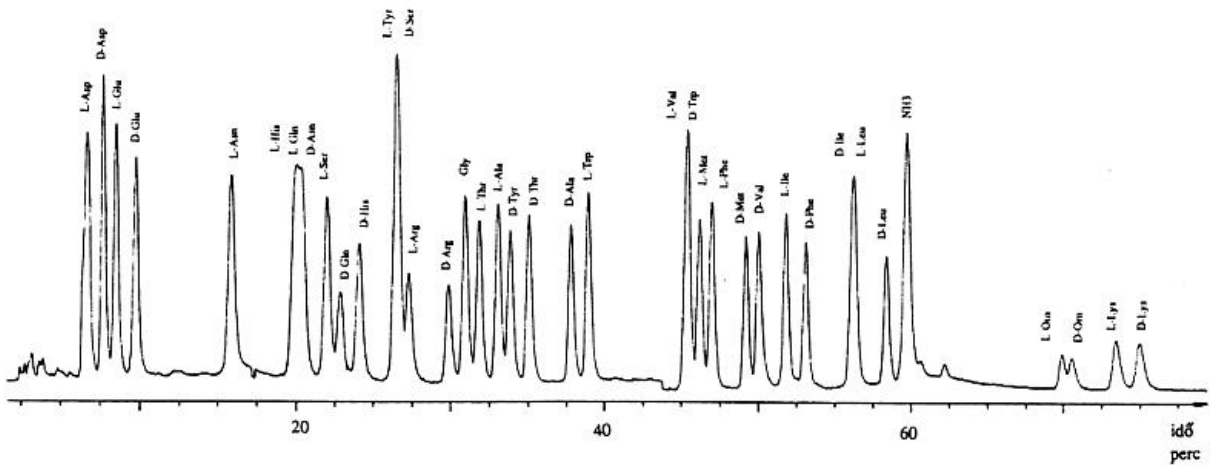
3.3. A módszer megbízhatósága

A módszer megbízhatóságának növelésére a biztonsági és az analitikai oszlopot is 30 °C-on termosztáltuk. Az aminosav enantiomerek OPA/TATG származékai retenciós idejének relatív standard szórása (RSD) 0,2% (szélső értékek: 0,03-0,40%), a csúcs alatti területek RSD értéke pedig 38 származék átlagában 3,8% (szélső értékek: 3,5-5,9%) volt. Abban az esetben ha a D-aminosav mennyisége az L-aminosavhoz viszonyítva igen kicsiny, (D/L arány kisebb mint 0,01), a csúcs alatti terület RSD értéke néhány esetben meghaladta a 10 %-ot. 38 aminosav enantiomer származékának linearitását vizsgálva a 0,3-300 μM (n=10) tartományban megállapítottuk, hogy a linearitás minden aminosav esetében kiváló (r átlagos értéke =0,999, szélső értékek: 0,989-0,9999).

3.4. A származékok szétválasztása

Az OPA/TATG származékok elválasztásának optimalálásánál (Einarsson et al., 1987) használt acetát puffert foszfát pufferre cseréltük ki, miáltal megnőtt az elválasztás hatékonysága és a mozgó fázis nagyobb pufferkapacitással rendelkezett az elválasztás szempontjából érdekes pH tartományban. A foszfát puffer ionerősségét 95 mM-ra növelve nőtt az elméleti tényezőszám az aminosav származékokra és majdnem elérte a várható maximumot. Annak ellenére azonban, hogy a nagyobb ionerősség növelte az elválasztás hatékonyságát, néhány OPA/TATG aminosav származék esetében viszont - melyek a nagyobb ionerősség hatására összemosódtak - rontotta az elválasztást. Ezért további vizsgálatainkat a 95 mM értéknél maradván végeztük. Az ionerősség növelésének hatására a D-szerin és a D-arginin elválása romlik, az L-arginin pedig még közelebb kerül a D-hisztidinhez. Az ionerősség növelésének hatására az ammónia csúcs ellentétes irányban

mozdul el azokhoz a származékokhoz képest, melyek fontosak hogy ne mosódjanak össze a D-leucinnal. A pH 7-re történő változtatásával szintén változás áll be a szelektivitásban. A kromatogramon megjelenő első négy csúcs - az aszparaginsav és a glutaminsav D- és L-enantiomerje - növekvő pH hatására együtt mozdul el a fronttól távolodva, a következő csoportnál viszont csak a szerinre volt hatással a magasabb pH, mely a front irányába elmozdulva pH=7,3-nál összemosódott a D-aszparaginnal. A kromatogram vége felé a magasabb pH hatására az L-fenilalanin összemosódott a D-izoleucinnal. A pH és az ionerősség minimális megváltoztatásának hatására a D- és az L-leucint már nem lehet egymástól szétválasztani. A D-triptofánt és az L-valint is nagyon nehéz egymástól szétválasztani, de ez a nagyobb pH és ionerősség hatására részben sikerült.

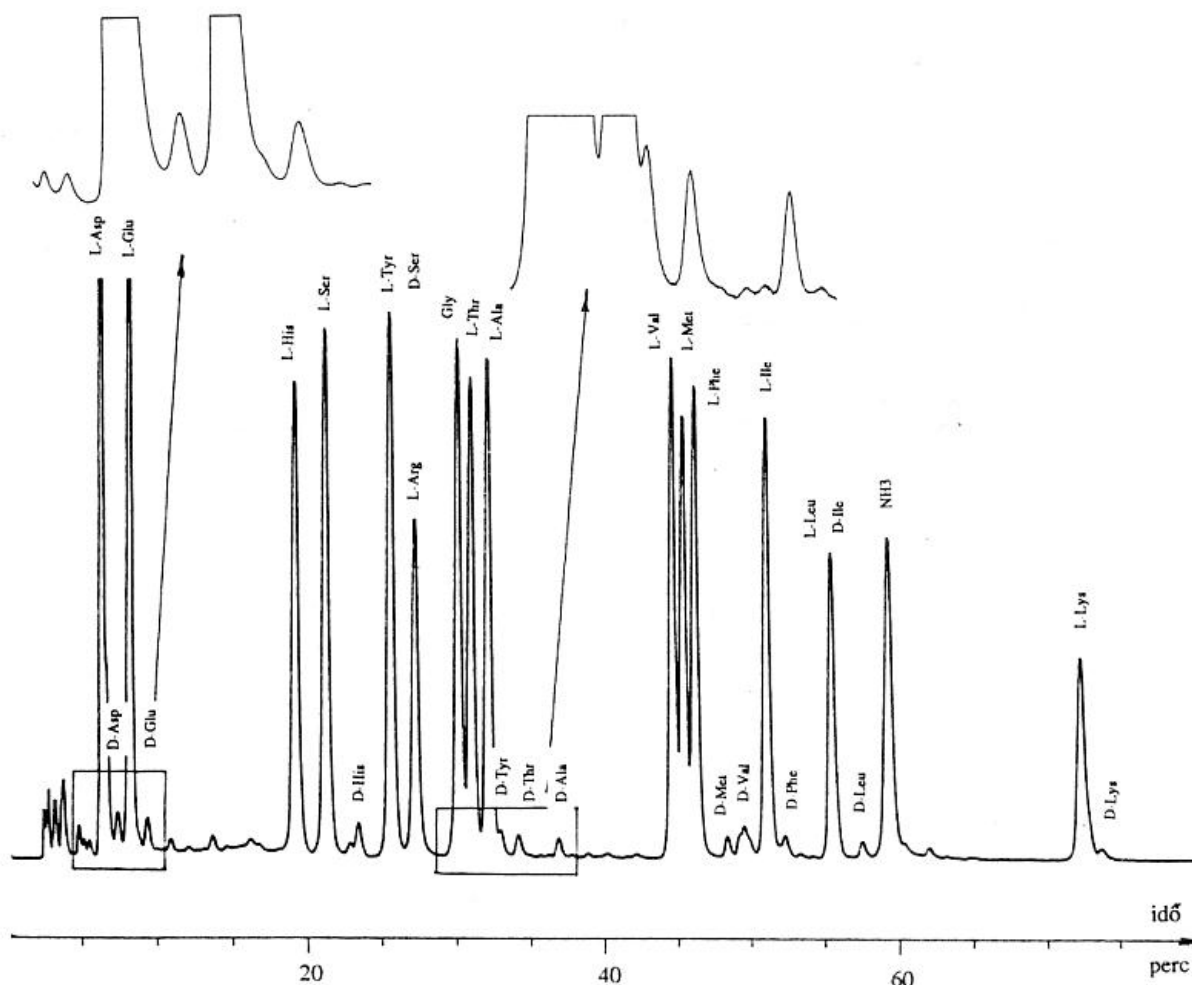


2. ábra: Az aminosav enantiomerek OPA/TATG származékainak szétválása gradiens elucióval

A 2. ábrán az aminosav enantiomerek keverékének kromatogramja látható. Az elválasztást 250x4.6 mm belső átmérőjű fordított fázisú oszloppal végeztük. Egyszerű, két komponensből álló gradienst használva, melynél a tetrahidrofuránt (Einarsson et al., 1987) acetonitrilre cseréltük ki, rendkívüli módon megnőtt az OPA/TATG aminosav származékok szétválása. Ezt annak ellenére kijelenthetjük, hogy a glutamin és az aszparagin enantiomerjei a többi aminosavval összemosódva jelennek meg a kromatogramon. Ennek ellenére mégis szükség volt a nagy metanol tartalmú eluensre a kromatografálás elején, mert különben az aszparaginsav és a glutaminsav enantiomerek nem váltak volna el tökéletesen egymástól. Az elválasztás tökéletesítésével lehetőség adódott az ornitin és a lizin enantiomerek szétválasztására is első ízben az OPA/TATG származékok analízise során.

A legtöbb alkalmazás során csak pár aminosav D- és L-enantiomerjére vagyunk kíváncsiak és nincs szükség az összes fehérjealkotó aminosav D- és L-enantiomerjének szétválasztására és meghatározására.

Ezért a mozgó fázis pH-jának és ionerősségének megváltoztatásával vagy másik szerves oldószer alkalmazásával és esetleg az analitikai oszlop méretének és töltetének változtatásával lehetőség van arra, hogy a kérdéses aminosav enantiomer(ek)et szét tudjuk választani és meg tudjuk határozni. Természetesen ilyenkor minden alkalommal el kell végezni a rendszer optimalizálását a szükséges aminosav(ak)ra. A 3. ábrán egy ilyen optimalizálás látható az aszparaginsav és a glutaminsav, valamint az alanin enantiomerjeinek szétválasztására.



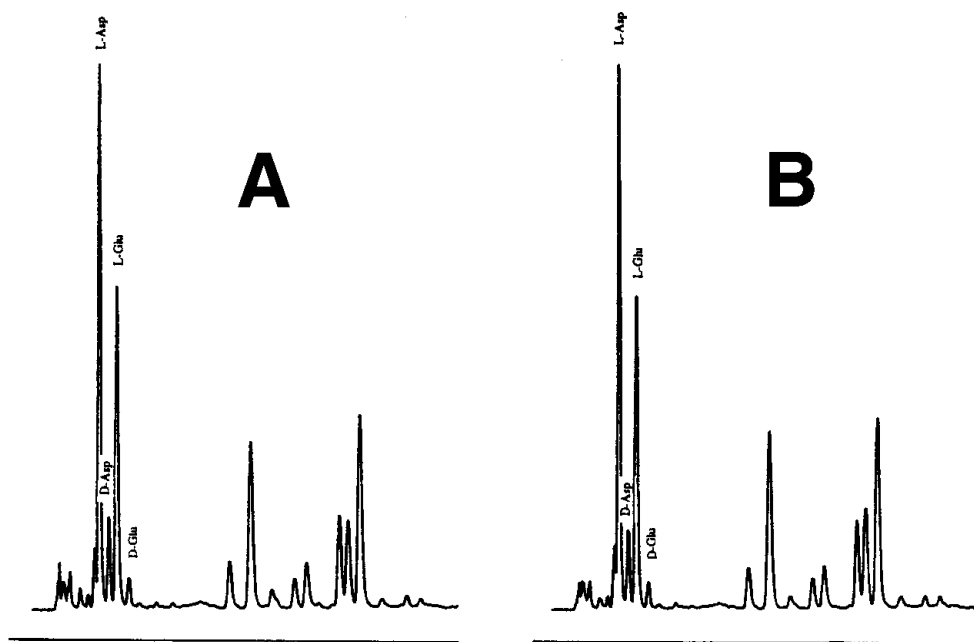
3. ábra: Az alacsony koncentrációban lévő D-aminosavak (5 μM) meghatározása a nagy koncentrációban lévő L-aminosavak (100 μM) mellett gradiens elucióval

A D-aszparaginsav és a D-glutaminsav illetve az aminosavak D/L aránya - a fossziliákban leggyorsabban racemizálódó két aminosav - különösen jól használható tengeri üledékek korának meghatározására, a D-alanin pedig a bakteriális fehérjeszintézis markere, hisz a baktériumok sejtfalának peptidglikánjai jelentős mennyiségű D-alanint tartalmaznak. Ebből a kromatogramból azonban az is látszik, hogy húszezres mennyiségű L-aminosav mellett sem okoz gondot a D-aminosavak elválasztása és meghatározása a hagyományos fluoreszcens detektor

alkalmazásával. A D-aminosavak meghatározásának alsó határa - fluoreszcens detektorral - ebben a rendszerben 0,2-0,5 μM között van, bár a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav esetén ez a koncentráció kisebb 0,1 μM -nál, a lizinnél pedig 2 μM körül van.

A ribonukleáz aminosavainak racemizációját gázfázisú hidrolízis (6M sósav, 110 °C, 140 óra) és folyadékfázisú hidrolízis során a 4. ábra mutatja. Az ábrákból megállapítható, hogy még 140 órás hidrolízis után sincs számottevő mennyiségű D-aminosav jelen az aszparaginsav és a glutaminsav kivételével. Az aszparaginsav és a glutaminsav esetében a 20 órás és a 140 órás hidrolízis utáni racemizáció az alábbiak szerint alakult:

A hidrolízis	Aszparaginsav (D/L)•100	Glutaminsav (D/L)•100
Gázfázisú, 20 óra	3,2	2,2
Folyadék fázisú, 20 óra	2,1	1,4
Gázfázisú, 140 óra	17,2	8,7
Folyadékfázisú, 140 óra	15,6	7,8



4. ábra: A ribonukleáz aminosavainak racemizációja gázfázisú (A) és folyadékfázisú (B) hidrolízis során (6M sósav, 110 °C, 140 óra)

A gázfázisú és a folyadékfázisú hidrolízist összehasonlítva megállapítható, hogy mind a 20, mind a 140 órás hidrolízisnél a gázfázisú hidrolízis során volt nagyobb a racemizáció, bár a különbség nem volt statisztikailag bizonyítható. A hidrolízis során lejátszódó racemizációra kapott adataink jó egyezést mutatnak Hare és Hoering (1975) mérési eredményeivel, akik a 24 órás folyadékfázisú hidrolízis után az aszparaginsav D/L arányára 0,017-et, a glutaminsavéra pedig 0,014-et kaptak.

Végül összehasonlítva az 1-(9-fluorenil)-etil-kloro-formiátos (FLEC) és az o-ftálaldehid / 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -glükopiranozidos (OPA/TATG) módszert aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására - anélkül, hogy a két módszert rangsorolni kívánnánk - a következő megállapítások tehetők:

- Mindkét módszer kiválóan alkalmas az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására, mert a származékképzés során egyiknél sem tapasztalható számottevő racemizáció.
- A FLEC módszer talán előnyösebb akkor, ha megfelelően nagy mintamennyiség áll rendelkezésünkre, és nem különösebben érdekelnek bennünket az aszparaginsav enantiomerjei.
- Az OPA/TATG módszerrel az aszparaginsav enantiomerjei tökéletesen szétválaszthatók.
- Az OPA/TATG módszer előnyösebb akkor, ha igen kis anyagmennyiségek állnak rendelkezésünkre (pl. kevesebb mint 1 mg kis fehérjetartalmú mikrofoszfát), vagy ha a minta sok ásványi anyagot tartalmaz.
- A FLEC módszer igen nagy előnye, hogy alkalmas az iminosavak szelektív származékképzésére, a (+)FLEC és (-)FLEC alkalmazásával pedig - a megváltozott elúciós sorrendet kihasználva - a csúcsok azonosításának biztonsága megnő, illetve a mintában elő sem forduló enantiomer retenciós ideje is meghatározható.

Végül összegzésként megállapíthatjuk, hogy mindig az analízist kivált anyaghoz kell a módszert igazítani, és az analizálandó mintáról kapott információk alapján célszerű a módszert kiválasztani.

Irodalom

1. Aswad,D.W.(1984): Anal. Biochem.,**137**, 405
2. Buck,R.H. & Krummen,K.(1984): J. Chromatogr., **315**, 279
3. Hare,P.E. & Hoering,T.C.(1875): Carnegie Inst. Wash. Yearb., **74**, 608
4. Kinoshita,T., Kasahara,Y. & Nimura,N.(1981): J. Chromatogr., **210**, 77
5. Lam,S.(1986): J. Chromatogr., **355**, 157.
6. Nimura,N., Oguro,H. & Kinoshita,T.(1980): J. Chromatogr., **202**, 375
7. Nimura,N., Toyama,A, & Kinoshita, T.(1984): J. Chromatogr., **316**, 547
8. Nimura,N. & Kinoshita,T.(1986): J.Chromatogr., **352**, 169

Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma II. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása származékképzés után

Folestad, S., Tivesten, A., Csapó J.

A kidolgozott módszer alkalmazható az α -aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására az o-ftálaldehiddel (OPA) és az optikailag aktív 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -glükopiranoziddal történő származékképzés után fordított fázisú folyadékkromatográfiával. A származékképzés során a reakció szobahőmérsékleten néhány perc alatt lejátszódik, és a kapott származékok igen stabilak. A képzett diasztereomerek szelektivitása - a lizin és az ornitin kivételével - különösen jónak mondható. A származékok fluoreszcenciás gerjesztési és emissziós maximuma 342 és 410 nm volt. A kimutathatóság határa fluoreszcens detektor esetén 2 pmol, elektrokémiai detektor esetén pedig 1 pmol volt az aminosavak többségére. A leirt módszerrel meghatározták a ribonukleáz gáz- és folyadékfázisú hidrolízise során fellépő racemizáció nagyságát is.

D-Amino Acid Content of Foodstuffs and Feeds. II. Separation and Determination of Amino Acid Enantiomers after Derivatization

Folestad, S., Tivesten, A., Csapó, J.

A method is described for the separation and determination of α -amino acid derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) and optically active 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside by reverse phase liquid chromatography. It can be stated that the selectivity of the diastereomers formed - with the exception of lysine and ornithine - is especially good. The fluorescence excitation and emission maxima of the derivatives were 342 and 410 nm, respectively. The detection limit for the majority of amino acids was 2 pmol in case of fluorescence detector and 1 pmol using electrochemical detector. The extent of racemization occurring during gas and liquid phase hydrolysis of ribonuclease was determined by the method described.

D-Aminosäuregehalt von Lebensmitteln und Futtermitteln II. Trennung und Bestimmung von Aminosäure-Enantiomeren nach der Derivation

Folestad, S., Tivesten, A. und Csapó, J.

Die ausgearbeitete Methode ist für die Trennung und Bestimmung von α -Aminosäure-Enantiomeren nach Derivatbildung mit o-Phtalaldehyd (OPA) und mit dem optisch aktiven 2,3,4,6-Tetra-O-Acetyl-1-Thio- β -Glycopiranosid unter Anwendung der Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie geeignet. Die Reaktion läuft während der Derivatbildung bei Zimmertemperatur in einigen Minuten ab und die erhaltenen Derivate sind recht stabil. Die Selektivität der gebildeten Diastereomere kann mit Ausnahme von Lysin und Ornithin als besonders günstig eingeschätzt werden. Die Fluoreszenzinduktions- und Emissionsmaxima betragen 342 und 410 nm. Die Nachweisgrenze liegt für die Mehrheit der Aminosäuren im Falle des Fluoreszenzdetektors bei 2 pmol und des elektrochemischen Detektors bei 1 pmol. Mit der beschriebenen Methode wurde auch die Größe der Razemisation bei der Hydrolyse der Ribonuclease in der Gas- und Flüssigkeitsphase bestimmt.