

2.2.56. AMINOSAV-ANALÍZIS⁽⁵⁾

Az aminosav-analízis a fehérjék, a peptidek és egyéb gyógyszerkészítmények aminosav-összetételének vagy aminosavtartalmának meghatározására alkalmazott módszereket jelenti. A fehérjék és a peptidek makromolekulák, amelyek kovalens kötésekkel lineáris polimerré összekapcsolódott aminosav-egységekből állnak. A fehérjék és a peptidek tulajdonságait aminosavsorrendjük határozza meg. A fehérjék általában specifikus konformációjú, összehajtogatott szerkezetű, nagy molekulák, míg a peptidek kisebbek és esetleg csak néhány aminosavból állnak. Az aminosav-analízist alkalmazhatjuk fehérjék és peptidek mennyiségi meghatározására, fehérjék és peptidek azonosítására aminosav-összetételük alapján, fehérjék és peptidek szerkezetvizsgálatára, a peptid térkép-vizsgálatok fragmentációs stratégiáinak értékelésére, és olyan atípusos aminosavak kimutatására is, amelyek adott fehérjében vagy peptidben esetleg jelen lehetnek. Az aminosav-analízis megkezdése előtt a fehérjét/peptidet aminosavjaira kell hidrolizálni. A fehérje/peptid hidrolízise után az aminosav-analízis ugyanúgy végezhető el, mint más gyógyszerkészítményekben a szabad aminosavak vizsgálata. Az analízishez a vizsgálati minta aminosav-összetevőiből rendszerint származékokat készítenek.

KÉSZÜLÉK

Az aminosav-analízisre alkalmazott módszerek általában a vizsgálati mintában jelenlévő aminosavak kromatográfiás elválasztásán alapulnak. Az általánosan alkalmazott módszerekhez az analitikai eljárásokhoz kialakított, automatizált kromatográfiás berendezéseket használják. Az aminosav-analizátor általában kisnyomású vagy nagynyomású folyadékkromatográf, amely képes olyan mozgófázis-grádiens előállítására, amellyel a vizsgálandó aminosavak a kromatográfiás oszlopon elválaszthatók. A készüléknek alkalmasnak kell lennie oszlop utáni származékképzésre is, kivéve, ha a minta analízise oszlop előtti származékképzéssel történik. A detektor – attól függően, hogy milyen származékképzési módszert alkalmazunk – általában ultrabolya/látható vagy fluoreszcenciás detektor. A detektorról jövő analóg jel átalakítására és mennyiségi értékelésére megfelelő regisztráló berendezést (pl. integrátort) alkalmazunk. Kívánatos, hogy az aminosav-analízisre külön e célra fenntartott készülék álljon rendelkezésre.

ÁLTALÁNOS ÓVINTÉZKEDÉSEK

A háttérszennyezés mindig gondot jelent az analitikus számára az aminosav-analízis végrehajtása során. Nagytisztaságú reagensekre van szükség (pl. nem kielégítő tisztaságú sósavval glicin-szennyezést vihetünk be). Az analízishez alkalmazott reagenseket néhány hetenként – kizárólag nagynyomású kromatográfiás (HPLC) célra szánt oldószerek felhasználásával – rendszeresen meg kell újítani. Az esetleges mikrobiológiai szennyeződést és az oldószerekben esetleg jelenlévő idegen anyagok mennyiségét – az oldószerek felhasználás előtti szűrésével, az oldószertartályok lefedve tartásával és az aminosav-analizátor közvetlen napfénytől védett helyre telepítésével – csökkenteni kell.

A laboratóriumi gyakorlat meghatározó lehet az aminosav-analízis minősége szempontjából. A készüléket a laboratórium kevésbé forgalmas részében kell elhelyezni. A laboratóriumot tisztán kell tartani. A pipetták tisztítását és kalibrálását a karbantartási terv szerint kell végezni. A pipetták cseppentő-feltétjeit lefedett dobozban kell tárolni, az analitikusok ezeket pusztán kézzel nem érinthetik; latex-alapú vagy ezzel egyenértékű anyagból készült, hintőpor-mentes kesztyű

⁽⁵⁾ Ez a fejezet gyógyszerkönyvi harmonizációs eljáráson esett át. Lásd az 5.8 Gyógyszerkönyvi harmonizáció (9.13) c. fejezetet.

használata megengedett. A vizsgálandó mintát tartalmazó üvegcsét minél kevesebbszer nyissuk és zárjuk, mert a belekerülő por növelheti a glicin-, a szerin- és az alanin-szintet.

Ahhoz, hogy elfogadható aminosav-analízis eredményeket kapjunk, jól karbantartott készülékre van szükség. Amennyiben a készüléket rendszeresen használjuk, naponta ellenőrizni kell az esetleges tömítetlenségeket, a detektor és a fényforrás stabilitását, illetőleg azt, hogy az oszlop megőrizte-e az aminosavakra vonatkozó felbontóképességét. A készülék összes szűrőjét és egyéb, karbantartandó elemeit a karbantartási terv szerint rendszeresen tisztítani, illetve cserélni kell.

REFERENCIAANYAG

Az aminosav-analízishez szükséges, megfelelő aminosav-standardok – amelyek rendszerint aminosav-keverékek vizes oldatai – kereskedelmi úton beszerezhetők. Amennyiben aminosav-összetétel megállapítása a feladat, a vizsgálandó anyaggal egyidejűleg, kontrollként, fehérje-, illetve peptid-standardokat is analizálni kell, ezzel igazolva a teljes vizsgálati eljárás megbízhatóságát. E célra, fehérje-standardként, nagy tisztaságú szarvasmarha-szérumalbumin használható.

A KÉSZÜLÉK KALIBRÁLÁSA

Az aminosav-analizátor kalibrálása általában egy – különböző koncentrációjú aminosavak keverékéből álló – aminosav-standard analízisét jelenti, melyet, annak érdekében kell elvégezni, hogy a válasz-faktort és a méréstartományt minden egyes aminosavra külön-külön megállapíthassuk. A standardban minden egyes aminosav koncentrációja ismert. A kalibrálás folyamán az aminosav-standardból különböző – az adott aminosav-analízis módszer várható, lineáris tartományán belüli – hígításokat készítünk. Ezután, a különböző hígítási szinthez tartozó minták mindegyikét, párhuzamos méréseket végezve, analizálhatjuk. A kapott csúcsterület-értékeket – minden egyes aminosavra vonatkozóan – a hígított standard ismert aminosav-koncentrációinak függvényében ábrázoljuk. Ezen eredmények alapján meghatározhatjuk azt a koncentráció-tartományt, amelyben adott aminosav csúcsterülete megközelítőleg lineárisan függ a koncentrációtól. Ahhoz, hogy torzításmentes és ismételhető eredményeket kapjunk, az aminosav-analízishez úgy kell előkészítenünk a mintákat, hogy azok az alkalmazott eljárás mérés határain belül (pl. a lineáris munkatartományon belül) legyenek.

Adott aminosavra vonatkozó válasz-faktor megállapításához, minden egyes aminosav esetében, az aminosav-standardból 4 – 6 hígítást kell analizálni. A válasz-faktort úgy számoljuk ki, hogy az átlagos csúcsterületet vagy csúcsmagasságot osztjuk a standardban lévő aminosav nanomóljaival. Kalibrációs táblázatot/fájlt készítünk, amely tartalmazza valamennyi aminosav válasz-faktorát; ezt használjuk fel a vizsgálati mintában lévő aminosavak koncentrációinak kiszámítására: valamely aminosav nanomóljainak számát tehát úgy kapjuk meg, hogy az adott aminosavnak megfelelő csúcsterületet osztjuk ezen aminosav válasz-faktorával. Amennyiben sorozatmérések folynak, „egyponos kalibrálás” is elegendő lehet; a kalibrációs táblázatot/fájlt azonban gyakran kell felülvizsgálni, és az analízis megbízhatóságának biztosítása érdekében – analitikai ellenőrzővizsgálatokkal – szűrőpróbákat kell végezni.

ISMÉTELHETŐSÉG

Ahhoz, hogy egy analitikai laboratóriumban az aminosav-analízis eredmények mindig megbízhatóak legyenek, ügyelni kell a tartalmi meghatározások ismételhetőségére. Az aminosavak vagy származékaik kromatográfias elválasztásának értékelése során számos

aminosavcsúcsot figyelhetünk meg a kromatogramon. A nagyszámú csúcs miatt olyan aminosav-analízis rendszerre van szükség, amely ismételhetően képes a csúcsokat retenciós idejük alapján azonosítani és a csúcsterületeket a mennyiségi meghatározás céljából integrálni. Az ismételhetőség értékeléséhez általában standard aminosav-oldatot készítünk és ugyanazon standard oldatból több (pl. 6 vagy ennél több) párhuzamos analízist végzünk. Mind a retenciós idő, mind az integrált csúcsterület relatív szórását (RSD) meg kell határozni valamennyi aminosavra nézve. Az ismételhetőség ellenőrzését ki kell terjeszteni a több napon keresztül, több analitikus által folytatott, összetett tartalmi meghatározásokra is. Az összetett tartalmi meghatározások magukban foglalják a standard hígítások elkészítését a kiindulási anyagokból, a mintakezelés okozta hiba meghatározása érdekében. Az ismételhetőség értékeléséhez általában egy fehérje-standard (pl. szarvasmarha-szérumalbumin) aminosav-összetételét vizsgáljuk. A laboratórium a párhuzamos mérések szórásának (azaz a relatív standard deviációnak) értékelése alapján tudja megállapítani azokat az analitikai határértékeket, amelyeknek alapján biztosítani tudja, hogy a laboratóriumból kikerülő analízisek ellenőrzöttek legyenek. Ahhoz, hogy a lehető legjobb eredményeket biztosítsuk, célszerű határértékeket megadni a legkisebb gyakorlati szórásra. Az aminosav-analízis bizonytalanságainak csökkentése érdekében például a következő területekre kell összpontosítani: a mintaelőkészítés, a reagensek minősége és/vagy a laboratóriumi gyakorlat miatt létrejövő magas spektrális háttér-interferencia, továbbá a készülék teljesítőképessége és karbantartása, az eredmények értékelése, valamint az analitikus teljesítménye és szokásai. A validációs munka keretében valamennyi bevont paramétert teljes egészében meg kell vizsgálni.

MINTAELŐKÉSZÍTÉS

Ahhoz, hogy pontos aminosav-analízis eredményekhez jussunk, tisztított fehérje-, ill. peptidmintákra van szükségünk. A pufferanyagok (pl. sók, karbamid, felületaktív anyagok) zavarhatják az aminosav-analízist, ezért ezeket az analízis megkezdése előtt a mintából el kell távolítani. Az oszlop utáni aminosav-származékképzést alkalmazó módszereket általában nem befolyásolják oly mértékben a puffer-komponensek, mint az az oszlop előtti származékképzést alkalmazó módszerek esetében tapasztalható. Célszerű határt szabni a mintákkal végzett műveletek számának, hogy ezáltal csökkenjen a háttérszennyeződés kockázata, és ugyancsak kívánatos a visszanyerés javítása, valamint a közvetlen emberi munka csökkentése. A fehérjeminták puffer-komponenseinek eltávolítására általában a következő módszereket alkalmazzuk: 1. a fehérjemintát fordított fázisú folyadékkromatográfiás (HPLC) rendszerbe injektáljuk, a fehérjét – megfelelő szerves alkotórészt tartalmazó – illékony oldószerezrel eluáljuk és a mintát vákuum-centrifugálással beszáritjuk; 2. dialízist végzünk illékony pufferral vagy vízzel szemben; 3. centrifugás ultraszűrést alkalmazunk a puffer-alkotórész illékony pufferral vagy vízzel történő lecserélésére; 4. a fehérjét szerves oldószerez (pl. acetone) alkalmazásával kicsapjuk a puffer mellől; 5. gélszűrést alkalmazunk.

BELSŐ STANDARDOK

Ajánlatos, hogy az aminosav-analízis folyamán bekövetkező fizikai és kémiai anyagveszteségek, valamint egyéb változások figyelemmel kísérésére belső standardot alkalmazzunk. A pontosan ismert mennyiségű belső standardot a hidrolízis előtt is hozzáadhatjuk a fehérjeoldathoz. Ilyenkor a belső standard visszanyerése megadja a fehérjét felépítő aminosavakra vonatkozó, általános visszanyerést. A hidrolízis folyamán azonban a szabad aminosavak másként viselkednek, mint a fehérjekötésben lévő aminosavak, mely utóbbiak felszabadulásának, ill. esetleges bomlásának sebessége változó. Ezért a belső standard alkalmazása a hidrolízis folyamán bekövetkező veszteségek korrigálására megbízhatatlan eredményeket adhat. Ezt a szempontot is figyelembe kell venni majd az eredmények értékelése

során. A belső standardokat a hidrolízis után is hozzáadhatjuk az aminosav-elegyhez, hogy a mintabevitelben, a reagens stabilitásának változásában, valamint az áramlási sebesség változásában előforduló különbségeket korrigáljuk. Ideális esetben a belső standard olyan, a természetben nem előforduló primer aminosav, amely a kereskedelmi forgalomban beszerezhető és olcsó. A belső standardtól megköveteljük, hogy a hidrolízis folyamán stabil legyen, válasza lineárisan függjön a koncentrációtól és kizárólag rá jellemző retenciós idővel, más aminosavak átfedése nélkül eluálódjék. Elterjedten alkalmazott aminosav-standardok pl.: norleucin, nitrotirozin, α -aminovajsav.

FEHÉRJEHIDROLÍZIS

Mind a fehérjemintákat, mind a peptidmintákat hidrolizálni kell ahhoz, hogy aminosav-analízisüket elvégezhessük. A hibás eredmények elkerülése érdekében a hidrolízishez szánt üvegeszközöknek igen tisztáknak kell lenniük. A hidrolíziscsővekre kerülő hintőpor (a védőkesztyűkről) vagy ujjlenyomat is szennyeződést okozhat. Az üvegből lévő hidrolíziscsőveket 1 órán át 1 M sósavban forraljuk, vagy tömény salétromsavban, esetleg tömény sósav és tömény salétromsav azonos térfogatarányú elegyében áztatjuk. A kitisztított hidrolíziscsőveket nagytisztaságú vízzel öblítjük, majd egy ízben folyadékkromatográfiás célra szánt metanollal is átöblítjük; ezután egy éjszakán át szárítószekrényben szárítjuk és a felhasználásig lefedve tároljuk. Annak érdekében, hogy a szennyeződéseket a hidrolízis céljára szánt csővekről eltávolítsuk, úgy is eljárhatunk, hogy a tiszta üvegcsőveket 4 órán át 500 °C-on hevítjük. Más, egyenértékű anyagból készült laboratóriumi eszköz is használható, ha ilyen áll rendelkezésünkre.

A fehérjeminta – aminosav-analízis előtti – hidrolízisére legelterjedtebb módszer a savas hidrolízis. A savas hidrolízisre választott módszer – néhány aminosav teljes vagy részleges bomlása miatt – növelheti az analízis hibáját; a triptofán elbomlik, a szerin és a treonin részlegesen bomlik, a metionin oxidálódhat, és a ciszteint általában cisztinként nyerjük vissza (a cisztin-visszanyerés azonban – részleges bomlás vagy ciszteinné való redukálódás miatt – rendszerint kismértékű). Ha megfelelő (200 Hg μ m-nél, ill. 26,7 Pa-nál kisebb) vákuumot alkalmazunk vagy inert gázt (argont) vezetünk be a reaktoredény légterébe, csökkenteni tudjuk az oxidatív bomlás mértékét. Azokban a peptidkötésekben, amelyekben izoleucin és valin vesznek részt, az Ile-Ile, Val-Val és Val-Ile amidkötések csak részlegesen hasadnak; az aszparagin és a glutamin – aszparaginsavvá, illetőleg glutaminsavvá alakulva – dezamidálódik. A savas hidrolízis folyamán bekövetkező triptofán-, aszparagin- és glutamin-vesztéség tizenhétre korlátozza a mennyiségileg meghatározható aminosavak számát. Az előírt hidrolízis-módszerek némelyike éppen e hátrányos következmények megoldására irányul. Néhány előírt hidrolízis-módszer (pl. a 4.11 módszer) viszont más aminosavakban okozhat változásokat. Ezért, mielőtt – a savas hidrolízis helyett – más módszert alkalmaznánk, az adott hidrolízis-módszer alkalmazásának előnyeit és hátrányait mérlegelni és megfelelően vizsgálni kell.

A részlegesen elbomlott vagy lassan lehasadó aminosavak kezdeti koncentrációjának megállapítására gyakran vizsgálják a bomlás időfüggését (vagyis 24, 48 és 72 órás savas hidrolízis után végeznek aminosav-analízist). Ha a bomlékony aminosavak (pl. szerin, treonin) koncentrációját az idő függvényében követjük és a kapott értékeket ábrázoljuk, a görbét a kiindulási pontig extrapolálhatjuk és így meghatározhatjuk ezeknek az aminosavaknak a kezdeti koncentrációját. A kinetikai vizsgálatokat lassan lehasadó aminosavak (pl. izoleucin, valin) esetében is gyakran elvégzik. A hidrolízis időbeli lefolyását követve, ilyen esetekben az analitikus egy vízszintes szakaszt (platót) fog észlelni. Ez esetben a plató magasságát tekintjük az adott aminosav-egység koncentrációjának. Ha a hidrolízis ideje túl hosszú, a mintában csökkenni kezd az aminosav-egység koncentrációja, jelezve a hidrolízis körülményei miatt bekövetkező bomlást.

A kinetikai tanulmányoknak elfogadható alternatívája, hogy az aminosav kalibráló-standardot ugyanolyan hidrolízis körülmények közé helyezzük, mint a vizsgálati mintát. Nem biztos, hogy a szabad aminosav ugyanolyan sebességgel bomlik, mint a fehérjében/peptidben kötött bomlékony aminosav a hidrolízis folyamán. Ez különösen érvényes a lassan hasadó peptidkötésekre (pl. Ile-Val kötések). Mégis, ez a módszer teszi lehetővé, hogy az analitikus számításba tudja venni az aminosav-egységek bomlását. Alkalmazzák a mikrohullámú savas hidrolízist is, amely gyors eljárás, de különleges felszerelést és különleges óvintézkedéseket igényel. A mikrohullámú savas hidrolízis optimális körülményeit minden egyes fehérje-, ill. peptidminta esetére külön meg kell vizsgálni. A mikrohullámú hidrolízis eljárás alkalmazása általában mindössze néhány percet igényel, de már egy perc eltérés is téves eredményhez vezethet (pl. nem teljes hidrolízis vagy a bomlékony aminosavak bomlása esetében). A proteázokból álló keverékkel végrehajtott teljes proteolízis is használatos módszer, de bonyolult lehet, megfelelő ellenőrzést igényel és általában inkább peptidekre alkalmazható, mint fehérjékre.

Amikor ismeretlen fehérjét kezdünk vizsgálni, a hidrolízis időtartamának és hőmérsékletének változtatásával kísérleteket kell végezni a hidrolízis optimális körülményeinek meghatározására.

1. MÓDSZER

Az aminosav-analízist megelőző fehérje-, ill. peptidhidrolízisre alkalmazott, legelterjedtebb eljárás a fenoltartalmú sósavval végrehajtott savas hidrolízis. A fenol szerepe a tirozin halogéneződésének megakadályozása.

Hidrolizáló oldat. 0,1–1,0% fenolt tartalmazó 6 M sósav.

Vizsgálat

Folyadékfázisú hidrolízis. A fehérje-, ill. peptidmintát hidrolíziscsőbe mérjük és beszáritjuk. (A mintát azért kell beszáritani, hogy víztartalma ne hígítsa a hidrolízishez alkalmazott savat.) A beszáritott mintához, 500 µg liofilezett fehérjére számítva, 200 µl hidrolizáló oldatot adunk. A mintát tartalmazó csövet száraz jég – aceton fürdőben lefagyasztjuk és lánggal, vákuumban, leforrasztjuk. A mintákat általában 24 órán át, 110 °C-on hidrolizáljuk, mégpedig vákuumban vagy inert gáztérben, hogy oxidációjukat megakadályozzuk. Hosszabb ideig (pl. 48 vagy 72 órán át) csak olyankor hidrolizálunk, amikor okunk van feltételezni, hogy 24 óra alatt a fehérje nem hidrolizál teljesen.

Gőzfázisú hidrolízis. Ez egyike a legelterjedtebben alkalmazott savas hidrolízis-módszereknek, különösen mikroanalízisek esetében, amikor kevés minta áll rendelkezésre. Ha gőzfázisú hidrolízist alkalmazunk, minimálisra szorul vissza az az eshetőség, hogy a minta szennyeződik a savas reagenstől. A szárított mintákat tartalmazó üvegcséket egy – megfelelő mennyiségű hidrolizáló oldatot tartalmazó – edénybe helyezük, oly módon, hogy a hidrolizáló oldat ne érintkezzék a vizsgálandó mintával. Az edény légterében inert atmoszférát vagy – 200 Hgmm-nél, ill. 26,7 Pa-nál kisebb – vákuumot létesítünk, az edényt kb. 110 °C-ra melegítjük és 24 órán át ezen a hőmérsékleten hidrolizálunk. A szárított mintát a savgőzök hidrolizálják. A sav lecsapódását lehetőség szerint csökkenteni kell a mintákat tartalmazó üvegcsékben. A hidrolízis befejeztével a mintákat – az esetleg visszamaradt sav eltávolítása céljából – vákuumban beszáritjuk.

2. MÓDSZER

A triptofán hidrolízis során bekövetkező oxidációját merkaptotetánszulfonsavval – mint redukáló savval – szorítjuk vissza.

Hidrolizáló oldat. 2,5 M merkaptotetánszulfonsav-oldat

Gőzfázisú hidrolízis. A vizsgálandó fehérje/peptid kb. 1 – 100 µg-ját hidrolíziscsőben beszárítjuk, majd a hidrolíziscsővel együtt, egy – kb. 200 µl hidrolizáló oldatot tartalmazó – nagyobb csőbe helyezük. A nagyobbik csövet leforrasztjuk, mégpedig vákuumban (kb. 50 Hgmm, ill. 6,7 Pa), hogy a hidrolizáló oldat gőzfázisba kerüljön. A hidrolíziscsövet ezután kb. 12,5 perces időtartamra 170–185 °C-ra hevítjük. A hidrolízis befejeztével a hidrolíziscsövet 15 percig vákuumban szárítjuk a maradék sav eltávolítása céljából.

3. MÓDSZER

A triptofán hidrolízis során bekövetkező oxidációját tioglikolsavval (TGS) – mint redukáló savval – akadályozzuk meg.

Hidrolizáló oldat. 1% fenolt, 10% trifluorecetsavat és 20% tioglikolsavat (TGS) tartalmazó 7 M sósav.

Gőzfázisú hidrolízis. A vizsgálandó fehérje/peptid kb. 10–50 µg-ját a mintacsőben beszárítjuk. A mintacsövet egy – kb. 200 µl hidrolizáló oldatot tartalmazó – nagyobb csőbe helyezük. A nagyobbik csövet vákuumban (kb. 50 Hgmm, ill. 6,7 Pa) forrasztjuk le, hogy a TGS gőzfázisba kerüljön. A mintacsövet kb. 15–30 perces időtartamra 166 °C-ra hevítjük. A hidrolízis befejeztével a mintacsövet 5 percig vákuumban szárítjuk a maradék sav eltávolítása céljából. A triptofán-visszanyerés – ha ezt a módszert alkalmazzuk – függhet a vizsgált mintában lévő triptofán mennyiségétől.

4. MÓDSZER

A cisztein/cisztin és a metionin oxidációját – még a fehérjehidrolízis előtt – perhangyasavas oxidáló eleggyel hajtjuk végre.

Oxidáló oldat. A perhangyasavas oxidáló elegyet frissen készítjük: 1 térfogatrész 30%-os hidrogén-peroxid-oldatot 9 térfogatrész vízmentes hangyasavval elegyítünk és az elegyet 1 órán át szobahőmérsékleten tartjuk.

Vizsgálat. A fehérje-, ill. peptidmintát 20 µl vízmentes hangyasavban oldjuk. Az oldatot 5 percig 50 °C-on melegítjük, majd 100 µl oxidáló oldatot mérünk hozzá. Az oxidáció lezajlására 10–30 percet várunk. Ebben a reakcióban a cisztein ciszteinsavvá, míg a metionin metionin-szulfonná alakul. A reagens feleslegét vákuum-centrifugával távolítjuk el a mintából. Az oxidált fehérje savas hidrolízisét ezután az 1. vagy 2. módszerrel végezhetjük el. Ez a módszer – halogenidek jelenlétében – a tirozin-egységekben kémiai változásokat idézhet elő.

5. MÓDSZER

A cisztein/cisztin oxidációt a folyadékfázisú hidrolízis során nátrium-aziddal hajtjuk végre.

Hidrolizáló oldat. 0,2% fenolt tartalmazó 6 M sósavhoz annyi nátrium-azidot adunk, hogy végső koncentrációja 2 g/l legyen. A hozzáadott fenol meggátolja a tirozin halogéneződését.

Folyadékfázisú hidrolízis. A fehérje-, ill. peptidhidrolízist 24 órán át, kb. 110 °C-on végezzük. A hidrolízis folyamán a mintában lévő cisztein/cisztin a hidrolizáló oldatban lévő nátrium-azid hatására ciszteinsavvá alakul. Ez a módszer jobb visszanyerést tesz lehetővé, mint a 4. módszer, de metioninra nézve nem kvantitatív. A metionin olyan keverékké alakul, amely a kiindulási

metioninon kívül két oxidációs terméket – metionin-szulfoxidot és metionin-szulfont – is tartalmaz.

6. MÓDSZER

A cisztein/cisztin oxidációt dimetil-szulfoxiddal (DMSO) hajtjuk végre.

Hidrolizáló oldat. 0,1–1,0% fenolt tartalmazó 6 M sósavhoz annyi dimetil-szulfoxidot adunk, hogy végső koncentrációja 2 %*V/V* legyen.

Gőzfázisú hidrolízis. A fehérje-, ill. peptidhidrolízist 24 órán át, kb. 110 °C-on végezzük. A hidrolízis folyamán a mintában lévő cisztein/cisztin a hidrolizáló oldatban lévő DMSO hatására ciszteinsavvá alakul. Annak érdekében, hogy a szórást csökkentsük és részleges bomlást kompenzáljuk, ajánlatos az 1–8 mol ciszteint tartalmazó fehérje-standardok oxidatív hidrolíziséből származó ciszteinsav visszanyerésének értékelése. A fehérje/peptid hidrolizátumok válasz-faktorai jellemzően kb. 30 %-kal kisebbek, mint a nem-hidrolizált ciszteinsav standardok válasz-faktorai. Ez az eljárás – mivel a hisztidin, a metionin, a tirozin és a triptofán is kémiai változást szenved – nem ad teljes eredményt az összetételre nézve.

7. MÓDSZER

A cisztin/cisztein redukciót és alkilezést gőzfázisú piridiletilezéssel hajtjuk végre.

Redukáló oldat. 83,3 µl piridint, 16,7 µl 4-vinilpiridint, 16,7 µl tributil-foszfint és 83,3 µl vizet megfelelő edénybe mérünk; az edény tartalmát összekeverjük.

Vizsgálat. A fehérjéből/peptidből 1–100 µg-ot hidrolíziscsőbe mérünk, majd a hidrolíziscövet egy nagyobb kémcsőbe helyezük. A redukáló oldatot bemérjük a nagyobb kémcsőbe. Ezt a kémcsövet vákuumban (kb. 50 Hgum, ill. 6,7 Pa) leforrasztjuk, majd 5 percig kb. 100 °C-on melegítjük. Ezután a hidrolíziscövet kivesszük és vákuum-exszikkátorban 15 percig szárítjuk a reagensmaradványok eltávolítására. A piridiletilezett mintát ezután – a fentebb leírt eljárások egyikével – savas hidrolízis alá vethetjük. A piridiletilezést egyidejűleg egy 1–8 mol ciszteint tartalmazó standard fehérjemintával is végrehajtjuk, hogy a piridiletil-cisztein visszanyerést kiértékelhessük. Ha a piridiletilezési reakcióra hosszabb időt hagyunk, a terminális α-amino-csoporton és a fehérje lizin-egységeinek ε-amino-csoportján is átalakulások játszódhatnak le.

8. MÓDSZER

A cisztin/cisztein redukciót és alkilezést folyadékfázisú piridiletilezéssel hajtjuk végre.

Törzsoldatok. Három oldatot készítünk: 4 mM dinátrium-edetátot tartalmazó 1 M trometamol-hidroklorid–tompítóoldat (pH 8,5) (A-törzsoldat), 8 M guanidin-hidroklorid–oldat (B-törzsoldat), és 10%-os 2-merkaptotanol–oldat (C-törzsoldat). Mindhárom oldatot megsűrjük.

Redukáló oldat. 1 térfogatrész A-törzsoldat és 3 térfogatrész B-törzsoldat elegyítésével egy 0,25 M trometamol-hidrokloridos 6 M guanidin-hidroklorid–tompítóoldatot készítünk.

Vizsgálat. Kb. 10 µg vizsgálati mintát 50 µl redukáló oldatban oldunk. Az oldathoz kb. 2,5 µl C-törzsoldatot adunk. Az elegyet 2 órán át, szobahőmérsékleten, sötét helyen, nitrogén vagy argon gáz alatt tartjuk. A piridiletilezéshez kb. 2 µl 4-vinilpiridint adunk a fehérje-oldathoz és a reakcióelegyet további 2 órán át hagyjuk állni szobahőmérsékleten, sötét helyen. A fehérje/peptid sómentesítését a fordított fázisú folyadékkromatográfiával (HPLC) elválasztott

fehérje/peptid frakció elkülönítésével végezzük el. Az elkülönített mintát a savas hidrolízis előtt vákuum-centrifugában száríthatjuk.

9. MÓDSZER

A cisztin/ciszetin redukción és alkilezést folyadékfázisú karboximetilezéssel hajtjuk végre.

Törzsoldatok. Készítésükhöz lásd a 8. módszert.

Karboximetilező oldat. 100 g/l töménységű, alkoholos jódcetamid-oldatot készítünk.

Tompítóoldat. A 8. módszerhez leírt redukáló oldatot használjuk.

Vizsgálat. A vizsgálati mintát 50 µl tompítóoldatban oldjuk. Az oldathoz kb. 2,5 µl C-törzsoldatot elegyítünk. Az elegyet 2 órán át, szobahőmérsékleten, sötét helyen, nitrogén vagy argon gáz alatt tartjuk. Ezután az összes elméleti tiol-tartalomra számított karboximetilező oldat másfélszeresét mérjük az oldathoz és a reakcióelegyet 30 percig hagyjuk állni szobahőmérsékleten, sötét helyen. Amennyiben a minta tiol-tartalma nem ismeretes, a jelenlévő fehérje minden 20 nmol-jára számítva, 5 µl 100 mM jódcetamid-oldatot adunk az oldathoz. A reakciót 2-merkaptóetanol feleslegének hozzáadásával állítjuk le. A fehérje/peptid sómentesítését a fordított fázisú folyadékkromatográfiával (HPLC) elválasztott fehérje/peptid frakció elkülönítésével végezzük el. Az elkülönített mintát a savas hidrolízis előtt vákuum-centrifugában száríthatjuk. A keletkezett *S*-karboxiamidometil-cisztein a savas hidrolízis folyamán *S*-karboximetil-ciszteinné fog alakulni.

10. MÓDSZER

A cisztein/cisztinből ditioldiglikolsav vagy ditioldipropionsav hatására vegyes diszulfid keletkezik. A ditioldiglikosav és a ditioldipropionsav reagens közt attól függően választunk, hogy mekkora az aminosav-analízis módszertől megkívánt felbontás.

Redukáló oldat. Ditioldiglikolsav (vagy ditioldipropionsav) 0,2 M nátrium-hidroxid-oldattal készített, 10 g/l töménységű oldata.

Vizsgálat. Hidrolíziscsőbe mért, kb. 20 µg vizsgálati mintához 5 µl redukáló oldatot és 10 µl izopropilalkoholt elegyítünk, majd vákuum-centrifugával a folyadék teljes mennyiségét eltávolítjuk a mintából. Ezután a mintát az 1. módszerrel hidrolizáljuk. E módszer előnye, hogy más aminosav-egységek származékképzésével, mint mellékreakcióval, nem kell számolni, továbbá, hogy a mintát nem kell sómentesíteni a hidrolízis előtt.

11. MÓDSZER

Az aszparagin és a glutamin aszparaginsavvá, ill. glutaminsavvá alakul a savas hidrolízis folyamán. A mintához aszparagin- és aszparaginsav-egységeket (jelölésük: *Asx*), illetve glutamin- és glutaminsav-egységeket adunk (jelölésük: *Glx*). A fehérjék/peptidek bisz(1,1-trifluoracetoxi)jódbenzollal (BTI) úgy reagálnak, hogy az aszparagin- és a glutamin-egységek savas hidrolízis útján diaminopropionsav-, ill. diaminovajsav-egységekké alakulnak. Ezen átalakulások lehetővé teszik, hogy az analitikus aszparaginsav- és glutaminsav-egységek jelenlétében is meghatározhassa a fehérje/peptid aszparagin- és glutamin-tartalmát.

Redukáló oldatok. Három oldatot készítünk: 10mM trifluoecetsav-oldat (A-oldat), 5 M guanidin-hidrokloridot és 10 mM trifluoecetsavat tartalmazó oldat (B-oldat) és BTI 36 mg/ml

töménységű, frissen készített, dimetilformamidos oldata, (C-oldat). Mindhárom oldatot megszűrjük.

Vizsgálat. Kb. 200 µg vizsgálati mintát tiszta hidrolíziscsőbe mérünk és 2 ml A- vagy B-oldatot, valamint 2 ml C-oldatot mérünk hozzá. A hidrolíziscsövet vákuumban leforrasztjuk, majd 4 órán át 60 °C-on melegítjük, sötét helyen. A mintát ezután a reagensfelesleg eltávolítására vízzel dializáljuk. A dializált mintát azonos térfogatú butil-acetáttal háromszor kirázzuk, majd liofilizáljuk. Ezután már elvégezhető a fehérje savas hidrolízise a fentebb leírt módszerek valamelyikével. Az ioncserés kromatográfián alapuló aminosav-analízis során az α,β-diaminopropionsav-egységek és az α,γ-diaminovajsav-egységek rendszerint nem válnak el a lizin-egységektől. Ezért, ha az aminosavak elválasztására ioncserét alkalmazunk, a származékképzés nélküli és a BTI-származékképzéssel kapcsolt savas hidrolízissel végzett aszparaginsav- és glutaminsav-tartalom meghatározás eredményeinek különbsége adja az aszparagin- és glutamin-tartalmat. A tartalmi meghatározás treoninra, metioninra, ciszteinre, tirozinra és hisztidinre kapott eredményei is változhatnak a BTI-származékképzés hatására; amennyiben az analitikust az is érdekli, hogy a fehérje/peptid ez utóbbi aminosav-egységekből mennyit tartalmaz, BTI nélküli hidrolízist is kell végeznie.

AZ AMINOSAV-ANALÍZIS MÓDSZEREI: ÁLTALÁNOS ELVEK

Sokféle aminosav-analízis eljárás létezik, és az eljárás kiválasztása sok esetben attól függ, hogy milyen érzékenységet kívánunk meg a tartalmi meghatározástól. Általában, a gyakorlatban alkalmazott aminosav-analízis eljárásoknak kb. fele a szabad aminosavak ioncserés kromatográfiás elválasztásán és ezt követő oszlop utáni származékképzésen alapul. (Származékképzésre pl. ninhidrint vagy *o*-ftálaldehidet használunk.) Az oszlop utáni származékképzési eljárások olyan minták esetében alkalmazhatók, amelyek kis mennyiségben tartalmaznak pufferanyagokat (pl. sókat, karbamidot) és az ilyen vizsgálatok általában 5 – 10 µg fehérjemintát igényelnek egy analízishez. A többi aminosav-analízis eljárás többnyire a szabad aminosavak oszlop előtti származékképzésén alapul (pl. fenil-izotiocianáttal, 6-aminokinoil-*N*-hidroxiszukcinimidil-karbamáttal vagy *o*-ftálaldehiddel, (dimetilamino)azobenzolszulfonil-kloriddal, 9-fluorenimetyl-klórformiáttal és 7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,1,3-diazollal); a származékokat ezután fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával választjuk el. Az oszlop előtti származékképzési eljárások igen érzékenyek, és általában 0,5–1,0 µg fehérjeminta elegendő egy analízishez, de tompítójellegű sók jelenléte zavarhatja a meghatározást. Az oszlop előtti származékképzési eljárások során egy adott aminosavból többféle származék is keletkezhet, és ez bonyolítja a kapott eredmények értelmezését. Az oszlop utáni származékképzési eljárásokat a meghatározás teljesítőképességének ingadozása általában kevésbé befolyásolja, mint az oszlop előtti származékképzési eljárásokat.

Mennyiségi aminosav-analízis céljaira az alábbiakban ismertetett módszerek használhatók. Az eljárásokhoz szükséges készülékek és reagensek kereskedelmi úton beszerezhetők. E módszereknek számos változata létezik, melyek az alkalmazott reagens készítmények, reakciókörülmények, kromatográfiás rendszerek, stb. tekintetében különböznek egymástól. A jellemző paraméterek függhetnek az adott esetben használt felszereléstől és eljárástól. Számos laboratóriumban többféle aminosav-analízis eljárást alkalmaznak, hogy mindegyik előnyeit kihasználhassák. E módszerek adatgyűjtő rendszer segítségével az analóg jeleket láthatóvá teszik és a mennyiségi kiértékeléshez a csúcsterületeket integrálják.

1. MÓDSZER – OSZLOP UTÁNI SZÁRMAZÉKKÉPZÉS NINHIDRINNEL

A mennyiségi aminosav-analízisre alkalmazott módszerek közül a legelterjedtebbek egyike az oszlop utáni ninhidrines származékképzéssel összekapcsolt ioncserés kromatográfia. Szabály,

hogy a litium alapú kationcserélő rendszert a bonyolultabb, fiziológiai minták vizsgálatához, míg a gyorsabb, nátrium alapú kationcserélő rendszert a fehérjehidrolizátumokból nyert, egyszerűbb – jellemzően 17 aminosavat tartalmazó – aminosav-elegyek vizsgálatához alkalmazzuk. Ioncserélő oszlopon az aminosavak elválasztását a pH és a kationerősség egyidejű változtatásával végezzük. Az elválasztás javítása érdekében hőmérséklet-grádiens is gyakran alkalmazunk.

Amikor az aminosav ninhidrinnel reagál, a reakciónak jellemző bíborvörös vagy sárga színe van. Az aminosavak – az iminosavak kivételével – bíborvörös színnel reagálnak és abszorpciós maximumuk 570 nm-en van. Az iminosavak, mint pl. a prolin, sárga színt adnak, melynek abszorpciós maximuma 440 nm-en van. A ninhidrin és az oszlopról eluálódott aminosavak közti reakciót mindkét hullámhosszon követjük és az így kapott kromatogramot használjuk fel az aminosav-összetétel meghatározására.

A legtöbb aminosav-származék kimutatási határa 10 pmol-nak, míg a proliné 50 pmol-nak bizonyult. A válasz a 20–500 pmol tartományban lineáris, és a korrelációs együtthatók meghaladják a 0,999-et. Ahhoz, hogy a fehérjék/peptidok összetételére helyes eredményeket kapjunk, a legmegfelelőbb, ha az ilyen aminosav-analízishez a hidrolízis előtti mintaméret 1 µg-nál nagyobb.

2. MÓDSZER – OSZLOP UTÁNI OPA SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az *o*-ftálaldehid (OPA) primer aminokkal, tiolok jelenlétében, erősen fluoreszkáló izoindol-származékokat képez. Ezt a reakciót az ioncserés kromatográfiával történő aminosav-analízisben oszlop utáni származékképzésre használjuk fel. Az elválasztás elve megegyezik az 1. módszerével.

Bár az OPA szekunder aminokkal (iminosavakkal, pl. prolinnal) nem képez fluoreszkáló vegyületeket, a nátrium-hipoklorittal vagy a klóramin-T-vel végzett oxidáció után a szekunder aminok is reakcióba lépnek az OPA-val. Az eljárás során a szabad aminosavak elválasztására erősen savas kationcserélő oszlopot alkalmazunk, majd ezt követően nátrium-hipoklorittal vagy klóramin-T-vel oszlop utáni oxidációt hajtunk végre és OPA-val, valamilyen tiolszármazék, pl. *N*-acetyl-L-cisztein vagy 2-merkaptóetanol jelenlétében oszlop utáni származékképzést végzünk. A nátrium-hipoklorit vagy a klóramin-T folyamatos bevitele a primer aminosavak származékképzését nem befolyásolja észrevehetően.

Az aminosavak ioncserélő oszlopon történő elválasztását a pH és a kationerősség változtatásával végezzük. Az eluált aminosavak oszlop utáni, OPA-val történő származékképzését követően a reagens fluorimetriás detektoron áramlik át. Az aminosav-OPA-származékok fluoreszcencia-intenzitásának követésére 348 nm-es gerjesztő hullámhosszat és 450 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmazunk.

Az aminosav-OPA-származékok többségének kimutatási határa néhányszor tíz pmol-nak bizonyult. A válasz a néhány pmol-tól a néhányszor tíz nanomol-ig terjedő tartományban lineáris. Ahhoz, hogy az összetételre helyes eredményeket kapjunk, ajánlatos a hidrolízis előtti fehérje-, ill. peptidmintából 500 ng-nál nagyobb mennyiséget bemérni.

3. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI PITC SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

A fenil-izotiocianát (PITC) aminosavakkal fenil-tiokarbamil (PTC) származékokat képez, amelyek 254 nm-en igen nagy érzékenységgel mutathatók ki. Ezért alkalmazzuk az aminosav-összetétel vizsgálatára az aminosavak PITC-vel végzett oszlop előtti származékképzését, amelyet ultraibolya detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztás követ.

Miután a reagenst vákuumban eltávolítottuk, az aminosav-származékokat szárazon és lefagyasztva, néhány hétig lényeges bomlás nélkül tárolhatjuk. Amennyiben az injektlásra szánt oldatot hidegen tároljuk, a kromatográfiás válaszban 3 nap elteltével még nem mutatkozik észrevehető csökkenés.

A PTC-aminosavak elválasztását oktadecilszililezett oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiával végezzük, melynek során az acetonitril-koncentrációt és a tompító ionerősségét változtatjuk. A PTC-aminosavak oszlopról történő elúcióját 254 nm-en követjük.

A PTC-aminosavak többségének kimutatási határa 1 pmol-nak bizonyult. Válasz-linearitás a 20–500 pmol tartományban nyerhető, és a korrelációs együtthatók meghaladják a 0,999-et. Ahhoz, hogy az összetételre helyes eredményeket kapjunk, ajánlatos a hidrolízis előtti fehérje-, ill. peptidmintából 500 ng-nál nagyobb mennyiséget bemérni.

4. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI AQC SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az aminosavak 6-aminokinoil-*N*-hidroxiszukcinimidil-karbamáttal (AQC) történő oszlop előtti származékképzése után fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztást alkalmazunk.

Az AQC aminosavakkal stabil, fluoreszkáló, aszimmetrikus karbamid-származékokat (AQC-aminosavak) képez, amelyek fordított fázisú folyadékkromatográfiával jól analizálhatók. Ezért alkalmazzuk az aminosav-összetétel vizsgálatára az aminosavak AQC-vel végzett oszlop előtti származékképzését, amelyet fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztás követ.

Az AQC-aminosavak elválasztását ODS-oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiával végezzük, melynek során az acetonitril-koncentrációt és a tompító ionerősségét változtatjuk. A származékok szelektív fluoreszcencia-detektálása 250 nm-es gerjesztő hullámhosszon és 395 nm-es emissziós hullámhosszon lehetővé teszi a reakcióelegy közvetlen injektlását, anélkül, hogy az egyetlen erősebben fluoreszkáló melléktermék (6-aminokinolin) zavarja. A reagensfelesleg 6-aminokinolin, *N*-hidroxiszukcinimid és szén-dioxid keletkezése közben gyorsan hidrolizál ($t_{1/2} < 15$ s), így 1 perc elteltével származékképződés már nem játszódik le.

Az AQC-aminosavak szobahőmérsékleten legalább 1 hétig lényegében változatlan csúcsterületekkel jelennek meg. Ezért, az AQC-aminosavak stabilitása bőven lehetővé teszi az éjszakai automatizált kromatográfiás analízist.

A kimutatási határ, a cisztein kivételével, valamennyi aminosav esetében a kb. 40 fmol és 320 fmol közti tartományba esik. A cisztein kimutatási határa kb. 800 fmol. Válasz-linearitás a 2,5–200 μ M tartományban nyerhető, 0,999-nél nagyobb korrelációs együtthatókkal. A fehérjehidrolizátumok ilyen származékainak analízisével 30 ng fehérjéből/peptidből is jó eredményeket nyerhetünk az összetételre vonatkozóan.

5. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI OPA SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az aminosavak oszlop előtti, *o*-ftálaldehiddel (OPA) történő származékképzése után fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztást alkalmazunk. Ez a módszer szekunder amin típusú aminosavak (pl. prolin) kimutatására nem alkalmas.

Az OPA, tiol-reagens jelenlétében, primer amino-csoportokkal erősen fluoreszkáló izoindol-származékokat képez. Tiolként 2-merkaptó-etanol vagy 3-merkaptó-propionsavat használhatunk. Maga az OPA nem fluoreszkál, ezért nem hoz létre zavaró csúcsokat. Ezenkívül, oldékonysága és stabilitása vizes oldatban, valamint a reakció gyors lejátszódása alkalmassá

teszi a módszert automatizált származékképzésre és analízisre, melynek során a mintát és a reagenst automata mintavevő elegyíti. Az OPA hátránya, hogy szekunder aminosavakkal nem reagál. Ezzel a módszerrel nem mutathatók ki szekunder amin jellegű aminosavak (pl. prolin). E hátrány ellensúlyozására ezt az eljárást össze lehet kapcsolni más módszerekkel (lásd 7. és 8. módszer).

Az aminosavak oszlop előtti OPA-val történő származékképzését fordított fázisú folyadékkromatográfia követi. Az aminosav-OPA-származékok instabilitása miatt a folyadékkromatográfias elválasztást és analízist a származékképzés után haladéktalanul el kell végezni. Az aminosav-származékok kimutatására a folyadékkromatográfhoz fluorimetriás detektor csatlakozik. Az aminosav-OPA-származékok fluoreszcencia-intenzitásának követésére 348 nm-es gerjesztő hullámhosszat és 450 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmazunk.

Noha a fluoreszcenciás módszer 50 fmol-os kimutatási határáról is beszámoltak, az analízis gyakorlati határa 1 pmol maradt.

6. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI DABS-CL SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az aminosavak oszlop előtti, (dimetilamino)azobenzolszulfonil-kloriddal (DABS-Cl) történő származékképzése után fordított fázisú folyadékkromatográfias elválasztást alkalmazunk; a detektálás itt látható fényel történik.

A DABS-Cl aminosavak megjelölésére szolgáló kromofór reagens. A DABS-Cl-dal megjelölt aminosavak (DABS-aminosavak) igen stabilak és 436 nm-en abszorpciós maximummal rendelkeznek.

A DABS-aminosavakat – valamennyi természetes aminosav DABS-Cl származékát – elválaszthatjuk fordított fázisú folyadékkromatográfiával, ODS oszlopon, acetonitrilből és vizes tompítóelegyből álló gradiens rendszert alkalmazva. Az oszlopról eluált, elválasztott DABS-aminosavakat 436 nm-en, a látható tartományban detektáljuk.

E módszerrel az iminosavakat, pl. a prolint is analizálhatjuk az aminosavakkal együtt, mégpedig hasonló érzékenységgel. Ha a fehérjét/peptidet előzetesen szulfonsavval – pl. merkaptoténszulfonsavval, *p*-toluolszulfonsavval vagy metánszulfonsavval – hidrolizáljuk (lásd a „Fehérjehidrolízis” pont 2. módszert), a DABS-Cl-származékképzési módszerrel egyidejűleg elvégezhetjük a triptofán-egységek mennyiségi meghatározását is. A többi savérzékeny aminosav-rész, pl. az aszparagin és a glutamin szintén analizálható, ha a fehérjét/peptidet BTI-vel előzetesen diaminopropionsavvá, illetve diaminobutánsavvá alakítjuk (lásd a 11. módszert a „Fehérjehidrolízis” cím alatt). Ha ezt a módszert alkalmazzuk, a norleucin, mint nem proteinogén aminosav, nem használható belső standardként, mert a primer aminosavak csúcaival zsúfolt kromatográfias tartományban eluálódna. Helyette nitrotirozint használunk belső standardként, mivel ez a „tisztá” tartományban eluálódik.

A DABS-aminosav kimutatási határa kb. 1 pmol. Egy-egy DABS-aminosavból 2–5 pmol mennyiségi meghatározását megbízhatóan elvégezhetjük, a dabzilezett fehérjehidrolizátumból pedig csak 10–30 ng szükséges egy analízishez.

7. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI FMOC-CL SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az aminosavak oszlop előtti, 9-fluorenilmetil-klórformiáttal (FMOC-Cl) történő származékképzése után fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfias elválasztást alkalmazunk.

Az FMOC-Cl mind primer, mind szekunder aminosavakkal intenzíven fluoreszkáló vegyületeket képez. A reakció enyhe körülmények között, vizes oldatban 30 másodpercen belül

teljes mértékben lezajlik. A származékok stabilak, kivéve a hisztidin-származékot, amely kissé bomlékony. Noha maga az FMOC-Cl fluoreshkál, a reagens feleslegét és a fluoreshkáló melléktermékeket el tudjuk távolítani anélkül, hogy az FMOC-aminosav-származékokban veszteség keletkezne.

Az FMOC-aminosavakat ODS oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfia segítségével választjuk el. Az elválasztást gradiens elúcióval végezzük, lineárisan módosítva a 10 térfogatrész acetonitrilt, 40 térfogatrész metanolt és 50 térfogatrész ecetsavas tompítóoldatot tartalmazó elegyet egy 50 térfogatrész acetonitrilt és 50 térfogatrész ecetsavas tompítóoldatot tartalmazó elegyre. Ily módon 20 aminosav-származék 20 percen belül elválasztható. Az oszlopról eluált származékok mindegyikét fluorimetriás detektorral követjük, 260 nm-es gerjesztő hullámhosszat és 313 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmazva.

A kimutatási határ az alacsony femtomól tartományban van. A linearitási tartomány az aminosavak többségét illetően 0,1 és 50 µM közé esik.

8. MÓDSZER – OSZLOP ELŐTTI NBD-F SZÁRMAZÉKKÉPZÉS

Az aminosavak oszlop előtti, 7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazollal (NBD-F) történő származékképzése után fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfias elválasztást alkalmazunk.

Az NBD-F mind primer, mind szekunder aminosavakkal intenzíven fluoreshkáló vegyületeket képez. Az NBD-F-származékok előállításához 5 percig tartó, 60 °C-os melegítést alkalmazunk.

Az NBD-aminosav-származékokat ODS-oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiaival választjuk el acetonitril és vizes tompítóoldat elegyével végzett gradiens elúcióval; ily módon 17 aminosav-származék különíthető el 35 percen belül. Belső standardként ε-aminokapronsavat használhatunk, mivel ez a „tisza” kromatográfias tartományban eluálódik. Az oszlopról eluált származékok mindegyikét fluorimetriás detektorral követjük, 480 nm-es gerjesztő hullámhosszat és 530 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmazva.

A módszer érzékenysége csaknem azonos az oszlop előtti OPA-származékképzési módszer érzékenységével (5. módszer), kivéve a prolint, amellyel szemben az OPA nem reakcióképes; éppen emiatt az NBD-F alkalmazása előnyös lehet az OPA-val szemben. A kimutatási határ – mindegyik aminosavra nézve – kb. 10 fmol. A profil-analízis kb. 1,5 mg fehérjehidrolizátumot tartalmazó, oszlop előtti reakcióelegyet elvégezhető.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE

Fehérje-, ill. peptidhidrolizátumok aminosavtartalmának meghatározásával kapcsolatban meg kell említeni, hogy savas hidrolízis során a triptofán és a cisztein elbomlik, a szerin és a treonin részlegesen bomlik el, míg az izoleucin- és a valin-egységek esetleg csak részben hasadnak le. A metionin a savas hidrolízis folyamán oxidálódhat, és néhány aminosav (pl. a glicin és a szerin) gyakran előfordulhat szennyezőként. Megfelelő vákuum (200 Hgmm-nél, ill. 26,7 Pa-nál kisebb nyomás) alkalmazása, vagy inert gáz (argon) bevezetése a reaktoredény légterébe a gőzfázisú hidrolízis folyamán, csökkentheti az oxidatív bomlás mértékét. Mindebből következik, hogy adott fehérje-, ill. peptidhidrolizátumban a ciszteinre, triptofánra, treoninra, izoleucinre, valinra, metioninra, glicinre és szerinre kapott kvantitatív eredmények változóak lehetnek és további vizsgálatot, megfontolást tehetnek szükségessé.

Aminosav-mólszázalék. Az aminosav-mólszázalék egy adott aminosav egységeinek száma 100 aminosav-egységre vonatkoztatva valamely fehérjében. Ezt a számot használjuk az aminosav-analízis eredményeinek értékeléséhez, ha a vizsgált fehérje molekulatömegét nem ismerjük. Ez

az adat fehérjék és peptidok azonosságának igazolására és egyéb célokra is használható. A kapott csúcsokat az előírások szerint végzett valamennyi meghatározás során kellő óvatossággal kell azonosítani és integrálni. A vizsgálati mintában jelenlévő minden egyes aminosav mólszázalékának kiszámítására a következő kifejezést használjuk:

$$100 r_U / r ,$$

ahol r_U a vizsgált aminosavra vonatkozó csúcsválasz nanomólban és r a vizsgálati mintában jelenlévő összes aminosavra vonatkozó csúcsválasz összege nanomólban. A vizsgált aminosavak mólszázalékának összehasonlítása az ismert fehérjékből nyert adatokkal, segíthet a fehérjeminta azonosításában, illetve azonosságának megerősítésében.

Ismeretlen fehérjeminták. Ismeretlen fehérjeminták fehérjekoncentrációjának meghatározására az alábbi eredményanalizáló eljárást alkalmazhatjuk. A visszanyert aminosavak mikrogrammban kifejezett, egyedi tömegének kiszámítására a következő kifejezést használjuk:

$$mM_r / 1000 ,$$

ahol m a vizsgált aminosav visszanyert mennyisége nanomólban és M_r ezen aminosav átlagos molekulatömege, korrigálva a peptidkötés létrejöttkor kilépő vízmolekula tömegével. A visszanyert aminosavak tömegének összege – a részben elbomlott és a teljesen elbomlott aminosavak megfelelő figyelembevételével – becslést ad a vizsgált fehérje össztömegére. Amennyiben az ismeretlen fehérje molekulatömege ismert (pl. SDS-PAGE analízis vagy tömegspektroszkópia révén), aminosav-összetétele megjósolható. Az aminosav-egységek számának kiszámítására a következő kifejezést használjuk:

$$m / (1000 M / M_r) ,$$

ahol m a vizsgált aminosav visszanyert mennyisége nanomólban, M a fehérje össztömege mikrogrammban és M_r az ismeretlen fehérje molekulatömege.

Ismert fehérjeminták. Ismert molekulatömegű és aminosav-összetételű fehérjeminta aminosav-összetételének és fehérjekoncentrációjának vizsgálatára az alábbi eredményanalizáló eljárást alkalmazhatjuk. Ha a vizsgált fehérje összetétele ismert, kihasználhatjuk azt a tényt, hogy néhány aminosav visszanyerése jó, miközben más aminosavak visszanyerése teljes vagy részleges lebomlás (pl. triptofán, cisztein, treonin, szerin, metionin), nem teljes lehasadás (pl. izoleucin és valin) vagy szabad aminosav (pl. glicin, szerin) szennyezés miatt nem kielégítő.

Mivel a fehérjét a visszanyert aminosavak jellemzik legjobban, ezeket választjuk a fehérjék mennyiségi jellemzésére. Jó visszanyerésű aminosavak főként a következők: aszpartát-aszparagin, glutamát-glutamin, alanin, leucin, fenilalanin, lizin és arginin. Ez a lista – egyéni analízis-módszerrel szerzett tapasztalatok alapján – módosítható. Ahhoz, hogy az összes jó visszanyerésű aminosavra alapozott fehérjetartalmat megkapjuk, minden egyes jól visszanyert aminosav nanomólban kifejezett mennyiségét osztjuk az adott aminosav-egységek várható számával. A fehérjetartalomra kapott eredményeket átlagoljuk. Az összes jó visszanyerésű aminosavra kapott fehérjetartalom középérték körüli eloszlásának egyenletesnek kell lennie. Azokat a – bizonyos aminosavak alapján kapott – fehérjetartalom-értékeket, amelyeknek a középértéktől való eltérése elfogadhatatlan, nem vesszük figyelembe. Általában az 5 %-nál nagyobb eltérést szokás elfogadhatatlannak tekinteni. A minta fehérjetartalmát úgy kapjuk, hogy a megmaradt értékekből az átlagot újraszámoljuk. Az analizált minta aminosav-összetételét megkapjuk, ha minden egyes aminosavtartalmat osztunk a kapott fehérjetartalom-átlaggal.

Az összetételre vonatkozó, százalékban kifejezett relatív hibát a következő képlet alapján számoljuk ki:

$$100 m/m_S,$$

ahol m a vizsgált aminosav egy aminosav-egységre vonatkoztatott, kísérletesen meghatározott mennyisége nanomólban, m_S pedig ugyanezen aminosav-egység ismert értéke. Az összetételre vonatkozó relatív hiba átlaga egyenlő az egyes aminosavak összetételre vonatkozó relatív hibái abszolút értékeinek átlagával – a triptofánt és a ciszteint általában kizárva e számításból. Az összetételre vonatkozó relatív hiba átlaga fontos tájékoztatást adhat az analízis menetének stabilitásáról. A fehérjemintára kapott aminosav-összetétel és az ismert aminosav-összetétel közti egyezés felhasználható a mintában lévő fehérje azonosításának és tisztaságának megerősítésére.