

D- ÉS L-AMINOSAVAK ELVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA IONCSERÉS
OSZLOPKROMATOGRÁFIÁVAL DIASZTEREOMER DIPEPTID FORMÁBAN
II. A 2-SZULFONSAV-ALANIL DIPEPTIDEK SZÉTVÁLASZTÁSA ÉS
MEGHATÁROZÁSA

CSAPÓ JÁNOS^{*}, PENKE BOTOND^{**}, CSAPÓNE KISS ZSUZSANNA^{*}

^{*} Agrártudományi Egyetem (Keszthely) Állattenyésztési Kar, Kaposvár

^{**} Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézet, Szeged

Érkezett: 1988. augusztus 3.

Előző közleményünkben (Csapó és msai, 1988) beszámoltunk azokról a kísérletekről melyeket a D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározására végeztünk diasztereomer alanil dipeptid formában. Az Ala-X (X = fehérjeépítő D- vagy L-aminosav) dipeptidek – amint az a szétválasztásukra végzett kísérletekből kiderült – még az aszparaginsav esetében is az Ala után jelennek meg a kromatogrammon, tehát az elválasztás legalább 1/2–3/4 órát vesz igénybe. Fentiek miatt további lehetőséget kerestünk arra, hogy a szintetizált diasztereomer dipeptidek lehetőleg rövid elúciós idővel rendelkezzenek. Ezért második acilező aminosavnak a cisztint (CySS) választottuk, abban bízva, hogy az aktív észteres kondenzációval létrehozott tripeptidet perhangyasavval oxidálva 2 olyan dipeptidet kapunk, melynek egyik aminosava, a ciszteinsav meggyorsítja a dipeptid elúcióját, így lényegesen rövidebb idő alatt lehet a diasztereomer dipeptideket egymástól elválasztani. A minták előkészítését a különböző munkaműveleteket az alanil-dipeptideknél teljesen azonos módon végeztük, ezért ezt megismételni nem kívánjuk. Jelen közleményünkben csak 2-szulfonsav-alanil diasztereomer dipeptidek elválasztását és meghatározását írjuk le.

1. Anyagok és módszerek

1.1. A felhasznált anyagok

Módszerünk leglényegesebb pontja itt is a diasztereomer dipeptidek szintézise és szétválasztása. A 2-szulfonsav-alanil dipeptidek szintézisére itt is az N-hidroxi-szukcinimid aktív észteres koncentrációt alkalmaztunk, az α -aminocsoport védelmére pedig ugyancsak a tercbutil-oxi-karbonil (BOC) csoportot használtuk fel.

Az elmondottak megvalósítására szintetizáltuk a bis-terc. butil-oxi-karbonil-L-cisztin-bis-N-hidroxi-szukcinimid-észtert (terc. BOC)₂-L-CySS-(ONSu)₂ a peptidkémiaiával foglalkozó kézikönyvekben leírt módon (Bajusz, 1980). Az aktív észterek szintézise után kristályos aminosavakból illetve az aminosavanalizátoron elválasztott egyes aminosavakból állítottuk elő a diasztereomer dipeptideket.

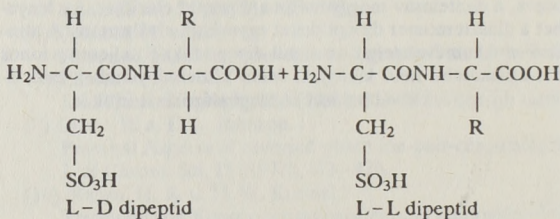
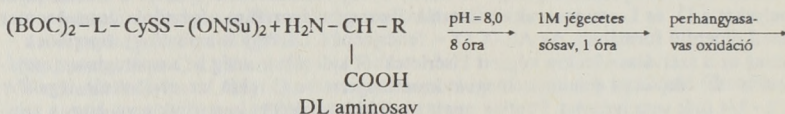
1.2. A fehérjealkotó aminosavak szétválasztása

A fehérjealkotó aminosavak szétválasztását az előző közleményünkben leírt módon végeztük el.

1.3. A diasztereomer dipeptidok szintézise

A szintetikus aminosavat vagy az aminosavanalizátorral elválasztott és liofilezéssel beszáritott maradékot vízben feloldottuk úgy, hogy az oldat koncentrációja 1-10% körül legyen minden aminosavra. Az oldat pH-ját egy-két nátrium-hidrogén-karbonát kristály hozzáadásával pH=8-ra állítottuk be, majd hozzáadtuk a CySS dioxán-víz 1:1 elegyében feloldott 2-2,5-szeres fölöslegben lévő védett aktív észtert. 8 órán át rázattuk a reakcióelegyet, majd liofilezővel beszáritottuk. Beszáritás után a BOC-védőcsoportot 1 mólos jégecetes sósavval 1 óra alatt lehasítottuk, majd cisztinil tripeptidet perhangyasavval Hirs (1956) módszere szerint oxidáltuk. A diszulfid hid oxidatív hasítása után két ciszteinsavtartalmú dipeptidet kaptunk, melyet perhangyasav eltávolítása és pH=2,2 citrát pufferben történő oldás után tápláltunk be az aminosavanalizátor ioncserélő oszlopára. A koncentrációkat hígítással úgy állítottuk be, hogy a keletkezett dipeptidok koncentrációja az 50-100 nanomól tartományba essen.

A reakcióegyenletek az alábbiak:



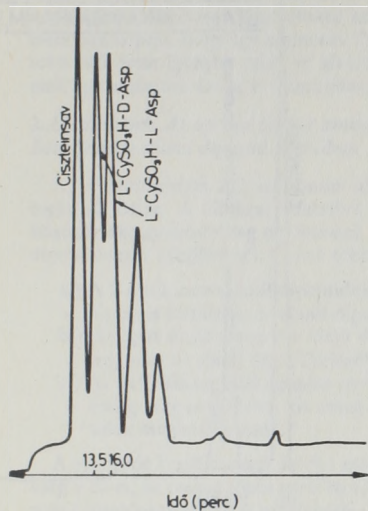
1.4. A 2-szulfonsav-alanil dipeptidok szétválasztása és meghatározása

Az 1. ábra a DL-Asp, a 2. ábra a DL-Glu, a 3. ábra a DL-Ala, a 4. ábra a DL-Val, az 5. ábra a DL-Ile, a 6. ábra pedig a $(\text{BOC})_2\text{-L-CySS-(ONSu)}_2$ aktív észternek az előzőekben közölt feldolgozás utáni kromatogramját mutatja. Az elválasztás körülményei az alábbiak:

Készülék:	LKB-Biochrom 4101
Az ioncserélő oszlop mérete:	500 x 6 mm
Az ioncserélő gyanta:	Chromex UA-8-as
Puffer áramlási sebesség:	80 cm ³ /óra
Ninhidrin áramlási sebesség:	40 cm ³ /óra
Oszlop hőmérséklet:	40 °C az egész elválasztás folyamán
Puffer A: pH=2,90; Na molaritás 0,2; az analízis végéig,	
Nátrium-hidroxid = 0,4 mólos; 15 perc	
Equilibrálás: puffer A (pH=2,9); 45 perc	

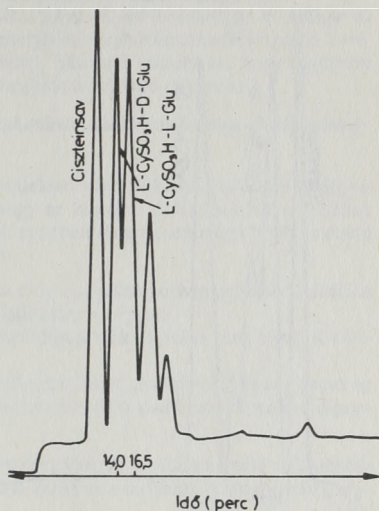
1. ábra:

D-ÉS L- ASP MEGHATÁROZÁS



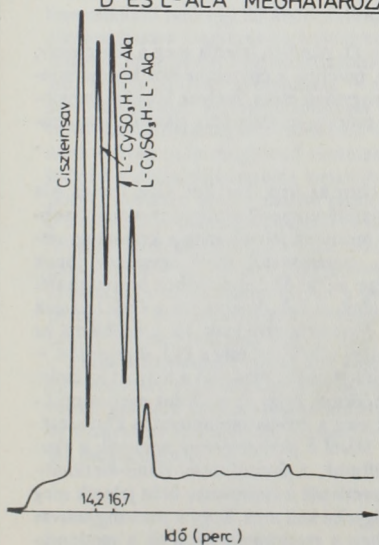
2. ábra:

D-ÉS L- GLU MEGHATÁROZÁS



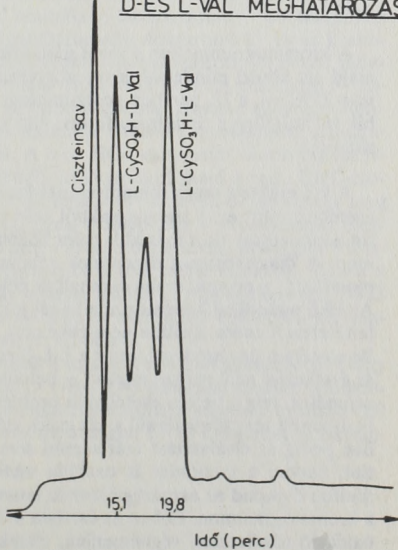
3. ábra:

D-ÉS L- ALA MEGHATÁROZÁS

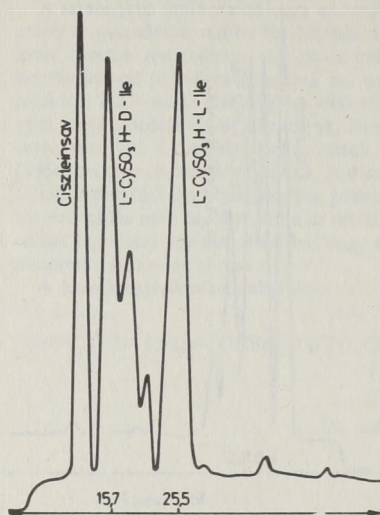


4. ábra:

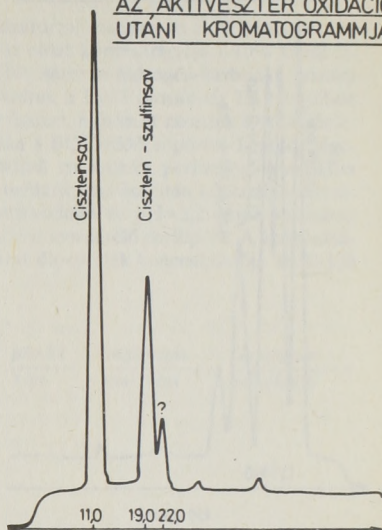
D-ÉS L- VAL MEGHATÁROZÁS



5. ábra:

D-ÉS L-ILE MEGHATÁROZÁS

6. ábra:

AZ AKTÍVÉSZTER OXIDÁCIÓ
UTÁNI KROMATOGRAMMJA

A kromatogramokon a front után közvetlenül a 11. percben jelenik meg a ciszteinsav, majd ezt követi mindegyik kromatogramnál a 19. percben a ciszteinsavhoz képest mintegy 25%-nyi, a 22. percben pedig mintegy 5%-nyi nagyságú csúcs, melyek közül a nagyobbik valószínűleg a ciszteinszulfinsav, míg a kisebbik csúcsot ez ideig nem sikerült beazonosítanunk.

A két említett csúcs semmilyen nehézséget nem okoz az Asp, Thr, Ser, Glu, Pro és Ala esetében, mert ezen aminosavakból keletkező két diasztereomer 2-szulfonsav-alanil dipeptid a ciszteinsav és a második csúcs közötti szabad területen jelenik meg a kromatogramon. A diasztereomer dipeptidok elválása mind a ciszteinsavtól, mind egymástól jónak mondható, a normál aminosavanalízis példájával élve a Thr-Ser elválásához hasonlítható. Az első metodikai nehézség a valinnál jelentkezik, ahol az L-L-dipeptid és a CySO₂H-nak feltételezett csúcs elválása nem tökéletes, részben egymásba olvadnak. Ez a probléma az Ile esetében úgy módosul, hogy a L-L-dipeptid elválása tökéletes, míg a D-L dipeptidbe – az értékelést nem zavaró módon – beleolvad a CySO₂H csúcs. Hasonló a helyzet az izoleucinnál is, míg a tirozin esetében a probléma úgy módosul, hogy az elsőként megjelenő L-D dipeptid már közvetlenül a két csúcs után jelenik meg a kromatogramon, a Phe esetében pedig az elválasztást már semmi sem zavarja, Mivel a perhangyasav nemcsak a ciszint, hanem a metionint is oxidálja metionin-szulfonná, a 2-szulfonsav-alanil-metionin-szulfon dipeptid az aszparaginsavhoz hasonlóan közvetlenül a ciszteinsav után jelenik meg a kromatogramon. Ebben az esetben különösen ügyelni kell arra, hogy a perhangyasavas oxidáció tökéletesen végbemenjen, ellenkező esetben a metionin-szulfon és a metionin-szulfoid dipeptidjeinek keverékét kapjuk, és akkor a meghatározás csaknem lehetetlen.

Mivel a 2-szulfonsav-alanil-dipeptidek retenciós idejében az egymás után következő aminosavak esetében csak minimális különbségek vannak, az alanil dipeptideknél leírtakhoz hasonló aminosav csoportokat nem lehet létrehozni. E módszernek az az előnye az előzőhöz képest, hogy egy aminosav D- és L-izomerjének meghatározása lényegesen kevesebb időt vesz igénybe mint az alanil-dipeptideknél, hátránya viszont az, hogy egyszerre csak egy aminosav D- és L-izomerjének meghatározását lehet vele elvégezni.

2. *Eredmények. Az optikai izomer aminosavak meghatározásának pontossága diasztereomer 2-szulfonsav-alanil dipeptid formában*

Az 1. táblázatban a 2 szulfonsav-alanil dipeptidekkel végzett kísérleteink eredményeit foglaltuk össze. A táblázat adataiból látható, hogy az elméleti érték és a mért értékek középértéke gyakorlatilag egybeesnek, a szórások azonban lényegesen nagyobbak az alanil dipeptideknél közöltekénél. Ennek több oka lehet:

- a) A 2-szulfonsav-alanil dipeptidek előállítása még egy plusz perhangyasavas oxidációs lépést is tartalmaz az alanil-dipeptidek előállításához képest.
- b) Az igen rövid retenciós idejű diasztereomer dipeptidek elválása sem olyan tökéletes, mint az alanil dipeptideknél.
- c) Az aktív észter feldolgozása során keletkező ciszteinsav, cisztein-szulfonsav illetve az eddig még ismeretlen kis csúcs esetenként zavarhatják a szulfonsav tartalmú dipeptidek meghatározását.

A variációs koefficiensek értéke csak 3 esetben (és akkor is csak kismértékben) haladja meg a 10-et, az összes többi esetben ez alatt marad, tehát ez a módszer is megbízható, reprodukálhatósága ennek is megfelelő.

3. *Következtetések*

Amint arról az előző közleményünkben beszámoltunk, laboratóriumunk – és a hazánkban működő mintegy 30 aminosavanalizátorral rendelkező laboratórium – adottságaihoz alkalmazkodva ioncserés oszlopkromatográfiás meghatározást dolgoztunk ki D- és L-aminosavak mennyiségi meghatározására. Az alanil dipeptidekre kidolgozott, jól bevált módszer után a módszer gyorsítására – a diasztereomer dipeptidek korábbi elúciójára – célszerűnek látszott egy savas aminosav tartalmú dipeptid szintézise. Ismerve az amino-, karboxil- és hidroxilcsoport védésének és későbbi szabadbá tételek nehézségeit, választásunk a front után megjelenő ciszteinsavra esett. A terc. BOC-csoporttal védett cisztin N-hidroxi-szukcinimid-észterét kapcsoltuk a mérendő aminosavhoz, majd a terc. BOC-csoport eltávolítása után a cisztint perhangyasavval ciszteinsavvá oxidáltuk és így kaptuk meg a 2-szulfonsav-alanil diasztereomer dipeptideket. Ezek a dipeptidek a várakozásnak megfelelően közvetlenül a ciszteinsav után jelentek meg a kromatogrammon, és a legtöbb vizsgált aminosav esetében a ciszteinsavtól is, és egymástól is jó elválást mutattak. Ennek a módszernek az előzőhöz képest a gyorsaság az előnye, hiszen itt egy analízis alig 20-25 percig tart, hátránya viszont az, hogy munkaigényesebb és a szórások különösen kis koncentrációk esetében majdnem kétszer nagyobbak (1. táblázat).

Fenti hiányosságok ellenére a módszer alkalmas a legalább 1%-ban jelenlévő D- (vagy L-) aminosav kimutatására a 99%-ban szereplő L- (vagy D-) aminosav mellett. Módszereinket ajánljuk mindazon laboratóriumoknak, melyek rendelkeznek aminosavanalizátorral és szintetikus aminosavak, peptidok vagy természetes anyagok D- és L-aminosavait kívánják meghatározni.

*

Különböző keverékek D- és L-aminosav-tartalmának meghatározása 2-szulfonsav-alanil diasztereomer dipeptid formában

A vizsgált anyag	Elméleti érték, %		Mért érték, %		A mérések száma	Szórás		Variációs koefficiens	
	D	L	D	L		D	L	D	L
Glutaminsav	50	50	51,7	48,2	5	3,02	2,54	5,84	5,27
	25	75	25,3	75,1	5	1,94	3,22	7,67	4,29
	5	95	4,8	94,9	5	0,51	4,85	10,63	5,11
	1	99	0,99	99,2	5	0,092	4,99	9,29	5,03
Alanin	50	50	49,9	51,0	5	2,98	2,63	5,97	5,16
	25	75	24,6	74,9	5	2,00	3,11	8,13	4,15
	5	95	5,1	95,2	5	0,54	4,62	10,59	4,85
	1	99	1,02	98,4	5	0,085	5,03	8,33	5,11
Valin	50	50	50,3	48,9	5	2,79	2,71	5,55	5,54
	25	75	24,7	75,3	5	2,11	3,33	8,54	4,42
	5	95	4,89	95,2	5	0,48	4,71	9,82	4,95
	1	99	1,11	98,7	5	0,091	5,11	8,20	5,18
Izoleucin	50	50	48,7	49,9	5	2,94	2,48	6,04	4,97
	25	75	25,3	74,8	5	1,85	3,01	7,31	4,02
	5	95	5,11	95,2	5	0,47	4,90	9,20	5,15
	1	99	0,97	98,8	5	0,101	4,97	10,41	5,03

A szerzők hálás köszönetet mondanak Ferenczi Richárdnak, a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézete munkatársának a védett aktív észterek előállításában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozunk az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság Fehérjeprogram Irodájának az anyagi támogatásért.

Irodalom

Bajusz S. (1980): Peptidszintézis. In: Csákvári B. szerk.: A kémia újabb eredményei. 47. Akadémiai Kiadó, Budapest, 230.

Csapó J. – Penke B. – Csapóné Kiss Zs. (1988): D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában. I. Az alanil dipeptidek szétválasztása és meghatározása.

Élelmiszervizsgálati Közlemények

Hirs, C. H. W. (1956): The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J. Biol. Chem.*, 219. 611-621.

D- ÉS L-AMINOSAVAK ELVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA IONCSERÉS OSZLOPKROMATOGRÁFIÁVAL DIASZTEREOMER DIPEPTID FORMÁBAN

II. A 2-SZULFONSAV-ALANIL DIPEPTIDEK SZÉTVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

Csapó J., Penke B. és Csapóné Kiss Zs.

A liofilezést követően az egyes aminosavakból a t.-(BOC)₂-L-CySS-(ONSu)₂ aktív észterrel – egy perhangyasavas oxidációt közbeiktatva – 2-szulfonsav-alanil dipeptideket szintetizáltak. A diasztereomer dipeptidek közvetlenül a ciszteinsav után jelennek meg a kromatogrammon, elválásuk egymástól és az aktív észter feleslegéből keletkezett ciszteinsavtól jó. A meghatározás pontossága kielégítő, a variációs koefficiens értéke 5-10% között alakul.

SEPARATION AND DETERMINATION OF D - AND L - AMINO ACIDS BY IONE EXCHANGE CHROMATOGRAPHY IN FORM OF DIASTEREOMER DIPEPTIDE

II. SEPARATION AND DETERMINATION OF 2 - SULPHONIC ACID - ALANILE DIPEPTIDES.

Csapó, J., Penke, B., and Csapó-Kiss, Zs.

The authors synthesized 2 - sulphonic acid - alanile dipeptides from the individual amino acids by means of $\alpha_T - (\text{BOC})_2 - \text{L} - \text{CySS} - (\text{ONSn})_2$ active ester. The diastereomer dipeptides appear directly after cysteine acid on the chromatogram. Their separation from each other and from cysteine acid are good. The accuracy of the method is proper. The coefficient of variation is 5-10%.

ПРИМЕНЕНИЕ ИОН-СЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ В АНАЛИТИКЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ II. ПРИМЕНЕНИЕ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ТЕХНИКИ

Х. Нгуен, Э. Шишка, Н. Аданинэ Кишбочкай, П. Молнар

С целью упрощения и ускорения проведения модифицированного Гран-метода, авторы разработали программу для вычислительной машины типа Commodore-64. Обработка данных с помощью вычислительной машины способствовала тому, что воспроизводимость и точность результатов измерений значительно превысила обычный метод.

TRENNUNG UND BESTIMMUNG VON D- UND L-AMINOSÄUREN MIT DER IONENAUSTAUSCH-SÄULENCHROMATOGRAPHIE IN FORM VON DIASTEREOMERDIPEPTID

II. TRENNUNG UND BESTIMMUNG VON 2-SULPHONSÄUREALANILDPEPTIDEN

Csapó, J. und Mitarb.

Verfasser haben nach der Liofilisation von den einzelnen Aminoäuren mit dem $(\text{BOC})_2\text{-L-CySS-(ONSn)}_2$ aktiven Ester unter Einschaltung einer Oxidation mit der Perameisensäure synthetisiert. Die Diastereomer-Dipeptide erscheinen auf dem Chromatogram unmittelbar nach der Cysteinsäure, ihre Trennung voneinander und von der aus dem Überschuss des aktiven Ester entstehenden Cysteinsäure kann als gut bezeichnet werden. Die Genauigkeit der Bestimmung ist zufriedenstellend, der Variationskoeffizient beträgt 5 bis 10%.

Al Himdani A. és munkatársai cikkének ábrái helyesen:

- 160. oldal 1., 2. ábra helyett a 144. oldal 1. ábra
- 161. oldal 3., 4. ábra helyett a 145. oldal 2., 2.a., 3. ábra
- 162. oldal 5., 6. ábra helyett a 146. oldal 4., 5., 6. ábra
- 163. oldal 7., 8. ábra helyett a 148. oldal 7. ábra.