

Az aminosav-analízis hibaforrásainak vizsgálata

I. Az analízisfolyamat hibái

ZSIGMOND ATTILA – BÉKÉS FERENC – UNGÁR ERIKA
Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1981. április 3.

Bevezetés

Az első automatikus aminosav-analizátor megépítése óta eltelt több mint két évtized során a folyadékkromatográfia általános fejlődése, valamint az aminosavak ioncserélő kromatográfiai elválasztásának optimalizálása érdekében végzett intenzív kutatómunka eredményeképpen olyan nagy hatékonyságú módszereket dolgoztak ki, amelyek segítségével az eredeti elválasztási időt és a kimutatható aminosav mennyiségeket nagyságrendekkel sikerült csökkenteni.

E jelentős fejlődés ellenére az aminosav-analízis pontosságát nem sikerült jelentősen növelni és a nemzetközi összehasonlító vizsgálatok tanúsága szerint az eljárás tényleges pontossága a gyakorlatban sohasem éri el minden aminosavra a gyártó művek által megadott 2–5% közötti értékeket. Mivel a nagy értéket képviselő aminosav-analizátorok hatékony működése népgazdasági szempontból is fontos, indokoltnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk, melyek azok a tényezők, amelyek az analízisfolyamat hibáit, illetve pontatlanságait okozzák. Azokkal a hibákkal kívánunk elsősorban foglalkozni, amelyek az értékelést megnehezítik, vagy bizonytalanná teszik, vizsgáljuk azokat a hatásokat, amelyek a felbontó képesség romlását, a csúcsalak torzulását okozzák, az analízisfolyamat reprodukálhatóságát, illetve a jel – zaj viszonyt rontják. Nem foglalkozunk gépi – mechanikai, vagy elektronikus jellegű – hibákkal, amelyek az aminosav-analizátor normális működését lehetetlenné teszik, valamint a kromatográfiai körülmények helytelen megválasztásából eredő hibákkal (feloldás hiánya, csúcsok egybeesése stb.), inkább azokra a hibalehetőségekre kívánjuk felhívni a figyelmet, amelyek jól működő készülék és helyesen megválasztott kromatográfiai körülmények mellett is problémákat okozhatnak.

Az aminosav-analízisnél fellépő hibákat többféle szempontból csoportosítjuk. Jellegük szerint vannak objektív és szubjektív hibák, eredetük szerint gépi (mechanikus, hidraulikus, elektromos vagy elektronikus), kémiai eredetű, valamint helytelen kezeléssel fakadó hibákat különböztethetünk meg.

Az elemzés időbeli lefolyása szerint a minta-előkészítésből fakadó, a kromatográfiai elemzésből – és a kromatogram értékeléséből eredő hibákat különböztethetünk meg.

A KISZ KB Értelmisségi Fiatalok Tanácsa, a MTA Tudományszervezési Csoportja és a KÉKI KISZ Szervezete rendezésében 1980. november 17-én elhangzott előadás átdolgozott és kibővített változata.

Jelen cikkünkben nem foglalkozunk a minta-előkészítés által okozott hibákkal, tehát azzal a problémakörrel, hogy az analízisre kerülő minta aminosav összetétele mennyiben felel meg az eredeti mintáénak, milyen veszteségek lépnek fel az előkészítő műveletek során. A tulajdonképpeni analízisfolyamattal kapcsolatos hibák, illetve hibaforrások ismertetésénél az aminosav-analizátor szerkezeti felépítését vesszük alapul. (Lásd: 1. ábra.) Az egyes hibajelenségeket saját gyakorlatunkból vett kromatogramrészletekkel illusztráljuk.

Az elválasztó rész hibái

Az elválasztó rész hibáinak ismertetésekor a mintabemérés, az ioncserélő gyanta oszlop, az elválasztáshoz használt pufferek, illetve a minta összetétele, valamint az áramlást megvalósító szivattyúk tökéletlen működése által okozott problémákat mutatjuk be.

A mintabemérés hibája

A vizsgálandó aminosavminta bemérése kézi úton, félautomatikus vagy automatikus mintabemérők segítségével történhet.

A kézi mintabemérést olcsóbb készülékeken még ma is elterjedten használják: a kromatográfias oszlop tetejét leszerelve a mintát kalibrált pipetta vagy precíziós fecskendő segítségével a gyantaoszlop tetejére rétegezik, majd ún. bemosó pufferral (\sim pH 2) legtöbbször nitrogén nyomással, többszöri utánöblítéssel megkötik az ioncserélő gyantán. Az eljárás bonyolultsága miatt viszonylag sok hiba forrása lehet, begyakorlott kezelő személyzetet igényel.

Igen elterjedtek a kézi mintabemérő csapok is. Működésük lényege az, hogy valamilyen reprodukálható kalibrált térfogatú üvegbe, vagy kapillárisba bevitt folyadék mennyiséget manuális beavatkozással juttatunk a folyadékútba. Sokféle változatban kaphatók.

A fél- és teljesen automata mintabemérők elsősorban kényelmi megoldásokban különböznek egymástól. A minták tárolására két, elvileg különböző módszert dolgoztak ki.

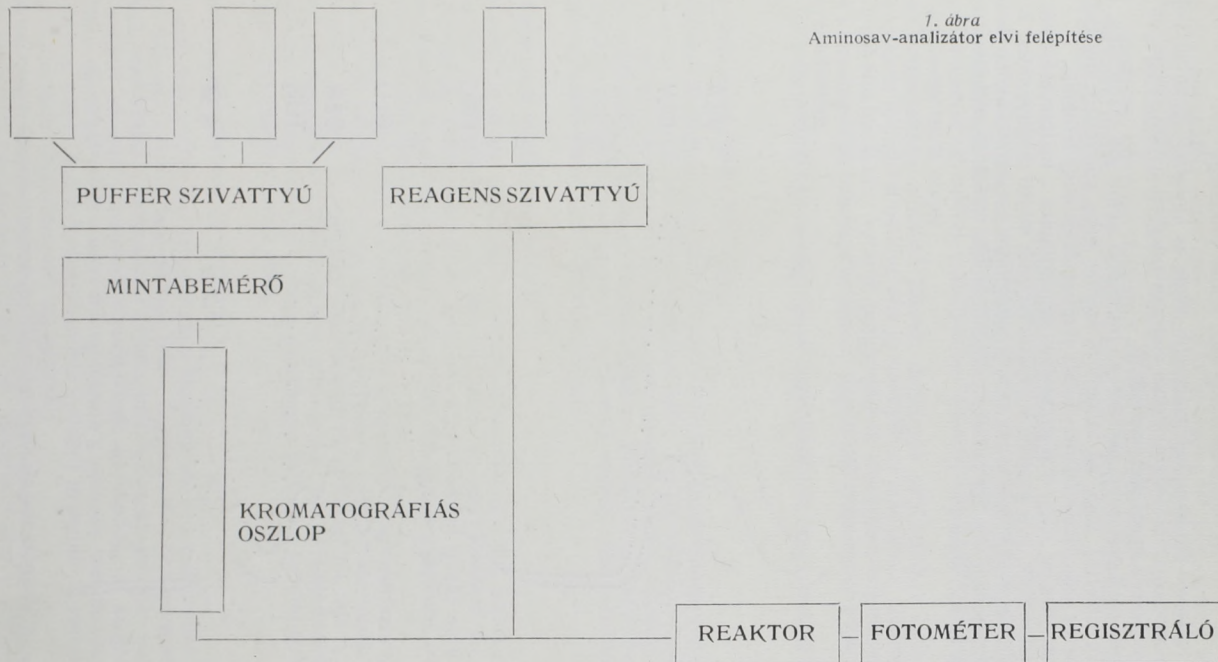
A folyadék alakban történő tárolás során a mintákat általában üveg, vagy műanyag kapillárisokban, hűtve tárolják a beadagolásig. A minta térfogata bemérési rendellenességek vagy csepegések miatt változhat, nem kellő átszivtatás esetén a minta felhigulhat. További problémát okoz a tárolás alatti bomlás, ami még hűtés mellett is jelentős lehet.

Az ioncserélő gyantaoszlopon történő mintatárolás elve az, hogy a mintát az ioncserélő oszlopon megkötve (rendszerint hűtve) tárolják az analízis megkezdéséig. Az ioncserélőn kötött aminosavak stabilitása általában jobb, mint a folyadék állapotban. Az eljárás további előnye az, hogy a minták bizonyos mértékű előtisztítását is lehetővé teszi, azok a szennyező komponensek ugyanis, amelyek az elválasztó oszlopon irreverzibilisen megkötődve annak eltömődését, illetve elválasztóképességének romlását okozzák, már a mintatároló ioncserélőn megkötődnek.

Az aminosav-analízisben rendkívül szerencsésnek mondható az a körülmény, hogy a minta savanyú kémhatásának hatására a benne található aminosavak az ioncserélő gyantaoszlop tetején, kis térfogatban megkötődnek, emiatt ugyanis nem lép fel a mintabemérők konstrukciójában sok bonyodalmat okozó zónaszélesedés. (Jellemző példa erre, hogy a különböző pufferekkel elsőnek eluálódó aminosavakat – pl. ciszteinsav, valin, hisztidin – tartalmazó eluátumok összterfogata a mintáénál kisebb is lehet.)

5* PUFFEREK

REAGENS(EK)



1. ábra
Aminosav-analizátor elvi felépítése

5 ELVÁLASZTÓ RÉSZ

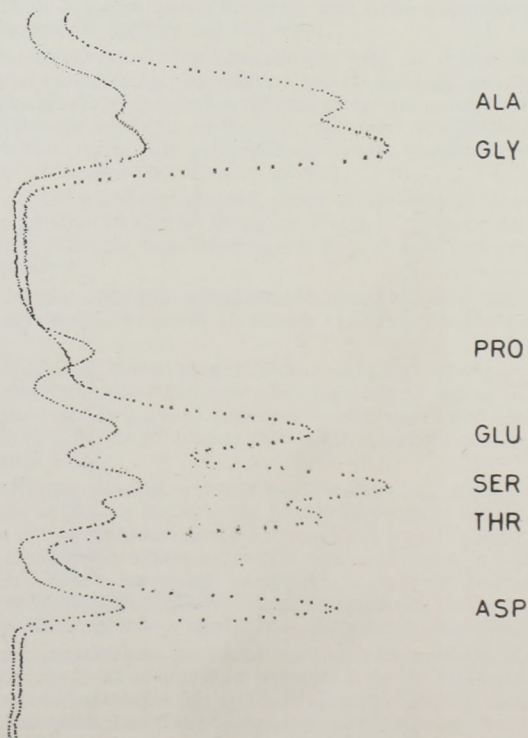
DETEKTÁLÓ RÉSZ

Az ioncserélő oszlop által okozott problémák

Az elválasztó rendszer leglényegesebb eleme az ioncserélő gyantaoszlop. Töltésként manapság szinte kizárólagosan aminosav-analízis céljára kifejlesztett szférikus kationcserélő gyantákat használnak.

Az ioncserélő oszlop hibaforrásként leginkább akkor jön számításba, ha töltése rosszul sikerült, vagy ha különböző szerves vagy szervetlen anyagok megkötése, illetve mikrobiális fertőzés miatt elválasztóképessége leromlik.

Annak ellenére, hogy a penészesedés meggátlására a konzerválószeres széles skáláját javasolták, elég gyakori a gombás fertőzés miatti szennyeződés. Emellett az oszlopon megkötődő humin anyagok és nehézfémek hatására az oszlop elválasztóképessége, a jel-zaj viszony romlik, a csúcsok alakja torzul. Ilyen kromatogramot mutatunk be a 2. ábrán.



2. ábra

Csökent elválasztóképességű oszlopon végzett aminosav-elválasztás kromatogramja

Az elszennyeződött ioncserélő gyantát az oszlopból kinyomatva, különböző kezelésekkel regenerálhatjuk. A szerves szennyeződésekét lúgos főzessel vagy ásványi savas kezeléssel távolítják el, a nehézfémek megkötéséhez alkalmas komplexképzőt adagolnak. Lényeges a gyanta elaprózódásából eredő finom frakció eltávolítása is, mivel már kis mennyisége is az oszlop hidraulikus ellenállásának jelentős növekedését eredményezheti.

A folyadékszállítás hibái

A folyadékszállítást végző elemek minden oszlopkromatográfiai módszernél kulcsfontosságúak, hibátlan működésük az, eluáló pufferek és a detektáláshoz szükséges reagensek egyenletes, szabályozható áramoltatása az aminosav-analizátor funkcióképességének is alapja.

Legáltalánosabban állítható löketű, dugattyús szivattyúkat használnak e célra, a modern folyadékkromatográfia gyakorlatában már bevált, különböző szabályozókkal elektronikusan vezérelt pumpatípusok elterjedése e területen is várható. A kromatográfiai felhasználás szempontjából döntő szempont a folyadékszállítás egyenletessége.

A folyadékszállításban megfigyelhető instabilitásokat négy alaptípusba sorolhatjuk:

a) Nagyfrekvenciás zajok (flow noise)

Jellemzőjük, hogy az áramlásban beálló változások periódusideje kicsi, a detektálандó csúcs szélességéhez képest elhanyagolható. Tipikus példa az ilyen zajra a dugattyús szivattyúk pulzálása által okozott nyomás-, illetve áramlási sebesség változás. A retenciós időre, illetve a csúcs területre gyakorolt hatásuk általában elhanyagolható, a detektálásnál azonban az alapzajt növelik. Kiküszöbölésük csak költséges csillapító tagok beépítésével lehetséges.

b) Kisfrekvenciás zajok (flow wander)

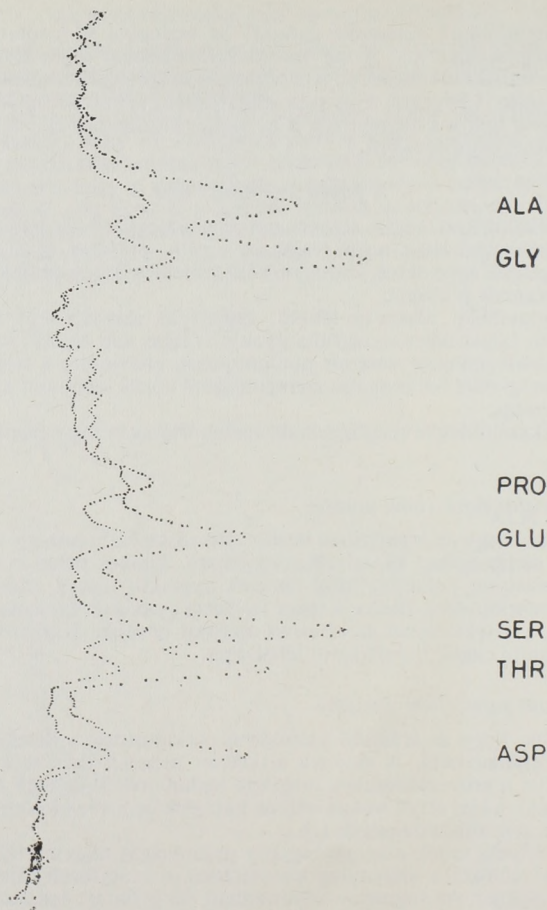
Jellemzőjük, hogy az áramlási változások periódusideje a detektálандó csúcs szélességével összemérhető. A zaj oka általában nehezen deríthető fel, többféle hatás okozhatja: a csővezetékben megbújó légbuborékok, lebegő apró szennyeződések, amelyek a szivattyú volumetrikus hatásfokának ingadozását eredményezik, enyhe, instabil tömítetlenségek stb.

A kisfrekvenciás zajok a kromatográfia pontosságát nagymértékben rontják. A retenciós idő változása viszonylag kis mértékű, a csúcsterület hibája azonban katasztrófális is lehet. Az aminosav-analitikában ezt a hatást fokozza az, hogy az áramlási zaj hatására a reaktorban való tartózkodási idő is megváltozik, emiatt nagymértékű az alapvonal-ingadozás is. Szélsőséges esetben a kromatogram egyáltalán nem értékelhető (Lásd 3. ábra).

c) Lassú áramlásváltozások (flow drift)

A lassú, folyamatos áramlásváltozás a retenciós idő és a csúcsterület megváltozása miatt igen jelentős hiba forrása lehet. Leggyakoribb oka a különböző hőmérsékleti instabilitások (környezeti hőmérséklet változása, pumpán belüli melegedés) mellett az oszlop áramlási ellenállásának növekedése. A megnövekedett hidraulikus ellenállás miatt a nagyobb nyomáson a pumpák volumetrikus hatásfoka csökken, kisebb lesz a folyadékszállítás (kivételt képeznek az elektronikusan szabályozott állandó folyadékszállítású pumpák).

Az aminosav-analízis gyakorlatában azért különös jelentőségű ez a zajtípus, mert az ioncserélő gyantaoszlop töltete nem tekinthető merev gömbökből álló



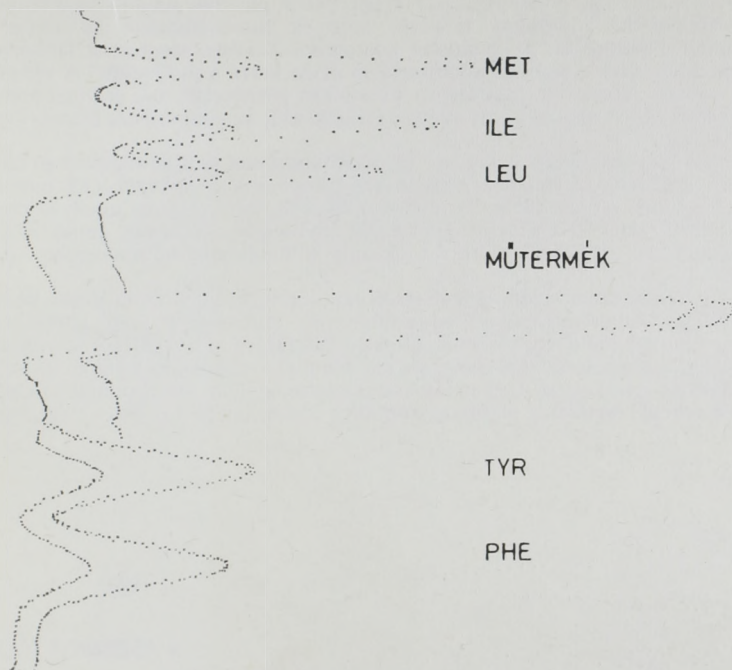
3. ábra
Kisfrekvenciás zajok hatására torzult kromatogram

halmaznak (ún. kemény gél típusú), az oszlopra ható nyomás következtében – típustól függő mértékben – lassan összenyomódik, áramlási ellenállása folyamatosan nő.

Mindezen változások megelőzésének első lépése az áramlási sebességek minél gyakoribb ellenőrzése. A kromatografálást még akkor is célszerű hosszabb ideje stabilizálódott rendszerben kezdeni, ha ez látszólag idő- és anyagvesztéseget okoz.

d) Időszakos folyadékszállítás kimaradás

A folyadékszállítás időszakos kimaradását leggyakrabban a szivattyúkba pufferváltáskor beszívódó levegő okozza. A kromatografálás ilyenkor a legtöbb



4. ábra
Puffer kimaradás hatására keletkezett műtermék „csúcs”

esetben megszakad, gyakran előfordul azonban olyan eset is, ha a buborék kicsi, hogy az áramlás helyreáll. Ilyenkor a kromatogramon érdekes, csúcsszerű műterméket találunk (lásd 4. ábra). A puffer kimaradásakor ugyanis csak a ninhidrin áramlik a reaktorba és a fotométerbe, a lassabb áramlás miatt hosszabb a tartózkodási idő, a reagens színe sötétedik. Hasonló okokból a reagens szállításának kimaradása esetén negatív csúcs jelentkezik. A műtermék csúcsok a manuális értékelésnél viszonylag könnyen kiszűrhetők, zavarokat csak az automatizált adatfeldolgozásnál okoznak. A folyadékszállítás kimaradás ugyanakkor a kromatografálás további részében is zavarokat okozhat, az előre beállított pufferváltási időpontok eltölődése miatt.

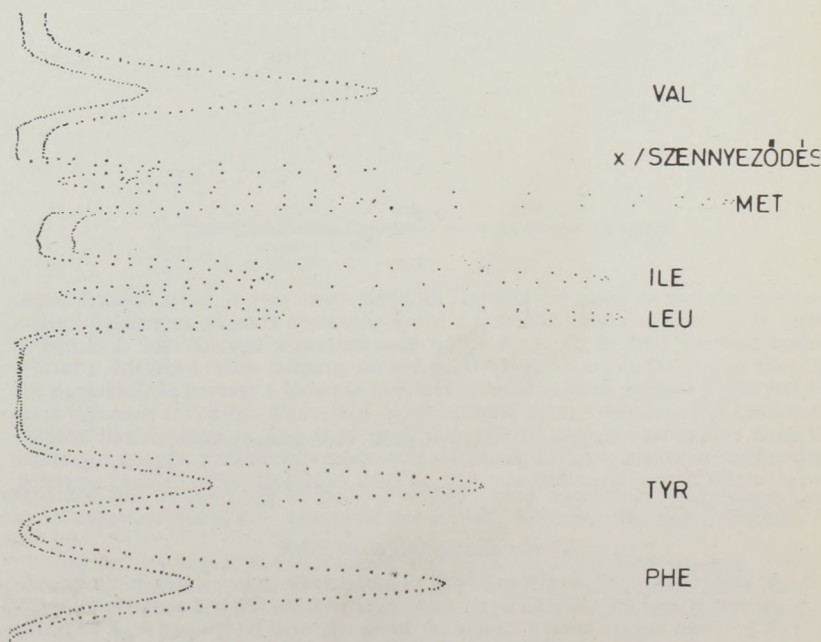
Puffer összetételből eredő hibák

Az elválasztáshoz használt pufferek pH értékének és ionerősségének alapvető szerepe van az aminosavak elúciójában. Az optimális összetételű pufferbe is kerülhetnek azonban zavaró hatású szennyező komponensek. Különösen azok az anyagok jelentenek problémát, amelyek az oszlopról eluálódva ninhidrinnel színes terméket képeznek és a koncentrációtól függően alapvonal ingadozásként vagy műtermék csúcsként jelentkeznek. Ezek az anyagok nem szükségszerűen aminocsoportot tartalmazó vegyületek, a detektálás körülményei miatt szénhidrátok, fenolos ve-

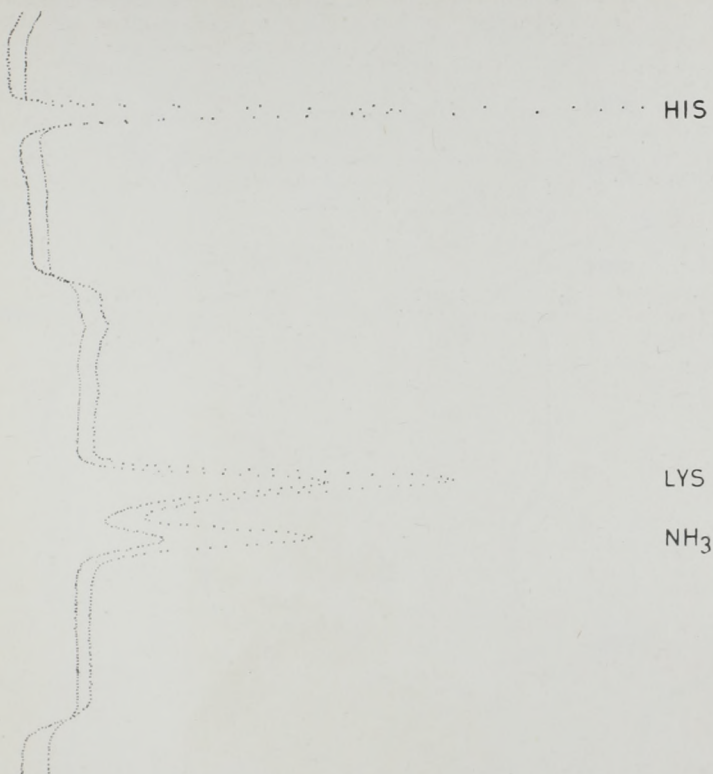
gyületek is adhatnak pozitív reakciót. Magas pH-jú pufferek alkalmazásakor olyan ninhidrin-pozitív anyagokat találtak, amelyek bizonyíthatóan az ioncserélő gyantából oldódtak ki. A szennyező komponensek zöme azonban a felhasznált reagensekből, illetve emberi kontamináció útján kerül a pufferekbe. A szennyezések zavaró hatása mikroanalízisnél fokozottan jelentkezik, sok esetben ezek és nem a készülékek műszaki paraméterei szabják meg az aminosavak kimutathatósági határát.

Saját gyakorlatunkban néhány tétel citromsavban és thio-diglikolban találtunk zavaró szennyeződések. A szennyező komponens az első (pH 3,25) pufferrel nem eluálódott, a második pufferre (pH 4,25) váltáskor azonban uszályos csúcsként jelentkezett. Retenciós idejénél fogva egybeesett a valinnal, annak értékét megnövelte és alapvonal változást okozott a methionin környezetében (lásd 5. ábra).

A pufferek szennyezettségéből eredő problémák közül a mindennapi kromatográfiás gyakorlat számára legfontosabb az ún. ammónia – plátó jelensége. A savanyú pufferekbe a reagensekből, illetve a laboratórium levegőjéből (dohányzás, nyílt láng, ammóniás oldatok) bekerülő ammónia az ioncserélő gyantán megkötődik és a bázikus aminosavak tartományában kisebb-nagyobb váll formájában eluálódik. Szerencsés esetben a plátó szimmetrikus alakú, teteje vízszintes, így a rajta



5. ábra
Ismeretlen szennyező komponens eluációja

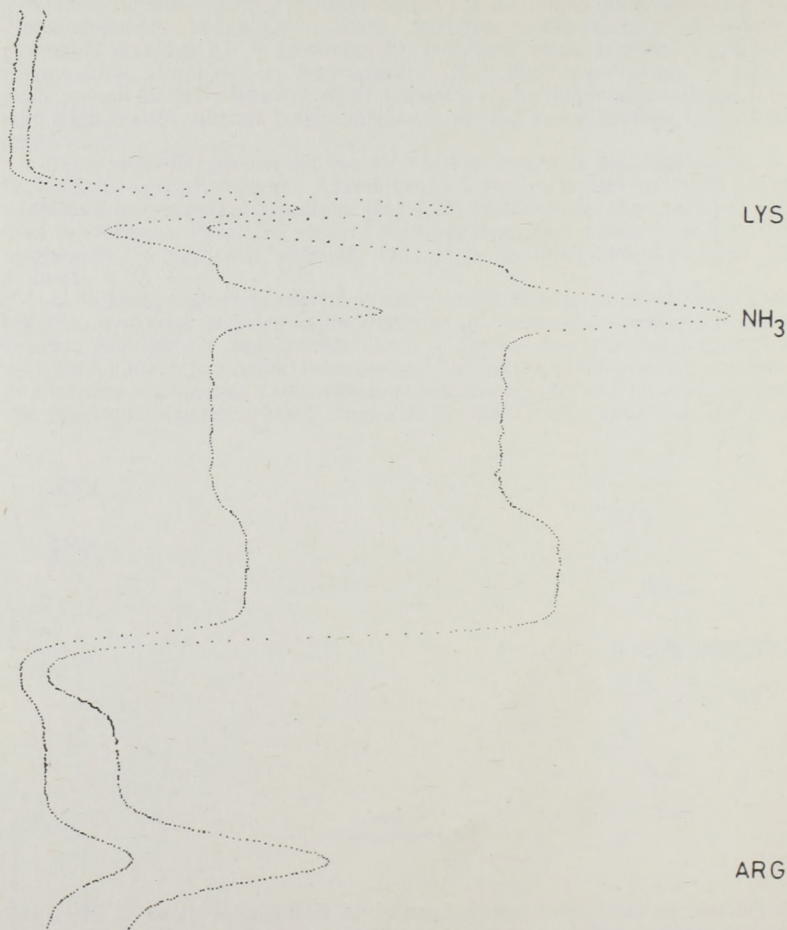


6. ábra
Ammónia plátó

ülő csúcsok, ha korlátozott pontossággal is, de értékelhetők (lásd 6. ábra). Ha a savanyú pufferek ammónia szennyezettsége eltérő mértékű, a plátó alakja eltorzul, ugyanez áll elő akkor is, ha a plátót eluáló puffer pH-ja túl magas. Különös problémát jelent, ha valamelyik csúc a plátó fel- vagy leszálló ágára esik (lásd 7. ábra), ilyenkor az értékelés általában lehetetlenné válik.

A bázikus puffer(ek) ammónia szennyezettsége is érzeteti hatását a kromatogramokon. Az ammónia az ioncserélő oszlopon először megkötődik, majd a frontális kromatográfia elveinek megfelelően áttör, megjelenik az effluensben, emiatt az alapvonal eltolódik. Ez a jelenség általában az arginin környékén látható (8. ábra).

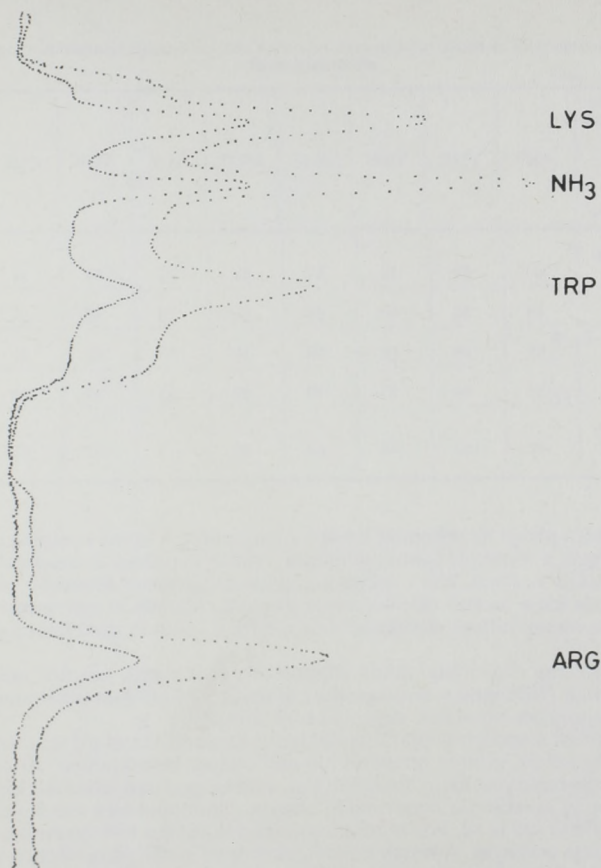
Az ammónia-szennyeződés elleni védekezés két irányú: egyrészt a külső ammónia szennyezés ellen különféle savas csapdák lehet védekezni, a reagensekből az oldatokba kerülő ammóniát pedig általában az elválasztó rész elé iktatott ioncserélő oszlopon kötik meg. E célra vagy speciális, nagy kapacitású ammóniaszelek-



7. ábra
Az ammónia plátó felszálló ágára eső csúcsot nem lehet értékelni

tív gyantákat használnak, vagy az oszlopot a savas pufferek átáramoltatása után kiiktatják a rendszerből és külön regenerálják.

A pufferek által okozott problémák között meg kell még említeni azt a jelenséget, hogy a citromsav lassú disszociációja miatt az összemérés után a pufferek pH-ja lassan változhat. E hatás a gyakorlatban legtöbbször úgy jelentkezik, hogy a készítés napján kipróbált pufferrel a rákövetkező napon nem lehet jó elválasztást elérni. Célszerű emiatt a puffereket a használatbavétel előtt 1–2 nappal elkészíteni.



8. ábra
Ammónia áttörés a bázikus tartományban

A minta összetétele által okozott hibák

Gyakran előfordul, hogy a minta kémhatása vagy koncentrációja az optimálistól eltér, vagy, hogy a minta olyan anyagokat tartalmaz, amelyek az aminosavak normális elválasztását zavarják, vagy azokkal együtt eluálódva irreális eredményeket okoznak.

A minták felvételét legtöbbször pH 2 körüli pufferrel végzik, ez biztosítja ugyanis az aminosavaknak az ioncserélő gyantához való optimális kötődését, ugyanakkor nem okoz túl nagy változást az első eluáló puffer kémhatásában sem.

A minta pH-jának gyakorlatilag csak az első pufferrel eluálódó aminosavakra van hatása. Néhány ide vonatkozó kísérlet eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be.

Savas tartományban eluálódó aminosavak retenciósi idői különböző mintafelvívő pufferek alkalmazásával

retenciósi idő (perc) / felvívő puffer	ASP	THR	SER	GLU	PRO	GLY	ALA	CYS	VAL
pH 2,2 citrát puffer	40	48	51	57	62	77	81	91	103
0,5 N HCl	46	53	55	60	65	79	83	91	104
1 N HCl	53	59	61	65	70	83	87	93	106
2 N HCl	70	74	75	79	83	93	99	105	118
pH 3,2 citrát puffer	37	45	48	53	59	74	77	85	98

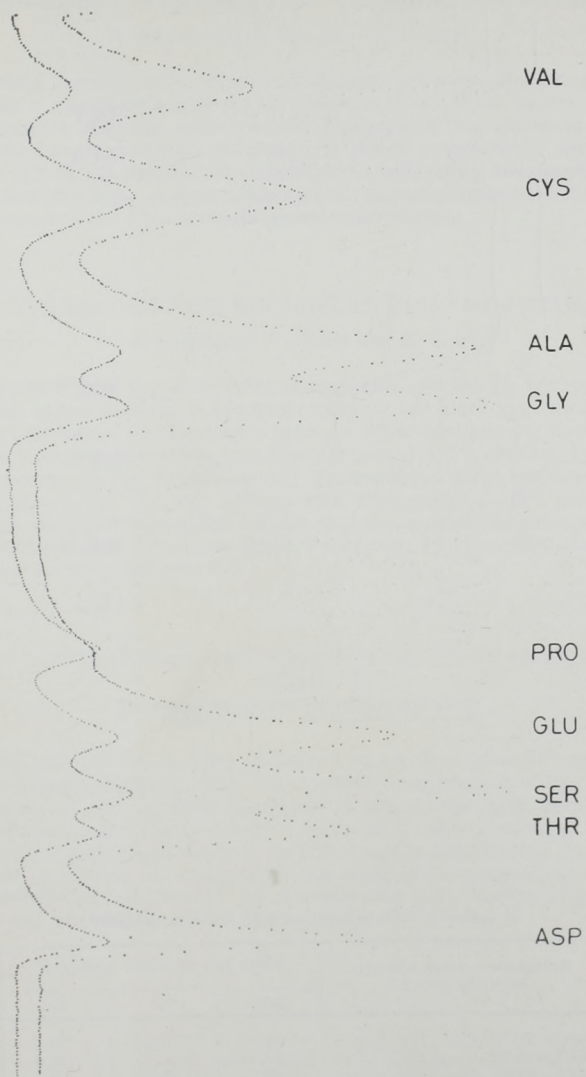
Ha a minta pH-ja az optimális értéknél magasabb, a savas komponensek nem kötődnek eléggé, a retenciósi idők csökkennek, uszályképződés és csúcsalaktorzulás jelentkezik (lásd 9. ábra). Ha a minta az optimális értéknél savasabb, az aminosavak retenciósi ideje megnő. Különösen az elsőnek eluálódó aszparaginsav tolódik el, emiatt a savasság túlzott növekedésekor romlik a feloldás, ezen felül a csúcsalak is torzul.

Ez a probléma elsősorban akkor jelentkezik, ha a minta jelentős mennyiségű savat tartalmaz (részlegesen semlegesített sósavas fehérjehidrolizátumok, savas extraktumok, szerves savakkal deproteinizált minták stb.).

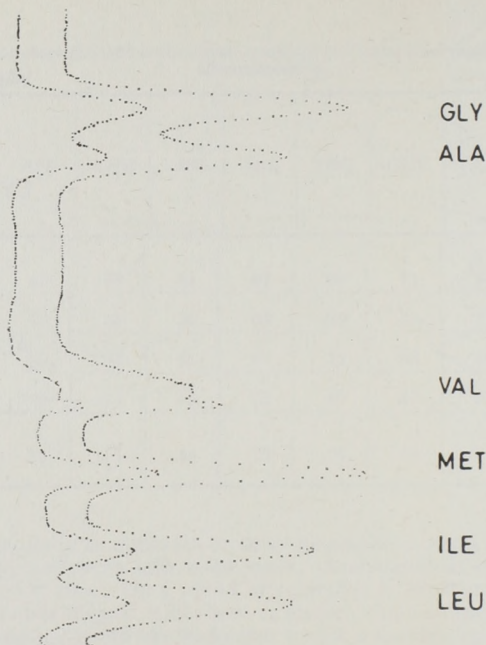
Ha a minták koncentrációja a beállításhoz használt standard aminosav oldattól jelentősen eltér, szintén retenciósi idő módosulást tapasztalunk. Az ioncserélő oszlop ugyanis bizonyos fokú önszabályozó képességgel rendelkezik, kismértékű túlterheléskor az elválasztás nem romlik, csupán a komponensek elúciós térfogata, ezáltal a retenciósi idő is nő. Kis mintakonzentrációk esetén természetesen mindennek a fordítottja érvényes. A retenciósi idő akkor is változik, ha a minta a standard aminosav keverékhez képest további komponenseket is tartalmaz, ezek megjelenése ugyanis eltolja a kromatogramot. Ez a hatás más viszonylag kis koncentráció változás esetén is mérhető (lásd 2. táblázat).

Szerencsétlen esetben a minta nem optimális kémhatása vagy koncentrációja, illetve a már említett egyéb hatások (a folyadékszállítás időszakos kimaradása, illetve lassú változásai) a retenciósi időket úgy változtatják meg, hogy a készüléken beprogramozott pufferváltások nem a kellő időben mennek végbe. Ez a kromatogramon többféle formában jelentkezhet: kettévágott csúcsok, alapvonal-eltolás csúcs közben, vagy csúcsalak torzulás. Utóbbira példát mutatunk be a 10. ábrán, ahol a valin elúciója az első pufferrel kezdődik, és a 2. pufferrel fejeződik be. Ilyen esetekben a kvantitatív értékelés természetesen lehetetlen.

A helytelen pufferváltásból eredő hibák ellen úgy védekezhetünk eredményesen, ha egy adott időprogram keretében azonos típusú, azonos körülmények között kezelt és közel azonos koncentrációjú mintákat elemzünk. A helyes pufferváltási időpontok beprogramozásához a standard aminosav-keverék savasságát is a mintával megegyezőre kell beállítani.



9. ábra
 Uszályképződés és a felbontás romlása túl magas pH-jú minta esetén



10. ábra
Pufferváltás által kettévágott csúcs (valin)

2. táblázat

A retenciósidők függése a minta koncentrációjától

Aminosav csúcsok közötti távolság (perc)	Minta koncentráció $\mu\text{mól}/\text{cm}^3$		
	0,05	0,1	0,2
ASP – VAL	51	51,9	53,1
MET – PHE	34,5	35,1	36,6
LYS – ARG	47	48,2	49,1

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОГРЕШНОСТЕЙ АНАЛИЗАТОРА АМИНОКИСЛОТ

А. Жигмонд, Ф. Бэкэш и Е. Унгар

Авторы в первой части статьи обобщают погрешности важнейших биохимических и пищеводаналитических способов приборного измерения состава, автоматического анализа аминокислот. Проверяли, что которые те явления, какие те проблемы, которые ухудшают точность результатов анализа аминокислот. В статье где занимаются процессом разделения выполняемого анализатором аминокислоты, авторы знакомят возникающие ошибки. В дальнейшем, занимаются погрешностями детектации оценки.

UNTERSUCHUNG DER FEHLERQUELLEN DER AMINOSÄUREANALYSE

A. Zsigmond, F. Békés und E. Ungár

In diesem erstem Teil einer Abhandlungsreihe wurden die wichtigsten Fehlerquellen der automatischen Aminosäureanalyse, als eines der wichtigsten Verfahren der instrumentalen Bestimmungen der Zusammensetzung in der Biochemie und in der Lebensmittelanalyse zusammengefasst. Die Phänomene und Probleme, die die Genauigkeit der Ergebnisse der Aminosäureanalyse herabsetzen, wurden gründlich untersucht. Bei der vorliegenden Diskussion werden die Fehlertypen beschrieben, die im abtrennenden Teil des Aminosäureanalysiergerätes vorkommen. In den nachfolgenden Teilen der Reihe werden die Fehlerquellen des Nachweises und der Auswertung diskutiert.

INVESTIGATION OF THE ERROR SOURCES OF AMINOACID ANALYSIS

A. Zsigmond, F. Békés and E. Ungár

In this first part of a series of papers the error sources of one of the most important proceses of instrumental composition measurement of biochemistry and food analysis: of the automated analysis of amino acids have been summarized. The phenomenons and the problems responsible for the decrease of the accuracy of the results of amino acid analysis were thoroughly investigated. In the course of the present discussion the error types occurring in the separating section of the aminoacid analyzer are treated. In the following parts the error sources of the detection and evaluation will be discussed.