

A szabad és fehérjében kötött triptofán-enantiomerek meghatározása különböző hidrolízismódszerek alkalmazásával

The Determination of the Free and Protein-bound Tryptophan Enantiomers by Using Different Hydrolysis Methods

LÓKI Katalin¹, ALBERT Csilla², VARGÁNÉ VISI Éva¹, BÍRÓ Melinda², SALAMON Szidónia², SÁRA Péter¹, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna¹, CSAPÓ János^{1,2}

¹Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai-Biokémiai Tanszék, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40. Tel.: 36-82-314-155, fax: 36-82-321-749, e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu; www.u-kaposvar.hu

²EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék, RO-4100 Csíkszereda, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-314-657, fax: 40-266-372-099; albertcsilla@sapientia.siccolorum.ro, www.emte.ro

ABSTRACT

Diastereoisomers of L- and D-tryptophan were formed with a chiral reagent 1-thio-β-D-glucose tetraacetate (TATG) and o-phthaldialdehyde (OPA) and they were separated from the derivatives of the other amino acids that occur in food proteins on an achiral column by high performance liquid chromatography. Mercaptoethanesulfonic acid, which is an adequate agent for hydrolyzing proteins, made the derivatization with OPA and TATG impossible, contrary the reaction completed in the presence of p-toluenesulfonic acid, but the oxidative losses during hydrolysis is significant.

Keywords: D-tryptophan, diastereoisomer, separation, high performance column chromatography

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer- és takarmányfehérjékben előforduló aminosavak közül talán a triptofán (Trp) mennyiségének pontos meghatározása a legnehezebb. A többi aminosavval szemben, a triptofán fehérjeláncból való felszabadításához nem alkalmazható az elterjedten használt 110 °C-on 24 óráig 6 M sósav-oldattal végzett hidrolízis, mivel a triptofán szinte teljesen elbomlik ilyen körülmények között. A triptofán oxidatív átalakulásának megelőzése céljából tiolcsoportot tartalmazó védőanyagokat lehet a sósavas elegyhez adni [5], [7]. Egy másik lehetőség, hogy sósav helyett p-toluolszulfonsavat alkalmazunk (PTS), és az indolcsoport védelme érdekében 3-(2-aminoetil)indolt (triptamint) adunk a savas oldathoz [6]. A hidrolízist végre lehet hajtani merkapto-etán-szulfonsavval is (MES), ahol a hidrolizáló ágens egyben redukív csoportot is tartalmaz [9]. A legjobb Trp-kitermelést a lúgos közegű bárium-hidroxidos vagy nátrium-hidroxidos hidrolízismódszereknél mérték [8], [1]. Amennyiben nem feladatunk meghatározni a Trp-tartalmon belül a D- és az L-enantiomerek arányát, utóbbi módszereket célszerű alkalmazni a triptofán felszabadítására a fehérjeláncból. A hidrolízis során alkalmazott erősen lúgos közeg azonban az L/D-arány megváltozását okozhatja, ugyanis élelmiszer- és takarmányfehérjékben az aminosavak jelentős racemizációját figyelték meg lúgos kezelés hatására [4], ezért ha az enantiomerek meghatározása a cél, savas hidrolízismódszereket kell alkalmazni.

A triptofán fehérjeláncból történő felszabadítását követően az enantiomerek elválasztását és mennyiségük meghatározását kell megvalósítani. Egy lehetséges megoldás, hogy az analízis előtt az aminosav-enantiomerekből OPA (o-ftáldialdehid) és TATG (1-tio-β-D-glükóz-tetraacetát) reagensekkel diasztereoizomer-párokat képeztünk, melyek akirális állófázisú oszlopon is elválaszthatóak, és fluorescens jelük detektálható. A többi fehérjealkotó aminosav elválasztását már megvalósították a fenti módszerrel [3], [2].

A kutatás célja az volt, hogy egy folyadékkromatográfiás módszert dolgozzunk ki a D- és az L-Trp-tartalom meghatározására, valamint megvizsgáljuk, hogy melyik hidrolízismódszer alkalmazása a legcélravezetőbb a triptofán fehérjéből való felszabadítására, a racemizáció és az egyéb oxidációs veszteségek szempontjából. Továbbá célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy milyen mértékű az L-Trp racemizációja, illetve bomlása különböző pH-jú oldatokban történő melegítés hatására.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Származékképzés és analízis

A kémiai analízist a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karának Kémiai-Biokémiai Tanszékén végeztük el. A triptofán-enantiomerekből OPA (o-ftálaldehid) és TATG (1-tio- β -D-glükóz-tetraacetát) reagensekkel diasztereoizomer-párokat képeztünk [3], [2], majd fordított fázisú oszlopokon (Superspher 60 RP-8e, vagy Purospher RP-18e állófázis, 125mmx4mm i.d.) választottuk el őket egymástól. A mozgó fázis foszfátpuffer (39 mM, pH=7)–metanol–acetonitril elegy volt, az optimalás utáni végső összetételt lásd a következő fejezetben. Az analíziseket MERCK-Hitachi gyártmányú, LaChrom típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal végeztük. A detektálás során a diasztereoizomerek fluoreszcens jelét mértük (λ_{ex} : 325nm, λ_{em} : 420nm).

2.2. A szulfonsavas hidrolízisek

A para-toluol-szulfonsavas (PTS) hidrolízisnél 5 cm³ 3 M 0,2% 3-(2-amino-etil)indol (triptamin) tartalmú PTS oldatot adtunk a kb. 15 mg fehérjét tartalmazó mintához (juh hemoglobin). Ezt követően az orvosi ampullába nitrogéngázt vezetünk két percig, leforrasztottuk, majd 110 \pm 2 °C-on tartottuk 24 órán keresztül. Ezt követően 4 M-os NaOH-oldattal semlegesítettük, majd 25 cm³-es mérőlombikba téve desztillált vízzel hígítottuk, ezt követően még ötszörösére hígítottuk. A hidrolízist elvégeztük triptamint nem, csak PTS-t tartalmazó oldatokkal is.

A merkapto-etán-szulfonsavas (MES) hidrolízist követően a MES-t el kell távolítani, hogy ne zavarja a származékképzési reakciót. Ennek érdekében három módszert próbáltunk ki. Először 5 cm³ 0,5 M-os CuSO₄-oldatot adtunk 5 cm³ MES oldathoz (0,01 mmol D- és 0,01 mmol L-Trp, 4,5 mmol MES), majd a szuszpenziót centrifugáltuk (4000 g, 20 perc). A felülúszó pH-ját 5 és 6 közé állítottuk be 4 M NaOH-oldattal.

A második próba során a MES-oldatot (3 cm³ 3 M MES; 0,01 mmol D- és 0,01 mmol L-Trp) háromszorosára hígítottuk, majd 3 cm³ oxidáló oldatot adtunk hozzá, mely 30 w/v %-os H₂O₂ és 85 w/v %-os hangyasav 1:9 arányú (v/v) elegyéből állt. Ezt követően 50 °C-on 5 percig melegítettük az oldatot, majd hűtést követően a visszamaradó perhangyasav megkötése céljából 0,52 g nátrium-metabiszulfítot adtunk hozzá.

A harmadik alkalommal a MES-oldat 1 cm³-ét (1 cm³ 3 M MES-oldat és 0,01 mmol D-, valamint 0,01 mmol L-Trp desztillált vízzel 5 cm³-re kiegészítve) 25 cm³-es lombikba tettük. A pH-t 2-re, 6-ra, illetve 9-re állítottuk be 4 M NaOH-oldattal (egy kontrollmintát is készítettünk pH-beállítás nélkül), majd 20 cm³ desztillált vizet és 1 cm³ 0,1138 g/cm³ (0,612 mmol) jódecetsav-oldatot adtunk hozzá.

2.3. A triptofántartalmú oldatok hőkezelése

Az 1 mg/cm³ L-Trp-t tartalmazó oldatok pH-ját (3; 5; 7; 9; 11) 6 M sósav oldattal, illetve 4 M NaOH-oldattal állítottuk be. Az oldatokat orvosi ampullába tettük és a leforrasztás előtt 2 percig nitrogéngázzal öblítettük, majd 100 \pm 1 °C-on 0; 5; 10; 20; 40; 60 percig, illetve 2; 4; 8; 12; 24; és 48 óráig melegítettük.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

3.1. A triptofán-enantiomerek elválasztása az élelmiszerfehérjében előforduló aminosavaktól

Annak ellenére, hogy az aminosavak analízisét megelőzi a hidrolízis, először egy analitikai módszert kellett kidolgozni a Trp-enantiomerek elválasztására, hiszen enélkül a hidrolízismódszereket sem tudtuk volna megvizsgálni. A Trp-enantiomerekből OPA-val és TATG-vel képeztünk származékokat, és az így létrejövő diasztereoizomereket akirális állófázisú oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszerben választottuk el egymástól. A módszerfejlesztésnél kétféle standardoldattal dolgoztunk az egyéb aminosav-származékok interferenciájának kiszűrése érdekében. Az egyik oldat csak D- és L-Trp-t, a másik az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav L- és D-enantiomerjét tartalmazta. Az elválasztás optimalása során változtattuk az állófázis minőségét, a mozgófázis összetételét, ezen belül a szerves fázis arányát és minőségét (metanol, acetonitril, vagy mindkettő).

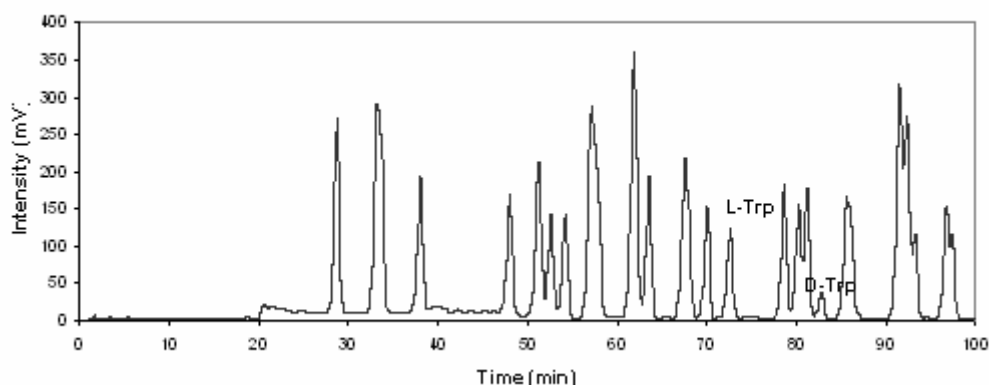
1. táblázat

Gradiens-összetétel az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztására az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól

Oszlop: Purospher RP-18e; 125 mm x 4 mm, áramlási sebesség: $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Idő (min)	Metanol (v/v%)	Foszfát puffer (39 mM, pH=7,0) (v/v%)	Acetonitril (v/v%)
0	20	80	0
120	20	45	35
130	20	45	35
135	20	80	0
140	20	80	0

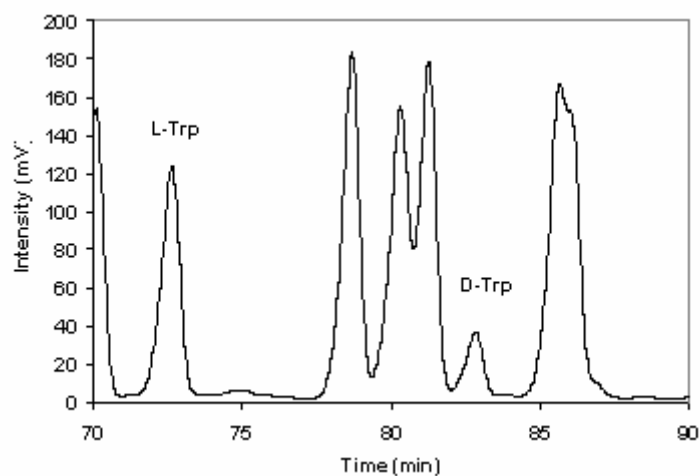
Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztását az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól az 1. ábra, Trp-származékok elválasztását kinagyítva pedig a 2. ábra mutatja.



1. ábra

Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztása az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól, a teljes kromatogram

Oszlop: Purospher RP-18e; 125 mm x 4 mm, Gradiens program: az 1. táblázatban leírtak alapján, az áramlási sebesség: $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.



2. ábra

Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztása az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól, a Trp-származékok elválasztását bemutató részlet.

A diasztereoizomer-származékok fluorescens jele között jelentős különbség volt; az L-Trp származéké mintegy 2,4-szer nagyobb volt, mint a D-Trp-é. A kalibrációs egyenes adatai a 2. táblázatban láthatóak. Az alacsony koncentrációtartományban (14 ng L-Trp és 28 ng D-Trp/injektálás) a relatív szórás (RSD) 1,1 és 4,1% volt; a közepes tartományban (140 ng L-Trp és 280 ng D-Trp/injektálás) ezek az értékek 3,7 és 1,9% voltak; a magas koncentrációtartományban (276 ng L-Trp és 552 ng D-Trp/injektálás) 1,6 és 2,3%-nak adódtak (n=6).

2. táblázat

A kalibrációs egyenes adatai a triptofán-enantiomerek OPA-TATG származékainak fluorescens detektálása során (ex.:325 nm, em.: 420 nm). A lineáris tartományon belül a kalibrációs szintek száma 9 volt az L- és 10 a D-triptofán esetében.

Aminosav	Lineáris tartomány (nmol ml ⁻¹)	Korrelációs koefficiens	Meredekség (A)	Tengelymetszet (B)	Kimutatási határ (nmol ml ⁻¹)
L-Trp	3–72	0,9998	12,6	-2,6	2,2
D-Trp	3–150	0,9996	5,3	-3,0	1,8

X = a kromatográfias csúcs magassága (mV)/koncentráció (nmol·cm⁻³)

Y = koncentráció (nmol·cm⁻³)

3.2. A szulfonsavas hidrolízismódszerek vizsgálata

Merkapto-etán-szulfonsav jelenlétében nem alakultak ki az aminosavak OPA-TATG származékai, melynek valószínűsíthető oka az volt, hogy a TATG helyett a MES képzett származékot az OPA-val és a Trp-nal. A MES eltávolítása, illetve szulfhidril-csoportjának átalakítása céljából több módszerrel próbálkoztunk. Először a MES-ből réz-merkaptid csapadékot képeztünk, majd a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszó oldat aliquot részével végeztük el a származékképzést, azonban a Trp-származékok jelét a merkaptidok eltávolítása után sem észleltük.

Ezt követően a MES-t perhangyasavval diszulfonsavvá oxidáltuk. Mivel a perhangyasav reagálhat a triptofánnal, és feleslege a származékképző reagensekkel is, az egész folyamat ugyanolyan körülmények között megvalósítottuk alaninnal (Ala) is, melynek oldallánca (R-csoportja) nem érzékeny az oxidatív átalakításokra. A perhangyasav feleslegét nátrium-metabiszulfittal kötöttük meg. Ilyen körülmények között sem jelent meg a Trp és az Ala diasztereoizomer származékainak a jele a kromatogramon, tehát sem a Trp, sem az Ala OPA-TATG származéka nem alakult ki detektálható mennyiségben a MES perhangyasavas oxidációja és a perhangyasav-felesleg megkötését követő származékképzés során. A Trp esetében valószínűsíthető az oxidatív átalakulás N-formil-kinureninné.

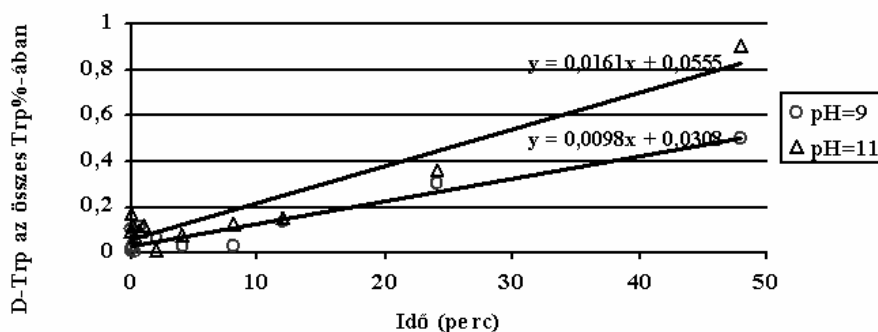
Legvégül a MES-t jódecetsavval karboxi-metil-származékká alakítottuk át, de a Trp-nak csak egy kis hányada alakult át OPA-TATG származékká, és a TATG koncentrációjának növelése sem vezetett eredményre. Vizsgáltuk, hogy megfelelő volt-e az oldatok pH-ja a származékképzéskor (pH=9,5), de nem tapasztaltunk eltérést. Kipróbáltuk a MES-OH-oldat származékképzés előtti semlegesítését, a pH 2-re, 6-ra, illetve 9-re állítását, de egyik esetben sem tapasztaltuk a diasztereoizomer-párok jelintenzitásának növekedését.

Para-toluol-szulfonsav jelenlétében a származékképzés megfelelő módon végbement, azonban csupán PTS jelenlétében a Trp visszanyerése nagyon alacsony. Juh hemoglobint 3 M PTS-oldatban hidrolizálva az eredeti Trp-tartalomnak mindössze 44±2%-át kaptuk vissza. Amennyiben a Trp indolgyűrűjének megvédése érdekében triptamint adunk az oldathoz [6], a származékképzés – valószínűleg a triptamin aminocsoportja miatt – nem megy végbe. Terveink között szerepel a 3-(3-indolil)propionsav kipróbálása, mely a származékképzés szempontjából indifferens.

3.3. A hőkezelés hatása a Trp bomlására és racemizációjára különböző pH-jú vizes oldatokban

A szabad L-Trp racemizációja nem volt jelentős az alacsonyabb pH-jú oldatokban (pH=3–7). A D-Trp mennyisége 12 órás forralás után kezdett el növekedni (3. ábra), de a D–L átalakulás mértéke kisebb volt, mint 1%.

Az L-Trp mennyisége egy napos hőkezelést követően 2–5%-kal csökkent. A racemizációhoz képest a többi átalakulási/bomlási folyamat nagyobb szerepet játszott a Trp-tartalom csökkenésében.



3. ábra

A D-Trp-tartalom növekedése 100 °C-os hőntartás hatására 7-es és 11-es pH-jú vizes oldatokban

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás során megvalósítottuk a triptofán-enantiomerek elválasztását az élelmiszer-fehérjékben előforduló egyéb aminosavaktól. Az aminosav-enantiomerekből l-tio- β -D-glukóz-tetraacetáttal és o-ftálaldehiddel diasztereoiszomereket képeztünk, majd a többi aminosav zavaró hatásának kiszűrése érdekében elvégeztük a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai elválasztás optimalizálását. A legnagyobb kitermeléssel járó savas fehérjehidrolízis-módszerek közül merkapto-etán-szulfonsav jelenlétében nem megy végbe a származékképzési reakció, ezzel szemben a para-toluol-szulfonsavas hidrolízist követően a származékképzés megvalósítható, de a Trp bomlása számottevő. Különböző pH-jú modelloldatokban az L-triptofán vesztesége 2 és 5% között változott 24 órás forralás után. Az oxidatív bomlás mellett (pH=9 és 11) a parciális racemizáció is szerepet játszott az L-triptofán koncentrációjának csökkenésében.

5. IRODALOM

- [1] AOAC Official Method 988.15, "Tryptophan in Foods and Food and Feed Ingredients, Ion Exchange Chromatography Method" In: *AOAC Official Methods Analysis*. 1995. 45. 4. 4.
- [2] Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Einarsson, S. – Folestad, S. – Tivesten, A.: Methods for determination of D-amino acid content of foods and feeds. *Acta Alimentaria*. 1995. 24. 125-126.
- [3] Einarsson, S. – Folestad, S. – Josefsson, B.: Separation of amino acid enantiomers using precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 2,3,4,6,-tetra-O-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside. *J. Liq. Chromatogr.* 1987. 10. 1589-1598.
- [4] Friedman, M.: Chemistry, Nutrition, and Microbiology of D-Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 1999. 47. 3457-3479.
- [5] Freedlender, E.F. – Haber, E.: Obtaining large variable-region peptides from rabbit light chains. *Biochemistry*. 1972. 11. 2362-2370.
- [6] Liu, T.Y. – Chang Y.H.: Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid. Determination of tryptophan. *J. Biol. Chem.* 1971. 246. 2842-2848.
- [7] Matsubara, H. – Sasaki, M.: High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1969. 35. 175-181.
- [8] Miller, E.L.: Determination of the Tryptophan Content of Feeding Stuffs with Particular. *J. Sci. Fd. Agric.* 1967. 18. 381-387.
- [9] Penke, B. – Ferenczy, R. – Kovács, K.: A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 1974. 60. 45-50.