Project nr. 505.7050

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van kwaliteitskenmerken aan de hand van eiwitten en eiwitafbraakprodukten in land- en tuinbouwprodukten.

Rapport 88.21 Maart 1988

ONTWIKKELING VAN EEN METHODE VOOR HET AANTONEN VAN HET L-ISOMEER VAN AMINOZUREN M.B.V. REVERSED-PHASE CHROMATOGRAFIE.

P. Stouten

Afdeling: Eiwitchemie

Goedgekeurd door: drs H.L. Elenbaas

Rijkskwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

8821

VERZENDLIJST

INTERN

directeur

Herstel

Aerts

Den Hartog

Huf

Mw M.J. Groot

circulatiemappen

bibliotheek

hfd. Eiwitchemie 3x

EXTERN

DLO-Algemeen en Management

DLO-Dierlijke Produktie

VKA

VZ

COVP

IVVO

AID

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

8821.0

SAMENVATTING

Dit verslag beschrijft het onderzoek naar een methode om enantiomeren van aminozuren te bepalen.

De methode is toepasbaar op synthetisch bereide aminozuren genoemd in de "Verordening Vvr Bijzondere Stikstofhoudende Produkten 1985" (1), d.w.z. op het L- en D- isomeer van lysine, methionine, tryptofaan en threonine.

Het onderzoek naar de analyse van deze aminozuren is opgebouwd uit twee deelonderzoeken:

- Het vergelijken van drie bepalingsmethoden m.b.v. HPLC-chromatografie.
- Het ontwikkelen van een methode voor het bepalen van enantiomeren van aminozuren.

Deze methode gaat als volgt:

Er wordt gebruikt gemaakt van een extractie met water gevolgd door een zuivering d.m.v. filtratie. Het verkregen filtraat wordt gederivatiseerd met Boc-L-Cysteïne in combinatie met OPA en m.b.v. reversed-phase chromatografie gescheiden op een C 18-kolom. Detectie vindt d.m.v. fluorescentie plaats.

Tijdens het onderzoek zijn ook de detectiegrenzen voor de vier aminozuren bepaald. Voor de vier aminozuren geldt, dat 0,5% van de D-isomeer naast 99,5% van het L-isomeer kan worden bepaald.

1 INLEIDING

Een dier heeft voor de synthese van diverse lichaamseiwitten en andere N-houdende stoffen aminozuren nodig. Aan die behoefte wordt voldaan door eiwitten uit het voer op te nemen, die in het spijsverterings kanaal tot aminozuren worden verteerd en geresorbeerd.
De grondstoffen die worden gebruikt voor het samenstellen van diervoeders zijn voornamelijk bijprodukten afkomstig uit de humane voeding. Deze stoffen hebben meestal een laag eiwitgehalte. Vroeger werd om dit lage eiwitgehalte te compenseren extra eiwit toegevoegd, maar nu is dit meestal niet meer het geval. Door steeds betere en goedkopere produktieprocessen is de fabrikage van synthetisch bereide essentiële aminozuren goedkoper geworden, waardoor het toevoegen van synthetisch bereide aminozuren aantrekkelijker is geworden.
Synthetische aminozuren kunnen in zowel de L- als de D-vorm voorkomen. Deze beide vormen zijn optisch isomeren. Eiwitten bevatten alleen L-aminozuren. Het L-isomeer wordt bijna volledig door het lichaam van mens en dier opgenomen. Dit in tegenstelling tot het D-isomeer (de niet natuurlijke vorm), waarbij in het gunstigste geval 40 à 50% wordt geresorbeerd. Een tekort kan tot verschillende uiteenlopende ziekten, en achterstand in groei leiden. Dit alles is sterk afhankelijk van het aminozuur en de leeftijd van het dier (2).
Bij het synthetisch bereiden van aminozuren ontstaat een racemisch mengsel. Dit mengsel bestaat uit gelijke hoeveelheiden van de beide stereo-isomeren, ook enantiomeren genoemd. Via een bepaald proces in de industrie wordt uit een racemisch mengsel de L-vorm verkregen. Het kan voorkomen, dat door procesfouten of verontreinigingen van de grondstof de zuiverheid van het produkt te wensen overlaat. Daarom is in de "Verordening Vvr Bijzondere Produkten 1985" (1) gesteld, dat een aminozuurpreparaat, dat voor de diervoeding bestemd is, ten minste voor 98% uit het L-isomeer moet bestaan. Al geruime tijd worden door de AID aan het RIKILT aminozuur monsters aangeboden, voor controle op deze zuiverheid volgens de "Verordening" (1). Tot nu toe werden de synthetisch verkregen aminozuurpreparaten gecontroleerd op hun totale gehalte (L- plus D- isomeer).

2 AMINOZUREN

Niet alle aminozuren, die in eiwitten voorkomen kunnen door het dier gesynthetiseerd worden. Op grond hiervan worden de aminozuren ingedeeld in (2):

A. essentiële aminozuren, deze worden in het lichaam niet of niet voldoende snel gesynthetiseerd,

B. niet essentiële aminozuren, deze worden in het lichaam (zonodig) gesynthetiseerd (eventueel ten koste van essentiële aminozuren).

Tabel 1: ESSENTIËLE AMINOZUREN.

		essentieel voor:					
Amino-zuur	Sym	Hond (rat)	Kuiken	Kip	Varken	Mens	Kat
arginine	arg	1)	+	+	2)		+
histidine	his	+	+	+	+		+
isoleucine	ile	+	+	+			+
leucine	leu	+	+	+	+	+	+
lysine	lys	+	+	+	+	+	+
methionine	met	+	+	+	+	+	+
cystine	cys						
fenylalanine	phe	+	+	+	+	+	+
tyrosine	tyr						
threonine	thr	+	+	+	+	+	+
tryptofaan	trp	+	+	+	+	+	+
valine	val	+	+	+	+	+	+
glycine	gly		+				

1) Voor groeiende pups is arginine mogelijk ook essentieel, evenals voor groeiende ratten.

2) Snelgroeiende varkens behoeven arginine.

Uit: Grondslagen van de diervoeding (2).

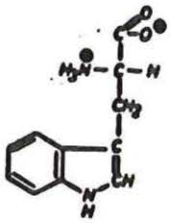
Herkauwers nemen een bijzondere positie in, omdat in de voormagen door de pensmicroben zowel essentiële als niet-essentiële aminozuren worden gesynthetiseerd.
Daardoor zijn herkauwers niet (voor onderhoud en lage produkties) of minder (bij hoge melkprodukties) afhankelijk van het aminozuurpatroon van het voedsel.
Uit tabel 1 blijkt dat niet steeds dezelfde aminozuren essentieel zijn bij de verschillende diersoorten en dit ook met de leeftijd varieert.
Methionine neemt echter een aparte plaats in, zo kan methionine in het voer worden vervangen door toediening van
α-hydroxy-y-methylthioboterzuur (2).

Formules van de vier onderzochte aminozuren.

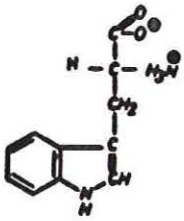
TRYPTOFAAN

Symbool : TRP
Structuur :

L-Isomeer:



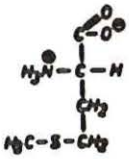
D-Isomeer:



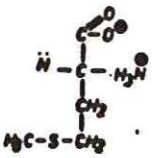
METHIONINE

Symbool : MET
Structuur :

L-Isomeer:



D-Isomeer:

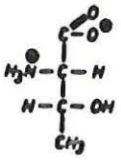


THREONINE

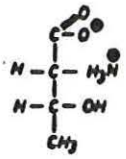
Symbool : THR

Structuur :

L-Isomeer:



D-Isomeer:

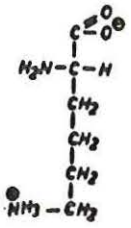


LYSINE

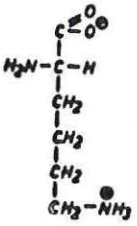
Symbool : LYS

Structuur :

L-Isomeer:



D-Isomeer:



4 METHODEN

Na een literatuurstudie bleven er drie methoden over die in aanmerking kwamen om nagewerkt te worden n.l.:

1 HPLC-methode (chirale stationaire fase)

2 HPLC-methode (chirale stationaire fase)

3 HPLC-methode (chiraal derivatiseringsreagens)

4.1 Methode 1, beknopte weergave, gebaseerd op de methode van G. Gubitz en W. Jellenz (3).

Principe:

De L- en D- vorm van het aminozuur worden d.m.v. het koper(2)acetaat eluens gecomplexeerd. De ontstane complexen zullen zich nu op de kolom, waarin zich een chirale stationaire fase bevindt, verschillend gaan gedragen.
Dit verschil in gedrag tussen de beide vormen zorgt voor een verschil in retentie. De UV-detectie vindt bij 240 nm plaats.

Monstervoorbewerking:

Homogeniseer het monster of de standaard en weeg ca. 0.1 gram af. Los het monster of de standaard op in 60 ml water, voeg zonodig enkele druppels gec. zoutzuur toe. Breng over in een maatkolf van 100 ml. Vul aan en meng. Filtreer de oplossing en verdun het filtraat. Het verkregen filtraat is nu klaar om op de kolom te brengen.

Chromatografische condities:

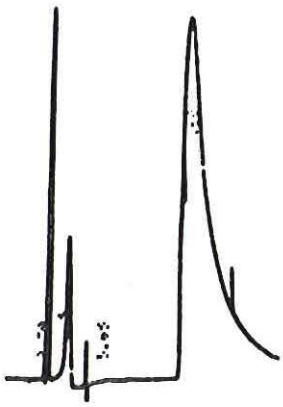
Kolom	: Nucleosil Chiral-1 (Mackerey en Nagel)
Deeltjes grootte	: 5 µm
Dimensies	: L = 250 mm, i.d. = 4,0 mm
Flow	: 1,2 ml/min
Eluens	: 1,0 mM koperacetaat pH = 5,6
Temp	: 60°C
Detectie	: UV 240 nm

Na verschillende modificaties te hebben getoetst, zijn we uiteindelijk uitgekomen op de hierboven vermelde condities, die de beste resultaten gaven. Onder deze condities zijn drie aminozuren gechromatografeerd.

Chromatogrammen:

D-L Methionine

D-L Lysine



D-L threonine

Uit bovenstaande chromatogrammen mag duidelijk zijn, dat alleen methionine enigszins gescheiden is. Met deze methode zijn we dan ook gestopt.

4.2 Methode 2, beknopte weergave, gebaseerd op de methode van Noriyuki Nimara et al (4).

Principe:
De L- en D-vorm van het aminozuur worden gescheiden doordat er een complex wordt gevormd met de stationaire fase. Het verschil in stabiliteit tussen de twee gevormde complexen leidt tot de uiteindelijke scheiding tussen de enantiomeren.

Monstervoorbewerking:

Homogeniseer het monster of de standaard en weeg ca. 0.1 gram af. Los het monster of standaard op in 60 ml water, voeg zonodig enkele druppels gec. zoutzuur toe. Breng over in een maatkolf van 100 ml. Vul aan en meng. Filtreer de oplossing en verdun het filtraat. Het verkregen filtraat kan nu op de kolom gebracht worden.

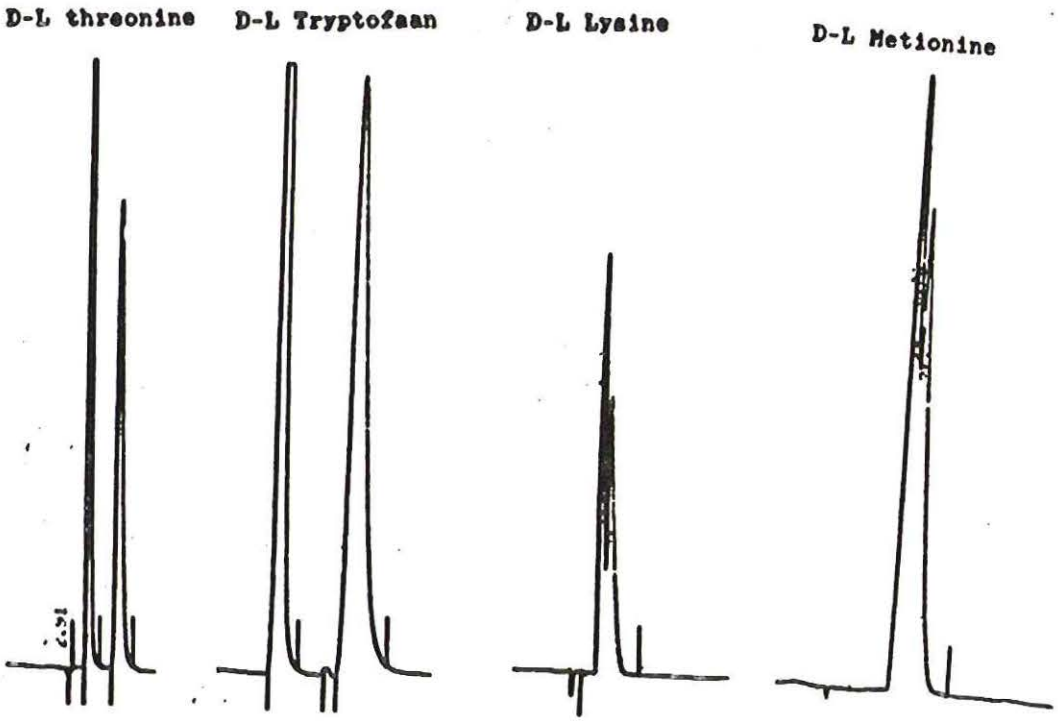
Chromatografische condities:

Kolom	: Chiral Pro-Cu=Si 100 polyol (Serva 42306)
Deeltjes grootte	: 5 µm
Dimensies	: L = 250 mm, i.d. = 4,6 mm
Flow	: 1 ml/min
Eluens	: 0,05 M kaliumdiwaterstoffosfaat pH = 4,6
Temp	: 75°C
Detectie	: UV 220 nm

Na verschillende modificaties te hebben getoetst, zijn we uiteindelijk uitgekomen op de hierboven vermelde condities.

Onder deze condities zijn alle vier de aminozuren gechromatografeerd.

Chromatogrammen :



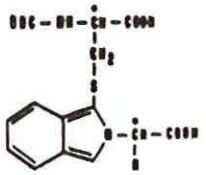
De chromatogrammen laten zien dat threonine en tryptofaan goed gescheiden zijn, de andere twee niet.
We zijn met deze methode gestopt hoewel ze betere perspectieven biedt dan de eerste methode. Maar met deze methode konden de vier aminozuren ook niet tot op de basislijn gescheiden worden, een voorwaarde om 98% van de L-vorm te bepalen. De mogelijkheid om alle vier de enantiomeren te scheiden zal bij pH 7,5 of hoger groter zijn, hetgeen zeer lange retentietijden tot gevolg heeft. Om deze retentietijden te reduceren zal de ion-sterkte van het eluens moeten worden verhoogd en dit is in combinatie met een temperatuur van 75°C niet te realiseren. De kans op uitkristalisatie van de zouten afkomstig uit het eluens in het systeem wordt dan zeer groot.

4.3 Methode 3, gebaseerd op de methode van R.H. Buck en K. Krummen (5)

Principe:
De L- en D-vorm van het aminozuur worden d.m.v. een OPA-reagens waarin een chirale stof (BOC-L-Cysteine) opgelost is, gederivatiseerd. De gevormde derivaten worden op een reversed-phase C 18-kolom gescheiden.

Reactie:
Aangenomen wordt dat de reactie die tussen het aminozuur en het derivatiseringsreagens als volgt plaatsvindt:

aminozuur + ortho-ftaaldialdehyde-boc-L-cysteine →



Boc-L-cysteine ofwel N-tert. -butyloxycarbonyl-L-cysteine vormt met het L- en D-isomeer van het aminozuur twee verschillende complexen. Deze complexen zullen zich ook verschillend op de kolom gedragen waardoor scheiding plaatsvindt tussen het L- en D-isomeer.
Boc-L-cysteine bestaat uit de L-vorm van het cysteine. Hierdoor kan racemisatie optreden als de stof niet goed wordt bewaard. Daarom moet regelmatig de optische zuiverheid van de stof gecontroleerd worden.

OPA ofwel ortho-ftaaldialdehyde wordt gebruikt om het aminozuur te derivatiseren. In combinatie met boc-L-cysteine ontstaan er stabiele derivaten.

Monstervoorbewerking:
Homogeniseer het monster of de standaard en weeg ca. 0,1 gram af. Los het monster of standaard op in 60 ml water, voeg zonodig enkele druppels gec. zoutzuur toe. Breng over in een maatkolf van 100 ml. Vul aan en meng. Filtreer de oplossing en verdun het filtraat. Derivatiseer en breng het monster of standaard op de kolom.

Chromatografische condities:

Kolom	: Chromspher C 18-kolom (Chrompack 28267)
Deeltjes grootte	: 5 µm
Dimensies	: L = 200 mm, i.d. = 3,0 mm
Flow	: 0,5 ml/min
Eluens	: Meng afhankelijk van het te bepalen aminozuur de hier ondergenoemde oplossingen in verschillende verhoudingen.
Oplossing A	: Meng een 0,05 M natriumfosfaatbuffer pH 7 met methanol in de verhouding (60/40).
Oplossing B	: Meng een 0,05 M natriumfosfaatbuffer pH 7 met methanol in de verhouding (30/70).
Temp	: 50°C
Fluorescentiedetectie	: λex = 338 nm, λem = >420 nm

Na verschillende modificaties zijn voor elk van de vier aminozuren wisselende samenstellingen van het eluens gebruikt om de aminozuren te chromatograferen, zie tabel 2.

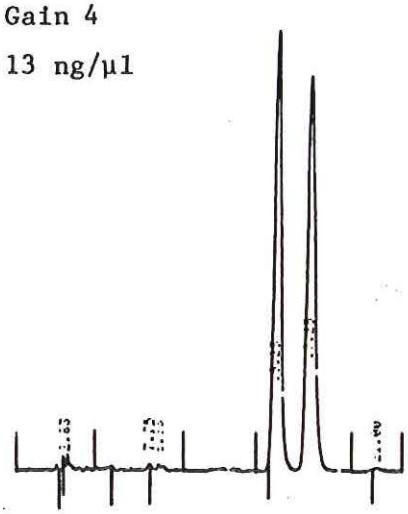
Tabel 2

Aminozuur	Eluens A	Eluens B
Lysine	60	40
Methionine	90	10
Threonine	80	20
Tryptofaan	50	50

Chromatogrammen van de vier aminozuren verkregen met de eluens-samenstellingen zoals vermeld in tabel 1.
Het L-isomeer elueert bij alle vier de aminozuren eerder van de kolom dan het D-isomeer.

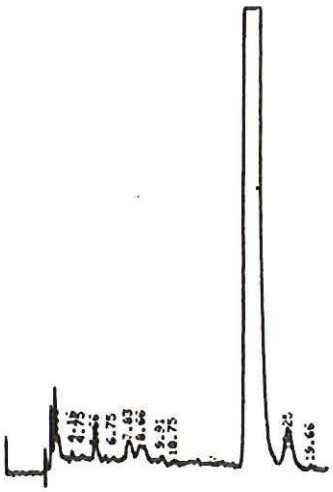
LYSINE

Standaard : D-L lysine (50-50)
Eluens verhouding: zie tabel 1
Injectie volume : 30 µl (gederivatiseerde standaard)
Gevoeligheid : Gain 4
Concentratie : 13 ng/µl



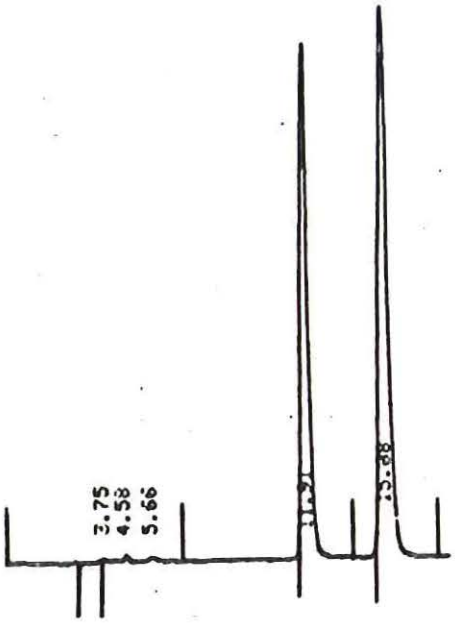
LYSINE

Standaardoplossing: 0.5% D in L-Lysine
Injectie volume : 60 µl
Gevoeligheid : Gain 16



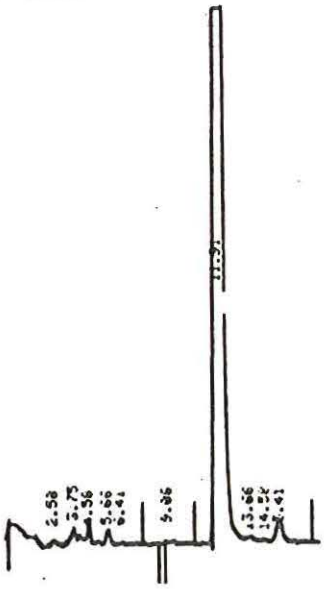
METHIONINE

Standaard	: D-L Methionine (50-50)
Eluens verhouding	: zie tabel 1
Injectie volume	: 30 µl (gederivatiseerde standaard)
Gevoeligheid	: Gain 4
Concentratie	: 13 ng/µl



METHIONINE

Standaardoplossing	: 0.5% D in L-Methionine
Injectie volume	: 30 µl
Gevoeligheid	: Gain 8



TRYPTOFAAN

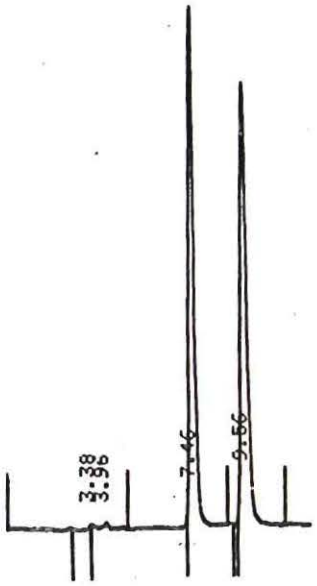
Standaard : D-L tryptofaan (50-50)

Eluens : zie tabel 1

Injectie volume : 30 µl (gederivatiseerde standaard)

Gevoeligheid : Gain 1

Concentratie : 12 ng/µl

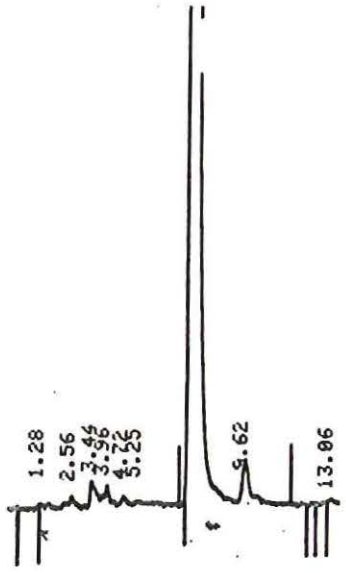


TRYPTOFAAN

Standaardoplossing : 0.5% D in L-tryptofaan

Injectie volume : 60 µl

Gevoeligheid : Gain 8



THREONINE

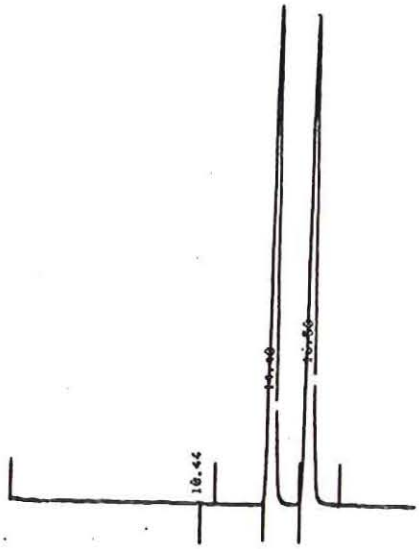
Standaard : D-L threonine (50-50)

Eluens verhouding : zie tabel 1

Injectie volume : 20 µl (gederivatiseerde standaard)

Gevoeligheid : Gain 2

Concentratie : 11 ng/µl

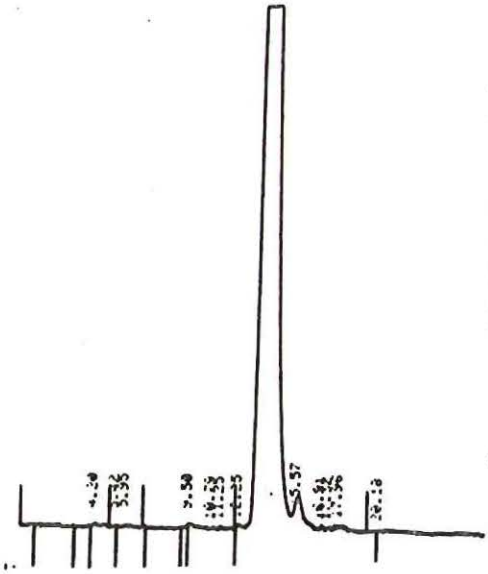


THREONINE

Standaard oplossing: 0.5% D in L-threonine

Injectie volume : 20 µl (gederivatiseerde standaard)

Gevoeligheid : Gain 8



De chromatogrammen laten zien dat alle vier aminozuren basislijn gescheiden zijn, met een onderste detectiegrens van 0.5%.
We hebben de methode verder geoptimaliseerd en gemodificeerd. Een schematische weergave van de methode is te vinden in bijlage 1. Er is ook een Intern Voorschrift van gemaakt, hetgeen is bijgevoegd als bijlage 2.

5 DISCUSSIE/CONCLUSIE

Van de drie methoden hebben we gekozen voor methode 3, gebaseerd op de methode van R.H. Buck en K. Krummen.
De hoge gevoeligheid, de goede scheiding, de korte analyseduur en de lage aanschafprijs van de kolom, zorgen dat deze methode t.o.v. de twee andere het meest geschikt is voor toepassing om de L- en D-isomeren van aminozuren te scheiden.
Omdat de aangeboden monsters, aminozuurpreparaten bestemd voor diervoeding, maar uit één aminozuur bestaan, is een isocratische methode ontwikkeld. Voor een monster met meerdere aminozuren is een methode met gradiëntelutie noodzakelijk.

6 LITERATUUR

1. "Verordening Vvr Bijzondere Stikstofhoudende Produkten, 1985" in Groene instructieboek van Produktschap van veevoeder.

2. Grondslagen van de diervoeding, Standaard Dictaat van de Vakgroep Zootechniek te Utrecht.
   A. Th van 't Klooster, R.A. Prins en R. van der Berg.

3. Separation of optical isomers of amino acids by ligandexchange chromatography using chemically bonded chiral phases.
   G. Gubitz and W. Jellenz
   Journal of Chromatography, 203 (1981) 377-384.

4. Reversed-phase liquid chromatographic resolution of underivated D.L-amino acids using chiral eluents.
Noriyuki Nimara, Atsuki Toyama, Yoko Kasahara, Toshio Kinoshita.
Journal of Chromatography, 239 (1982) 671-677.

5. Resolution of amino acid enantiomeren by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatisation with chiral reagent.
R.H. Buck and K. Krummen.
Journal of Chromatography, 315 (1984) 279-285.

Dankbetuiging

Speciaal wil ik M.J. Groot van de afdeling Microscopie bedanken voor het afstaan van het Standaard Dictaat van de Vakgroep Zoötechniek te Utrecht.

BIJLAGE 1

SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE GEBRUIKTE METHODE

Inweeg ca. 0.1 gram monster of standaard
voeg toe 60 ml water

↓

Oplossen (evt. toe. van enkele druppels
gec. zoutzuur). Kwantitatief overspoelen
in een maatkolf van 100 ml

↓

Aanvullen, mengen en filtreren

↓

Filtraat 100-maal verdunnen

↓

Twee delen van het verdunde filtraat mengen
met een deel derivatiseringsreagens

↓

Afhankelijk van het aminozuur een
hoeveelheid monster of standaard
in het systeem injecteren

↓

Fluorescentiedetectie
ex : 344 nm
em : >420 nm