

Hoch empfindliche Aminosäurenanalyse durch Kapillar-HPLC

Vordersäulenderivatisierung mit 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate (AQC)

J. Naidanow *, L. Minárikova **, G. Barka ***, P. Földi * / ****

Einführung: In den vergangenen Jahren haben sich für die Analyse von Aminosäuren die Methoden der Vordersäulenderivatisierung mit anschließender Auftrennungen derselben durch Reversed-Phase-Chromatographie immer mehr gegenüber der klassischen Methode durchgesetzt. Bei letzterer werden sämtliche Aminosäuren underivatisiert durch Ionenaustauschchromatographie getrennt und anschließend in einer ‚Mixing Coil‘ bei erhöhter Temperatur mit **Ninhydrin** umgesetzt [1]. Der Vorteil dieser Methode ist neben ihrer Robustheit ihre hohe Auflösung. So können z.B. in klinischen Proben neben allen 42, sogenannten physiologischen Aminosäuren auch Aminosäuren analysiert werden. Die Methode ist jedoch relativ unempfindlich, ferner werden für eine einzige Analyse 1 bis 2 Stunden benötigt.

Das deshalb zur Steigerung der Empfindlichkeit statt Ninhydrin für die Nachdersäulenderivatisierung verwendete **Fluorescamin** konnte dieses jedoch nicht verdrängen [2].

Verglichen mit der Nachdersäulenderivatisierung sind die Analysenverfahren der Vordersäulenderivatisierung mit anschließender Auftrennung der Aminosäuren durch Reversed-Phase-HPLC in der Regel zwar die schnelleren und empfindlicheren Techniken, jedoch konnten sich weder die Derivatisierung mit **1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-chlorid**, DANS-Cl [3] oder **Dimethylamino-azobenzol-sulfonyl-chlorid**, DABS-Cl [4], noch mit **Phenylisothiocyanat**, PITC [5] durchsetzen. Gründe hierfür sind das Entstehen von Nebenprodukten und die relativ geringe Reaktivität von Dansyl- und Dabsyl-chlorid, sowie die arbeitsintensive Derivatisierung bzw. die Notwendigkeit mehrmals evakuieren zu müssen, um überschüssiges PITC zu entfernen [6].

Die Vordersäulenderivatisierung der Aminosäuren mit **ortho-Phthaldialdehyd**, OPA, und einem Thiol, z.B. 3-Mercaptoethanol oder Ethanthiol, ist eine der modernsten Techniken [7]. Sie zeichnet sich vor allem durch hohe Empfindlichkeit, ≥ 10 fMol, und kürzeste Analysenzeiten aus [8]. Von großem Nachteil ist jedoch, daß **ortho-Phthaldialdehyd** nicht mit sekundären Aminen wie Prolin oder Hydroxyprolin reagiert und seine Addukte instabil sind [9]. Besonderes Interesse findet jedoch die hochempfindliche Analyse der enantiomeren D- und L-Aminosäuren in Nahrungs-

mitteln durch vollautomatische Vordersäulenderivatisierung mit **OPA** und **N-Isobutyryl-cystein** mit anschließender Trennung aller Diastereomeren durch Reversed-Phase-HPLC [10 / 11].

Um die erwähnten Nachteile bei der Analyse von Proteinhydrolysat, zerebrospinaler Flüssigkeit, Serum, Seewasser etc. zu umgehen, beschrieben 1983 B. Josefsson et al. erstmalig die Derivatisierung der Aminosäuren mit **9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid**, Fmoc [12 / 13]. Die Derivate des für die Peptidsynthese verwendeten Fmoc's zeichnen sich besonders durch ihre niedere Nachweisgrenze, ≤ 50 fMol, sowie ihre hohe Stabilität, ≥ 24 Std., aus. Sowohl bei manueller, als auch bei automatischer Derivatisierung kann das zur völligen Umsetzung der Aminosäuren notwendige, im Überschuß zugesetzte, jedoch die Auswertung der Chromatogramme störende Fmoc einfach durch Zugabe von **1-Amino-adamantan** gebunden werden [14]. Ein weiterer, besonders hervorstechender Vorteil dieser Methode ist, daß nach Ersetzen des Fmoc's durch sein chirales Analogon **(+)-1-(9-Fluorenyl)ethylchloroformat**, unter ansonsten identischen Reaktions- und nahezu gleichen Trennbedingungen leicht Probengemische enantiomerer Aminosäuren und Amine analysiert werden können [15].

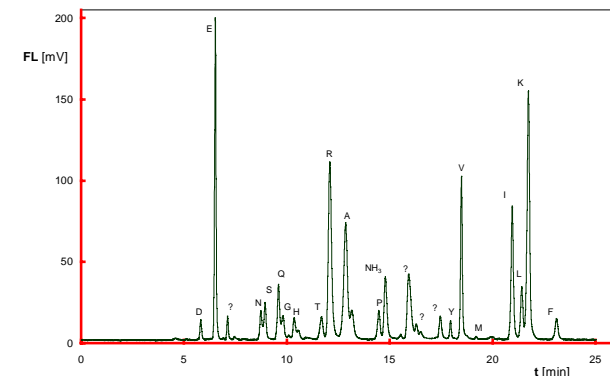
Da jede der kurz erwähnten Methoden im Vergleich mit jeder anderen nicht nur mehr oder weniger Vorteile, sondern auch Nachteile hat, ist es bis dato unumgänglich für die jeweilige Problemstellung die jeweils optimale Methode auszusuchen. Weil jedoch Erforschung und Diagnose z.B. der Alzheimer'schen- und anderer schwerwiegender, vielfach genetisch bedingter Krankheiten [16] ebenso wie die Analyse von Proteomen immer höhere Empfindlichkeit bei stets nur minimalen zur Verfügung stehenden Probenmengen erfordern, war es das Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente, die für Standard- bzw. analytische HPLC bereits beschriebene Vordersäulenderivatisierung der Aminosäuren mit **6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate** (AQC) weiter zu entwickeln [17]. Die neue Methode sollte robust, manuell und automatisch einfach zu handhaben und zumindest so empfindlich wie die Derivatisierung mit OPA oder Fmoc sein. Dies wiederum bedeutet, sie muß „Nano- und Kapillar-HPLC tauglich“ sein und darüber hinaus den Erforder-

nissen einer modernen Analytik von Proteomen genügen [18].

Materialien und Methoden: Die Analysen der human Plasma-, Biopsi- und Hefeextraktproben wurden mit einem HPLC-System bestehend aus folgenden Komponenten durchgeführt: Delta-Chrom SDS150 (master) + SDS15s (slave) Pumpe (Hochdruckgradient / Watrex Prague, Czech Republic), Midas Autosampler (Spark Holland), 1040 HP Fluoreszenz-Detektor (Agilent Technologies), and EZ-Chrom-Datastation (Scientific Software, USA).

Für die Mikrobore- und Narrowbore-Chromatographie stand ein HPLC-System von Thermo Finnigan, Darmstadt, zur Verfügung. Dies bestand aus einer HPLC-Pumpe Modell P 4000, einem Autoinjektor / Säulentermostaten Modell AS 3000, einem UV-Detektor Model Spektra Focus (Flußzelle 1,3 µL / Schichtdicke 3 mm) und einem Fluoreszenz-Detektor Modell FL 2000 (Flußzelle 3 µL / 2 mm). Die Datenerfassung und Steuerung der Anlage erfolgte mit einem mit AMD Athlon/1000 MHz Mikroprozessor ausgestatteten PC und Software ebenfalls von Thermo Finnigan.

Das für die nano- und Kapillar-Säulen verwendete HPLC-System der Fa. Sunchrom, Friedrichsdorf, bestand aus der Kapillar-HPLC-Pumpe Modell MicroPro (Spritzenvolumen 2 mL), wahlweise einem manuellen Mikroinjektionsventil Modell ‚Upchurch Scientific‘ M-435 oder aber für die automatische Derivatisierung aus einem Autosampler Modell Endurance, einem UV-Detektor Modell Spectraflow 501 ausgestattet mit einer 45 nL Flußzelle (Schichtdicke 1 cm). Gesteuert wurde das System bzw. die Daten erfaßt mit der Chromstar Software 6.0, ebenfalls von SunChrom. - Alle Eluenten wurden stets kontinuierlich mit Helium begast.



Stationäre Phase: WATREX Amino Acid-AQC 5 µm; Säule: 250 x 4 mm mit 20 x 4 mm Vorsäule; Eluent A: 100 mM Na-Acetat Puffer pH 6.4; Eluent B: 70 % ACN / Wasser = 60 / 40 30 %; Gradient: 5-18% B (0-4 min), 18-19% B (4-10 min), 19-35% B (10-16 min), 35-40% B (16-24 min); Flußrate: 1.5 mL/min; lin. Fluß: 1.99; mm/sek; Druck: 20-24 MPa; Temperatur: 37°C; Detektion(FI): 254 exc.- 395 em; Flußzelle: 16µL; Injektion: 20µL; Probe: Hefeextrakt.

Abb. 1 Fermentationskontrolle - Analyse eines Hefeextraktes

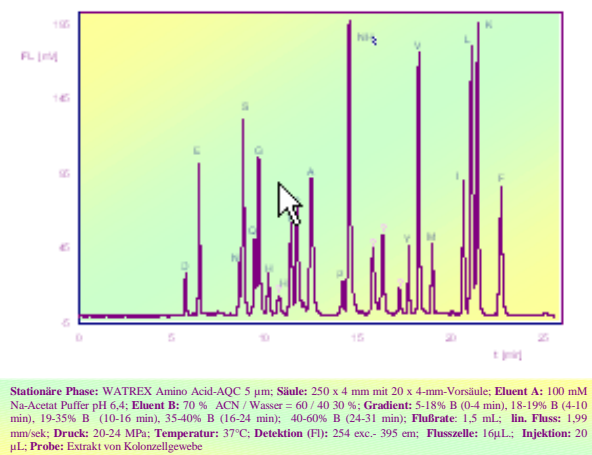
Hefezellen: Zwei oder drei Hefekolonien wurden in 3 ml Wasser suspendiert. Anschließend wurden die Aminosäuren nach der durch D.P. Gent und

J.C. Slaughter modifizierten Methode von Y. Ohsumi et al. extrahiert [19 / 20].

Kolonzellgewebe: 10-30 mg Kolongewebe wurde 10 Minuten lang in 200 µl Wasser bei 50°C inkubiert. Die Mischung wurde kurz zentrifugiert, und 100 µl des Überstandes mit 400 µl Acetonitril versetzt. Dieser Extrakt wurde intensiv geschüttelt (Vortex) und 10 Minuten lang bei 10 000 x g zentrifugiert.

Die als Standards verwendeten Aminosäuren wurden von Serva, Heidelberg, bezogen, Elutions- bzw. Lösungsmittel (HPLC grade), sowie Puffersubstanzen (p.a.) hingegen von Merck, Darmstadt. Narrowbore- (150 x 2 mm) und Kapillarsäulen (150 mm x 300 µm) gepackt mit GROM Saphir C18 bzw. C8 - 3 µm waren großzügiger Weise von GROM Analytik + HPLC zur Verfügung gestellt worden, die analytischen HPLC-Säulen (WATREX 250 x 4 mm Amino Acid-AQC 5 µm with 20 x 4mm Vorsäule) und das Derivatisierungsreagenz AQC jedoch von WATREX Praha s.r.o. Alle Aminosäurestandards und - Proben wurden nach einer Vorschrift ebenfalls von WATREX derivatisiert [21].

Diskussion und Ergebnisse: Da es das erklärte Ziel der im Folgenden diskutierten Experimente war, eine einfach Hand zu habende, zuverlässige Methode zur Aminosäurenanalyse in der Proteomforschung zu entwickeln, wurde besonders nach für diese Applikation speziell geeigneten stationären Phasen gesucht, die auch gepackt als Kapillarsäulen leicht kommerziell erhältlich sind. Aus diesem Grunde waren zwar zunächst für Standardanalysen DeltaChrom™-AQC Säulen - 5 µm (250 x 4mm) von WATREX verwendet worden (Abb. 1 / 2), jedoch wurden um die



Stationäre Phase: WATREX Amino Acid-AQC 5 µm; Säule: 250 x 4 mm mit 20 x 4 mm-Vorsäule; Eluent A: 100 mM Na-Acetat Puffer pH 6.4; Eluent B: 70 % ACN / Wasser = 60 / 40 30 %; Gradient: 5-18% B (0-4 min), 18-19% B (4-10 min), 19-35% B (10-16 min), 35-40% B (16-24 min); Flußrate: 1.5 mL/min; lin. Fluß: 1.99; mm/sek; Druck: 20-24 MPa; Temperatur: 37°C; Detektion (FI): 254 exc.- 395 em; Flußzelle: 16µL; Injektion: 20 µL; Probe: Extrakt von Kolonzellgewebe

Abb. 2 Aminosäurenanalyse in der Onkologie – Biopsie von Kolonzellgewebe

Empfindlichkeit der Analysen zu steigern nach einem Screening mehrerer stationärer Phasen ausschließlich Narrowbore- und Kapillarsäulen gepackt mit GROM Saphir C18 - 3 µm (150 x 2 mm bzw. x 300 µm) verwendet. Obgleich die chromatographischen Bedingungen wie Säulenlänge 15 cm, Partikelgröße 3 µm, Elutionspuffer

50 mM Na-Acetat pH 5,75 bzw. 6,0 und Temperatur 45°C optimiert worden waren, konnten mit der GROM Saphir C18-Phase keine zufriedenstellende Analysenzeiten (~ 60 min) erzielt werden (Abb. 3). Deshalb wurde diese zu

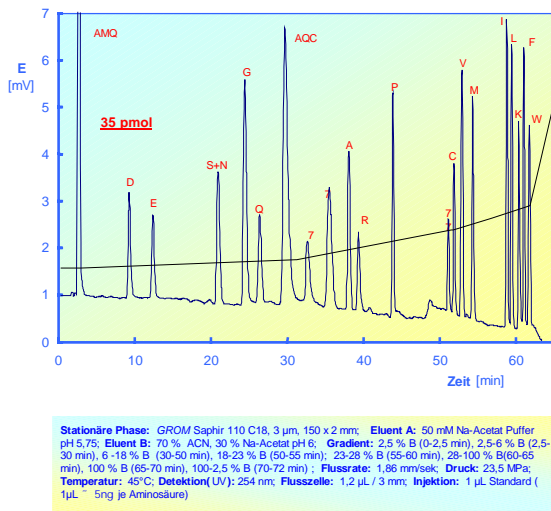


Abb. 3 Optimierte Trennbedingungen auf ODS-Phase (GROM Saphir 110 C18 – 3 µm)

guter Letzt durch GROM Saphir C8 ersetzt und so die Analysenzeiten um ≥ 20 Minuten verkürzt (Abb. 4). Auf eine weitere Verkürzung der Analysenzeit durch Ersetzen der 15 cm langen HPLC-Säulen, durch solche der Länge von 12,5 cm war für die Routine verzichtet worden, da die neue Methode robust und sicher sein sollte.

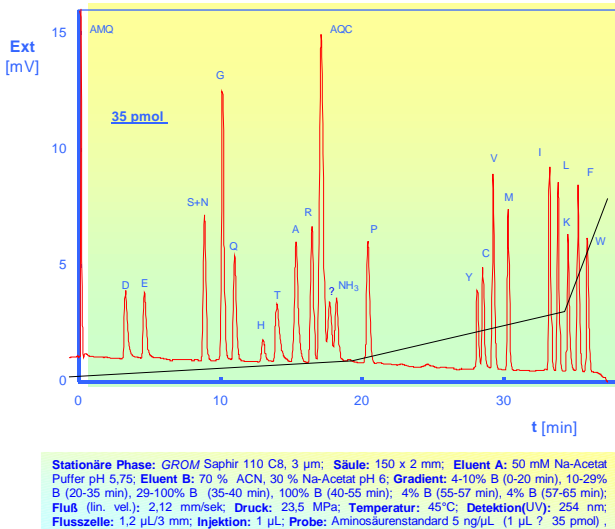


Abb. 4 Optimierte Trennbedingungen auf Octyl- Phase (GROM Saphir 110 C8 - 3 µm)

Um Labors, in denen für die Analyse von Aminosäuren kein „Vollautomat“ zur Verfügung steht, den Einstieg in diese, d.h. manuelles Derivatisieren, zu ermöglichen, vor allem aber um die Derivatisierung selbst bzw. vollständige Durchmischung kleinster Volumina ($\geq 2 \mu\text{L}$) von Probe, Reagenz und Puffern optimieren zu können, wurde die Stabilität der derivatisierten Aminosäuren nicht nur bei 4°C, sondern auch bei Raumtemperatur untersucht. Es konnte daher

gezeigt werden, daß die Aminosäuren nach ihrer Derivatisierung mit AQC, aufbewahrt im Karusell eines Autoinjektors über 15 Std. bei Raumtempe-

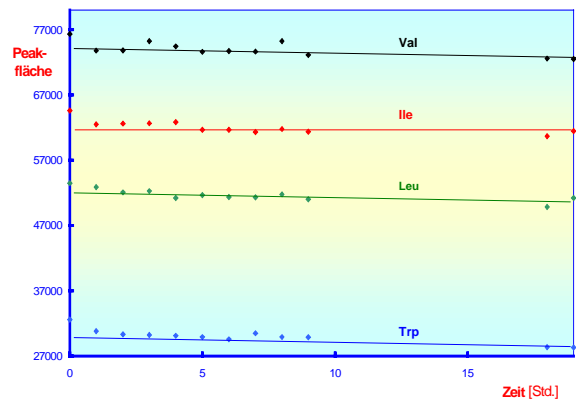


Abb. 5 Stabilitätstest bei 21°C (chromatographische Bedingungen s. Abb. 3)

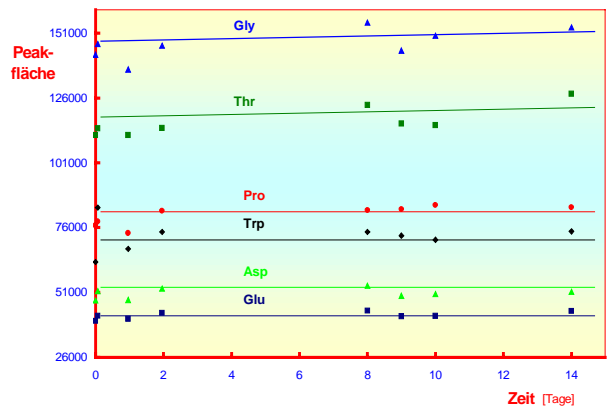


Abb. 6 Stabilitätstest bei 4°C (chromatographische Bedingungen s. Abb. 3)

ratur (Abb. 5) und bei 4°C z.B. aufbewahrt in einem Autosampler sogar über 14 Tage (Abb. 6) stabil sind. Abbildungen 7 und 8 bestätigen wie erwartet, daß Fluoreszenz- etwa 50 bis 100mal empfindlicher ist als UV-Detektion. Dies gilt nicht nur für die Aminosäurenanalyse und ist jeweils vor allem abhängig von durchstrahltem Volumen und Schichtdicke der verwendeten Durchflußzellen, nicht aber von den Dimensionen der für den Vergleich eingesetzten HPLC-Säule. Leider sind

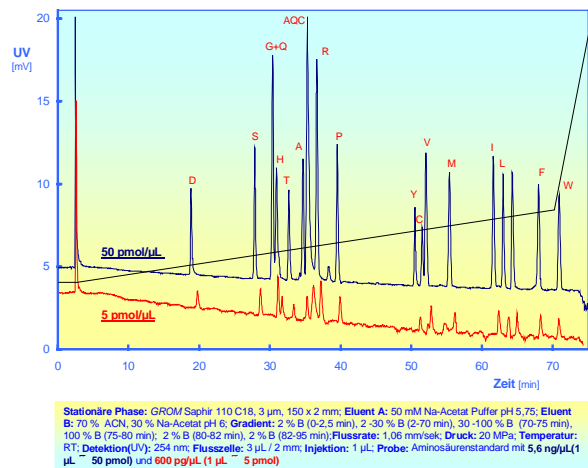
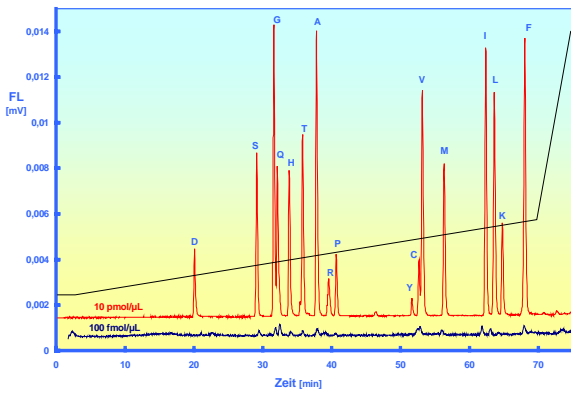


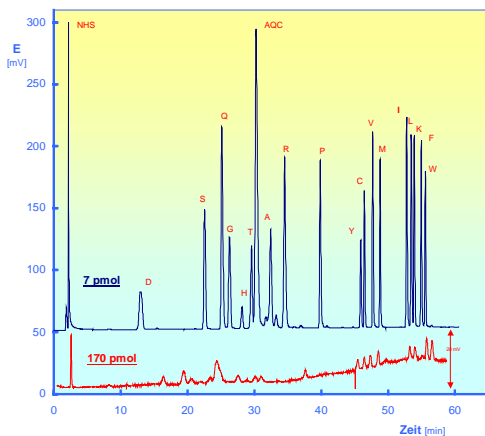
Abb. 7 Nachweisgrenze mit Narrowbore-HPLC-Säule (2 mm ID) und UV-Detektion



Stationäre Phase: GROM Saphir 110 C18, 3 µm, 150 x 2 mm; Eluent A: 50 mM Na-Acetat Puffer pH 5,75; Eluent B: 70 % ACN, 30 % Na-Acetat pH 6; Gradient: 2 % B (0-2,5 min), 2 -30 % B (2-70 min), 30 -100 % B (70-75 min), 100 % B (75-80 min); 2 % B (80-82 min), 2 % B (82-95 min); Flussrate: 1,06 mm/sek; Druck: 20 MPa; Temperatur: RT; Detektor(FL): 250 nm exc, 365 nm em; Flusszelle: 3 µL / 2 mm; Injektion: 1 µL; Probe: Aminosäurestandard 1,1 ng/µL (1 µL = 10 pmol) und 11 pg/µL (1 µL = 100 fmol)

Abb. 8 Nachweisgrenze mit Narrowbore-HPLC-Säule (2 mm ID) und Fluoreszenzdetektion

jedoch zur Zeit für diese Applikation noch keine konventionellen Fluoreszenzdetektoren mit entsprechend kleinen, d.h. für die Kapillar- und Nano-HPLC geeigneten, Durchfluszzellen kommerziell erhältlich. Laser-Induzierten-Fluoreszenzdetektoren mit der erforderlichen Anregungswellenlänge 250 nm stehen derzeit ebenfalls noch nicht zur Verfügung. Dennoch ermöglicht die Verwendung einer Kapillarsäule (300 µm ID) und eines entsprechenden UV-Detektors statt einer Narrowbore-Säule (2 mm ID) und eines Fluoreszenzdetektors gleich hohe Empfindlichkeit für die Analyse der Aminosäuren, nämlich ca. 100 fmol (Abb. 9). Wird jedoch diese Kapillarsäule nochmals z.B. gegen eine Nano-HPLC-Säule (50 µm ID) ausgetauscht, so ist eine weitere Erniedrigung des Detektionslimits um das ca. 40-fache zu erwarten.



Stationary phase: GROM Saphire 110 C18 - 3 µm, Column size: 150 mm x 0,30 mm; Eluent A: 50 mM Na-acetate pH 5,75, B: 70 % ACN - 50 mM Na-acetate pH 6,0 (v/v); Gradient: 2 - 10% (0 - 30 min), 10 - 60% (30 - 80 min); Flow (lin. vel.): 0,80 mm/s; Temperature: 45° C; Detector (UV): 254 nm; Flow cell: 10 mm / 45 nL; Injektion: 150 nL; Sample: standard mixture (~10 pmol of each amino acid)

Abb. 9 Detektionslimit der mit AQC derivatisierten Aminosäuren mit Kapillar-HPLC-Säulen und anschließender UV-Detektion

Für die Analyse von Proteomen ist neben der hohen Empfindlichkeit die nur geringe Probenmenge bzw. das sehr kleine -Volumen, das für die Injektion auf eine Kapillar-HPLC-säule benötigt wird, ein weiterer außerordentlicher Vorteil. Mit

einem geeigneten Autosampler, der kleinste Probenmengen vollautomatisch derivatisieren und injizieren kann, können diese Vorteile voll ausgeschöpft werden (Abb. 10). Die Genauigkeit dieser modernen Methode, nämlich der automatischen, aber auch der manuellen Vordersäulenderivatisierung der Aminosäuren mit AQC und anschließender Trennung der Derivate durch Nano- oder Kapillar-HPLC, steht den anderen Methoden somit nicht nach, sondern scheint sogar diesen nicht nur wegen ihrer wesentlich einfacheren Handhabung überlegen zu sein.

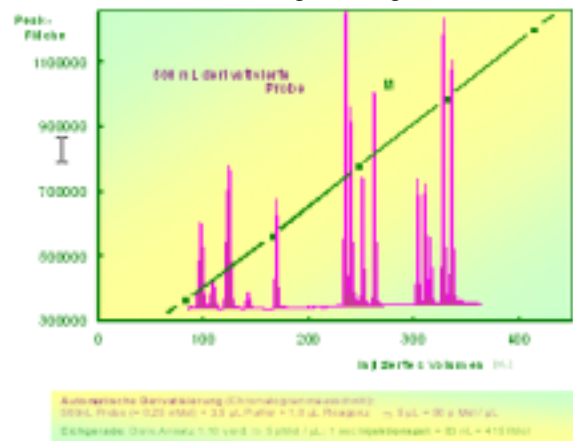


Abb. 10 Automatische Derivatisierung der Aminosäuren im nano-Bereich - Eichgerade für die quantitative Bestimmung von Methionin -

Zusammenfassung: Die beschriebene Methode der Vordersäulenderivatisierung mit AQC zur Analyse von Aminosäuren zeichnet sich besonders vor allen anderen, oben kurz erwähnten Techniken durch ihre einfache Handhabung aus. Dies liegt darin begründet, daß die gebildeten Derivate wesentlich stabiler sind als die vergleichbarer Methoden. Ferner kann bei UV-Detektion der AQC-Derivate die Nachweisgrenze durch Einsatz von Kapillarsäulen (300 µm ID) statt analytischer Säulen (4,0 bzw. 4,6 mm ID) mehr als 200-fach erniedrigt bzw. die Empfindlichkeit der Methode erhöht werden. Dieses Ergebnis kann jedoch mit Nano-HPLC-Säulen ($\leq 100 \mu\text{m ID}$) noch wesentlich verbessert werden. Die nach Vordersäulenderivatisierung von Aminosäuren mit AQC mit Kapillarsäulen und UV-Detektion erzielte Empfindlichkeit entsprechender Analysen ist also mindestens eben so hoch wie die mit analytischen Säulen und Fluoreszenzdetektion erzielte von OPA- und FMOC-Derivaten. Die UV-Detektion bietet gegenüber der Fluoreszenzdetektion noch einen weiteren beachtlichen Vorteil, nämlich daß Tryptophan ebenfalls hochempfindlich bestimmt werden kann. Dies ist wegen der intramolekularen Fluoreszenzlöschung ansonsten nicht möglich.

Die skizzierten Ergebnisse unterlegen wegen der erzielten, hohen Empfindlichkeit und der einfachen Handhabung somit den Schluß, daß im direkten Vergleich mit anderen Methoden die Derivatisierung der Aminosäuren mit AQC mehr Vorteile als jene hat.

Ausblick: Es wird nach einem kostengünstigen Laser-Induzierten-Fluoreszenzdetektor gesucht. Mit nano-HPLC-Säulen (< 100 µm) und diesem könnte dann, zumal entsprechende nano-Durchfließzellen bereits zur Verfügung stehen, die Empfindlichkeit für die Analyse der Aminosäuren durch Vordersäulenderivatisierung bis in den

unteren ato-Molbereich ausgedehnt bzw verbessert werden. Diese sehr hohe Empfindlichkeit zu erreichen scheint zwar technisch möglich zu sein, ob dies jedoch auch sinnvoll ist, d.h. wegen Kontamination, Arbeitsaufwand etc. praktisch handhabbar sein wird, müssen weitere Experimente erst noch unter Beweis stellen.

Literatur

- [1] D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. **30**, 1190 – 1205 (1958)
- [2] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, Science **178**, 871 – 872 (1972)
- [3] W. Tapuhi, D.E. Schmidt, W. Lindner, B.L. Karger, Anal. Biochem. **115**, 123 – 129 (1981)
- [4] J.Y. Chang, P. Martin, R. Bernasconi, D.G. Braun, FEBS Lett. **132**, 117 – 120 (1981)
- [5] R.L. Heinrickson, S.C. Meredith, Anal. Biochem. **136**, 65 – 74 (1983)
- [6] B. Bidlingmeyer, S.A. Cohen, T.L. Tarvin, J. Chromatogr. **336**, 93 – 104 (1984)
- [7] W.D. Hill, F.H. Walters, T.D. Wilson, J.D. Stuart, Anal. Chem. **51**, 138 – 1341 (1979)
- [8] Th. Graser, H. Godel, P. Földi, P. Fürst, Anal. Biochem. **151**, 142 – 152 (1985)
- [9] H. Godel, Th. Graser, P. Földi, P. Fürst, J. Chromatogr **297**, 49 – 61 (1984)
- [10] H. Brückner, P. Jack, M. Langer, H. Godel, Amino Acids **2**, 271 – 284 (192)
- [11] H. Brückner, T. Westhauser, Chromatographia **39**, 419 – 426 (1994)
- [12] S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist, J. Chromatogr. **282**, 609 – 618 (1983)
- [13] S. Einarsson, S. Folestad, B. Josefsson, S. Lagerkvist, Anal. Chem. **58**, 1638 – 1643 (1986)
- [14] I. Betnér, P. Földi, LC + GC Magazine **6**, 832 – 840 (1988)
- [15] S. Einarsson, B. Josefsson, Anal. Chem. **59**, 1191 – 1195 (1987)
- [16] G. Thorsén, J. Bergquist, A. Westlind-Danielsson, B. Josefsson, Anal. Chem **73**, 2625 – 2631 (2001)
- [17] S.A. Cohen, D.P. Michaud, Anal. Biochem. **211**, 279 – 287 (1993)
- [18] C. Klein, P. Földi, LaborPraxis **2**, 34 - 36 (2002)
- [19] D.P. Gent, and J.C. Slaughter, J, Appl. Microbiol. **84**, 752-758 (1998)
- [20] Y. Ohsumi, K. Kitamoto and Y. Anraku, **170**, 2676-2782 (1988)
- [21] Vorschrift zur Derivatisierung v. Aminosäuren mit AQC, WATREX Praha s.r.o., Prag (2004)

Die Autoren danken E. Grom, GROM Analytik+HPLC (Rottembnburg-Hailfingen), für das großzügige Zurverfügungstellen der Narowbore- und Kapillarsäulen, sowie M. Minarik, WATREX Praha s.r.o (Prag, CSSR), für das AQC-Reagenz. Besonderer Dank für experimentelle Unterstützung und anregende Diskussionen gilt L. Fantova, Watrex Praha s.r.o and Z.Palkova (Department of Molecular Biology, Charles University, Prague). Ferner danken wir A. Nickiesch-Hartfiel, Hochschule Niederrhein, z.B. für ihre praktische Unterstützung bei der Beschaffung von Instrumenten und Chemikalien.

* Abt. f. Biotechnologie, Hochschule Niederrhein, Krefeld, D

** Abt. f. Molekulare Biologie, Karls-Universität, Prag, CR

*** SunChrom, Friedrichsdorf, D

**** GROM Chromatography (GRACE-DAVISON), Rotenburg-Hailfingen, D