



Metabolit-Profilung II

Aminosäuren vollständig automatisiert analysieren

Mitte des letzten Jahrhunderts kamen Wissenschaftler auf die naheliegende Idee, durch Bestimmung der Aminosäurekonzentration Stoffwechselerkrankungen zu diagnostizieren – schließlich sind Aminosäuren an vielen wichtigen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Die Gaschromatographie, verbunden mit der Massenspektrometrie (GC/MS), bietet ideale Voraussetzungen zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren in biologischen Matrices. Wie effizient die Analytik ist, hängt von ihrem Automatisierungsgrad ab.

Aminosäuren sind für Mensch und Tier gleichermaßen wichtig, können jedoch nur in begrenztem Umfang vom Organismus produziert werden. Eine Reihe Aminosäuren, namentlich die essenziellen, müssen wir mit der Nahrung aufnehmen. Aminosäuren sind die Bausteine der Proteine und erfüllen eine Vielzahl wichtiger Funktionen im Organismus. Die Aminosäure Tyrosin etwa wird zu Katecholamin umgewandelt, also in ein Hormon, das anregend und stabilisierend auf das Herz-Kreislauf-System wirkt. Glutamat wiederum dient als Neurotransmitter, das heißt, es überträgt neuronale Signale.

Aufgrund ihrer Einbindung in viele Stoffwechselfvorgänge lassen sich Aminosäuren als wichtige Marker u. a. für angeborene Stoffwechselerkrankungen verwenden. Zu den bekanntesten gehört die Phenylketonurie (PKU): Der Organismus ist hierbei nicht in der Lage, Phenylalanin abzubauen; die Aminosäure reichert sich im Körper an und beeinträchtigt die geistige Entwicklung des Menschen. Diagnostizieren lässt sich die PKU über die Bestimmung der erhöhten Phenylalanin-Konzentration. Aus praktischen Gesichtspunkten werden Aminosäuren insbesondere in Körperflüssigkeiten wie Blutplasma und Urin bestimmt.

Zur Bestimmung von Aminosäuren in biologischen Proben kommen häu-

fig kommerzielle Aminosäureanalytoren zum Einsatz; ihr Funktionsprinzip basiert auf der Kationenaustausch-Chromatographie mit Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion. Nachteil dieser Methode ist ihr enorm hoher Zeitaufwand. Als attraktive, weil effiziente Alternative empfiehlt sich die Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC/MS), wobei die Aminosäuren mittels Chlorameisensäurepropylester in flüchtige und damit GC-gängige Derivate umgesetzt werden.

„Damit die Methode für einen hohen Probendurchsatz geeignet ist, haben wir die Probenvorbereitung vollständig automatisiert“, sagt Dr. Katja Dettmer, Projektleiterin Metabolomics am Institut für funktionelle Genomik von Prof. Dr. Peter Öfner an der Universität Regens-

burg. Alle relevanten Schritte, angefangen bei der Zugabe des internen Standards (IS) über die Derivatisierung bis hin zur Probenaufgabe in das GC/MS-System, erfolgen mit der GERSTEL-MPS-PrepStation vollständig automatisiert. Dr. Dettmer: „Durch die Automatisierung konnten wir den manuellen Arbeitsaufwand minimieren und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit verbessern.“

Die MPS-PrepStation verfügt über zwei voneinander unabhängig arbeitende Roboterarme. Während einer im vorliegenden Fall für die Addition der Derivatisierungsreagenzien mit einer Flüssigspritze im mL-Maßstab ausgestattet ist, erfolgt die Zugabe des internen Standards (IS) sowie die Probenaufgabe der notwendig kleinen Probenmenge mittels des zweiten Arms, der mit einer µL-Flüssigspritze ausgestattet ist.

Neben diesem Hardware-spezifischen Aspekt bietet die zugrunde liegende komfortable Softwaresteuerung (GERSTEL-MAESTRO-Software) den Vorteil einer intuitiven Bedienoberfläche, bei der sich die erforderlichen Probenvorbereitungsschritte bequem aus einer übersichtlichen Tabelle per Mausklick zusammenstellen und dank Prep-Ahead-Funktion mit der GC/MS-Analyse zeitlich verschachteln lassen.

Und so gingen die Wissenschaftler vor: Die biologische Probe, etwa Blut



Aufbau der GERSTEL-MultiPurpose-Sampler-PrepStation

oder Urin, wird in ein Glasrollrandfläschchen (Vial) dosiert und mit einem magnetischen Deckel luftdicht verschlossen. Die Vials werden anschließend in den gekühlten Probenhalter der MPS-Prep-Station gestellt. Alle weiteren Schritte erfolgen automatisch, dank magnetischer Verschlusskappen einschließlich Transport der Vials zum Schüttler, der die Probe auf Wunsch rührt und schüttelt sowie erwärmt und abkühlt. Zur Analyse werden je nach Probenmatrix 20 bis 50 µL Probe eingesetzt. Folgende Schritte werden von der MPS-Prep-Station voll automatisiert durchgeführt: 1. Zugabe des internen Standards (Mix von ^{19}C und ^{15}N markierten Aminosäuren und zwei deuterierten Verbindungen). 2. Verdünnungsschritt. 3. Zugabe einer Natriumhydroxid-Lösung, einer Picolin-Lösung, die als Katalysator fungiert, sowie des Derivatisierungsreagens Chlorameisensäurepropylester. 4. Mischen der Probe im Schüttler und 5. Extraktion der gebildeten Derivate mit einem organischen Lösemittel, namentlich Isooktan, „das mit der wässrigen Probe im Zweiphasensystem die obere Phase bildet“, erklärt Dr. Dettmer.

Mit einer 10-µL-Spritze werden aus der oberen Phase 2,5 µL entnommen und direkt in den Gaschromatographen injiziert. Die Trennung erfolgt auf einer ZB-AAA-Säule (Phenomenex Inc.). Verwendet wurde ein Agilent GC 6890, ausgestattet mit dem GERSTEL-Kalt-AufgabeSystem (KAS) als PTV-Injektor. Die Detektion erfolgte mit einem Agilent MSD 5975 parallel im Scan- und SIM-Modus, wobei für jede Aminosäure zwei charakteristische Massenfragmente aufgenommen wurden.

Dettmer und Kollegen bestimmen mit ihrer MPS-KAS-GC/MS-Methode 33 Aminosäuren und Dipeptide quantitativ: Alanin, Sarcosin, Glycin, α -Aminobuttersäure, Valin, β -Aminoisobuttersäure, Leucin, Allo-Isoleucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Prolin, Asparagin, Thiazolidin, Aspartat, Methionin, Hip-

pursäure, Hydroxyprolin, Glutamat, Phenylalanin, α -Amino adipinsäure, α -Aminopimelinsäure, Glutamin, Ornithin, Glycyl-Prolin, Lysin, Histidin, Hydroxylysin, Tyrosin, Prolin-Hydroxyprolin, Tryptophan, Cystathionin und Cystin. Die Quantifizierung erfolgte über Kalibrierkurven unter Einsatz einer Reihe interner Standards, bestehend aus einem Mix von uniform ^{13}C - und ^{15}N -markiertem Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Prolin, Asparagin, Aspartat, Methionin, Glutamat, Phenylalanin, Glutamin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan, Cystin sowie D5-Hippursäure und $[2,5,5\text{-}^2\text{H}_3]$ α -Amino adipinsäure.

„Die Aminosäuren, für die kein interner Standard zur Verfügung stand, wurden mit der isotoopenmarkierten Aminosäure korrigiert, die am nächsten eluierte“, erklärt Dr. Dettmer. Durch die Verwendung stabiler isotoopenmarkierter Aminosäuren als internem Standard wurde eine deutliche Verbesserung von Reproduzierbarkeit und Korrelationskoeffizient der Kalibrierung erzielt. „Die GC der 33 Aminosäuren dauert weniger als zehn Minuten, ist also deutlich schneller als auf herkömmliche Weise“, freut sich die Wissenschaftlerin.

Für die meisten Aminosäuren wurde in einem Bereich von 0,3–2000 µM kalibriert, bei Einsatz von 50 µL biologischer Flüssigkeit. Der Bereich der Nachweisgrenzen (Limit of Detection, LoD) lag zwischen 0,03 µM für die Aminosäuren Alanin, Glycin oder Tryptophan und 12 µM für Glutamin und Prolin-Hydroxyprolin; die unterste Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) lag zwischen 0,3 und 30 µM.

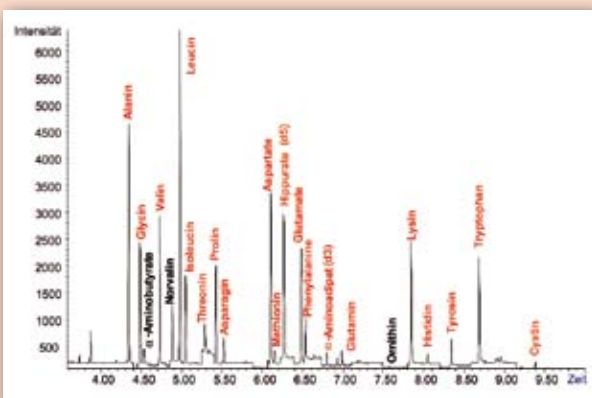
Die Methode wurde laut Dr. Dettmer auf verschiedene biologische Proben erfolgreich angewendet und die Reproduzierbarkeit bestimmt. Untersucht wurde Harn von Menschen und Mäusen sowie Plasma, wobei jeweils eine zehnfache Bestimmung durchgeführt und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet wurde. Sie lag zwischen 2,0 und 8,8

Prozent für menschlichen Harn, zwischen 0,9 und 8,3 Prozent für menschliches Plasma und zwischen 1,3 und 9,1 Prozent für Mäuseharn.

„Mit unserer Methode lassen sich biologische Proben wie Urin, Zellkulturen, Zellextrakte und Plasma mühelos und sicher analysieren“, bestätigt Dr. Dettmer. Eine Anwendung ist die Bestimmung der Aminosäurekonzentration in Körperflüssigkeiten zwecks Diagnose der bereits erwähnten angeborenen Stoffwechselstörungen. Neben der klinischen Diagnostik spielt die Bestimmung von Aminosäuren in der Lebensmittelanalytik eine besondere Rolle, da die essenziellen Aminosäuren bekanntermaßen unter normalen Umständen ausschließlich mit der Nahrung dem Organismus zugeführt werden können.

Wie die Praxis zeige, bestätigt Dr. Katja Dettmer, ließe sich die MPS-KAS-GC/MS-Methode auch auf die Analyse von Aminosäuren in Lebensmitteln wie Milch, Bier und Saft anwenden. Um die Anwendbarkeit ihrer Methode in der Lebensmittelanalytik zu demonstrieren, haben sie und ihre Kollegen exemplarisch Apfelsaft, Bier und Sojasoße untersucht. Am Rande bemerkt: Sojasoße ist eine asiatische Würzsauce, bestehend aus Wasser, Sojabohnen, Getreide und Salz. Wie die Analyse zeigt, schildert die Wissenschaftlerin, enthält Sojasoße viele Aminosäuren in zum Teil überragend großen Mengen, wobei Glutamat mit 47,73 mM dominiert. Die Hauptaminosäuren in Apfelsaft sind Alanin, Prolin, Asparagin, Aspartat und Glutamat, wobei Asparagin mit einer Konzentration von 3,16 µM heraussticht.

Im Bier machen die Aminosäuren Alanin mit 1,13 mM und Prolin mit 3,56 mM die Hauptkomponenten aus. „Die Resultate zeigen deutlich“, fasst Dr. Katja Dettmer zusammen, „dass sich unsere automatisierte MPS-KAS-GC/MS-Methode hervorragend zum Nachweis von Aminosäuren in biologischen Matrices eignet, sei es in Blut und Urin oder auch in Lebensmitteln.“



Chromatogramm einer Vollmilchprobe. Aminosäuren, die einen Isotopenmarkierten Standard haben, sind in der Abbildung rot markiert.

Weitere Informationen



Dr. Katja Dettmer,
Universität
Regensburg,
Institut für Funktionelle Genomik,
Josef-Engert-Str. 9,
D-93053

Regensburg,

Tel. +49 (0) 941 943 5015,
E-Mail: katja.dettmer@klinik.uni-regensburg.de.

Sie können Ihre Anfrage auch direkt an aktuell@gerstel.de richten.