

Τεχνικό Φυλλάδιο
Αρωματικά αμινοξέα – Χρωματογραφική μέθοδος HPLC

Ειρήνη Αμαρυλλίς Χατζησταυρή

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τα αρωματικά αμινοξέα είναι τρία, η τυροσίνη, η φαινυλαλανίνη και η τρυπτοφάνη. Πέρα από βασικές μονάδες των πρωτεϊνών, συμμετέχουν και την βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών, ορμονών κ.α. (1). Τα συγκεκριμένα αμινοξέα συνδέονται με πολλές, γενετικές και μη, ασθένειες με αποτέλεσμα να αποτελούν βιοδείκτες, δηλαδή εργαστηριακό διαγνωστικό εύρημα.

Αρχή μεθόδου

Αναπτύχθηκε μέθοδος ταυτόχρονου ποσοτικού προσδιορισμού των ελεύθερων τριών αρωματικών αμινοξέων στο πλάσμα με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με UV/VIS ανιχνευτή. Η μέθοδος βασίζεται στην λήψη πλάσματος, στην αποπρωτεΐνωσή του και στον διαχωρισμό των ελεύθερων αρωματικών αμινοξέων από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος με την χρήση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και στήλης endcapped. Κατά την ανάλυση χρησιμοποιείται βαθμιδωτή έκλυση και το εμβαδόν της κορυφής της απορρόφησης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του κάθε αμινοξέος στο βιολογικό δείγμα.

Ενδεικτικές Φυσιολογικές Τιμές Ενηλίκων

Τυροσίνη: 55 - 147 μM

Φαινυλαλανίνη: 56 – 74 μM

Τρυπτοφάνη: 30 – 60 μM

(2)

Αντιδραστήρια

R1 (ακετονιτρίλιο - ACN, HPLC grade, Chem lab NV, Belgium)

R2 (πρότυπο διάλυμα τυροσίνης 0,03 M, HPLC grade, SIGMA-ALDRICH)

R3 (πρότυπο διάλυμα φαινυλαλανίνης 0,03 M, HPLC grade, SIGMA-ALDRICH)

R4 (πρότυπο διάλυμα τρυπτοφάνης 0,03 M, HPLC grade, Merck)

Τελικές Συγκεντρώσεις

MeCN (65 v/v)

Χρόνος Ζωής Αντιδραστηρίων

Αναγράφεται στο set. Τα R1, R2, R3 και R4 διατηρούνται σε θερμοκρασία κατάψυξης.

Χρησιμοποιούμενο Δείγμα

Πλάσμα με EDTA αντιπηκτικό.

Σταθερότητα αρωματικών αμινοξέων στο πλάσμα για τουλάχιστον 12 μήνες στους - 50 °C (3).

Μέθοδος

(Όλοι οι όγκοι εκφράζονται σε μL)

Χρωματογραφική στήλη: Hypersil GOLD (175 \AA , 3 μm , 150 x 4,6 mm, endcapped)

Μήκος κύματος: 205 nm για την φαινυλαλανίνη και 220 nm για την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη.

Θερμοκρασία ανάλυσης: 25 °C

Ταχύτητα ροής: 1,2 mL/min

Συνολικός Χρόνος ανάλυσης: 10 min

Buffer: NaPi (100mM, pH 2,1)

Βαθμιδωτή Έκλυση με Κινητή Φάση: 0 min \rightarrow Buffer 90%: 10% MeCN

10 min \rightarrow Buffer 70%: 30% MeCN

	Δ	Π
Πλάσμα υγιούς ατόμου	-	500
Πλάσμα ασθενούς	500	-
R1	1000	1000
Vortex για 20", φυγοκέντρηση σε 6.600 g για 5 min (μικροφυγόκεντρος), ποσοτική λήψη υπερκειμένου, επανάληψη vortex και φυγοκέντρησης.		
Υπερκείμενο	Ποσοτική λήψη	Ποσοτική λήψη
R2	-	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 *
R3	-	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 *
R4	-	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 *
Ανάμειξη και ανάλυση σε HPLC, προτύπων και δείγματος.		
* Σε κάθε πρότυπο αντιστοιχεί μία ποσότητα με την σειρά από το κάθε αντιδραστήριο, π.χ. 2 μL R2 - 2 μL R3 - 2 μL R4 για το δεύτερο πρότυπο.		

Υπολογισμοί

Υπολογισμός C κάθε αμινοξέος (μM) με βάση την καμπύλη αναφοράς του καθενός
Εμβαδό = f(C αμινοξέος (μM))

Τεχνικά Χαρακτηριστικά

Γραμμικότητα (Linearity)

Γραμμική συσχέτιση μεταξύ απορρόφησης και αμινοξέος παρατηρήθηκε έως τουλάχιστον 5086 μM για την τυροσίνη, 4566 μM για την φαινυλαλανίνη και 1603 μM για την τρυπτοφάνη.

Όριο Ανίχνευσης (LOD) & Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το LOD υπολογίστηκε στα 1344 μM για την τυροσίνη, στα 761 μM για την φαινυλαλανίνη και στα 344 μM για την τρυπτοφάνη.

Το LOQ υπολογίστηκε στα 4481 μM για την τυροσίνη, στα 2536 μM για την φαινυλαλανίνη και 1147 μM για την τρυπτοφάνη.

Επαναληψιμότητα (Repeatability)

	C πραγματική (μM)	MO C καμπύλης αναφοράς (μM)	SD C καμπύλης αναφοράς	CV%
Tyr (n=7)	3658,5	2743,02	1907,22	69,53
Phe (n=7)	2195,1	1757,03	1104,13	62,84
Trp (n=7)	731,7	523,70	349,68	66,77

Αναπαραγωγικότητα (Reproducibility)

	C πραγματική (μM)	MO C καμπύλης αναφοράς (μM)	SD C καμπύλης αναφοράς	CV%
Tyr (n=2)	1707	841,36	104,64	12,44
Phe (n=2)	1034,1	654,92	153,40	23,42
Trp (n=2)	331,8	251,86	80,69	32,04

Αναφορές

1. **Καρίκας, Γεώργιος Αλβέρτος.** *Εφηρμοσμένη Βιοχημεία*. Αθήνα : Οδυσσέας, 2012. pp. 39-48. 978-960-210-580-1.
2. **Psychogios, Nikolaos, et al.** The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE*. 2011, Vol. 6, 2, p. e16957.
3. **Kornhuber, Malte E., et al.** Stability of human blood serum aminoacids after storage at different pH and temperature conditions. *Clinica Chimica Acta*. 3 29, 1991, Vol. 197, 3, pp. 189-200.