

chuẩn được xác định bằng phương pháp đo quang phải lớn hơn 95 % so với nồng độ tính từ dung dịch chuẩn gốc.

Tính kết quả:

Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$S_1 \times \frac{C \times V}{S_2} \times \frac{1}{m}$$

Trong đó:

S₁ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch thử;

S₂ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch chuẩn;

C là nồng độ retinyl acetat trong dung dịch chuẩn gốc (IU/ml);

m là lượng chế phẩm đem xử lý thành dung dịch thử (g);

V là thể tích dung dịch chuẩn gốc đã đem xử lý (ml).

10.11 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ACID AMIN

Phương pháp phân tích acid amin là phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các acid amin trong các protein và peptid, cũng như trong các chế phẩm thuốc. Phương pháp phân tích acid amin được áp dụng để định tính và định lượng các protein và peptid dựa trên các cấu tử acid amin tạo ra chúng, để giúp việc xác định cấu trúc của các protein và peptid cũng như việc xác định cách phân đoạn của chúng nhằm thiết lập giản đồ peptid và để phát hiện các acid amin không điển hình có thể có mặt trong một protein hoặc peptid.

Trước khi phân tích acid amin trong protein hoặc peptid, cần thiết phải thủy phân protein hoặc peptid thành các acid amin. Sau đó tiến hành phân tách các acid amin thu được giống như khi ta phân tách các acid amin tự do có trong các chế phẩm thuốc. Điều quan trọng là chúng phải được biến đổi thành các dẫn chất thích hợp cho việc phân tách và phát hiện.

Thiết bị

Các phương pháp để phân tích acid amin thường dựa trên việc tách các acid amin có trong mẫu thử bằng phương pháp sắc ký. Các thiết bị sắc ký tự động thường chiếm lợi thế. Thiết bị phân tích acid amin điển hình là một máy sắc ký lỏng áp suất thấp hoặc áp suất cao, có khả năng thực hiện chương trình dung môi để tách các acid amin khi qua cột sắc ký. Máy cần có thêm thiết bị tạo dẫn chất acid amin sau cột, trừ khi mẫu thử được tạo thành dẫn chất trước cột. Để phát hiện kết quả, thường dùng detector hấp thụ tử ngoại - khả kiến hoặc detector huỳnh quang, tùy thuộc vào cách tạo dẫn chất đã áp dụng. Một thiết bị tích phân cho phép chuyển đổi tín hiệu tương tự đi từ detector ra và cho phép định lượng.

Thường sử dụng các máy chuyên dụng để phân tích acid amin.

Chú ý

Nhiều đường nền luôn là mối quan tâm của người tiến hành phân tích acid amin. Để khắc phục, phải dùng các

thuốc thử có độ tinh khiết cao (ví dụ acid hydrocloric có độ tinh khiết thấp có thể gây nhiễm glycin). Thông thường cách một vài tuần lại phải thay mới các thuốc thử. Chỉ dùng các dung môi dùng cho sắc ký lỏng. Lọc lại các dung môi trước khi dùng để giảm thiểu sự nhiễm khuẩn và các tạp chất. Đậy kín các bình đựng dung môi. Không để các thiết bị phân tích acid amin tiếp xúc trực tiếp với tia sáng mặt trời.

Chất lượng thực hành phòng thí nghiệm có thể quyết định chất lượng phân tích acid amin. Giữ phòng thí nghiệm sạch sẽ. Đặt thiết bị phân tích trong phòng thí nghiệm tại chỗ riêng biệt, ít bị ảnh hưởng của các hoạt động khác. Định kỳ rửa sạch và chuẩn hóa lại các pipet. Bảo quản đầu pipet trong hộp đậy kín. Không được cầm đầu pipet bằng tay trần, phải mang găng tay bằng cao su không xoa bột talc hoặc loại khác có chất lượng tương đương. Hạn chế số lần mở và đóng bình đựng mẫu thử vì bụi có thể làm gia tăng kết quả về hàm lượng các chất glycin, serin và alanin. Cần bảo dưỡng tốt thiết bị phân tích acid amin để có kết quả chấp nhận được. Nếu thiết bị được dùng thường ngày thì hàng ngày phải kiểm tra độ rò rỉ dung môi của thiết bị, độ ổn định của đèn và detector, độ phân giải của cột.

Định kỳ làm sạch hoặc thay thế các kính lọc của thiết bị và các linh phụ kiện cần bảo dưỡng khác.

Các chất đối chiếu

Trên thị trường có sẵn các acid amin chuẩn để dùng trong phân tích acid amin; chúng thường là dung dịch hỗn hợp các acid amin chuẩn trong nước. Khi cần xác định thành phần acid amin trong một mẫu thử, các protein hoặc peptid chuẩn phải được phân tích song song với mẫu thử để kiểm tra sự toàn vẹn của thử nghiệm. Trong trường hợp này, chuẩn protein được sử dụng là albumin huyết thanh bò tinh khiết cao.

Chuẩn hóa thiết bị

Việc chuẩn hóa thiết bị phân tích acid amin được thực hiện bằng cách phân tích một chuẩn acid amin, gồm hỗn hợp các acid amin chuẩn đã biết trước hàm lượng của từng chất, để xác định hệ số đáp ứng và khoảng tuyến tính ứng với mỗi một acid amin chuẩn đã thử.

Pha loãng mẫu chuẩn acid amin thành nhiều dung dịch có nồng độ khác nhau, nằm trong khoảng tuyến tính dự đoán trước của các acid amin có trong mẫu chuẩn. Tiến hành phân tích nhiều lần với mỗi nồng độ. Biểu thị kết quả thu được trên biểu đồ thể hiện tương quan giữa diện tích pic thu được ứng với mỗi nồng độ của acid amin đã thử. Nhờ biểu đồ này, có thể xác định được khoảng tuyến tính của mỗi acid amin, tại đó, các diện tích pic thu được có tương quan xấp xỉ tuyến tính với các nồng độ của các acid amin đã thử. Khi phân tích acid amin, để có kết quả đúng và lặp lại, điều quan trọng là phải pha và thử nghiệm trên các mẫu thử có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính tương ứng với kỹ thuật phân tích đang áp dụng.

Để xác định hệ số đáp ứng cho mỗi acid amin, ta phân tích từ 4 nồng độ đến 6 nồng độ của acid amin chuẩn tương

ứng. Hệ số đáp ứng tính được là giá trị trung bình của diện tích pic (hoặc của chiều cao pic) ứng với nồng độ 1 nanomol của dung dịch acid amin chuẩn. Thiết lập một dãy chuẩn hóa bao gồm hệ số đáp ứng tương ứng của các acid amin và sử dụng dãy này để tính nồng độ (nanomol) của mỗi acid amin có trong mẫu thử bằng cách chia diện tích pic (hoặc chiều cao pic) thu được của acid amin đó cho hệ số đáp ứng tương ứng có trong dãy chuẩn hóa.

Trong việc phân tích thường ngày, khi dùng dãy chuẩn hóa, ta chỉ cần xác định một diện tích pic là đủ. Tuy nhiên, dãy chuẩn hóa này phải thường xuyên được thử lại bằng các phân tích kiểm tra và được cập nhật để bảo đảm tính toàn vẹn của nó.

Độ lặp lại

Muốn có các kết quả phân tích acid amin có chất lượng ổn định tại một phòng thí nghiệm phân tích, cần quan tâm đến độ lặp lại của phép định lượng. Cần có một hệ thống thiết bị phân tích các acid amin có khả năng cung cấp các giá trị lặp lại của thời gian lưu của pic (để định tính) và các giá trị lặp lại của diện tích pic (để định lượng). Cách xác định tiêu biểu độ lặp lại bao gồm việc pha chế một dung dịch chuẩn các acid amin, rồi tiến hành đo mẫu đó nhiều lần (6 lần hoặc nhiều hơn). Sau đó, tính độ lệch chuẩn của các giá trị thời gian lưu và độ lệch chuẩn các giá trị diện tích pic đã được tích phân, ứng với mỗi acid amin đã được phân tích. Việc xác định độ lặp lại còn được mở rộng bằng cách nhiều người phân tích khác nhau cùng tiến hành xác định độ lặp lại đó trong nhiều ngày. Người ta còn thực hiện việc định lượng nhiều dung dịch có nồng độ khác nhau của chuẩn gốc để xác định sự biến thiên do việc pha chế mẫu thử. Thường người ta phân tích thành phần acid amin của một protein chuẩn (ví dụ albumin huyết thanh bò) để đánh giá độ lặp lại. Nhờ việc xác định độ lệch chuẩn, ta có thể thiết lập các giới hạn phân tích để đạt kết quả tốt, với độ lệch chuẩn thấp nhất. Để giảm bớt sai số trong phân tích, nhiều yếu tố cần được quan tâm và xem xét đầy đủ như: cách chuẩn bị mẫu thử, nhiễu đường nền do chất lượng của các thuốc thử, việc thực hành thí nghiệm, tính năng và việc bảo dưỡng máy móc thiết bị, các dữ liệu phân tích và cách biện giải và cuối cùng là việc thực thi thành thạo của người làm phân tích.

Chuẩn bị mẫu thử

Muốn có kết quả phân tích acid amin đúng, phải dùng các mẫu thử protein và peptid đã tinh chế. Các tạp chất như các muối, ure, chất tẩy rửa... có thể gây nhiễu, nên cần phải loại khỏi mẫu thử trước khi tiến hành phân tích. Phương pháp điều chế dẫn chất sau cột sắc ký không bị nhiễm bởi các tạp chất ở mức độ lớn như khi điều chế dẫn chất trước cột sắc ký. Nên giảm số thao tác trên mẫu thử để giảm nhiễu đường nền, tăng kết quả tìm thấy và giảm công lao động. Các cách thông thường để loại tạp chất trong mẫu thử protein bao gồm:

Tách bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, thu protein bằng một dung môi bay hơi có chứa một lượng thích hợp thành phần hữu cơ rồi làm khô bằng ly tâm chân không;

Thẩm tách loại bỏ tạp chất;

Ly tâm siêu lọc;

Kết tủa protein bằng một dung môi hữu cơ (ví dụ acetone);

Lọc qua gel.

Chất chuẩn nội

Cần dùng một chất chuẩn nội để kiểm soát những mất mát và biến đổi lý hóa học xảy ra trong quá trình phân tích acid amin. Do đó, trước khi tiến hành thủy phân phải thêm một lượng chính xác chất chuẩn nội vào dung dịch protein cần phân tích. Lượng chuẩn nội tìm thấy được sẽ là một thông số chung cho lượng tìm thấy được của các acid amin có trong protein. Tuy nhiên các acid amin tự do và các acid amin liên kết trong cấu trúc protein không giống nhau về tốc độ thủy phân hoặc phân hủy. Vì vậy việc dùng chất chuẩn nội để hiệu chỉnh sự mất mát trong quá trình thủy phân có thể cho kết quả không đáng tin cậy. Cần chú ý điều này khi biện giải kết quả phân tích. Ta còn có thể thêm chất chuẩn nội vào hỗn hợp các acid amin sau khi đã được thủy phân để hiệu chỉnh những sai lệch về kết quả phân tích gây ra do các sai lệch khi tiêm mẫu, do thay đổi độ ổn định của thuốc thử cũng như tốc độ dòng của dung môi. Chất chuẩn nội lý tưởng là một acid amin bậc nhất nhân tạo, có sẵn trên thị trường với giá rẻ. Chất này phải bền vững trong quá trình thủy phân, có hệ số đáp ứng tuyến tính với nồng độ và phải được rửa giải cho một pic có thời gian lưu duy nhất và được phân giải tốt với các pic tương ứng với các acid amin khác. Các chất chuẩn nội thường được dùng bao gồm norleucin, nitrotyrosin và acid α -aminobutyric.

Thủy phân protein

Cần thiết phải tiến hành thủy phân các mẫu thử protein và peptid trước khi phân tích các acid amin tạo thành. Để tránh sai kết quả, các đồ thủy tinh dùng trong thủy phân phải hết sức sạch. Dầu vân tay trên ống thủy phân hoặc bột tách ra từ bao tay cũng có thể làm nhiễm bản mẫu thử. Để rửa sạch các ống thủy tinh dùng trong thủy phân (ống thủy phân), ta đun sôi chúng 1 h trong dung dịch acid hydrochloric 1 M hoặc ngâm chúng trong acid nitric đậm đặc hoặc trong hỗn hợp đồng thể tích acid hydrochloric và dung dịch nitric đậm đặc. Sau đó tráng sạch bằng nước cất tinh khiết cao, tiếp đến bằng methanol dùng trong sắc ký lỏng cao áp. Cuối cùng sấy qua đêm trong tủ sấy rồi bảo quản kín cho đến khi dùng. Cũng có thể nung đồ thủy tinh dùng để thủy phân ở nhiệt độ 500 °C trong 4 h để tránh nhiễm bẩn. Cũng có thể sử dụng loại dụng cụ thích hợp, chỉ dùng một lần rồi bỏ.

Thủy phân bằng acid là phương pháp thông dụng nhất để thủy phân một mẫu thử protein trước khi tiến hành phân tách các acid amin tạo ra mẫu thử đó. Thủy phân bằng acid có thể cho kết quả phân tích thay đổi vì một số acid amin bị phân hủy một phần hay hoàn toàn. Cụ

thể là: Tryptophan bị phân hủy, serin và threonin bị phân hủy một phần, methionin có thể bị oxy hóa còn cystein thì chuyển đổi thành cystin (tuy nhiên lượng cystin tìm thấy được thường thấp hơn thực tế vì một phần bị phân hủy hoặc bị khử trở lại thành cystein). Có thể giảm thiểu sự phân hủy do bị oxy hóa bằng cách tiến hành thủy phân trong môi trường chân không thích hợp (áp suất thấp hơn 200 μm thủy ngân hoặc 26,7 Pa) hoặc bằng cách nạp một khí trơ (argon) vào khoảng trống phía trên của bình phản ứng. Các đường nối peptid giữa isoleucin - isoleucin, valin - valin, isoleucin - valin và valin - isoleucin chỉ có một phần được cắt đứt để giải phóng acid amin thôi. Asparagin và glutamin đều bị khử amid để thành acid aspartic và acid glutamic tương ứng. Vì tryptophan, asparagin và glutamin bị mất mát trong khi thủy phân bằng acid nên ta chỉ còn định lượng được 17 acid amin. Một số kỹ thuật thủy phân mô tả sau đây sẽ đề cập cách khắc phục các trở ngại nêu trên. Tuy nhiên một số kỹ thuật (từ số 4 đến số 11) lại có thể biến đổi một số acid amin khác. Vì vậy cần cân nhắc lợi hại khi chọn kỹ thuật thủy phân protein/peptid và phải thực nghiệm thích hợp trước khi chọn một kỹ thuật thủy phân khác kỹ thuật thủy phân bằng acid.

Thường hay dùng phương pháp phân tích acid amin theo chương trình thời gian thủy phân (tức là phân tích acid amin ở các thời điểm thủy phân là 24 h, 48 h và 72 h) để xác định nồng độ ban đầu của các acid amin dễ bị phân hủy hoặc chậm bị phân tách khi thủy phân: Vẽ đồ thị biểu thị sự liên quan giữa nồng độ thu được của acid amin dễ bị phân hủy (ví dụ serin, threonin) với thời gian thủy phân rồi ngoại suy tới điểm gốc thời gian, ta sẽ được nồng độ ban đầu (nồng độ ở gốc thời gian) của acid amin dễ bị phân hủy đó. Áp dụng phương pháp chương trình thời gian thủy phân này cho các acid amin chậm được phân tách (ví dụ isoleucin và valin), trên đồ thị sẽ có một đoạn bằng (đoạn thẳng nằm ngang) ứng với nồng độ của acid amin cần phân tích đó. Nếu thời gian thủy phân quá dài, nồng độ của các acid amin cần phân tích sẽ bắt đầu giảm, chứng tỏ acid amin đó đã bị phân hủy do điều kiện thủy phân.

Một cách khác của phân tích acid amin theo chương trình thời gian thủy phân được chấp thuận là cho một chuẩn acid amin trải qua cùng các điều kiện như khi thủy phân mẫu thử protein/peptid. Acid amin chuẩn, ở thể tự do, có thể sẽ không có kết quả hoàn toàn tiêu biểu cho tốc độ phân hủy của các acid amin dễ bị phân hủy có trong mẫu thử protein/peptid. Điều này đặc biệt đúng đối với các liên kết peptid chậm bị phân tách (như liên kết isoleucin - valin). Tuy nhiên cách phân tích này sẽ cho phép giải thích một vài trường hợp phân hủy acid amin trong mẫu thử.

Cách thủy phân bằng acid trong lò vi sóng cũng đã được sử dụng, cho kết quả nhanh chóng nhưng đòi hỏi thiết bị đặc biệt và cẩn thận trọng đặc biệt. Phải xác định được các điều kiện thủy phân trong lò vi sóng tối ưu cho mỗi mẫu thử protein/peptid riêng biệt. Thủy phân trong lò vi sóng chỉ cần thời gian ít phút, nhưng nếu chỉ thêm hoặc bớt một

phút so với yêu cầu thì cũng sẽ có thể có kết quả sai lệch (hoặc do các acid amin dễ bị phân hủy sẽ bị phân hủy hoặc do mẫu thử chưa được thủy phân hoàn toàn).

Cách thủy phân hoàn toàn bằng một hỗn hợp các men protease cũng được áp dụng nhưng phức tạp, đòi hỏi phải được kiểm soát chặt chẽ và thường được áp dụng nhiều để phân tích các peptid hơn là các protein.

Khi tiến hành phân tích lần đầu một mẫu thử protein mới, cần phải làm thực nghiệm để xác định các điều kiện tối ưu về thời gian và nhiệt độ thủy phân.

Kỹ thuật thủy phân 1

Thủy phân bằng acid hydrochloric có chứa một lượng phenol là kỹ thuật thông dụng nhất để thủy phân mẫu thử protein/peptid trước khi tiến hành phân tích acid amin. Thêm phenol vào môi trường thủy phân cốt để ngăn ngừa hiện tượng halogen hóa tyrosin.

Dung dịch thủy phân: Dung dịch acid hydrochloric 6 M chứa từ 0,1 % đến 1 % phenol.

Thủy phân pha lỏng: Cho vào ống thủy phân mẫu thử protein/peptid rồi làm khô (để loại nước, tránh pha loãng dung dịch thủy phân). Cứ 500 μg mẫu thử đông khô, ta thêm 200 μl dung dịch thủy phân. Làm lạnh ống thử trong acetone đông băng khan. Hàn ống thủy phân ở chân không. Thủy phân mẫu thử trong 24 h ở 110 $^{\circ}\text{C}$ và trong chân không hoặc khí trơ để tránh oxy hóa. Nếu lo ngại mẫu thử chưa được thủy phân hoàn toàn, cần nghiên cứu kéo dài thêm thời gian thủy phân (ví dụ trong 48 h và 72 h).

Thủy phân pha hơi: Đây là một trong các kỹ thuật thủy phân thông dụng nhất được ưa dùng để làm vi phân tích, khi chỉ có một lượng nhỏ mẫu thử. Kỹ thuật này cũng cho phép giảm thiểu việc mẫu thử bị nhiễm bẩn bởi dung dịch thủy phân. Đặt ống thủy phân chứa mẫu thử đã làm khô trong một ống thử to hơn, ống này chứa một lượng thích hợp dung dịch thủy phân và như vậy ngăn không cho mẫu thử tiếp xúc trực tiếp với dung dịch thủy phân. Hút chân không (áp suất thấp hơn 200 μm thủy ngân hoặc 26,7 Pa), hoặc bơm một khí trơ vào phần trên của ống thử. Hàn ống lớn và thủy phân ở 110 $^{\circ}\text{C}$ trong 24 h. Hơi acid sẽ thủy phân mẫu thử và lượng acid ngưng tụ trong ống thủy phân chứa mẫu thử là tối thiểu. Sau khi thủy phân xong, sấy khô mẫu thử trong chân không để loại bỏ acid dư thừa.

Kỹ thuật thủy phân 2

Giảm hiện tượng oxy hóa tryptophan trong khi thủy phân bằng cách dùng acid mercaptoethansulfonic (MESA) làm acid khử.

Dung dịch thủy phân: Dung dịch MESA 2,5 M.

Thủy phân pha hơi: Làm khô 1 μg đến 100 μg mẫu thử protein/peptid trong ống thủy phân. Đặt ống thủy phân trong một ống lớn hơn, chứa khoảng 200 μl dung dịch thủy phân. Hàn ống lớn trong chân không (áp suất khoảng 50 μm thủy ngân hoặc 6,7 Pa). Thủy phân ở 170 $^{\circ}\text{C}$ đến 185 $^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 12,5 min. Sau khi thủy phân xong làm khô ống thủy phân ở chân không trong 15 min để loại acid dư thừa.

Kỹ thuật thủy phân 3

Ngăn ngừa hiện tượng oxy hóa tryptophan bằng cách dùng acid thioglycolic (TGA) làm acid khử.

Dung dịch thủy phân: Dung dịch acid hydrochloric 7 M chứa 1 % phenol, 10 % acid trifluoroacetic và 20 % acid thioglycolic.

Thủy phân pha hơi: Làm khô từ 10 µg đến 50 µg mẫu thử protein/peptid trong một ống thủy phân. Đặt ống thủy phân trong một ống lớn hơn, chứa khoảng 200 µl dung dịch thủy phân. Hàn ống lớn trong chân không (áp suất khoảng 50 µm thủy ngân hoặc 6,7 Pa). Thủy phân mẫu thử ở 166 °C trong khoảng 15 min đến 30 min. Sau khi thủy phân xong, làm khô ống thủy phân trong chân không trong 5 min để loại acid dư thừa.

Lượng tryptophan tìm thấy có thể phụ thuộc vào lượng mẫu lấy thử.

Kỹ thuật thủy phân 4

Oxy hóa cystein/cystin và methionin bằng acid performic trước khi thủy phân mẫu thử.

Dung dịch oxy hóa: Dùng acid performic mới pha bằng cách trộn đều 1 thể tích hydrogen peroxid 30 % (TT) với 9 thể tích acid formic khan (TT), rồi để ở nhiệt độ phòng trong 1 h.

Tiến hành: Hòa tan mẫu thử protein/peptid trong 20 µl acid formic khan (TT) và để ở 50 °C trong 5 min. Sau đó thêm 100 µl dung dịch oxy hóa. Để phản ứng xảy ra trong 10 min đến 30 min. Cystein sẽ chuyển thành acid cysteic, còn methionin thành methionin sulfon. Ly tâm chân không để loại thuốc thử thừa, rồi thủy phân mẫu thử đã được oxy hóa theo kỹ thuật 1 hoặc 2 nói trên.

Kỹ thuật 4 này có thể làm biến đổi tyrosin khi môi trường có muối halid.

Kỹ thuật thủy phân 5

Oxy hóa cystein/cystin trong quá trình thủy phân pha lỏng bằng natri azid.

Dung dịch thủy phân: Thêm vào dung dịch acid hydrochloric 6 M (TT) có chứa 0,2 % phenol một lượng natri azid (TT) để có nồng độ 0,2 %. Phenol có trong dung dịch thủy phân ngăn ngừa sự halogen hóa của tyrosin.

Thủy phân pha lỏng: Thủy phân mẫu thử protein/peptid ở 110 °C trong 24 h. Trong quá trình thủy phân, cystein/cystin trong mẫu thử chuyển thành acid cysteic bởi tác dụng của natri azid có trong dung dịch thủy phân. Kỹ thuật 5 này cho kết quả tìm thấy của tyrosin tốt hơn kỹ thuật 4 nhưng lại không định lượng được methionin. Methionin chuyển thành hỗn hợp của methionin với 2 dẫn chất oxy hóa là methionin sulfoxid và methionin sulfon.

Kỹ thuật thủy phân 6

Oxy hóa cystein/cystin bằng dimethyl sulfoxid (DMSO) (TT).

Dung dịch thủy phân: Thêm vào dung dịch acid hydrochloric 6 M, chứa 0,1 % đến 1 % phenol, một lượng DMSO để được dung dịch nồng độ DMSO 2 % (tt/tt).

Thủy phân pha hơi: Tiến hành thủy phân mẫu thử protein/peptid ở khoảng 110 °C trong 24 h. Trong quá trình thủy phân, cystein/cystin có trong mẫu thử sẽ bị DMSO có trong dung dịch thủy phân chuyển thành acid cysteic. Để hạn chế sự bất ổn định của kết quả thu được và để chỉnh lý những sai lệch do sự phân hủy từng phần, người ta khuyến nên xác định kết quả tìm thấy acid cysteic sau khi đã thủy phân oxy hóa các mẫu protein chuẩn chứa từ 1 mol đến 8 mol cystein. Các hệ số đáp ứng thu được từ các dung dịch thủy phân protein/peptid thường thấp hơn khoảng 30 % so với hệ số đáp ứng thu được từ các chuẩn acid cysteic không qua thủy phân.

Vì histidin, methionin, tyrosin và tryptophan đều bị biến đổi nên kỹ thuật 6 này không cho kết quả phân tích đầy đủ thành phần cấu tạo của protein/peptid.

Kỹ thuật thủy phân 7

Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng pyridylethyl hóa ở pha hơi.

Dung dịch khử: Cho vào một bình thích hợp: 83,3 µl pyridin (TT), 16,7 µl 4-vinylpyridin, 16,7 µl tributyl phosphin và 83,3 µl nước cất rồi trộn đều.

Tiến hành: Cho vào ống thủy phân một lượng mẫu thử protein/peptid (trong khoảng từ 1 µg đến 100 µg). Đặt ống thủy phân vào một ống lớn hơn đã có sẵn dung dịch khử. Hàn kín ống lớn ở chân không (áp suất khoảng 50 µm thủy ngân hoặc 6,7 Pa) rồi làm nóng ở 100 °C trong 5 min. Sau đó lấy ống thủy phân ra, làm khô trong bình hút ẩm chân không trong 15 min để loại bỏ thuốc thử dư thừa. Cuối cùng thủy phân mẫu thử đã được pyridylethyl hóa, theo một trong các kỹ thuật thủy phân mô tả ở trên. Song song, tiến hành pyridylethyl hóa trong cùng điều kiện một mẫu chuẩn protein chứa 1 mol đến 8 mol cystein để xác định giá trị tìm thấy của pyridylethyl cystein.

Chú ý: Việc kéo dài thời gian phản ứng pyridylethyl hóa sẽ gây biến đổi các nhóm α-amino và ε-amino của lysin có trong mẫu thử protein/peptid.

Kỹ thuật thủy phân 8

Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng pyridylethyl hóa ở pha lỏng.

Các dung dịch gốc: Pha chế và lọc 3 dung dịch trong nước sau đây:

Dung dịch gốc A: Dung dịch Tris-hydroclorid 1 M (pH 8,5) chứa 4 mM dinatri edetat.

Dung dịch gốc B: Dung dịch guanidin hydroclorid 8 M.

Dung dịch gốc C: Dung dịch 2-mercaptoethanol 10 %.

Dung dịch khử: Pha hỗn hợp gồm 1 thể tích dung dịch gốc A và 3 thể tích dung dịch gốc B để có dung dịch đệm guanidin hydroclorid 6 M trong Tris-hydroclorid 0,25 M. **Tiến hành:** Hòa tan khoảng 10 µg mẫu thử protein/peptid trong 50 µl dung dịch khử, rồi thêm 2,5 µl dung dịch gốc C. Để 2 h ở nhiệt độ phòng, trong khí nitrogen hoặc argon và ở chỗ tối. Để thực hiện phản ứng pyridylethyl hóa, thêm vào khoảng 2 µl 4-vinylpyridin và để yên 2 h trong tối, ở nhiệt độ phòng. Sau đó, loại tạp bằng cách tách bằng sắc

ký lỏng cao áp pha đảo. Làm khô mẫu thử protein/peptid sau khi qua sắc ký bằng cách ly tâm chân không rồi tiến hành thủy phân bằng acid.

Kỹ thuật thủy phân 9

Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng carboxymethyl hóa ở pha lỏng.

Các dung dịch gốc: Pha như ở kỹ thuật thủy phân 8.

Dung dịch carboxymethyl hóa: Dung dịch iodoacetamid 10 % trong ethanol 96 %.

Dung dịch đệm: Dùng dung dịch khử của kỹ thuật thủy phân 8.

Tiến hành: Hòa tan mẫu thử protein/peptid trong 50 µl dung dịch đệm, thêm khoảng 2,5 µl dung dịch gốc C. Bảo quản 2 h trong khí nitrogen hoặc argon ở nhiệt độ phòng và trong tối. Thêm một lượng dung dịch carboxymethyl hóa gấp 1,5 lần tổng lượng các thiol có trong mẫu thử theo lý thuyết. Nếu không biết hàm lượng các thiol trong mẫu thử thì cứ 20 nanomol protein dùng 5 µl dung dịch iodoacetamid 100 mM. Để tiếp 30 min trong tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm lượng dư 2-mercaptoethanol để dùng phản ứng. Loại tạp và thu phần protein/peptid bằng cách phân tách trên sắc ký lỏng pha đảo. Làm khô phần protein/peptid thu được bằng ly tâm chân không trước khi thủy phân bằng acid.

Chất S-carboxyamidomethylcystein mới tạo thành được chuyển đổi thành S-carboxymethylcystein trong quá trình thủy phân.

Kỹ thuật thủy phân 10

Cystein/cystin tác dụng với acid dithiodiglycolic hoặc acid dithiodipropionic để cho một disulfid hỗn tạp. Tùy theo yêu cầu về độ phân giải của kỹ thuật phân tích acid amin được áp dụng mà chọn dùng acid dithiodiglycolic hoặc acid dithiodipropionic.

Dung dịch khử: Dung dịch acid dithiodiglycolic (hoặc acid dithiodipropionic) 1 % trong dung dịch NaOH 0,2 M.

Tiến hành: Cho vào ống thủy phân khoảng 20 µg mẫu thử protein/peptid. Thêm 5 µl dung dịch khử và 10 µl isopropanol. Ly tâm chân không để loại pha lỏng rồi thủy phân mẫu thử theo kỹ thuật thủy phân 1.

Kỹ thuật 10 này có lợi là các thành phần acid amin khác trong mẫu thử không bị ảnh hưởng của phản ứng và không cần loại tạp trước khi thủy phân.

Kỹ thuật thủy phân 11

Trong quá trình thủy phân bằng acid, asparagin và glutamin được chuyển đổi thành acid aspartic và acid glutamic tương ứng. Asparagin và acid aspartic được biểu thị bằng một đại lượng chung Asx, còn glutamin và acid glutamic bằng Glx. Trái lại, khi thủy phân bằng acid với sự có mặt của thuốc thử bis (1,1-trifluoroacetoxy)iodobenzen (BTI), asparagin và glutamin bị tác dụng và chuyển tương ứng thành acid diaminopropionic và acid diaminobutyric. Nhờ đó, ta xác định được asparagin và glutamin trong protein/peptid ngay khi có mặt của acid aspartic và acid glutamic.

Các dung dịch khử: Pha chế và lọc 3 dung dịch sau:

Dung dịch A: Dung dịch acid trifluoroacetic 10 mM.

Dung dịch B: Dung dịch chứa guanidin hydroclorid 5 M và acid trifluoroacetic 10 mM.

Dung dịch C: Dung dịch mới pha BTI 3,6 % trong dimethylformamid.

Tiến hành: Cho vào một ống thủy phân sạch khoảng 200 µg mẫu thử protein/peptid, 2 ml dung dịch A hoặc dung dịch B và 2 ml dung dịch C. Hàn ống thủy phân trong chân không. Để 4 h ở nhiệt độ 60 °C, trong tối. Sau đó thấm tách mẫu thử bằng nước cất để loại bỏ thuốc thử dư thừa. Chiết mẫu thử đã thấm tách 3 lần bằng 3 thể tích tương đương butyl acetat (TT), rồi làm đông khô.

Cuối cùng thủy phân mẫu thử đông khô theo các kỹ thuật thủy phân đã nói ở trên.

Các acid α,β-diaminopropionic và α,γ-diaminobutyric đều không được phân giải rõ ràng với lysin có trong mẫu thử, khi phân tách bằng sắc ký trao đổi ion. Vì vậy, khi dùng sắc ký trao đổi ion để tách các acid amin, hàm lượng của asparagin và của glutamin có mặt trong mẫu thử được xác định bằng hiệu số giữa hàm lượng của acid aspartic và của acid glutamic tương ứng thu được khi thủy phân acid không có BTI và hàm lượng của acid aspartic và của acid glutamic tương ứng thu được khi thủy phân có BTI.

Hàm lượng của threonin, methionin, cystein, tyrosin và histidin có thể bị sai lệch khi thủy phân bằng acid có BTI. Vì vậy, muốn có giá trị đúng của các hàm lượng này, mẫu thử phải được thủy phân bằng acid, không có thuốc thử BTI.

Tách và phát hiện các acid amin

Có nhiều kỹ thuật để tách và phát hiện các acid amin. Lựa chọn kỹ thuật nào phụ thuộc vào yêu cầu về độ nhạy của phép định lượng. Nhìn chung, khoảng một nửa các phép phân tích acid amin dựa trên việc tách thành acid amin tự do bằng sắc ký lỏng trao đổi ion rồi tạo dẫn chất sau cột phân tách. Kỹ thuật tạo dẫn chất sau cột có thể áp dụng cho các mẫu thử có một lượng nhỏ chất đệm (như các muối và urê) và thường cần từ 5 µg đến 10 µg mẫu thử protein cho một lần phân tích.

Các kỹ thuật còn lại, bao gồm việc tạo các dẫn chất trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Các kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột rất nhạy và thường chỉ cần từ 0,5 µg đến 1,0 µg mẫu thử protein/peptid cho mỗi lần phân tích, nhưng lại có thể bị ảnh hưởng bởi các muối đệm có trong mẫu thử. Mặt khác, kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột còn có thể cho nhiều dẫn chất khác nhau của cùng một acid amin, do đó gây trở ngại cho việc biện giải kết quả phân tích. So với kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột, thường kỹ thuật tạo dẫn chất sau cột ít bị ảnh hưởng bởi các biến thiên trong việc thực hiện phép định lượng hơn.

Có thể dùng các kỹ thuật sau đây để phân tích định lượng các acid amin.

Thiết bị và thuốc thử đều có sẵn trên thị trường. Hơn nữa, hiện có nhiều cải tiến về các mặt như pha chế thuốc thử, cách tiến hành phản ứng, thiết bị sắc ký dùng trong các kỹ thuật này, v.v.... Các thông số đặc trưng có thể thay đổi tùy thuộc vào thiết bị đã dùng và cách tiến hành phân tích. Nhiều phòng thí nghiệm còn áp dụng đồng thời nhiều kỹ thuật chứ không chỉ một, để tận dụng lợi ích của mỗi kỹ thuật đã áp dụng. Trong các kỹ thuật sau đây, tín hiệu tương tự được hiển thị trên máy ghi và diện tích các pic được tích phân để định lượng.

Kỹ thuật 1: Tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử ninhydrin
Sắc ký trao đổi ion tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử ninhydrin là một trong các kỹ thuật thông dụng nhất để phân tích định lượng các acid amin. Theo nguyên tắc, sắc ký trao đổi cation, dùng lithi làm đối ion trong pha động được áp dụng để phân tích các mẫu thử sinh học phức tạp; trái lại, sắc ký trao đổi cation, dùng natri làm đối ion trong pha động, nhanh hơn, được dùng với các mẫu thử đơn giản hơn, gồm hỗn hợp các acid amin đã được thủy phân từ protein/peptid ra (tiêu biểu gồm 17 acid amin khác nhau). Việc phân tích acid amin trên cột trao đổi ion được thực hiện thông qua sự phối hợp giữa thay đổi pH và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Chương trình nhiệt độ cũng thường được áp dụng để tăng nhanh sự phân tách.

Các acid amin bậc nhất tác dụng với ninhydrin cho hợp chất màu tím, hấp thụ cực đại ở bước sóng 570 nm. Trái lại, các acid amin bậc 2 (các imino acid) như prolin, tác dụng với ninhydrin cho hợp chất màu vàng, hấp thụ cực đại ở 440 nm. Vì vậy ta phát hiện các dẫn chất của acid amin thu được sau cột ở các bước sóng 440 nm và 570 nm. Đối với đa số các dẫn chất acid amin, giới hạn phát hiện được xác định là 10 picomol; đối với dẫn chất của prolin, giới hạn đó là 50 picomol. Khoảng tuyến tính là 20 picomol đến 500 picomol, với hệ số tương quan $r > 0,999$. Để có kết quả tốt, dùng một lượng mẫu thử lớn hơn 1 μg để thủy phân trước khi phân tích các acid amin trong protein/peptid là thích hợp nhất.

Kỹ thuật 2: Tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử OPA

Thuốc thử ortho-phthalaldehyd (OPA) tác dụng với các amin bậc nhất, khi có mặt một hợp chất thiol, cho các hợp chất isoindol phát huỳnh quang. OPA không tác dụng với các amin bậc 2 (các imino acid như prolin) để có hợp chất phát huỳnh quang; tuy nhiên, nếu oxy hóa chúng bằng natri hypochlorid hoặc cloramin T thì phản ứng với OPA sẽ xảy ra. Do đó, để phân tích các acid amin trong mẫu thử protein/peptid bằng kỹ thuật này, ta phải tách các acid amin tự do bằng sắc ký trao đổi cation mạnh rồi oxy hóa sau cột bằng natri hypochlorid hoặc cloramin T và tiếp đó tạo dẫn chất phát huỳnh quang bằng thuốc thử OPA với sự có mặt của một hợp chất thiol như N-acetyl-L-cystein hoặc 2-mercaptoethanol. Các acid amin bậc nhất không bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa nói trên.

Việc tách các acid amin bằng sắc ký lỏng trao đổi ion được thực hiện nhờ sự phối hợp giữa việc thay đổi pH và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Sau khi được phân tách, các dẫn chất phát huỳnh quang sẽ được phát hiện với bước sóng kích thích ở 348 nm và bước sóng phát quang ở 450 nm.

Giới hạn phát hiện được xác định ở mức một vài chục picomol, đối với đa số các dẫn chất OPA của acid amin. Khoảng tuyến tính là từ vài picomol đến vài chục nanomol. Để có kết quả phân tích tốt, lấy mẫu thử protein/peptid lớn hơn 500 ng để thủy phân.

Kỹ thuật 3: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử PITC

Thuốc thử phenylisothiocyanat (PITC) tác dụng với các acid amin để thành dẫn chất phenylthiocarbamyl (PTC) hấp thụ mạnh bức xạ ở bước sóng 254 nm. Tách các dẫn chất PTC của acid amin, đã được tạo trước cột, bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột octadecylsilyl (ODS) và phát hiện ở bước sóng 254 nm.

Việc phân tách các dẫn chất acid amin bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo được thực hiện nhờ việc phối hợp giữa các thay đổi về nồng độ acetonitril và về lực ion trong pha động.

Đối với đa số các dẫn chất PTC-acid amin, giới hạn phát hiện được xác định là 1 picomol. Khoảng tuyến tính là 20 picomol đến 500 picomol với hệ số tương quan $r > 0,999$. Để có kết quả phân tích tốt, lấy lượng mẫu thử lớn hơn 500 ng để thủy phân.

Chú ý: Sau khi đã loại bỏ trong chân không thuốc thử dư, các dẫn chất PTC-acid amin có thể bảo quản khô và đông băng trong vài tuần lễ mà không có sự phân hủy nào đáng kể. Nếu dung dịch để tiêm vào máy sắc ký được bảo quản lạnh, sau 3 ngày cũng chưa thấy suy giảm đáp ứng sắc ký nào đáng kể xảy ra.

Kỹ thuật 4: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử AQC

Thuốc thử 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AQC) tác dụng với các acid amin tạo thành các dẫn chất urê bất đối xứng, ổn định, phát huỳnh quang (các dẫn chất AQC-acid amin) và được phân tách bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Do đó, ta tạo dẫn chất AQC trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và phát hiện bằng detector huỳnh quang, ở bước sóng kích thích 250 nm và bước sóng phát quang ở 395 nm. Việc phân tách được thực hiện nhờ việc phối hợp sự thay đổi nồng độ acetonitril và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Tiêm trực tiếp hỗn hợp mẫu thử và thuốc thử vào máy sắc ký. Không có nhiều đáng kể gây ra bởi 6-aminoquinolin, sản phẩm thứ cấp chủ yếu phát huỳnh quang của thuốc thử. Thuốc thử dư được thủy phân nhanh chóng (nửa đời < 15 s) thành các chất 6-aminoquinolin, N-hydroxysuccinimid và carbon dioxyl và sau 1 min, không còn phản ứng tạo dẫn chất xảy ra.

Diện tích pic của các dẫn chất AQC-acid amin không thay đổi chủ yếu trong thời gian 1 tuần, ở nhiệt độ phòng. Nhờ tính ổn định này, có thể tiến hành phân tích qua đêm trên các máy tự động được.

Giới hạn phát hiện được xác định ở vào khoảng từ 40 femtomol đến 320 femtomol, tính cho mỗi acid amin, trừ cystein. Giới hạn phát hiện của cystein xấp xỉ bằng 800 femtomol. Khoảng tuyến tính là từ 2,5 micromol đến 200 micromol, với hệ số tương quan $r > 0,999$. Có thể thu được kết quả phân tích tốt với lượng mẫu protein/peptid lấy thử thấp tới 30 ng.

Kỹ thuật 5: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA

Thuốc thử ortho-phthalaldehyd (OPA), khi có mặt một hợp chất thiol (có thể dùng 2-mercaptoethanol hoặc acid 3-mercaptopropionic), sẽ tác dụng với các amin bậc nhất để cho một hợp chất isoindol phát huỳnh quang mạnh. Bản thân thuốc thử OPA không phát huỳnh quang, nên không gây trở ngại. Mặt khác, vì OPA dễ tan và ổn định trong nước đồng thời cho phản ứng nhanh nên có thể tạo dẫn chất và phân tích mẫu thử một cách tự động, dùng thiết bị tự nạp mẫu thử để trộn lẫn mẫu thử với thuốc thử. Tuy nhiên, OPA không cho phản ứng với các amin bậc 2, nên kỹ thuật 5 này không áp dụng được để phân tích các acid amin có hóa chức amin bậc 2 như prolin. Để khắc phục, phải phối hợp kỹ thuật 5 này với kỹ thuật 7 hoặc 8 mô tả sau đây.

Vì dẫn chất OPA-acid amin không bền vững nên sau khi tạo dẫn chất trước cột, phải tiến hành phân tích ngay trên sắc ký lỏng cao áp pha đảo và phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 348 nm và bước sóng phát quang 450 nm.

Giới hạn phát hiện bằng huỳnh quang thấp tới 50 femtomol đã được báo cáo. Tuy nhiên, giới hạn phát hiện thực tế của phép phân tích là 1 picomol.

Kỹ thuật 6: Tạo dẫn chất trước cột bằng thuốc thử DABS-Cl
Thuốc thử dimethylamino-azobenzensulfonyl clorid (DABS-Cl) là một thuốc thử cho màu để phát hiện acid amin. Các dẫn chất tạo thành (DABS-acid amin) rất bền vững và hấp thụ cực đại ở bước sóng 436 nm. Tạo các dẫn chất này trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và phát hiện kết quả ở bước sóng 436 nm.

Kỹ thuật này có thể phân tích cả các acid amin bậc nhất và acid amin bậc hai (như prolin) với cùng độ nhạy như nhau. Còn có thể định lượng đồng thời thành phần tryptophan có trong mẫu thử protein/peptid sau khi đã thủy phân mẫu thử bằng các acid sulfonic như: acid mercaptoethansulfonic, acid p-toluensulfonic hoặc acid methansulfonic như đã mô tả ở kỹ thuật thủy phân 2 ở trên. Các thành phần khác dễ hỏng vì acid như asparagin và glutamin cũng được phân tích sau khi đã làm phản ứng chuyển đổi thành acid diaminopropionic và acid diaminobutyric tương ứng bằng phản ứng với thuốc thử BTI đã mô tả ở kỹ thuật thủy phân 11 ở trên.

Trong kỹ thuật này, không dùng norleucin nhân tạo để làm chuẩn nội, vì nó được rửa giải ra tại vùng đáy đặc các pic của các acid amin bậc nhất trên sắc đồ. Có thể dùng

nitrotyrosin làm chuẩn nội vì nó được rửa giải ra tại vùng có ít pic trên sắc đồ.

Giới hạn phát hiện các DABS-acid amin ở khoảng 1 picomol. Lượng nhỏ từ 2 đến 5 picomol của một DABS-acid amin nào đó cũng có thể cho kết quả định lượng đáng tin cậy, và chỉ cần dùng 10 ng đến 30 ng protein thủy phân đã được dẫn chất hóa cho mỗi lần phân tích.

Kỹ thuật 7: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử FMOC-Cl

Thuốc thử 9-fluorenylmethyl cloroformat (FMOC-Cl) tác dụng với acid amin bậc nhất và acid amin bậc hai để tạo thành các dẫn chất FMOC-acid amin phát huỳnh quang mạnh.

Phản ứng xảy ra nhẹ nhàng trong môi trường nước, trong 30 s. Các dẫn chất được tạo thành đều bền vững, chỉ riêng dẫn chất của histidin là có biểu hiện phân hủy nào đó. Mặc dù bản thân thuốc thử và các sản phẩm phụ của phản ứng đều phát huỳnh quang nhưng ta có thể loại chúng đi không làm mất mát các dẫn chất FMOC-acid amin.

Sau khi tạo dẫn chất trước cột, tiến hành tách các FMOC-acid amin bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS với chương trình gradient dung môi, biến thiên tuyến tính từ hỗn hợp gồm 10 thể tích acetonitril, 40 thể tích methanol và 50 thể tích đệm acid acetic đến hỗn hợp gồm 50 thể tích acetonitril, 50 thể tích đệm acid acetic. Phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 260 nm và bước sóng phát quang 313 nm. Có thể phân tích được 20 dẫn chất acid amin trong vòng 20 min.

Giới hạn phát hiện vào cỡ femtomol. Đa số các acid amin có khoảng tuyến tính từ 0,1 micromol đến 50 micromol.

Kỹ thuật 8: Tạo dẫn chất trước cột bằng thuốc thử NBD-F

Thuốc thử 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) tác dụng với cả acid amin bậc nhất và acid amin bậc 2, ở nhiệt độ 60 °C, trong 5 min, để cho các dẫn chất NBD-acid amin phát huỳnh quang mạnh. Sau khi tạo dẫn chất trước cột, tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và chương trình gradient dung môi gồm acetonitril và hỗn hợp đệm trong nước. 17 dẫn chất acid amin được tách ra trong vòng 35 min. Có thể dùng acid ϵ -aminocaproic làm chất chuẩn nội, vì được rửa giải ở vùng ít pic trên sắc đồ. Phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang, ở bước sóng kích thích 480 nm và bước sóng phát quang ở 530 nm.

Kỹ thuật này có độ nhạy gần tương tự như độ nhạy của kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA (kỹ thuật 5) đối với các acid amin, trừ prolin không phân tích được bằng kỹ thuật 5 vì không phản ứng với thuốc thử OPA. Như vậy, kỹ thuật 8 này ích lợi hơn kỹ thuật 5.

Giới hạn phát hiện mỗi acid amin ở khoảng 10 femtomol và lượng mẫu thử protein/peptid thủy phân cần lấy để tạo dẫn chất trước cột ở khoảng 1,5 mg.

Tính kết quả

Khi xác định hàm lượng các acid amin trong một mẫu thử protein/peptid, cần nhớ rằng, trong quá trình thủy phân bằng acid, tryptophan và cystein bị phá hủy, serin

và threonin bị phá hủy một phần, valin và isoleucin không được tách hoàn toàn, methionin có thể bị oxy hóa và một vài acid amin như glycin và serin thường bị nhiều. Tiến hành phân tích ở môi trường chân không thích hợp (áp suất thấp hơn 200 μm thủy ngân hoặc 26,7 Pa) hoặc ở môi trường có khí trơ (như argon) khi thủy phân pha hơi, có thể giảm mức phân hủy do bị oxy hóa. Các kết quả định lượng cystein, tryptophan, threonin, isoleucin, valin, methionin, glycin và serin trong một mẫu thử protein/peptid đã thủy phân có thể thay đổi và do đó thường cần tiến hành xem xét đánh giá bổ sung.

Tính tỷ lệ phần trăm hàm lượng của một loại acid amin có trong mẫu thử protein/peptid

Đó là số lượng nanomol của một loại acid amin có trong 100 nanomol của toàn thể các acid amin có trong mẫu thử protein/peptid. Tỷ lệ này có ích trong việc đánh giá các dữ liệu thu được khi phân tích các acid amin trong một protein mà ta chưa biết khối lượng phân tử. Nó giúp cùng có kết quả định tính một protein/peptid chưa biết bằng cách so sánh tỷ lệ phần trăm hàm lượng mỗi loại acid amin trong mẫu thử chưa biết với tỷ lệ phần trăm hàm lượng của mỗi loại acid amin tương ứng có trong các protein/peptid đã biết.

Tính tỷ lệ phần trăm hàm lượng của một acid amin trong protein/peptid theo công thức sau:

$$\frac{100r_i}{r_t}$$

Trong đó:

r_i là đáp ứng (hàm lượng) tính theo nanomol của acid amin i ;
 r_t là đáp ứng (hàm lượng) tính theo nanomol của tất cả các acid amin thu được trên sắc đồ.

Mẫu thử protein/peptid chưa biết

Xác định khối lượng Q_i (tính theo microgam) của mỗi loại acid amin có mặt trong mẫu protein/peptid chưa biết

Tính bằng công thức sau:

$$Q_i = \frac{m_i \times M_i}{1000}$$

Trong đó:

Q_i là khối lượng (tính theo microgam) của acid amin i có trong mẫu thử;

m_i là hàm lượng (tính theo nanomol) của tất cả các acid amin i tìm thấy trên sắc đồ;

M_i là phân tử lượng trung bình (tính theo gam) của acid amin i , đã được hiệu chỉnh về khối lượng H_2O bị loại khi tạo thành liên kết peptid.

Ước lượng tổng khối lượng của mẫu thử protein/peptid:

Tổng khối lượng ΣQ_i của các loại acid amin tìm thấy cho phép ta ước lượng khối lượng của protein/peptid đem thử sau khi đã hiệu chỉnh về khối lượng mất mát do có sự phân hủy từng phần hoặc toàn phần của một số acid amin để bị phân hủy trong quá trình thủy phân.

Xác định số lượng của mỗi loại acid amin tham gia cấu tạo mẫu thử protein/peptid chưa biết. Nếu xác định được phân tử lượng M_p của protein/peptid đem thử (ví dụ bằng khối phổ), ta tính số lượng của mỗi loại acid amin i theo công thức sau:

$$\frac{m_i}{1000Q_p} = \frac{m_i \times M_p}{1000Q_p M_p}$$

Trong đó:

m_i là hàm lượng (tính theo nanomol) của acid amin i tìm thấy trong mẫu thử;

Q_p là khối lượng (tính theo microgam) của protein đem thử;

M_p là phân tử lượng của protein đem thử (tính theo gam).

Mẫu thử protein/peptid đã biết phân tử lượng và thành phần cấu tạo

Khi phân tích acid amin, một số acid amin cho kết quả tìm thấy tốt, trái lại, một số cho kết quả tìm thấy không sử dụng được vì hoặc bị phân hủy một phần hay toàn phần (ví dụ: tryptophan, cystein, threonin, serin, methionin), hoặc liên kết peptid không được tách hoàn toàn (như liên kết của isoleucin, của valin), hoặc bị nhiễu bởi một số acid amin tự do (như bởi glycin và serin).

Các acid amin cho kết quả tìm thấy tốt điển hình là aspartat-asparagin, glutamat-glutamin, alanin, leucin, phenylalanin, lysin và arginin. Danh sách này có thể thay đổi tùy thuộc vào hệ thống phân tích đã dùng. Các acid amin cho kết quả tìm thấy tốt đại diện cho protein, do đó ta lợi dụng chúng để xác định hàm lượng protein và số lượng của mỗi loại acid amin (còn gọi là thành phần của acid amin) có trong mẫu thử.

Xác định hàm lượng protein trong mẫu thử

Chia hàm lượng (tính theo nanomol) của mỗi loại acid amin có giá trị tìm thấy tốt cho số lượng dự đoán của acid amin đó trong protein để có hàm lượng protein tính theo loại acid amin đó.

Tính giá trị trung bình của tất cả các hàm lượng protein tính được theo từng loại acid amin có giá trị tìm thấy tốt của mẫu thử.

Các hàm lượng protein tính theo từng loại acid amin riêng rẽ phải được phân bố đồng đều xung quanh giá trị trung bình của hàm lượng protein mới tính được ở trên. Phải loại bỏ các giá trị hàm lượng protein riêng rẽ của từng acid amin quá sai lệch với giá trị trung bình đã tính được. Thường các giá trị sai lệch quá 5 % phải loại bỏ. Khi đó, phải tính lại giá trị trung bình của hàm lượng protein mới, dựa trên các giá trị còn lại (không bị loại bỏ) của hàm lượng protein riêng rẽ tính theo từng loại acid amin còn lại.

Xác định số lượng của từng loại acid amin trong mẫu thử

Chia hàm lượng của mỗi loại acid amin cho giá trị trung bình của hàm lượng protein đã tính ở trên, ta được số lượng của loại acid amin đó (tức thành phần acid amin) trong mẫu thử.

Tính sai số tương đối (theo tỷ lệ phần trăm) về thành phần trong mẫu thử

Áp dụng công thức sau để tính sai số tương đối về thành phần đối với một loại acid amin i:

$$\frac{100m_i}{m_{is}}$$

Trong đó:

m_i là hàm lượng, tính theo nanomol, xác định bằng thực nghiệm, của loại acid amin i có trong mẫu thử;

m_{is} là hàm lượng (tính theo nanomol) đã biết của loại acid amin i có trong mẫu thử.

Giá trị sai số tương đối trung bình về thành phần của mẫu thử là giá trị trung bình của tất cả các sai số tương đối về thành phần tính theo từng loại acid amin riêng rẽ, trừ tryptophan và cystein.

Giá trị sai số tương đối trung bình về thành phần của một mẫu thử cung cấp thông tin quan trọng về độ ổn định của phép phân tích theo thời gian. Sự phù hợp giữa giá trị thành phần acid amin trong mẫu thử, tìm thấy bằng thực nghiệm với giá trị thành phần acid amin đã biết trước của protein đem thử có thể giúp cho việc củng cố kết quả định tính và xác định độ tinh khiết của protein trong mẫu thử.

10.12 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHANOL

Sử dụng phương pháp 1 hoặc phương pháp 2 trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

PHƯƠNG PHÁP 1

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), sử dụng các dung dịch sau:

Dung dịch (1): Dung dịch chứa 5,0 % (tt/tt) ethanol (TT) và 5,0 % (tt/tt) propanol (TT) (chuẩn nội) trong nước.

Dung dịch (2): Pha loãng một thể tích chế phẩm thử bằng nước để thu được dung dịch chứa từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt) ethanol.

Dung dịch (3): Chuẩn bị như dung dịch (2) nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để thu được nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch là 5,0 % (tt/tt).

Điều kiện sắc ký:

Có thể áp dụng điều kiện sắc ký như sau:

Cột (1,5 m x 4 mm) được nhồi hạt xốp polymer (100 mesh đến 120 mesh) (Porapak Q hoặc Chromosorb 101 là phù hợp).

Nhiệt độ cột: 150 °C.

Nhiệt độ buồng tiêm và detector: 170 °C.

Tính hàm lượng phần trăm ethanol dựa vào tỷ lệ diện tích pic ethanol so với pic chuẩn nội thu được trên sắc ký đồ của dung dịch (1) và dung dịch (3).

PHƯƠNG PHÁP 2

Với những chế phẩm được phép sử dụng cồn công nghiệp có chứa methanol, xác định hàm lượng ethanol giống như phương pháp 1 nhưng chuẩn bị dung dịch (2) bằng cách

pha loãng một thể tích chế phẩm thử với nước để thu được dung dịch có nồng độ tổng cộng của methanol và ethanol từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt).

Xác định hàm lượng methanol bằng phương pháp sắc ký khí như đã mô tả ở phương pháp 1 nhưng chuẩn bị các dung dịch như sau:

Dung dịch (1): Dung dịch chứa 0,25 % (tt/tt) methanol (TT) và 0,25 % (tt/tt) propanol (TT) (chuẩn nội) trong nước.

Dung dịch (2): Pha loãng một thể tích chế phẩm thử bằng nước để thu được dung dịch chứa từ 0,2 % đến 0,3 % (tt/tt) methanol.

Dung dịch (3): Chuẩn bị như dung dịch (2) nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để thu được nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch này là 0,25 %.

Tổng lượng ethanol và methanol phải ở trong giới hạn quy định cho phép và tỷ số giữa lượng methanol và lượng ethanol tìm được phải tương ứng với tỷ lệ này của cồn công nghiệp có chứa methanol đã sử dụng.

PHƯƠNG PHÁP 3

Phương pháp này dùng cho những chế phẩm và các nguyên liệu dạng lỏng chứa ethanol.

Hàm lượng ethanol có trong một chất lỏng được biểu thị bằng số thể tích ethanol trong 100 thể tích chất lỏng đó ở 20 °C ± 0,1 °C và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo thể tích/thể tích (tt/tt).

Hàm lượng cũng có thể được biểu thị bằng gam ethanol trong 100 g chất lỏng và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo khối lượng/khối lượng (kl/kl).

Phương pháp A

Phương pháp này dùng cho những chế phẩm có chứa các chất tan có khả năng phân tách khỏi ethanol khi chưng cất. Khi cất, nếu trong mẫu thử ngoài ethanol và nước còn có lẫn các chất bay hơi khác thì hướng dẫn thích hợp sẽ được quy định trong chuyên luận riêng.

Liên quan giữa tỷ trọng ở 20 °C ± 0,1 °C, tỷ trọng tương đối (đã hiệu chỉnh ở chân không) và hàm lượng ethanol của hỗn hợp nước và ethanol được ghi trong Bảng 10.12 - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol (Tham khảo theo Khuyến cáo Quốc tế số 22, Tổ chức Quốc tế về Đo lường hợp pháp (1972)).

Thiết bị

Thiết bị (Hình 10.12) bao gồm một bình cầu thủy tinh đáy tròn (A) gắn với một đầu cất có bộ phận bẫy hơi (B), bộ phận này được nối với một ống sinh hàn (C) đặt thẳng đứng. Tiếp theo là một ống dẫn (D) gắn vào phần dưới của ống sinh hàn để dẫn dịch cất vào bình hứng (là bình định mức dung tích 100 ml hoặc 250 ml). Trong suốt quá trình cất, bình hứng này được nhúng trong cốc (E) chứa hỗn hợp đá và nước đá. Một miếng lót đường kính 6 cm đặt dưới bình cất (A) để bảo vệ mẫu không bị cháy.