

**AMİNO ASİDLERİN TAYİN METODLARINA GENEL
BİR BAKIŞ VE BECKMAN 120/B MODEL
OTOMATİK AMİNO ASİT ANALİZERİN ÇALIŞMA
PRENSİBİ**

Nihat Bayşu*

Amino asidler, bilhassa beslenme ve biyokimya yönünden pek büyük bir önem taşımaktadırlar. Gerek besinlerde ve gerekse biyolojik materyalde bulunan amino asidlerin kalite ve kantitelerinin bilinmesinde hekimlik yönünden büyük faydalar vardır.

Amino asidlerin tayini maksadıyla eskidenberi birçok metodlar kullanılmaktadır. Bu hususta ilk metodlardan birisi, amino asidlerin etil esterlerinin vakumda fraksiyonel distilasyona tabi tutulmasıdır. Muayyen amino asit gruplarını birbirinden separe edebilmek için butil alkol kullanılmıştır.

Amino asidlerin nötral, bazik ve asidik gruplar halinde fraksiyone edilmelerinden sonra Van Slyke'nin nitroz asidi metodunun tatbik edilmesi, protein hidrolizatında bulunan amino asidlerin separe edilmesi ve hesaplanması için başvurulmuş ilk metodlardan bir diğerridir. Bu teknikler, zamanımızda nadiren kullanılmaktadır. Bu konuda kullanılan bir diğere metod da elektrodializ metodudur. Bunda, yarı geçirgen bir zarla birbirinden ayrılmış üç parçalı bir düzeneğin orta kompartmanında bulunan bir amino asit karışımından elektrik akımı geçirilmek suretiyle amino asidlerin bir kompartmandan diğerrine farklı şekilde göç ettirilmeleri mümkündür. Amino asidlerin taşıdıkları yükler, özel pH ayarlayıcıları tarafından ayarlanabilir ve bu suretle meselâ, diamin asidler katotta, dikarboksilik asidler anot kompartmanında ve mono amino mono karboksilik asitler de orta kompartmanda toplanabilirler.

* A.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Dr. Asistanı

İzotop seyreltme metodu da bu metodlardan bir diğeridir. İçinde hangi amino asitlerin bulunduğu bilinmeyen bir karışıma izotop ile işaretlenmiş, bilinen bir amino asitten belirli miktarda ilâve edilir. Sonra eklenen amino asit, karışımdan kabil olduğu kadar saf bir halde tekrar elde edilir. Bu saf amino asitte izotop atomunu taşıyan amino asidin hangi oranda seyreltiği tayin edilir. Seyreltme oranından da karışımda önceden mevcut olan o amino asidin miktarı hesaplanır.

Mikrobiyolojik ve enzimatik metodlar da amino asitlerin tayinleri için kullanılmaktadır. Bazı mikroorganizmalar, çoğalmaları için kültür vasatlarında amino asitlerin bulunmasına ihtiyaç gösterirler. Bundan faydalanılarak, sadece tayini yapılacak olan amino asidi önceden ihtiva etmeyen, fakat belirli miktar nümuneyi havi bir ortamda mikroorganizmaların çoğalma derecelerinden hareketle o amino asidin miktarı hesaplanır.

Bakterilerin bazı nev'ilerinde muayyen amino asitleri dekarboksile eden spesifik enzimler mevcuttur. Bunların tesiriyle amino asitten açığa çıkan CO_2 gazının miktarı, manometrik olarak ölçülür. Buradan da o amino asidin miktarı hesaplanır (2).

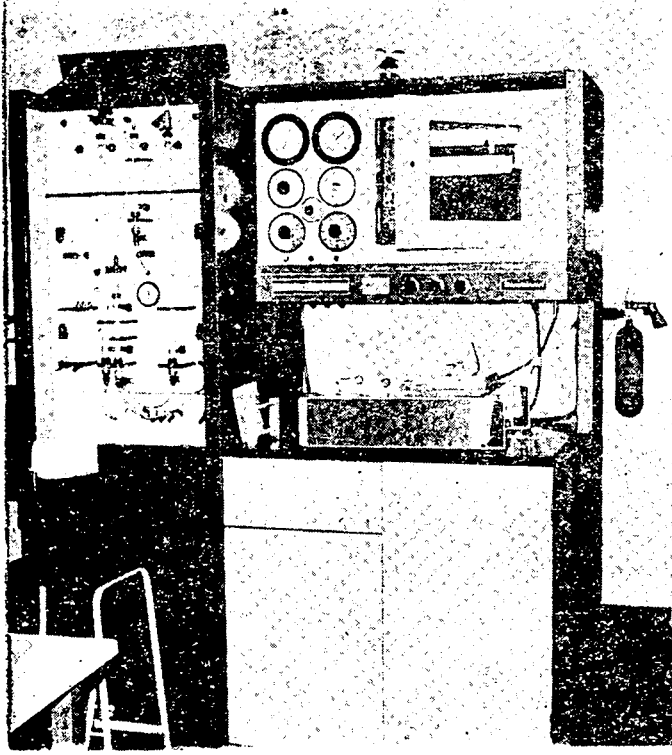
Kolorimetrik metodlar, amino asitlerin ninhidrin ile verdikleri renk reaksiyonuna dayanan hassas metodlardır. Bununla beraber kolorimetrik tayin metodları, hassasiyet bakımından amino asit analizindeki kadar tatminkâr değildir (5).

Bir de kromatografik metodlar vardır. Kromatografi, bir eritken içerisinde erimiş halde bulunan maddelerin sabit ve hareketli fazlar arasında ekilibrasyonuna uygun şekilde kurulmuş bir düzenekte, karışımda mevcut komponentlerin farklı hızlarda geçmeleri esasına dayanan bir teknik olarak tarif edilebilir. Zamanımızda, adsorpsiyon, partitasyon ve iyon değişimi kromatografileri olmak üzere üç tip kromatografi kullanılmaktadır (2). Amino asit analizler, bunlardan iyon değişimi kromatografisini tatbik ederek amino asitleri, hidrolizattan elüe etmektedirler. Kromatografiden sonra her amino asit elüsyon sırasına göre ninhidrin reaksiyonuna tabi olmaktadır. Amino asit analizler, tatbik edilen protein hidrolizatındaki amino asitlerin kromatografi, renk reaksiyonu ve kolorimetri ile kurvelerinin çizimi işlemlerini kendisi yaparak, neticeleri hassas ve doğru olarak veren modern cihazlardır. Böyle bir cihazla zaman ve madde yönünden en ekonomik şekilde çalışmak, ancak bu cihaza ait bazı teknik ve çok önemli inceliklerin bilinmesi ve tatbikiyle mümkün olabilir.

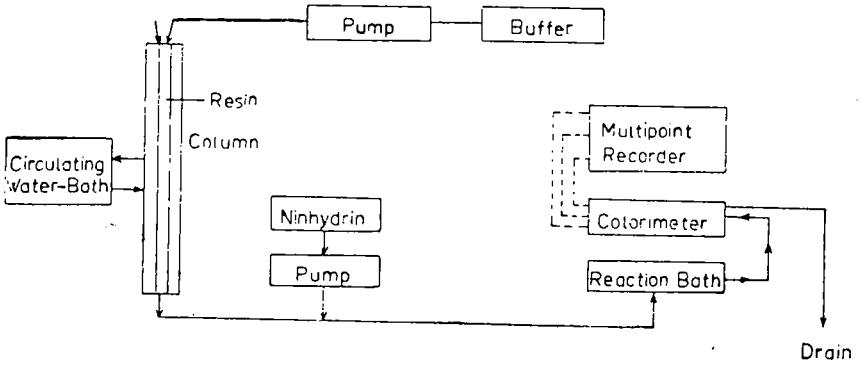
İşte yazımızın gayesi de, amino asit analiz metodlarını prensip itibariyle gözden geçirdikten sonra bunların en mükemmeli olan

otomatik amino asit analizi konusunu, Beckman 120/B model otomatik amino asit analizerin çalışma prensibini vererek izah etmek ve çalışma sırasında zaman ve madde tasarrufunu doğrudan doğruya etkileyen bazı teknik bilgileri kaydetmektedir.

Aşağıda Beckman 120/B model otomatik amino asit analizerin resmi görülmektedir.



Yukarıda resmi görülen analizler, 220 V., 32 Amp. ile çalışmakta olup gücü 2000 W. tır. Bu cihaz muhtelif kompartmanlardan ibarettir. Bunlar; 1- Kromatografi 2- Reaksiyon hamamı ve kolorimetre 3- tampon, rejenerasyon ve ekilibasyon sıvıları 4- Pompalar, sıcak su hamamı ve toplama kabı 5- Multipoint kaydedici 6- göstergeler ve otomatik kumanda kompartmanlarıdır. Ayrıca bir azot gazı bombası ile de haricen bağlıdır (2). Cihazın çalışma prensibi aşağıda şematik olarak gösterilmiştir:



Yukarıdaki basit, çalışma prensibi şemasından da anlaşılacağı üzere:

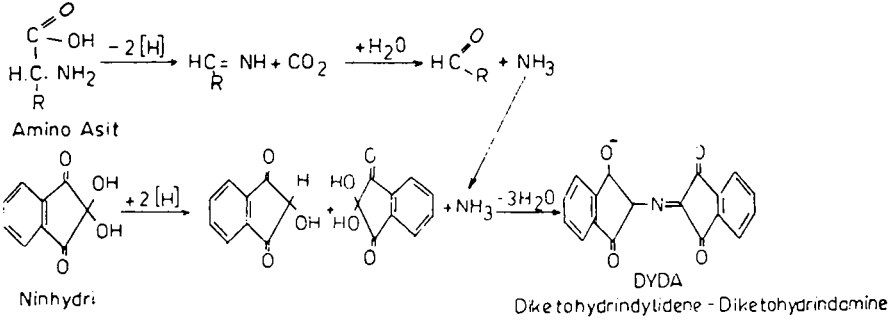
Amino asitler, herşeyden önce kolon kromatografisine tabi tutulan bir protein hidrolizatından kontrollu bir ısıda ve uygun bir pH derecesinde iyon değiştirici bir reçinede elüe edilirler.

Bunun kimyasal mekanizması şöyledir: Nümune, içinde polisülfonik bir reçinenin Sodyum tuzu bulunan kolona tatbik edilince iyon değişimi vuku bulur. Polisülfonik reçine negatif yüklü sülfonik asit grubu sebebiyle bir katyon değiştiricisidir. Amino asit molekülü de pozitif yüklü amino grubu sebebiyle iyonik bir kuvvetle reçineye bağlanır. Bu bir reverzibl reaksiyondur ve ekilibrasyon vuku bulur. Reçineden aşağıya doğru süzülen tampon solüsyonda amino asitler bulunduğundan kolonun üst kısmındaki ekilibrasyon dengesi bozulur ve reçine, bu dengeyi temin edebilmek için daha fazla amino asidi serbest bırakır. Amino asitlerin bu kromatografik elüsyonu, kimyasal bileşime, reçine taneciklerinin ve reçinenin poröz hacmine, kromatografi kolonunun yarıçapına ve boyuna, amino asit molekülünün yüküne, pH ya, iyonik kuvvete, elüe edici tamponun akış hızına ve operasyon ısısına bağlıdır (3, 4).

Bazık amino asitlerin elüsyonu 5,28 pH.lı, asidik ve nötr amino asitlerin elüsyonu ise 3,28 ve 4,25 pH.lı sitrat tamponlarla olur.

Bir pompa tarafından pompalanan tampon solüsyonun basıncı ile kolondaki iyon değiştirici reçineyi geçen amino asitler, yine kontrollu bir hızda ayrı bir pompa tarafından basılan ninhidrin ayırıcı ile karşılaşır. Reaksiyon hamamına giden bu karışım, orada 100°C de karakteristik mavi menekşe rengi vererek kolorimetreye geçer ve kolorimetre bu rengin intensitesini 570 milimikronda ölçer. Ancak serbest amino grubu olmayan prolin ve hidrosksiprolin gibi amino asid-

ler, sarı renk verirler ve bu renk ise 440 milimikronunda absorbe edilir. Kolorimetredeki absorpsiyonun derecesine göre geçen ışığın şiddetini cereyan haline getiren bir fotosel, multipoint yazıcıyı etkiler ve semi-logaritmik bir kromatogram kâğıdına amino asitlerin ayrı ayrı kurvelerinin çizilmesini sağlar. Ninhidrin ve amino asitler arasında aşağıda görüldüğü şekilde bir kimyasal reaksiyon cereyan eder (1):



Analizer, protein ve peptid hidrolizatında, fizyolojik sıvılarda, idrarda, kan plazmasında, doku ekstraktında ve yiyecek maddelerinde bulunan amino asitleri analize etmektedir. Bu materyalde bulunan karbonhidratlar ve yağlar analizi bozmazlar.

Cihazın zaman ve madde yönünden en ekonomik şekilde kullanılmasında, operatörünün dikkat etmesi gereken en önemli hususları şöyle sıralamak mümkündür (1):

1. Bir hidrolizatın kromatografisinde kullanılmış olan iyon değıştirci bir reçine uzun kolonla her analizden sonra, kısa kolonla ise her 3 analizden sonra usulüne uygun şekilde ve mutlaka rejenere ve ekilibre edilmelidir.
2. Tampon ve ninhidrinin akması sırasında göstergeler, normal olarak şu rakamlar arasında oynamalıdır.

3.28 pH lı tampon için	160-180
5.28 pH lı tampon için	40-60
Ninhidrin için	12-16

Bu rakamların fazla yükselmeleri halinde analize sonradan tekrarlanmak üzere son verilmelidir.

3. Tampon ve ninhidrinin analiz şartlarına uygun hız ve miktarlarda akmasını temin için her gün 1 defa ve ilk analizden önce "Coil" pozisyonunda "Flowrate" ölçülmelidir.
4. Ardarda analizler yapılacağı zaman yeni analiz, bir önceki analizin bitiminden itibaren azami 20 dakika sonra başlamış olma-

lıdır. Çünkü, "Coil" sistemden 20 dakika süre ile akış olmadığı takdirde, önceki analiz den kalan ninhidrin artıkları, sistemde kristalize olarak akış diyağramında bir aksama husule getirir ve analiz yapılamaz. Yeni bir analize başlanılmayacaksa, sistem analizi müteakip tampon ile 1 saat "Coil" pozisyonunda yıkanmalıdır.

5. Kromatogram üzerinde "Basis linie" ayarı, önceden yapılmakla beraber her amino asit veya amino asit grubunun çiziminden sonra kontrol edilerek gerekirse tazelenmelidir. Bu ayar bilhassa asidik ve nötral amino asitlerin analizi sırasında sık sık kontrol ve yenilenmeye ihtiyaç gösterir.

Bir kısa kolon analizinden sonra uzun kolonla analiz yapılacaksa, uzun kolonla analizin başlamasından itibaren 12.nci dakikada, uzun kolon analizini kısa kolon analizi takip edecekse, kısa kolon analizinin başlangıcından itibaren 7.inci dakikada "Basis linie" ayarı yenilenir. Bu süreler esnasında kaydedicinin çalıştırılmasına lüzum yoktur.

6. Reaksiyon hamamı ile sıcak su sirkülasyonunu temin eden hamamın su seviyeleri kontrol edilmeli ve gerekirse ikmal edilmelidir. İyi monte edilmiş bir reaksiyon hamamında su seviyesi hemen hemen değişmez. Diğerinde ise bu kontrol ve ikmalin sık sık tekrarlanması gerekir.
7. Mecburiyet ve âcil ekilibrasyon hallerinde, uzun kolonlardaki rejenerasyonu tamamlanmış olan reçine, 3,28 pH lı tampon ile 40 dakika "Drain" pozisyonunda yıkanabilir.
8. Kolonlardaki reçinelere nümune tatbiki sırasında N₂ gazı kaçırılmaması gerektiği gibi, tampon tapasının kolona irtibatlanması sırasında da içeride hava kabarcığı kalmamalıdır.
9. Tamponların yeniden ikmal halinde: Pompa 1. 3,28 ve 4,25 pH lı tamponları, pompa 2 de 5,28 pH lı tamponu pompalamaktadır. Yeni tamponların ikmalinden sonra pompa ile kromatografi kolonu arasındaki kanalın pompalar kompartmanına rastlayan kısmındaki irtibat açılıp, pompa basıncıyla sistemdeki hava kabarcıklarının çıkması temin edilir ve tekrar hava kabarcıksız olarak irtibatlanır. Bu işlem her ikmalden sonra tekrarlanır. Ancak, bu işlem ninhidrin için yapılıyorsa, ninhidrin "Bleeder"i de açılmalıdır." Buffer Change Timer", işlemin 3,28 pH lı tampona tatbikinde "First Buffer" ve 4,25 pH lı tampona tatbikinde de "Second Buffer" pozisyonuna getirilmelidir. Bu suretle kanallarda kalan hava kabarcığının sistemde bir tıkanıklık yaparak analize mani olması önlenmiş olur.

10. Cihazın hassasiyet kontrolü için, nümune ile birlikte belirli konsantrasyonda Norloysin de tatbik edilir. Norloysin'in kromatogramdaki kurvesinden hesaplanan konsantrasyonu ile tatbik edilen konsantrasyonu birbirinin aynı olmalıdır.
11. Reçine, reaktivasyon ve yeniden paketlenme sırasında herhangi bir kantitatif kayba uğramamalıdır.
12. Analiz şartları arasında pH çok mühim bir yer tuttuğundan, tamponların pH ayarı kesinlik taşımalıdır. pH derecesi iyi olmayan bir tamponla çizilen sistin/2 kurvesi, valine ya çok yakın veya çok uzakta bulunur. Bu tampon pH sınırın hatalı olduğunu bildiren iyi bir kriterdir. Sistin/2 yi valine yaklaştırmak gerektiğinde tampon HCl ile, aksi halde de NaOH ile yeniden gerekli pH derecesini kazanıncaya kadar hassas olarak ayarlanmalıdır.
13. Reçineler, usulüne uygun olarak rejenere ve ekilibre edilmemişlerse analiz başka bir pH da cereyan edeceğinden, kurveler de değişik yapı ve büyüklükte olur. Bu takdirde hemen analize son verilip, NaOH reçinenin her zamanki gibi 2/3 ünü değil de, tamamını kat'edinceye kadar rejenerasyon ve sonra da yine gereği gibi ekilibrasyon yapılmalıdır.
14. Multipoint kaydediciye mürekkep konulması gerektiğinde renklerin karıştırılmamasına çok dikkat edilmelidir. Kaydedicideki renk süngerlerinin sıralanışı şu şekildedir:

Mavi-Kahve-Kırmızı

Mavi-Kahve-Kırmızı

Mavi-Kahve-Kırmızı

Siyah-Siyah-Siyah

Bu şekildeki bir sıralanış, her 4 noktadan birinin siyah olmasını temin eder, ve integrasyonda bu siyah noktalar kullanılır.

Kromatogramda bulunan kahverenkli noktalar, prolin ve hidroksoprolin gibi serbest amino grubu taşımayan amino asitlerin; mavi noktalar, kromatogram üzerindeki kurve yüksekliği 1,400 ü geçen amino asitlerin ve kırmızı noktalar da bunların dışındaki amino asitlerin hesaplanmalarında kullanılırlar.

15. Uzun kolonla yapılan bir analizi müteakip yine uzun kolonla çalışılması halinde gerek zaman, gerekse maddeler yönünden çok ekonomik olan bir husus ta şudur:

Norloysin çizildikten sonra "Buffer Change Timer" "Second Buffer" durumundan tekrar "First Buffer" durumuna getirilir.

50 dakika beklenir, bu süre içinde normal protein hidrolizatının son amino asit kurveleri olan Tirozin ve Fenilalanin de çizilecektir. Norloysin çizildikten sonra, önceden nümune tatbik edilmiş olarak analize hazır vaziyette bekletilen diğer kolon 50. inci dakikada normal olarak analize sokulur. Ancak, bu 50 dakikalık bekleme süresini 20 dakikaya indirmek mümkündür. Zira 3.28 pH lı tampon 50 dakikada kaydediciye, 20 dakikada ise tampon tapasına, yani reçineye gelir. Bizim için önemli olanı da bu tamponun tapaya kadar gelmiş olmasıdır. Kurvelerin çizimi daha evvel bitse dahi 20 dakika süre dolmadan yeni analize başlamalıdır.

16. Cihazda akış diagramında herhangi bir aksaklık olursa, bir pıhtılaşma ihtimaline karşı hemen reaksiyon hamamını ve kolorimetreyi devreden çıkarmalıdır. Bu suretle bozukluğun "Coil" sisteme zarar vermesi önlenmiş olur.

L i t e r a t ü r

- 1 - **Beckmann** (1964): *Model 120 B Amino Acid Analyzer*. Published by Spinco Division, Beckman Instruments, Inc. Stanford Industrial Park, Palo Alto, California, Instruction Manual, AIM-2.
- 2 - **Cantarow, A. and Schepartz, B.** (1964): *Biochemistry*. Third edition W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, pp.: 93-96.
- 3 - **Moore, S. and Stein, W.H.** (1951): *Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins*. J. biol. Chem. 192, 663-681.
- 4 - **Moore, S. and Stein, W.H.** (1954): *Procedures for chromatographic determination of amino acids on four percent cross-linked sulfonated polystyrene resins*. J. biol. Chem. 221, 893-906.
- 5 - **Oser, B.L.** (1965): *Hawk's Physiological Chemistry*. 14 th ed. The Blakiston Division, Mc Graw-Hill Book Company. New York, London. pp.: 1050-1051.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 5.1.1970 günü gelmiştir.