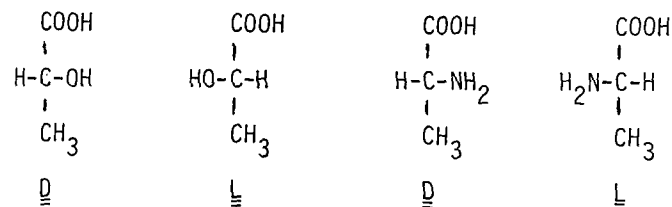


De bepaling van de absolute configuratie van chirale organische zuren, aminozuren en monosacchariden met behulp van gaschromatografie

Voordracht gehouden tijdens de wetenschappelijke vergadering van de NVKC op 21 september 1979 door J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegenthart, M. Duran en S. K. Wadman (Organisch Chemisch Laboratorium, Afd. Bio-organische Chemie en Universitaire Kinderkliniek „Het Wilhelmina Kinderziekenhuis”, Rijksuniversiteit Utrecht)*

Het onderzoek van metabole ziekten heeft van biochemisch oogpunt uit gezien de laatste tientallen jaren grote vooruitgang geboekt. In vele ziekenhuislaboratoria wordt thans gebruik gemaakt van screeningsprocedures voor aminozuren, peptiden, organische zuren, steroïden, purinen, pyrimidinen, monosacchariden, oligosacchariden, glycopeptiden en mucopolysacchariden. Diverse chromatografische technieken spelen hierbij een grote rol. Een aantal laboratoria maakt tevens gebruik van gaschromatografie (GC) gekoppeld met massaspektrometrie (MS). GC-MS heeft zich ontwikkeld tot een geweldig hulpmiddel bij de identifikatie en verifikatie van metabolieten (1).

Het onderzoek van de organische zuren in lichaamsvloeistoffen is thans in een fase gekomen, waarin tevens de bepaling van de absolute configuraties binnen het bereik van de mogelijkheden ligt. Evenals de meeste aminozuren zijn vele aminozuurmetabolieten (b.v. hydroxyzuren) ook chiraal (optisch actief). Ter onderscheiding van de enantiomeren wordt veelal gebruik gemaakt van de D en L konventie (fig. 1). Metabool gezien zullen D en L enantiomeren langs verschillende routes gevormd zijn. Bij de bestudering van erfelijke stoornissen is het dus tevens van belang de absolute configuratie van chirale metabolieten te kennen.



melkzuur

alanine

Fig. 1. Structuren van D en L enantiomeren van melkzuur en alanine.

De absolute configuratie van een verbinding kan op diverse manieren bepaald worden. Regelmatig toegepaste technieken zijn polarimetrie, enzymologie, kernspinresonantie, hogedrukvlloeistofchromatografie en gaschromatografie. Bij het gebruik van de polarimeter wordt de draaiing van de verbinding bepaald. Indien bekend, legt men daarna de relatie met D en L. Anders wordt de code + en - gebruikt. Voor microanalyses is de zuiverheid van de verbinding of een corresponderend derivaat van het hoogste belang. Verontreinigingen, speciaal optisch actieve verontreinigingen, kunnen misleidende resultaten opleveren. Ook de bepaling van D/L verhoudingen is niet eenvoudig. Voor het onderzoek van lichaamsvloeistoffen is deze methode niet zo geschikt.

* Ingekomen 26.9.79

Voor de absolute configuratie bepaling van een beperkt aantal metabolieten zijn hoogzuivere stereospecifieke enzymen beschikbaar. Verschillende enzymen vertonen echter tevens aktiviteit t.o.v. verbindingen die veel op het eigenlijke substraat lijken. Als voorbeeld kan genoemd worden de aktiviteit van lactaatdehydrogenase t.o.v. vele 2-hydroxyzuren. De methode is bruikbaar op microschaal. De analyse m.b.v. kernspinresonantie is alleen mogelijk indien de enantiomeren eerst gederivatiseerd worden met een chiraal reagens tot diastereomeren. De methode is niet direct bruikbaar op microschaal en vereist relatief zuivere stoffen.

De toepassing van gaschromatografie en hogedrukvlloeistofchromatografie biedt vele mogelijkheden. M.b.v. gaschromatografie kan de scheiding van D en L vormen op twee manieren bewerkstelligd worden:

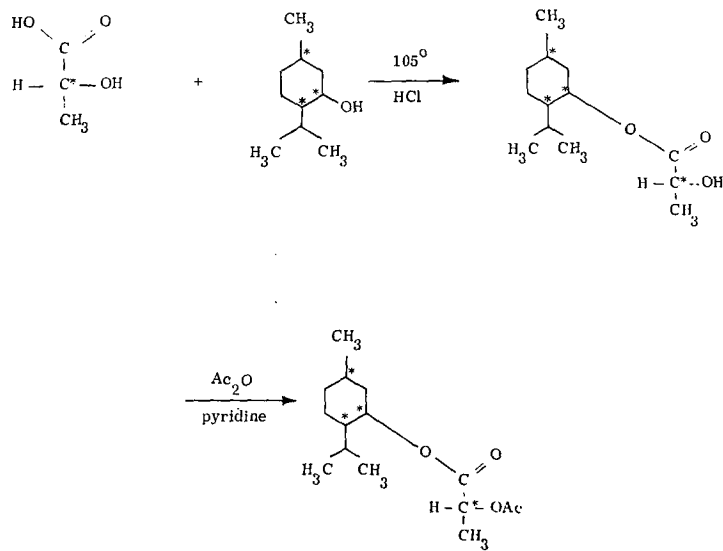


Fig. 2. Bereiding van O-acetyl (-)-menthyl ester derivaten.

Tabel 1.

Analyse van chirale metabolieten uit de urine van diverse patiënten.

Patiënten	Metabolieten	Lit.
Melkzuuracidurie	<u>D</u> -melkzuur ^a	(4, 5)
Melkzuuracidose	<u>L</u> -melkzuur ^a	(6)
	<u>L</u> -2-hydroxyboterzuur ^a	
	<u>D</u> -3-hydroxyboterzuur ^a	
Chronische metabole acidose	<u>D</u> -glycerinezuur ^a	(4, 7)
Hyperoxalurie type II	<u>L</u> -glycerinezuur ^a	(8)
Tumoren	vnl. <u>D</u> -β-aminoisoboterzuur ^b	(8)
2-Hydroxyglutaarzuuracidurie	<u>L</u> -2-hydroxyglutaarzuur ^c	(9)
2-Hydroxyglutaarzuuracidurie	<u>D</u> -2-hydroxyglutaarzuur ^c	(10)

^a O-acetyl (-)-menthyl esters

^b N-trifluoroacetyl (-)-menthyl esters

^c O-acetyl (-)-2-butyl esters

1. Scheiding van de enantiomeren (eventueel na bescherming van polaire groepen) op een chirale stationaire fase; 2. Omzetting van de enantiomeren in diastereomeren m.b.v. een chiraal reagens (een speciale derivatisering dus!) en scheiding van de diastereomeren op een niet-chirale fase. Bij het gebruik van hogedruk vloeistofchromatografie is de omzetting van enantiomeren in diastereomeren eveneens noodzakelijk. Grote voordelen van beide micromethoden zijn: a. Een hoge zuiverheid is niet noodzakelijk; meestal kan een extract van een lichaamsvloeistof direct gebruikt worden; b. Diverse metabolieten kunnen tegelijk bepaald worden; c. $\underline{D}/\underline{L}$ verhoudingen van enantiomeren kunnen eenvoudig vastgesteld worden.

In onze laboratoria is gaschromatografie een veel gebruikt hulpmiddel bij de diverse routine analyses. Het lag daarom voor de hand gebruik te maken van deze techniek bij de ontwikkeling van methoden ter bepaling van de absolute configuraties van chirale organische zuren en aminozuren. Enantiomeren worden gederiviseerd tot diastereomeren, terwijl voor de analyse gebruik wordt gemaakt van WCOT capillaire kolommen met niet-chirale fasen als SP-1000 en SE-30. Chirale substituenten worden geïntroduceerd in chirale zuren via verestering met b.v. (-)-menthol of (-)-2-butanol. Additionele alcohol functies worden geacetyleerd (zie fig. 2) en amino functies getrifluoroacetyleerd. In dit kader kan verder opgemerkt worden, dat monosacchariden geanalyseerd kunnen worden als pertrimethylsilyl (-)-2-butyl glycosiden (2, 3).

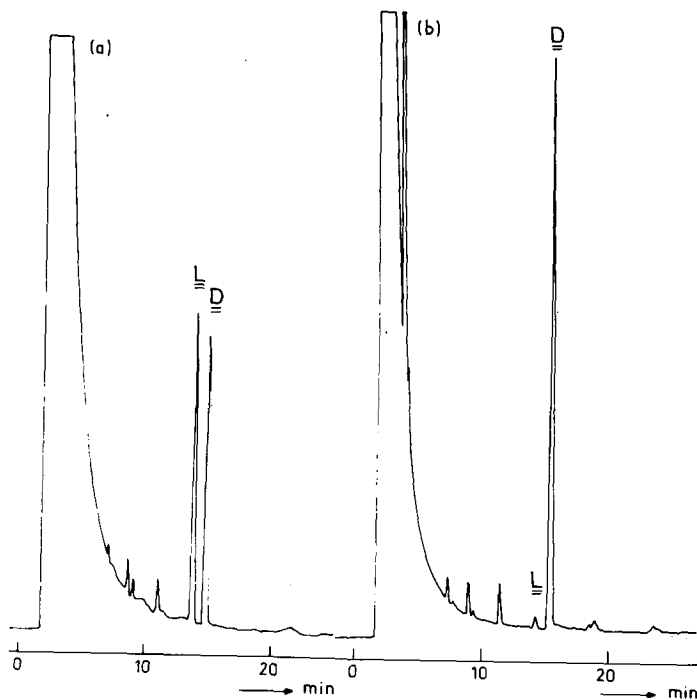


Fig. 3. Gaschromatogrammen van de O-acetyl (-)-menthyl ester derivaten van (a) synthetisch \underline{DL} -melkzuur en (b) \underline{D} -melkzuur uit de urine van een patiënt.

Een samenvatting van de tot nu toe door ons onderzochte metabolieten is weergegeven in tabel 1. Fig. 3 laat de splitting zien van racemisch melkzuur (\underline{DL}) bij gebruik van de O-acetyl (-)-menthyl ester derivaten. De beide pieken zijn toegerekend uitgaande van \underline{D} -melkzuur en \underline{L} -melkzuur. Tevens is het gaschromatogram van het urine extract van een patiënt met D-melkzuuracidurie weergegeven.

Gezien de resultaten moge het duidelijk zijn dat de bepaling van de absolute configuratie van chirale metabolieten beslist noodzakelijk is voor een beter inzicht in diverse metabole processen. Een nieuwe dimensie is aan de screening toegevoegd. Bovendien kan voornoemde kennis van belang zijn bij de vaststelling van mogelijke enzymdeficiënties.

Literatuur.

1. M. Duran, J. P. Kamerling, D. Ketting en S. K. Wadman. Massaspectrometrie in de kindergeneeskunde *T. Kindergeneesk.* 46, (1978) 101-110.
2. G. J. Gerwig, J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary GLC *Carbohydr. Res.* 62, (1978) 349-357.
3. G. J. Gerwig, J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart. Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary GLC *Carbohydr. Res.* 77, (1979) 1-7.
4. J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegthart, M. Duran, D. Ketting en S. K. Wadman. Determination of the configurations of lactic and glyceric acids from human serum and urine by capillary gas-liquid chromatography *J. Chromatogr.* 143, (1977) 117-123.
5. M. Duran, J. P. G. M. van Biervliet, J. P. Kamerling en S. K. Wadman. D-lactic aciduria, an inborn error of metabolism? *Clin. Chim. Acta* 74, (1977) 297-300.
6. J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, M. Duran, D. Ketting en S. K. Wadman. The absolute configuration of urinary 2-hydroxybutyric acid in patients with ketosis and lactic acidosis. *Clin. Chim. Acta* 88, (1978) 183-188.
7. S. K. Wadman, M. Duran, D. Ketting, L. Bruinvis, P. K. de Bree, J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegthart, H. Przyrembel, K. Becker en H. J. Bremer. D-glycemic acidemia in a patient with chronic metabolic acidosis. *Clin. Chim. Acta* 71, (1976) 477-484.
8. Niet gepubliceerde resultaten.
9. M. Duran, J. P. Kamerling, H. D. Bakker, A. H. van Gennip en S. K. Wadman. L-2-Hydroxyglutaric aciduria, an inborn error of metabolism? *J. Inher. Met. Dis.* (1980) in druk.
10. R. A. Chalmers, A. M. Lawson, J. P. Kamerling, R. W. E. Watts, E. Hey, D. Ogilvie en A. S. Tavill. D-2-Hydroxyglutaric aciduria, case report and biochemical studies. *J. Inher. Met. Dis.* (1980) in druk.