

## AMINOSAV OPTIKAI IZOMEREK ELVÁLASZTÁSA

Soós József

SZTE Szegedi Élelmiszeripari Főiskolai Kar  
6724. Szeged, Mars tér 7.  
Tel.: 62/546-023  
E-mail: soos@bibl.szef.u-szeged.hu

### ÖSSZEFOGLALÓ

Aminosavak és cukrok tükörképi izomerei közül jellemzően csak az egyiket tudják hasznosítani az élők, aminosavak közül a balos szimmetriájúakat. Ez összeegyeztethető a táplálkozási láncsal, mert természetes forrásokból ezekhez juthatunk hozzá az intrinzikus aszimmetria miatt. Az élelmiszerek (az előállítás folyamatoktól függő mértékben → magas hőmérséklet, nyomás, ionösszetétel, stb.) tartalmazhatnak nem természetes aminosav izomereket is. Ezeket jellemzően nem tudják hasznosítani a fogyasztók, de negatív élettani hatásuk nem zárható ki. A kérdés tanulmányozásához jól működő, egyszerű gázkromatográfiás módszereket ismertetünk: szimmetrikus megosztófázison aszimmetrikus származékképzéssel, illetve aszimmetrikus töltetű oszlop használatával szimmetrikus származékképzéssel kombinálva. Az utóbbi módszert jobbnak és megbízhatóbbnak találtuk.



Az élet anyagait tekintve aszimmetrikus: jellemzően D-cukrokra és L-aminosavakra épül. L-aminosavakból létrejött polipeptidek, illetve fehérjék a monomerek adta sztereokémiai lehetőségek szerint formálnak magasabb szintű struktúrákat ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, stb.), de ezek lehetséges kölcsönhatási felületeit is a kiinduló állapotot jellemző egyfajta optikai izoméria határozza meg döntően). Nagyon sok élettani következménye lehet, illetve bizonyíthatóan van, ha nem-természetes D-aminosavra konvertálódik egyetlen polipeptid láncem: sokszor működésképtelenné lesz az érintett fehérje, akár szerkezeti, akár funkcionális szerepű. Az aminosav racemizáció lényege: a  $C_{\alpha}$ -atom négy különböző szubsztituenssel tetraéderes szerkezetben aszimmetrikus, de protonvesztés miatt un. sík trigonális-hibridszerkezetbe mehet, ami a sík mindkét oldaláról visszafogadhatja a protont, így az izomerek egymásba alakulhatnak. Általánosságban D-aminosavakat élelmiszerekből sem tudunk felhasználni. Az élelmiszerek fehérjéi, peptidalapú segédanyagok, pl. tripeptid-alapú édesítőszer, szabad aminosavak, a feldolgozás/felhasználás körülményeitől függően, különösen magasabb hőmérsékleten kezelve, egyes aminosavak

vonatkozásban könnyebben racemizálódhatnak, és így bennük D-aminosavak jelenhetnek meg [1], amelyek végül is fogyasztásra kerülnek. Ennek következményei egyelőre nehezen felbecsülhetőek. A kérdést vizsgálni kell az élelmiszer-előállítás, feldolgozás, illetve az elfogyasztott nem természetes izomerek hatásai szempontjából is. Jelen dolgozatban aminosav optikai izomerek általunk használt egyszerűbb elválasztási technikáit ismertetjük. Ma már sok módszer ismert a címben jelzett feladat megoldására: folyadék-kromatográfiai (elsősorban HPLC, királis fázisokkal) és gázkromatográfiai (GC/GC-MS) technikák tekinthetők alapvetőnek. Itt gázkromatográfias elválasztási módszereket ismertetünk, mivel egy JEOL 20K GC állt rendelkezésünkre a gyakorlatban. A gázkromatográfia adta lehetőségek két csoportba sorolhatók:

- (1) Aszimmetrikus reagenssel teszünk különbséget a D- és L-izomer között. Ekkor az elválasztás optikailag inaktív töltetű oszlopon történik.
- (2) Optikailag aktív oszloptöltet alkalmazása leegyszerűsíti az anyag-előkészítést, és pontosabbá teszi az elválasztást.

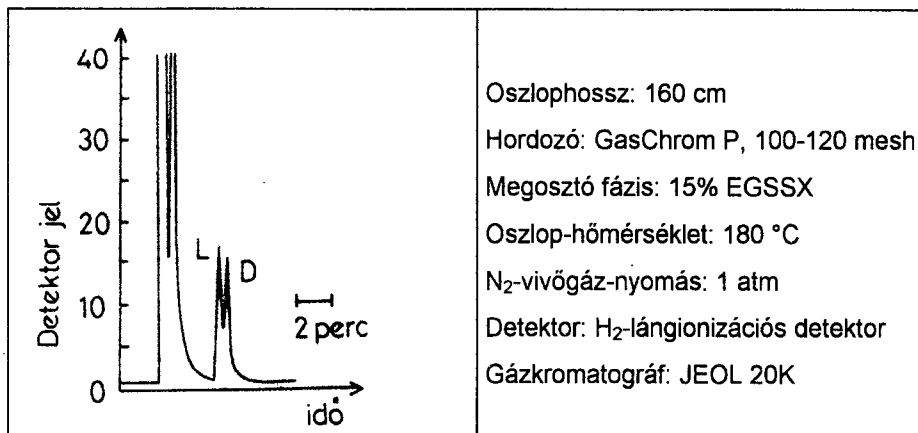
Jellemzően N-trifluoroacetyl-aminosav-észter származékok kerülnek oszlopra. Az (1) pontban ismertetettek szerint az észter valamely optikailag aktív alkohollal képzett terméket jelent (pl. 2-butil-, 2-oktil-észtert), míg a (2) ponthoz történő származékképzéshez egyszerű alkoholok (pl. metil-, n-butil- vagy i-propilalkohol) használhatók.

Alifás aminosavak (alanin, leucin, valin) optikai izomereit jó hatásfokkal választottuk el (l. táblázat és 1. ábra) szimmetrikus oszlopon, L-mentil-észterek formájában. Aminosavra számítva 50-szeres feleslegben 1.5 órán keresztül melegítettünk 120 °C-on L-mentolt, száraz sósav-gáz atmoszférában. A rendszert 110°C-ra hűtve, 20 Hgmm-en távolítottuk el a visszamaradt mentolt, majd szobahőmérsékleten, a kiindulási aminosav mennyiségre számítva, 20-szoros feleslegben adtunk trifluorecetsavanhidridet az aminosav-L-mentilészter származékhoz. Az acetileződés néhány perc alatt végbement. Az elválasztás gázkromatográfias paraméterei az 1. ábrán láthatóak.

I. táblázat. N-trifluoroacetyl-DL-aminosav-L-mentil-észterek enantiomerjeinek elválasztása

Aminosav	Retenciósi idő (perc)		$r_{LD}$
Alanin	D	3.78	0.884
	L	3.34	
Leucin	D	3.74	0.882
	L	3.30	
Valin	D	2.78	0.885
	L	2.46	

1 nmol aminosav még izomereire választható ezzel a technikával.



1. ábra. N-trifluoracetil-DL-alanin-L-mentilészter gázkromatogramja

Megjegyzendő, hogy a leírt rendszerben a különböző aminosavak izomerei meglehetősen átfedik egymást, ezért valamely aminosav elegyet analizálva, az optikai izomer arány meghatározása előtt az aminosavakat el kell választani egymástól.

Optikailag aktív töltetek alkalmazása az előzőekhez képest sok előnyt jelentenek. Ilyen megosztófázisok pl. az N-trifluoracetil-L-dipeptid-észterek, vagy az optikailag aktív diamidok. Az utóbbiak különösen jó hatásfokkal használhatók [2]. N-trifluoracetil-aminosav-metil- vagy i-propil-észterek vizsgálhatók ezeken az oszlopokon. Az egyes aminosavak és izomereik is elválnak rövid (2-4 m) töltelékű kolonnákon. Hasonló elválasztásokat végeztünk N-lauroil-L-valil-t-butilamid (később LVBA) megosztó fázissal. Az L-aminosav-LVBA-komplex energetikailag stabilabb lévén:  $r_{LD} > 1$  [3].

II. táblázat. Alifás aminosav optikai izomerek gázkromatográfiája  
N-lauroil-L-valil-t-butilamid megosztó fázison

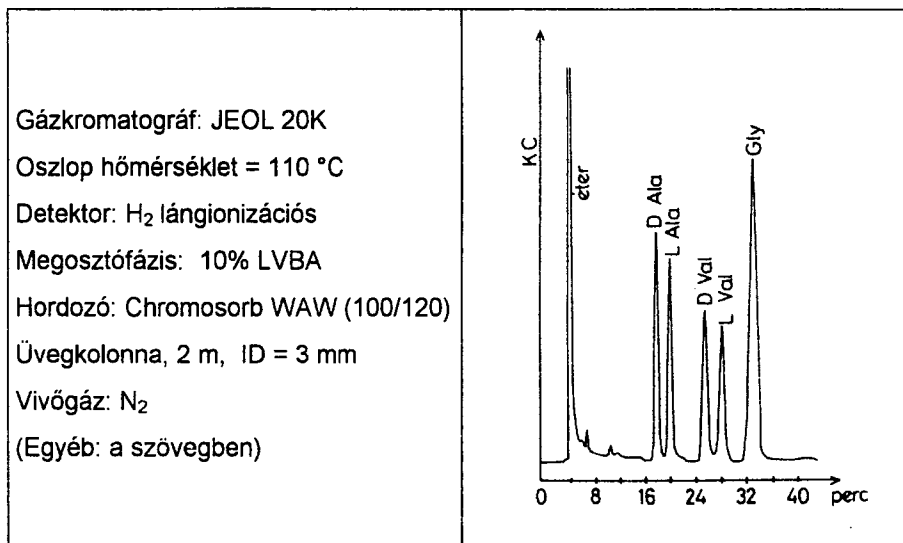
Aminosav	Izomer	$t_R$ (perc) $\pm$ SE	$r_{LD} \pm$ SE
Alanin-iP	D	13.8(1)	1.163(3)
	L	16.1(2)	
Valin-iP	D	21.4(1)	1.126(2)
	L	24.1(1)	
Glicin-iP		29.2(2)	
Leucin-Me	D	37.0	1.172
	L	43.4	
Serin-Me	D	37.6	1.064
	L	40.0	
Leucin-iP	D	52.7	1.217
	L	64.1	
nor-Leucin-iP	D	61.2	1.181
	L	71.3	

Rövidítések, jelmagyarázat:

- **iP** - izopropil-észter, **Me** - metil-észter
- $t_R$  - retenciós idő (korrigált),  $r_{LD} = t_R(L)/t_R(D)$ , **SE** - standard hiba
- Az "**Aminosav**" N-TFA-aminosav-metil-, vagy izopropil-észtert jelent.
- A gázkromatográfiás paramétereket ld. a szövegben.

A munkát JEOL 20K gázkromatográfjal végeztük (oszlop hőmérséklet = 110 °C, H<sub>2</sub> lángionizációs detektor, 10% LVBA megosztófázis, 100/120 mesh Chromosorb WAW hordozón, üvegkolonna hossz = 2 m, ID = 3 mm, N<sub>2</sub> vivőgáz). Az aminosavakat metil-, vagy izopropil-észter formában vizsgáltuk. A II. táblázatból látható, izopropil-észter használata javítja az izomer elválasztás jóságát.

Az O-észter előállítása száraz HCl gázzal telített metanollal, vagy izo-propilalkohollal történt. Az ebben felvett aminosav-mintát (1-5 mg/3 ml) 100 °C-on tartottuk 2 órát N<sub>2</sub> vagy argon atmoszférában. Ezután az oldószert bepárlással eltávolítva a mintához feleslegben (200  $\mu$ l) adtunk trifluoecetsav-anhidridet (TFA). Az acetileződés szobahőmérsékleten néhány percen belül végbement. N<sub>2</sub> árammal távolítottuk el a TFA feleslegét. A mintákat éterben vagy diklórmétánban oldva kromatografáltuk (1  $\mu$ g N-TFA-aminosav-észter /  $\mu$ l) – 2 ábra.



**2. ábra.** N-TFA-aminosav-izopropil-észterek gázkromatográfiája N-lauroil-L-valil-t-butilamid fázison

Alkalmos (elektronbefogási, vagy más néven ECD) detektorral ng alatti aminosav mennyiségek is vizsgálhatók. Itt említem meg, hogy hasonló (diamid) típusú gázkromatográfiás megosztó fázist használtak az amerikai Viking-programban, a marsi élet fontos bizonyítéka lett volna, ha aszimmetriát találnak. Az aminosav racemizáció vizsgálata sok területen (élelmiszerkémia, orvostudomány, gyógyszerkémia, geokronológia, stb.) hozhat új eredményeket.

### Irodalom

1. Man, EH., Bada, J.L. Annu. Rev. Nutr. 7 (1987) 209.
2. Charles R, et al. J. Chrom. 112 (1975) 121
3. Gil-AV E.J. Mol. Biol. 6 (1975) 131

## SEPARATION OF AMINO ACID OPTICAL ISOMERS

J. Soós

SZTE University College of Food Engineering  
6724 Szeged, Mars tér 7.  
Phone: +36-62/546-023  
E-mail: soos@bibl.szef.u-szeged.hu

### ABSTRACT

From amino acids and sugars, typically only one type of optical isomer can be used by living systems: concerning amino acids, the left handed ones. This is in agreement with the food chain structure because we can only have these from natural sources due to their intrinsic asymmetry. Food-products (depending on the processing details → high temperature, applied pressure, ion-composition, etc.) can contain unnatural optical isomers of different amino acids. Typically these are not utilized by the consumers but their negative physiological effect can not be ruled out in all certainty. In order to study the question, well working, simple gas chromatographic methods are described: asymmetric amino acid derivatives were analyzed on symmetric GC-phases or asymmetric load was used in GC-columns for symmetric derivatives. The later method was found to be better and more reliable.



A cikket lektorálta: **Dr. KÁLMÁN Miklós** igazgató  
(Bay Zoltán Alapítvány, Szeged)