

Tapasztalatok élelmi anyagok aminosavainak papírkromatográfiás meghatározásánál*

LINDNER KÁROLY

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1966. június 4.

Mindaddig, amíg tiszta aminosavakból összekevert elegy aminosavainak minőségi és mennyiségi analizisét végezzük el, az aminosavak papírkromatográfiás elválasztása és meghatározása nem tűnik túlságosan bonyolult feladatnak. Az élelmiszeripari termékek és más élelmi anyagok aminosavainak vizsgálata az igen nagy számú és eltérő tulajdonságú kísérő vegyület miatt azonban számos nehézségbe ütközhet.

Növényi fehérjék biológiai értékének meghatározásakor, például elsősorban a hidrolízist zavaró szénhidrátoktól kell a fehérjéket megszabadítani. Húsokból és húskészítményekből akár a fehérje aminosavait, akár a szabad aminosavakat kívánjuk meghatározni, gondoskodnunk kell a kromatogramok kifejlését zavaró ásványi anyagok eltávolításáról. Ugyanezt kell megoldanunk akkor is, ha a sajtérés során vizsgáljuk az aminosavakat és a keletkező peptideket. Sőt a sajtgyártás alapanyagául szolgáló tej szabad aminosavainak vizsgálata során nemcsak a zavaró ásványi sókat, hanem még a nagy mennyiségben jelenlevő laktózt is valamilyen módon el kell távolítani, mert enélkül a papírkromatográfiás meghatározás kudarca van itélve.

A legkülönbözőbb típusú élelmiszerek elemzésének megkönnyítésére a következőkben néhány, az Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézetben jó eredménnyel alkalmazott, illetve először bevezetett aminosav analitikai eljárásról számolunk be,

Az elmúlt 15 évben több ezer élelmiszer-fehérjét analizáltunk meg aminosav összetételre nézve, hogy elsősorban esszenciális aminosavtartalmuk alapján táplálkozási értéküket megítélhessük (1–20). Eltekintünk attól, hogy az évek során a mennyiségi meghatározásra használt polarográfiás és spektrofotometriás értékelést ismertessük, csupán az e feladat megoldására a legutóbbi időben alkalmazott eljárásunk lényegét és kivitelének vázlatos módját ismertetjük.

Az élelmi anyagokban található fehérjék hidrolízisét a szerzők egy része úgy javasolja elvégezni, hogy a szénhidrátokat is tartalmazó mintát meghatározott savkoncentráció és huminanyag képződést gátló ionok (pl. SnCl_2) jelenlétében közvetlenül elhidrolizálják. Sajnos a hidrolízis ily módon való lebonyolításával legfeljebb csak csökkenteni lehet a huminképződést. Emellett mégis számolni kell a kromatográfiát zavaró tényezőkkel (sók, ionok) amelyek eltávolítása viszont mindig aminosav veszteségekkel jár. A szerzők nagyobb része viszont – s mi magunk is – azt a módszert választottuk, hogy a lehetőleg tisztán kivont fehérjét humin képződést gátló sav felesleg mellett – hidrolizáljuk el (21). Ennek megfelelően a különböző típusú gabona- és olajos magvakból, továbbá az állati termékekből zsirmentesítés után optimális összetételű, rendszerint konyhasót, lúgot, illetve alkoholt tartalmazó extraháló keverékkel

* A II. Élelmiszervegyész anket keretében 1966. április 7-én elhangzott előadás.

vonjuk ki a fehérjéket és triklórecetsavas lecsapással, hig lúgoldattal való feloldással és újra lecsapással tisztítjuk meg azokat (22). Esetleg a zavaró anyagokat oldjuk ki a fehérje mellől (10). A tiszta fehérjét 100–200-szoros mennyiségű 18%-os sósavval üvegampullába forrasztjuk és a teljes hidrolízis céljából 24 órán át 100–103 C°-on tartjuk. Sok szerző hidrolízis után a sósavat vákuumban ajánlja elűzni. Ezt feleslegesnek találtuk, mivel az általunk elhidrolizált 10–20 mg fehérjéhez felhasznált sósavat egyszerű vízfürdön hideg levegő ráfúvatással 30–40 C° közötti hőmérsékleten, fél órán belül el tudjuk távolítani.

Általában elegendőnek tartják a nem specifikus Kjeldahl módszerrel történő nitrogén meghatározásból következtetni a hidrolizátum aminosav koncentrációjára. Ettől eltérőleg fontosnak tartottuk az aminosavakra jellemző aktív csoport, az alfa-aminonitrogén tartalom meghatározását, melyet saját módszerünkkel polarográffal (2, 23, 24, 25) végzünk el. Ennek meghatározása lehetővé teszi a hidrolizátumok koncentrációjának, illetve mennyiségének pontos mérését.

A kromatogramok kifejlesztésénél két lényeges feladatot kell teljesíteni abból a célból, hogy a kiértékelés minél pontosabb legyen. Az egyik feladat az, hogy megfelelő puffer-rendszerek és metodikai fogások segítségével egy dimenzióban a denzitometriás kiértékelés céljára tökéletesen megfelelő aminosav elválasztást biztosítsunk. A másik feladat pedig, hogy a mennyiségi meghatározáshoz minden egyes kromatogramon az ismeretlen aminosav keverékek mellett ismert összetételű, azonosan előállított, természetes aminosav keveréket (kazein-hidrolizátumot) alkalmazunk standardnak (26, 27).

A 16 aminosav denzitometriás kiértékelésre alkalmas szétválasztását az 1. táblázatban feltüntetett szkéma ismerteti.

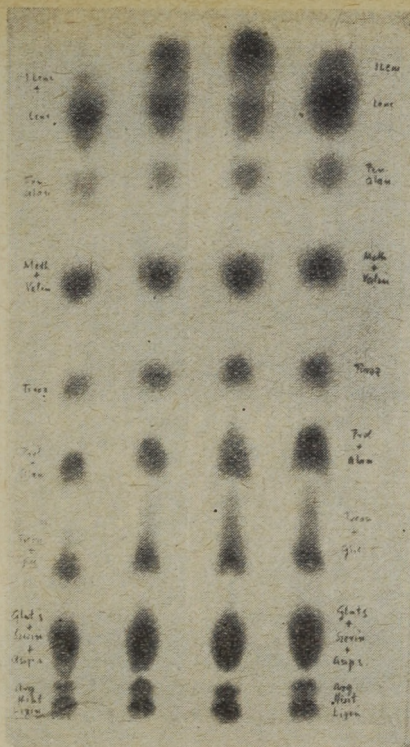
1. táblázat

Az aminosav elválasztás menete denzitometriás kiértékeléshez

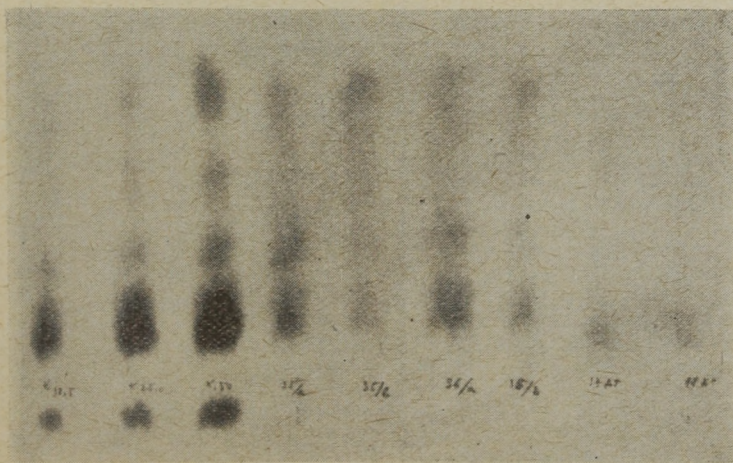
1. kromatogram alanin prolin triozin metionin valin fenilalanin leucin (4 butanol: 1 ecetsav: 1 víz)	2. kromatogram aszparaginsav glutaminsav szerin glicin treonin (12 pH fenol)	3. kromatogram arginin lizin hisztidin (1. 4 butanol: 1 ecetsav: 1 víz, <i>levágás</i> 11. 10 propanol: 10 butanol: 5 víz: 2 dietilamin)
--	--	---

Az 1. és 2. ábrában bemutatott butanos és fenolos kromatogramhoz különösebb magyarázatra nincs szükség. A felfelé futó kromatogramok futási idejének helyes megválasztásával, a hőmérsékletnek 20–25 C° közötti tartásával az 1. táblázatban feltüntetett aminosavak denzitometriás értékelésre alkalmas módon szétválnak.

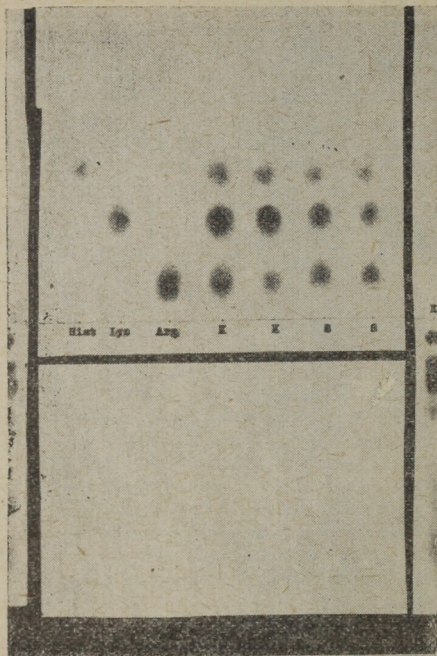
A 3. ábrában feltüntetett kromatogramhoz az alkalmazott technika szükségességét illetően, bővebb magyarázatra van szükség. A magyarázathoz tekintsük meg megegyezően az 1. ábrában látható butanos kromatogramot. Ezen a kromatogramon a hidrolízis után még megtalálható valamennyi aminosav jelen van. Figyelmesebben megtekintve, 3 fő csoportot állapíthatunk meg. A kromatogram alján szinte starthely szerű pontban helyezkednek el a bázikus tulajdonságú aminosavak, a lizin, hisztidin és arginin, felette két majdnem összefüggő foltban, főleg a savanyú tulajdonságú aminosavak (pl. dikarbon-savak), a glutaminsav, aszparaginsav, glicin, alanin stb. és ezek felett legfelül a többi, főleg az ún. neutrális aminosavak csoportja helyezkedik el. Ismeretes, hogy a bázikus aminosavak egymástól való elválasztása igen bonyolult feladat



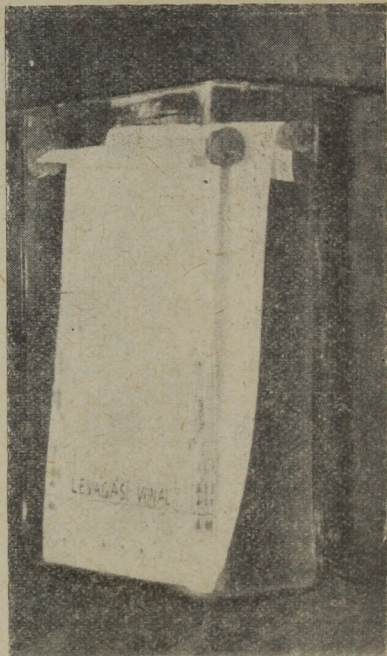
1. ábra. Fehérje hidrolizátumok kromatogramja butanol-jégetet-vízzel



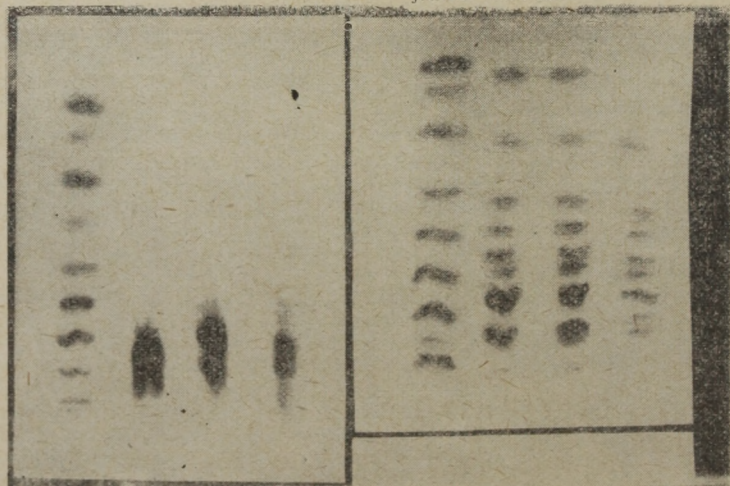
2. ábra. Aminosav-keverékek kromatogramja fenol-vízzel



3. ábra. A papirkromatográfia kivitelezése bázikus aminosavak meghatározására



4. ábra. Bázikus aminosavak elválasztására összeállított kromatográfiás berendezés az első futtatás alkalmával



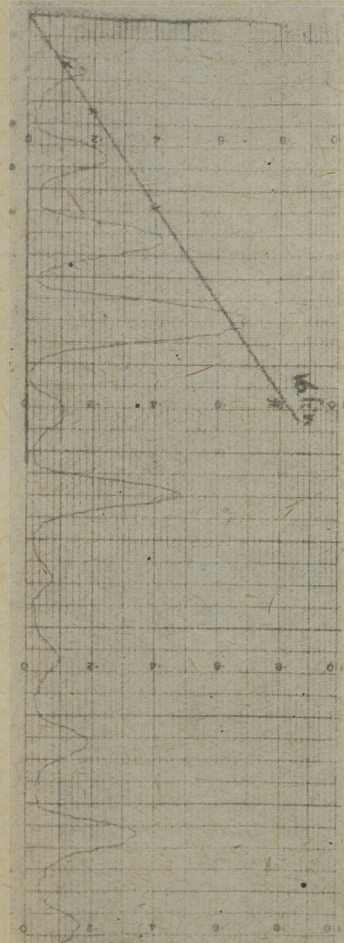
5. ábra. Zavaró anyagok hatásának kiiktatása előkromatográfálás utáni starthely levágással

és még az egyéb aminosavaknál sikerrel alkalmazható pufferezott papírkromatográfiás (28) kifejlesztés sem nyújt itt megoldást. Egyes szerzők ezért elektroforézissel, mások speciális enzimreakciókkal vagy mikrobiológiai eljárásokkal igyekeznek ezeket az aminosavakat meghatározni. Egyszerű fogással sikerült a klasszikus egydimenziós papírkromatográfiás elválasztást úgy alkalmazni, hogy ezek a bázikus aminosavak denzitometriás mérésre alkalmas mértékben, tökéletesen szétváljanak. Ennek lényege az, hogy a butanolos kromatogramot csak félig fejlesztjük ki egy olyan papíron, amelynek két felszálló ága van a 3., ill. 4. ábrában látható módon, majd megszáritás után levágva a bázikus aminosavak feletti aminosav foltokat, egy másik oldószer rendszerben (n propanol 10 : n butanol 10 : víz 5 : dietilamin 2) (29) visszafelé futtatva most már csak az elszeparált bázikus aminosavakat választjuk el. Ezeket a bázikus aminosavakat ebben a futtatórendszerben más azonos R_f értékű aminosavak zavarják, ha kromatografálás előtt nem gondoskodnánk eltávolításukról.

Hasonló elv alapján a zavaró anyagok „levágásával” dolgoztuk ki a sókat és más nem aminosav természetű anyagokat tartalmazó rendszerekben (pl. tej, női tej, vizelet, vérszérum stb.) a szabadaminosavak meghatározását (30, 31).

Eljárásunk a következő: A tejet centrifugálással zsírtalanítjuk, majd a zsírintes tejet, – illetve a vérszérumot a vörösvérsejtek lecentrifugálása után – annyi etanollal elegyítjük, hogy az etanol koncentrációja 75–80% legyen. Ez az alkohol koncentráció a fehérjéket lecsapja, az aminosavakat pedig oldatban tartja. Lecentrifugálás után alacsony hőmérsékleten, pl. hajszárító segítségével ráfűvott meleg levegővel az alkoholos oldatot szárazra pároljuk. A maradékot ismert térfogatú (1–2 ml) desztillált vízben felvesszük és 0,25 százalékos kazein hidrolizátum standardok mellett alikvot részét felvisszük a kromatográfiás papírokra. Vizeletből, vagy más, fehérjét csak legfeljebb csekély mennyiségben tartalmazó oldatokból közvetlenül viszünk fel a kromatogramokra. Mind a butanolos, mind pedig a 12 pH-s fenolos kromatogramot először butanolos oldószerral félig kifejlesztjük, amint azt az 5. ábrában látjuk, majd a felviteli foltok felső vonalával elvágólag a starthelyeket ollóval levágjuk. Ezután a teljes kifejlesztéshez szükséges oldószerekbe – tehát ismét butanolosba vagy fenolosba – helyezzük a kromatogramokat.

A papírkromatográfiával elválasztott aminosavak mennyiségét akár hidrolizátum-

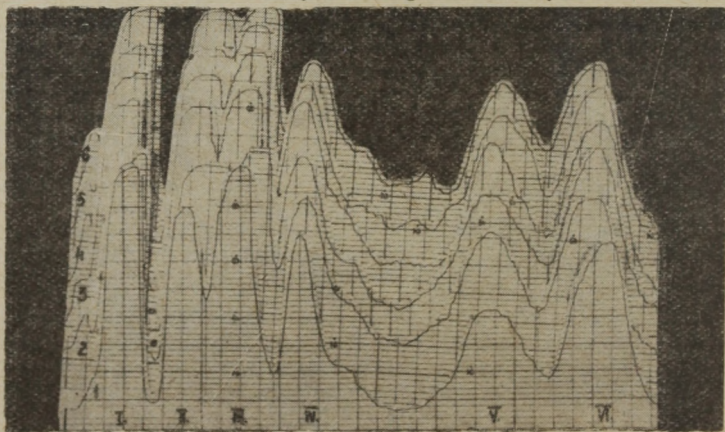


6. ábra. Valin standardok és szaba d aminosavak denzitogramja

okról, akár szabad aminosavakról van szó, a megfelelő módon kivágott kromatogram csíkok közvetlen denzitometriás mérése segítségével állapítjuk meg. A papírcsík kivágása irányától és a denzitometriás értékek kiszámítási módjától függően abszolút, vagy relatív számadatokat kapunk a mért aminosavelegy összetételére vonatkozóan.

Abszolút mennyiségi értékeket (az eredeti anyagra nézve mg-ban, vagy az eredeti fehérjére vonatkoztatva %-ban) kapunk, ha a kromatogram kifejlesztési irányára merőlegesen a megfelelő léptékben növekvő standardokkal együtt vágjuk ki az ismeretlen összetételű minták azonos aminosav foltjait és Locarte típusú denzitométerrel a foltokhoz tartozó „extinkciós görbéket” itt „extinkciós görbe” alatt a transzparencia logaritmusos változását jelző görbét értjük) felvesszük (6. ábra). Az egyes foltok „extinkciós görbéi” és az üres kromatográfiás papír extinkciós alapvonala által bezárt területet (pl. planiméterrel) lemérjük és az ismert mennyiségű aminosavak területeit grafikusán, vagy aritmetikusan arányosítjuk az ismeretlenekével, hogy megállapítsuk az aminosavak abszolút mennyiségét. Tájékoztatóul szolgáljon, hogy aminosav hidrolizátumok esetében mind a kazein standard, mind pedig az ismeretlen fehérjék felvitt mennyisége $25 \mu\text{g}$ nagyságrendű szokott lenni, míg szabad aminosavak esetében a felvitt kazein standard az $5 - 25 \mu\text{g}$ értékhatárokat öleli fel. Az abszolút denzitometriás mérések pontossága több párhuzamos mérés esetén a $\pm 5\%$ -ot nem haladja meg.

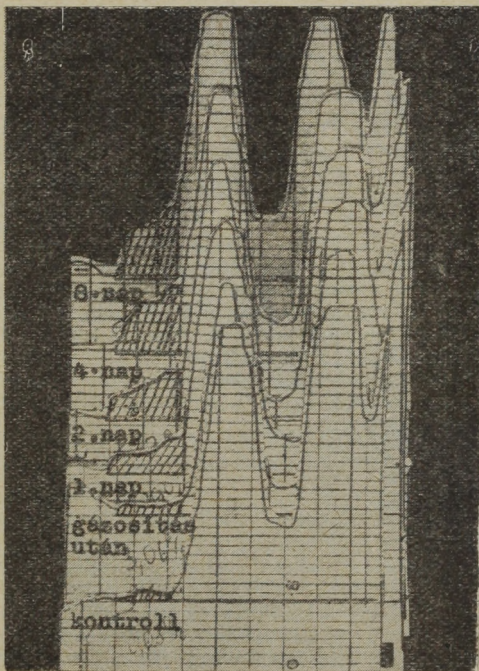
A relatív mennyiségek módszere igen gyors értékelést nyújt abban az esetben, ha bizonyos fehérjék aminosav arányai között számottevő különbséget kívánunk megállapítani, amint azt lencsefajtákkal végzett összehasonlító vizsgálataink bizonyították (32). Ebben az esetben a papírcsíkot a kromatogram futási irányában vágjuk ki és az egyes aminosav hidrolizátumok (elegyek) kromatogramjain az egymást követő aminosav foltokat denzitométerlünk. A kiértékelés ebben az esetben is a görbe alatti területek segítségével történik. Ilyenkor mindig az elektroforézis kiértékeléshez, vagy a zsírsavak gázkromatográfiás kiértékeléséhez hasonló módon, az egyes aminosavakat reprezentáló területek relatív százalékat adjuk meg az össz-területhez viszonyítva. Igen gyors vizuális értékelést tesz lehetővé, ha az egyes fehérjéket képviselő denzitogramokat egymás fölé helyezzük, mert ilyenkor az azonosság, vagy az esetleges különbségek, miként a 7. ábrában feltüntetett lencsefehérje denzitogramokból is jól észlelhető, könnyen



7. ábra. Hat, morfológiailag különböző lencsefajta fehérje hidrolizátumának butanolos kromatogramjával készített denzitogram hasonlósága

megállapíthatók. Ez a módszer nagyon ajánlható olyan laboratóriumok számára, amelyeknek egyrészt nagy számú vizsgálatot kell végezni annak eldöntésére, hogy milyen fehérjék tartalmaznak bizonyos kívánt, értékes aminosavakból nagyobb mennyiséget (pl. fajtakisérletek), másrészt olyan laboratóriumok nem rendelkeznek az alfa-amino-nitrogén pontos meghatározására alkalmas eszközzel. A relatív aminosav mennyiségek mérésére szolgáló módszer ugyanis még 50%-os felvételi különbségekre sem érzékeny, mivel ekkor csak a görbe alatti területek abszolút értékei növekednek, vagy csökkennek, de egymáshoz való arányuk azonos marad. Ennek az eljárásnak előnyeit az elmúlt hónapokban olyan vizsgálatainkban is tudtuk hasznosítani, amelyek azt célozták, hogy bizonyos gázosítási eljárásnál fellépő oxidációs jelenség milyen mértékben károsítja az egyes aminosavakat, illetve idéz-e elő azok oxidációs termékeiben növekedést. A 8. ábra mutat be ilyen egymásra helyezett denzitogramokat, amelyeknél világosan látható a gázhatás időtartamának növekedésével párhuzamosan jelentkező denzitogram intenzitás változás.

Gyakorlati aminosav-analitikai eljárásaink ismertetésével csupán azt kívántuk bizonyítani, hogy a drága eszközöket nélkülöző laboratóriumok is képesek az olcsó papirkromatográfias aminosav meghatározásokkal megközelítőleg olyan pontosságot elérni, mint amilyen pontosság egyébként az igen drága és csak külföldről beszerezhető automatikus oszlopkromatográfias berendezéssel érhető el. E rövid ismertetés remélhetőleg azt a célt is szolgálja, hogy bizonyos élelmiszertechnológiai eljárások aminosavakkal jellemezhető folyamatait a jövőben nagyobb számban fogják hazánkban is vizsgálni.



8. ábra. Gázosított, és különböző ideig tárolt tejpor-fehérje hidrolizátumok összehasonlító denzitogramjai

IRODALOM

- (1) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I., Polner R., Váradí P.: Növénytermelés, 3, 261, 1954. Acta Chimica Acad. Sci. Hung., 11, 151, 1957.
- (2) Lindner K.: Acta Chimica Acad. Sci. Hung., 9, 353, 1956.
- (3) Lindner K., Bedő M.: Élelmezési Ivar, 10, 100, 1956.
- (4) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I.: Kísérletes Orvostudomány, 5, 464, 1956.
- (5) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I.: ÉVIKE, 6, 59, 1960.
- (6) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I.: ÉVIKE, 6, 97, 1960.
- (7) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I.: ÉVIKE, 6, 229, 1960.
- (8) Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I.: Qualitas Plantarum et Mater. Veget., 7, 289, 1960.
- (9) Lindner K., Korpáczy I., Jaschik S., Szőke K.: Qualitas Plantarum et Mater Veget., 8, 25, 1961.
- (10) Lindner K., Nagy F., Krámer M., Szőke K.: ÉVIKE, 8, 315, 1962.
- (11) Lindner K., Krámer M., Szőke S.: ÉVIKE, 9, 5, 1963.
- (12) Lindner K., Jaschik S., Szőke S., Krámer M.: ÉVIKE, 9, 65, 1963.

- (13) Lindner K.: ÉVIKE, 10, 3, 1964.
- (14) Tarján R., Lindner K., Krámer M., Szöke S.: Gyermekgyógyászat, 9, 276, 1964.
- (15) Lindner K.: Qualitas Plantarum et Mater. Veget., 11, 31, 1964.
- (16) Lindner K., Krámer M., Szöke K., Nagy F.: Die Nahrung, 9, 85, 1965.
- (17) Tarján R., Krámer M., Szöke S., Lindner K., Szarvas T.: Gyermekgyógyászat 4, 97, 1965. Nutr. Dieta, 7, 136, 1965.
- (18) Lindner K., Telegdy Kováts M., Jaschik S., Krámer M., Szöke S., Varga K.: ÉVIKE, 11, 178, 1965.
- (19) Telegdy Kováts M., Lindner K., Varga K., Szöke S., Krámer M.: ÉVIKE, 11, 235, 1965.
- (20) Lindner K., Tarján R., Krámer M., Szöke K.: Prace i Materialy Naukowe, 6, 337, 1965.
- (21) Szára I.: Kísérletes Orvostudomány 3, 71, 1951.
- (22) Ermakov A. I. et al.: Metodi biohimicseszkoivo izsledovanija rasztenii 320 o. Moszkva – Leningrad 1952.
- (23) Lindner K.: ÉVIKE, 3, 145, 1957.
- (24) Lindner K.: Acta Chimica Acad. Sci. Hung., 26, 443, 1961.
- (25) Lindner K.: ÉVIKE, 10, 3, 1964.
- (26) Lindner K.: Kandidátusi értekezés, Budapest, 1956.
- (27) Lindner K.: ÉVIKE, 3, 174, 1957.
- (28) McFarren E. F.: Anal. Chem., 23, 168, 1951.
- (29) Hardy N., et al.: Anal. Chem., 27, 971, 1955.
- (30) Lindner K.: Die Nahrung 3, 299, 1959.
- (31) Lindner K.: Kísérletes Orvostudomány, 18, 208, 1966.
- (32) Lindner K.: Qualitas Plant. et Mater. Veget. (Közlés alatt)

ОПЫТЫ БУМАЖНО – ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

К. Линднер

Автор на основе анализа большего числа белков и свободных аминокислот в пищевых продуктах сообщает практический метод количественного определения аминокислот бумажной хроматографией и приемы применения для отстранения веществ мешающих хроматографию и анализ. Кроме количественной оценки денситограмм для количественной оценки бумажно-хроматограмм предлагает относительное сопоставление аминокислот для экспрессных методов аналогично к оценке элфограмм и газово-хроматограмм.

ERFAHRUNGEN BEI DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG DER AMINUREN VON LEBENSMITTELN

K. Lindner

Der Verfasser gibt auf Grund der Untersuchung zahlreicher Eiweissstoffe und freier Aminosäuren in Nahrungsmitteln praktische Hinweise für die papierchromatographische quantitative Bestimmung der Aminosäuren und teilt Verfahren mit, welche sich zur Ausschaltung der die Chromatographie und die Analyse störenden Einflüsse eignen. Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme empfiehlt er neben der absoluten quantitativen Auswertung von Chromatogrammen zwecks Schnellbestimmung die Vergleichung der relativen Mengen der Aminosäuren, ähnlich wie bei der Auswertung von Elphogrammen oder Gaschromatogrammen.

EXPERIENCES GATHERED AT THE PAPER CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF AMINOCIDS IN FOODS

K. Lindner

On the basis of experiences gathered in the determination of the contents of protein and free aminoacids of a great number of food varieties, the practical techniques the quantitative determination by paper chromatography are described by the author. The modes of eliminating the effect of substances interfering with chromatography and with the analysis in general are discussed. For the quantitative evaluation of paper chromatograms, in addition to the absolute quantitative evaluation of the densitograms, the comparison of the relative amounts of aminoacids is suggested for rapid determinations, similarly to the conventional evaluation of elphograms or gas chromatograms.