

# Kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfia alkalmazása aminosavak spektrofotometriás és denzitometriás meghatározására

DWORSCHÁK ERNŐ ÉS HEGEDŰS MIHÁLY

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1969. szeptember 12.

Az aminosavak vékonyréteg-kromatográfiai elválasztásáról igen sok közlemény számolt be, a felduzzadt méretű irodalmi adatok között számos referátum és kézikönyv, pl. *Pataki* könyve (1) segít eligazodni. A természetben leggyakrabban előforduló 18 aminosav kvantitatív meghatározására alkalmas, tökéletes elválasztását szilikagél rétegen nem tudták megvalósítani még kétdimenziós technikával sem. *Turner és Redgwell* (2), *Jones és Heathcote* (3), *Molnár és Sztaricskai* (4), valamint *Pál és Takács* (5) cellulóz, illetve cellulóz-szilikagél keverék rétegekkel sokkal jobb eredményt tudott létrehozni, lényegében megoldották a természetes 18 aminosav elválasztását.

Laboratóriumunkban célul tűztük ki, hogy meghatározzuk fehérje hidrolizátumok aminosav összetételét vékonyréteg-kromatográfiai úton. Mivel a fent felsorolt szerzők által leírt aminosav-elválasztási eredményeket nem tudtuk teljesen reprodukálni, ezért a szilikagél-cellulóz réteg arányának és a kifejlesztő oldószerkegyek megfelelő kiválasztásával az említett szerzők munkásságára épülő, de azokétól eltérő elválasztási technikát dolgoztunk ki, amely a célunknak megfelelőnek bizonyult.

Az elválasztott kromatogramok kvantitatív kiértékelésére direkt denzitometriás, ill. spektrofotometriás eljárást dolgoztunk ki. Ezeknél a módszereknél az előhívó reagenst *Barrolier* (6) előirata szerint készítettük.

## Kísérleti rész

### 1. Anyagok és vegyszerek

A kalibrációs egyenesek elkészítéséhez felhasznált aminosavak Sigma Chemical Co (USA) gyártmányúak voltak.

A ninhidrin, valamint a kifejlesztő elegyekben, az előhívóban és eluáló oldatban levő vegyszerek analitikai tisztaságúak és legtöbb esetben a Reanal cég gyártmányai voltak.

Vékonyréteg elkészítése: 5 db réteghez 10,5 g szilikagél G-t (Merck), 6,5 g cellulóz MN 300-at (Macherey – Nagel) 50 ml vízzel és 5 ml etanollal turmixgépben lassú fordulatszámmal 2 percig homogenizáltunk. Ezután a szuszpenzióból Desaga ГМВН terítőkészülékkel 0,25 mm vastag rétegeket készítettünk 20×20 cm-es lapokra. A lapokat további felhasználás előtt egy éjén át állni hagytuk.

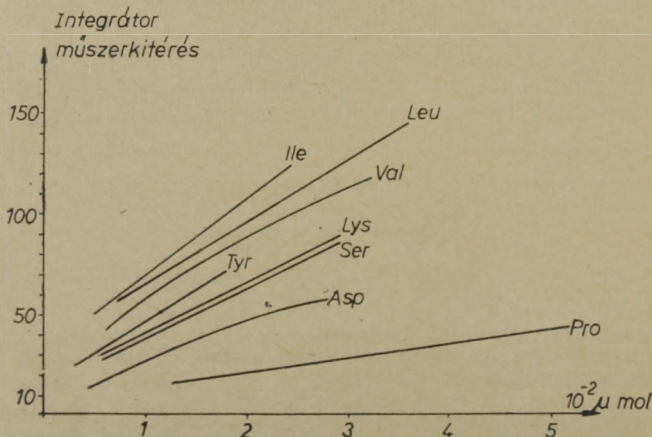
Kifejlesztő elegy (A): izobutilalkohol–88%-os hangyasav-víz 75:15:10.  
 Kifejlesztő elegy (B): tercier butanol-metilalkohol–5%-os ammónia  
 50:30:20.

Mind az előhívó reagenst, mind az eluáló oldatot *Barrolier* (6) előirata szerint állítottuk elő.

## 2. A kromatogram kifejlesztése és előhívása

Az elkészített  $20 \times 20$  cm-es réteglap bal alsó sarkára a két szélről kb. 1,6 cm távolságra felvittünk 10–100  $\mu\text{g}$  mennyiségű fehérje hidrolizátumot, vagy aminosavkeveréket. A startpontot úgy választottuk ki, hogy az első dimenzióban a szádirányra merőlegesen kromatografáltunk. Kb. 50 ml (A) kifejlesztő elegyet öntöttünk  $21 \times 7,5 \times 28$  cm méretű kifejlesztő üvegekamrába. Ezt követően a réteget tartalmazó üveglapot azonnal behelyeztük a kamrába, tehát nem vártuk meg a légtérnek oldószerezrel való telítődését. A kifejlesztést addig végeztük, míg az oldószerek frontja a lap felső szélétől kb. 2 cm távolságra jutott el. Ez kb. 5 óra hosszat vett igénybe. A (B) kifejlesztő eleggyel a második dimenzióban a következő nap folytattuk a műveletet, amely kb. 7 óráig tartott. A kifejlesztés körülményei ugyanazok voltak, mint az első dimenzióánál. A kromatogramot levegőáramban újra megszáritottuk.

Az előhívás a harmadik nap délutáni óráiban történt. A lapokat egyenletesen bepermeteztük az előhívó reagenssel olyan sebességgel, hogy a réteg helyileg ne „folyjon el”. Egy lapra kb. 25 ml reagenst használtunk fel. A lapokat levegőáramban megszáritottuk, majd 18 órán át sötét helyen tároltuk. Az előhívott kromatogram képét az 1. ábra, az egyes aminosavak  $R_f$  értékeit az 1. táblázat mutatja be.



1. ábra

Aminosavak kétdimenziós elválasztása szilikagél G-cellulóz MN 300 62:38 arányú keverékére

Aminosavak  $R_f$  értékei A és B kifejlesztő elegyekkel

Aminosavak	$R_f$ értékek $\times 100$	
	A	B
Alanin .....	49	7
Arginin .....	17	2
Aszparaginsav .....	31	0
Cisztin .....	10	4
Fenilalanin .....	68	45
Glicin .....	32	5
Glutaminsav .....	42	0
Hisztidin .....	12	14
Izoleucin .....	72	35
Leucin .....	73	40
Lizin .....	14	1
Metionin .....	59	27
Metionin szulfoxid .....	21	8
Metionin szulfon .....	25	17
Prolin .....	37	7
Szerin .....	28	12
Tirozin .....	59	23
Treonin .....	36	35
Valin .....	64	21

## 3. Elúciót követő spektrofotometriás meghatározás

Az előhívott és legalább 18 órát állni hagyott kromatogramon a foltok külső kerületét vékony tűvel körbe-karcoltuk. Fém spatulával óvatosan fel-lazítottuk, illetve felkapartuk a karcoláson belül eső réteget. Ezután egy kb. 10–15 ml térfogatú kónikus centrifugacsövet vettünk elő és a felkapart réteg valamint az üvegcső közötti esetleges, a réteg felkaparásából származó elektromos potenciálkülönbséget a fém spatulával kiegyenlítettük. A csövet ezt követően

2. táblázat

Aminosavak spektrofotometriás meghatározásának jellemző adatai

Aminosav	$10^{-2}$ $\mu$ mól aminosav extinkciója (4 ml-ben)	Mérési tartomány $10^{-2}$ $\mu$ mól	Variációs koefficiens
Alanin .....	0,089	0,3 – 4	$\pm 6$
Arginin .....	0,061	0,2 – 3	$\pm 5$
Aszparaginsav .....	0,033	0,5 – 6	$\pm 30$
Fenilalanin .....	0,054	0,3 – 4	$\pm 11$
Glicin .....	0,046	0,4 – 4	$\pm 11$
Glutaminsav .....	0,070	1,0 – 15	$\pm 5$
Hisztidin .....	0,043	0,15 – 2	$\pm 10$
Izoleucin .....	0,077	0,4 – 5	$\pm 5$
Leucin .....	0,074	0,7 – 8	$\pm 5$
Lizin .....	0,077	0,6 – 7	$\pm 9$
Metionin .....	0,037	0,2 – 2,5	$\pm 13$
Prolin .....	0,013	1,0 – 10	$\pm 18$
Szerin .....	0,068	0,6 – 6	$\pm 6$
Tirozin .....	0,062	0,3 – 4	$\pm 11$
Treonin .....	0,064	0,3 – 4	$\pm 9$
Valin .....	0,079	0,6 – 7	$\pm 10$

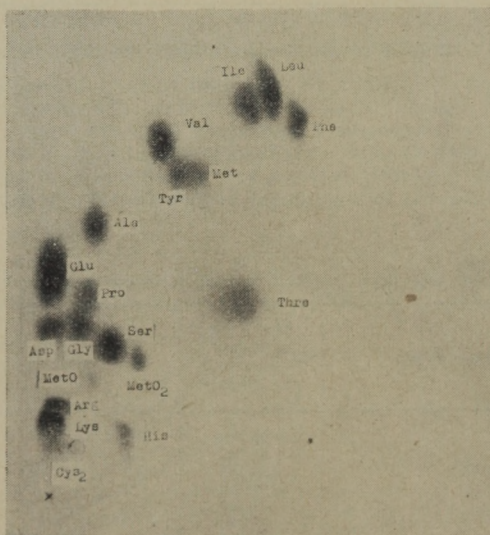
szájával lefelé szorosan a felkapart réteghalom köré helyeztük, majd a réteglapot hirtelen felfordítottuk. Ekkor az előhívott aminosavakat tartalmazó rétegrészecskék a centrifugacsőbe hullottak.

A centrifugacsővekbe ezután 4,0 ml eluáló oldatot pipettáztunk és vékony üvegbottal elkevertük a centrifugacső alján levő részecskékkel. A csöveket bedugaszoltuk, 2 órán át állni hagytuk. Közben még egyszer üvegbottal összekevertük. Végül a csövekben a rétegrészecskéket 10 perces centrifugálással különítettük el az oldatokról. Az oldatok extinkcióját Unicam SP 600 spektrofotométeren vízzel szemben 550 nm-en (a prolint 360 nm-en) határoztuk meg. Az optikai sűrűségek birtokában az aminosav mennyiségeket a 2. táblázatban levő egységnyi koncentrációhoz tartozó extinkciókból számítottuk ki. Az utóbbira azért volt lehetőség, mert az általunk vizsgált aminosavak a 2. táblázatban megjelölt koncentráció-tartományban követték a Lambert – Beer törvényt.

#### 4. Denzitometriás kiértékelés

A kvantitatív meghatározás másik lehetősége az volt, hogy az előhívott aminosavakat denzitometriásan Chromoscan (Joyce, Loeb, England) Double-Beam Recording Densitometer vékonyréteg feltétjével értékeltük ki az előhívást követő napon. Ismeretlen összetételű minta mérésénél a műszer érzékenységét ugyanolyan nagyságúra állítottuk, mint ahogy a kalibrációs görbéket standard

1. Izobutilalkohol – 88%-os hangyasav – víz 75:15:10



2. Tercier butanol-metiletiketon-5%-os ammónia  
50:30:20

2. ábra

Néhány aminosav denzitometriásan felvett integrátor műszerkitérésének és koncentrációjának összefüggése

aminosavakkal felvettük. A műszer alapvonalát a lapon olyan helyen állítottuk be, melynek környékén aminosav-folt nem volt található (pl. a treonin körzetében). Ezután az egyes foltok szintenzitását a kifejlesztés 1. dimenziójának irányában (kivételesen arginin és lizin) lemértük 465-ös jelzésű szűrő alkalmazása mellett. A méréseket kétszer végeztük el. A műszeren leolvastuk a foltok szintenzitálásával arányos görbék alatti területek értékeit. Ezekből az integrátor műszerkitérésekből a megfelelő aminosav kalibrációs görbén határoztuk meg a hozzájuk tartozó koncentrációkat. Néhány aminosavnak egy adott érzékenysége felvett kalibrációs görbéjét mutatja be a 2. ábra.

### Eredmények és megbeszélés

A természetben leggyakrabban előforduló aminosavak tökéletes elválasztása még kétdimenziós rétegekromatográfiás technikával sem egyszerű feladat. Több fajta adszorbenz réteg és kifejlesztő elegy kipróbálása után szilikagél G – cellulóz MN 300 62:38 arányú keverékét találtuk megfelelőnek arra, hogy kísérleti részben ismertetett futtatóelegyek segítségével a kvantitatív meghatározásra alkalmas módon elválasszuk egymástól az aminosavakat. Nem csupán az általában nehezen elválasztható aminosavpárok váltak el, hanem a metionin oxidációs termékei is (metionin-szulfoxid, metioninsulfon), mindez megfigyelhető az 1. ábrán. A futtatás ideje rövidebb mint tiszta cellulózzréteg használatakor, de hosszabb mint a szilikagél esetében.

Kevés szerző foglalkozott vékonyrétegen elválasztott aminosavak eluciót követő fotometriás meghatározásával. Barrolier (6) az általunk is használt stabil kadmiumacetát-ninhidrin reagens segítségével 2–5% pontosságot elérő módszert közölt. Eljárását azonban nem írta le teljes részletességgel, az egyes aminosavakra vonatkozó extinkciók és a mérések pontosságát jelző adatok hiányoznak. Esser (7) egydimenziós technikával a spektrofotometriás mérésnél mikrotérfigat alkalmazásával  $\pm 5\%$  pontosságot ért el. A viszonylag kis mérési hibát valószínűleg az tette lehetővé, hogy a szerző a lemezeket nem befűjással, hanem bemártással hívta elő. Clark (8) cellulóz lapon kétdimenziós elválasztás után az aminosavakat a mennyiségtől függően 10–18% pontossággal határozta meg.

Mint a 2. táblázatból látható, sikerült a természetben leggyakrabban előforduló aminosavakat a vékonyréteg-kromatográfiás eljárás során általában alkalmazott koncentráció tartományban ( $10^{-2}$   $\mu\text{mol}$ ), kétdimenziós technikával történő elválasztás és az előhívott foltok eluálása után spektrofotometriásan átlagosan  $\pm 10\%$  pontossággal meghatározni. A meghatározás 4 napot vesz igénybe. Az aszparaginsav esetében meg nem magyarázható módon nagy volt a mérések szórása. A pontosságot hátrányosan befolyásolhatja a lapok befűjással történő előhívása, mert ily módon nem biztosítható, hogy a réteg minden egyes felületi részére azonos mennyiségű reagens jusson. További kedvezőtlen tényező az, hogy kétdimenziós technikánál nem vihetünk fel standard aminosavakat a rétegre, ezáltal nem tudjuk kiküszöbölni az aminosav-foltok szintenzitását befolyásoló egyéb, jórészt ismeretlen tényezőket. Összehasonlítva Clark (8) munkájával, az általunk alkalmazott kadmiumacetáttal stabilizált ninhidrin-reagens viszont előnyös volt a pontosság növelése szempontjából.

A kromatogramok denzitometriás kiértékelése az eluálást követő fotometriás mérésnél sokkal pontosabb eredményeket adott. Mint a 3. táblázatból látható, a meghatározások átlagos szórása  $\pm 20\%$  volt. A koncentráció és az integrátor műszerkitérések közötti összefüggés a legtöbb esetben egyenes, némely aminosavnál (pl. aszparaginsav, valin) görbe vonalat adott. A csekély pontosság okaira vonatkozólag számos szerző munkájára támaszkodva próbáltunk magyarázatot találni. Elsősorban itt is a kétdimenziós technikából és a

Aminosavak denzitometriás meghatározásának jellemző adatai

Aminosav	$10^{-2}$ $\mu\text{mol}$ aminosav integrátor-műszerkitérése	Mérési tartomány $10^{-2}$ $\mu\text{mol}$	Variációs koefficiens
Alanin .....	50	0,42–1,68	21,2
Arginin .....	40	0,35–1,39	14,2
Aszparaginsav .....	26	0,68–2,70	21,8
Fenilalanin .....	52	0,42–1,66	21,5
Glicin .....	28	0,45–1,80	25,6
Glutaminsav .....	50	1,90–7,60	11,2
Hisztidin .....	22	0,24–0,97	35,6
Izoleucin .....	68	0,58–2,31	10,5
Leucin .....	65	0,88–3,50	15,7
Lizin .....	40	0,70–2,80	17,3
Metionin .....	28	0,25–1,01	28,6
Prolin .....	12	1,26–5,04	30,4
Szerin .....	38	0,70–2,80	16,2
Tirozin .....	47	0,42–1,68	16,2
Treonin .....	40	0,47–1,89	21,8
Valin .....	56	0,76–3,03	17,2

befújásos előhívásból származhat a mérések szórása. A lemezek befújásánál ugyanis nehéz homogén árnyalatú hátteret nyerni, amely megnehezíti különböző lemezek azonos alapvonalának beállítását. Ezen kívül a kromatogramon előhívott foltok alakja és nagysága nagymértékben befolyásolják a denzitometriás mérést [Klaus (9)]. Az általunk alkalmazott cellulóz-szilikagél keverék réteg egyébként is aránylag nagy aminosav-foltokat eredményez, amelyeknél az alak különbségek számottevőek és gyakran előfordulnak. E hibalehetőségek miatt egyes szerzők [Frodyma (10, 11)] a foltok direkt denzitometriája helyett inkább ajánlják azt a jóval nagyobb pontosságot biztosító, de nagyon munkacínyes eljárást, hogy a foltokat tartalmazó réteget lekaparják és standard körülmények között megméri a spektrális visszaverődést. A pontosság véleményünk szerint Frodyma (11) eljárásához hasonlóan legegyszerűbben úgy volna növelhető, hogy a ninhidrint a második dimenzióban történő futtatásnál a kifejlesztő eleyben kellene oldani. Ez a technika viszont eléggé költséges lenne a nagymértékű ninhidrin felhasználás miatt.

Végül köszönetünket fejezzük ki Csendes Jánosnének igen szorgalmas és pontos technikai segítségért.

## IRODALOM

- (1) Pataki G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie. Walter de Gruyter et Co. Berlin 1966.
- (2) Turner, N. A., Redgwell, R. J.: J. Chromatog. 21, 129, 1966.
- (3) Jones, K., Heathcote, J. G.: J. Chromatog. 24, 106, 1966.
- (4) Molnár Gy., Sztarieskai F.: Kísérletes Orvostudomány 79, 534, 1967.
- (5) Pál S., Takács Ö.: Kísérletes Orvostudomány 20, 360, 1968.
- (6) Barrolier J.: Naturwiss. 48, 404, 1961.
- (7) Esser K.: J. Chromatog. 18, 414, 1965.
- (8) Clark, M. E.: Analyst. 93, 810, 1968.
- (9) Klaus R.: J. Chromatog. 16, 311, 1966.
- (10) Frodyma, M. M., Fry, R. W.: J. Chromatog. 15, 501, 1964.
- (11) Frodyma, M. M., Fry, R. W.: J. Chromatog. 17, 131, 1965.

# ПРИМЕНЕНИЕ ДВУХРАЗМЕРНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО И ДЕНЗИТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

*Э. Дворшак – И. Хегедюш*

Авторы разработали метод совершенного отделения 19 аминокислот на тонком слое смеси силикагел Г – целлюлоз МН 300 в отношении 62 : 38, в первом размере использовали смесь изобутиловый спирт – 88%-ую муравьиную кислоту – воду в отношении 75 : 15 : 10, во втором размере терциербутанол – метилэтилкетон – 5%-ый аммоний в отношении 50 : 30 : 20.

Определили на тонком слое отделенных ацетатом калия стабилизированным реагентом ингидрина проявленных 16 аминокислот принадлежащих в диапазон концентрации  $10^{-2}$   $\mu$ мол.

- a) спектрометрически после элюации точно в среднем  $\pm 10\%$ ;
- b) непосредственно денситометрически точно в среднем  $\pm 20\%$ .

## ANWENDUNG DER ZWEIDIMENSIONELLEN DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE ZUR SPEKTROPHOTOMETRISCHEN UND DENSITOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN

*E. Dworschák und M. Hegedüs*

Die Verfasser arbeiteten die vollständige Trennung von 19 Aminosäuren auf einer Dünnschicht, einem Gemisch von Silicagel G und Cellulose MN 300 im Verhältnis 62 : 38 aus; Zur Entwicklung wurden in der ersten Dimension Isobutylalkohol 88%-ige Ameisensäure-Wasser 75 : 15 : 10, in der zweiten tertiäres Butanol-Methyläthylketon – 5%-ige Ammonialösung 50 : 30 : 20 als Laufmittel angewendet.

16 Aminosäuren im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$   $\mu$ mol, getrennt auf der Dünnschicht, entwickelt mit – vermittelt Cadmiunacetat stabilisiertem – Ninhydrin wurden

- a) Nach der Eluierung spektrophotometrisch durchschnittlich mit einer Genauigkeit von  $\pm 10\%$ ,
- b) vermittelt direkter Densitometrie durchschnittlich mit einer Genauigkeit von  $\pm 20\%$  bestimmt.

## APPLICATION OF TWO-DIMENSIONAL THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IN AMINO ACID DETERMINATION BY SPECTROPHOTOMETRY OR DENSITOMETRY

*E. Dworschák and M. Hegedüs*

The complete separation of 19 amino acids was worked out on a thin-layer composed of the 62 : 36 mixture of silicagel and cellulose MN 300. In the first dimension the chromatogram was developed with the mixture of isobutylalcohol – 88% formic acid – water (75 : 15 : 10), in the second dimension with tertiary butanol – methyl ketone and 5% ammonia (50 : 30 : 20).

16 amino acids, falling in the  $10^{-2}$   $\mu$ M region of concentration, separated on thin-layer, and visualized by ninhydrin reagent, stabilized with cadmium acetate, were determined, after elution, with  $\pm 10\%$  accuracy by spectrophotometry.

The same amino acids were determined by direct dosimetry, with  $\pm 20\%$  accuracy.