

Búzafehérjék N-terminális (DNF-) aminosavainak vékonyrétegekromatográfiás elválasztása és meghatározása

VARGA JÁNOS

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1967. augusztus 23.

Előző közleményemben (1) a búzafehérjék N-terminális aminosavainak elektroforézises és papírkromatográfiás vizsgálatáról számoltam be. A meghatározás során több metodikai nehézséget kellett kiküszöbölni. A DNF-aminosavak elválasztása és meghatározása a két módszerrel így nem volt kielégítő. Ezért a sok területen igen jól bevált vékonyrétegekromatográfiás eljárással végeztem további kísérleteket.

A vékonyrétegekromatográfiáról megjelent első közlemény (2) óta ezt az elválasztási módszert a szervetlen és szerves vegyületek legkülönbözőbb csoportjainak elválasztására felhasználják. A papírkromatográfia bár még ma is a legszélesebb körben alkalmazott elválasztástechnika, jó néhány vegyületcsoportnál (pl. DNF-aminosavak, terpének, glükozidok stb.) nem, vagy csak nehézkesen szolgáltatott eredményt. A DNF-aminosavak elválasztására eddigi tapasztalataim szerint, a vékonyrétegekromatográfiás mód vált be a legjobban. Az eljárásnak sok előnye van a papírkromatográfiával szemben, egyéb tekintetben is. A papírkromatográfiás vizsgálatok 10–48 órás idejével szemben ezzel a módszerrel 0,5–3 óra alatt eredményt kapunk. A vizsgált anyagokat élesen választja el egymástól. Kismennyiségek (pl. DNF-aminosavaknál 0,1 μ g) meghatározását teszi lehetővé, továbbá a mennyiségi vizsgálatoknál a lekapat rétegből az elválasztott anyagok jól eluálthatók. A vékonyrétegekromatográfiánál könnyen kivitelezhető az elválás élességét nagymértékben fokozó, ismételt futtatás módszere is.

1. Vizsgálati anyagok

Vizsgálataimhoz kereskedelmi BL 55-ös lisztet használtam fel. A lisztből Osborne (3), illetve Quensel (4) és Pence, Elder (5) szerint állítottam elő, albumin, globulin A, B, C gliadin és glutenin frakciót. A gliadinfrakció kivételével valamennyi frakciót dialízissel sómentesítettem. A vizsgálathoz porított, légszáraz fehérjét használtam fel.

2. A fehérjefrakciók dinitrofenilezése

Az albuminfrakciót nátriumhidrogénkarbonátos közegben oldottam és 5%-os alkoholos 2,4-dinitrofluorbenzol (továbbiakban DNFB) oldatot adtam hozzá. A globulinfrakciókat és a gluteninfrakciót etilénkloridhidrines oldás után nátriumhidrogénkarbonát és 5%-os alkoholos DNFB hozzáadásával dinitrofenileztem. A gliadinfrakciót 70%-os alkoholban oldottam és nátriumhidrogénkarbonát hozzáadása után, 5%-os alkoholos DNFB-oldat hozzáadásával végeztem a dinitrofenilezést. A dinitrofenilezés ideje valamennyi frakciónál 24 óra volt. (Szobahőmérsékleten, rázatás közben.)

A dinitrofenilezett albuminfrakciót sósavas savanyítás után centrifugálással nyertem ki. A többi DNF-fehérjefrakciót savanyítás után körülbelül ötszörös mennyiségű desztillált vízbe öntéssel csaptam ki, majd centrifugáltam. A DNF-fehérjefrakciókat a feleslegben levő DNFB-től és az esetleges jelenlevő szabad aminosavak DNF-származékaitól alkohol-éter (1:1) keverékével s végül éterrel ismételtelen kimostam. A tiszta DNF-fehérjéket szárítottam, majd porítottam.

3. DNF fehérjék hidrolízise

200 mg DNF-fehérjét üvegampullába töltöttem és 50-szeres mennyiségű 5,7 n azeotróp sósavat adtam hozzá. N_2 -gázárammal levegőmentesítettem, majd forrasztás után 105 ± 2 C°-on 8 órán keresztül hidrolizáltam.

4. DNF aminosavak extrakciója a hidrolizátumból

A sósavas hidrolizátumokat desztillált vízzel kb. 3-szorosára hígítottam, majd peroxidmentes éterrel háromszor extraháltam. Az étesres extraktumokat desztillált vízzel sósavmentesre mostam és vákuumban szárazra pároltam. A száraz maradékot 2 ml metanolban vettem föl és a felcseppentést ezekből az oldatokból végeztem el.

Az éterrel extrahált vizes-sósavas maradékokat vízfürdön szárazra pároltam, ismételtelen desztillált vízzel felvettem és újra bepároltam, hogy a sósavat teljesen eltávolíthassam. Végül 2 ml desztillált vízben vettem fel a száraz maradékot.

5. Éteroldható DNF-aminosavak vékonyrétegekromatográfiája

5.1 Az adszorbens réteg kiválasztása és elkészítése

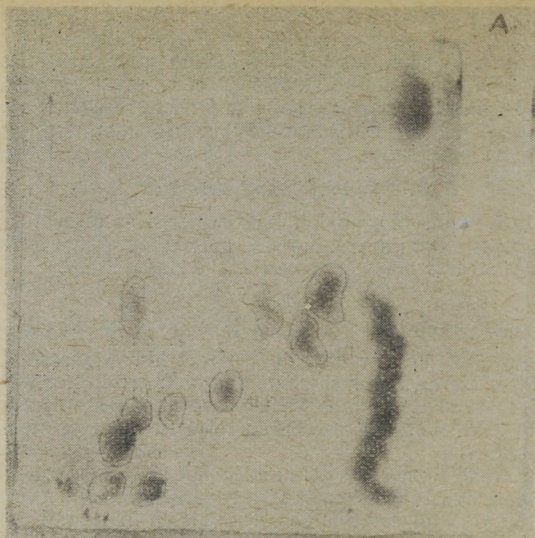
A vékonyréteg adszorbens anyagának kiválasztásánál abból kellett kiindulni, hogy a DNF-aminosavak nem túl hidrofil és savas jellegű anyagok (tekintettel az $-NH_2$ -csoport blokkolására). Ilyen jellegű anyagok elválasztására a legmegfelelőbb rétegananyagok a Kieszelgel G (szilikagél +13% gipsz keveréke) alkalmas. A réteg kialakítását 20×20 cm-es mattirozott üveglapok felületén végeztem. Igen fontos az üveglapok felületének teljes zsírtalanítása s a réteg egyenletes felhordása. Egy-egy lapra – felkenő szerkezettel – kb. 3,5–4 g Kieszelgel G-t vittem fel. (5 db laphoz 20 g Kieszelgel G+45 ml víz keverékét használtam.) A felvitt réteget ventilációval szárítottam meg. A réteg külön aktiválást nem igényelt.

5.2 A futtatószer kiválasztása

Az éteroldható DNF-aminosavak biztonságos azonosítása céljából két-dimenziós futtatást alkalmaztam. Az első irányban az irodalomban ajánlott (6,7) toluolos rendszert használtam előnyösen. (toluol: piridin: etilénklórhidrin: 0,8 n ammónia oldat = 100:30:60:60). A második irányban több futtató kipróbálása után legmegfelelőbbnek a kloroform-benzilalkohol-jégecet (70:30:3,5) keveréke bizonyult, amely az általam alkalmazott felszálló technikánál általában a leg-élesebb elválasztást teszi lehetővé. A vízoldható DNF-aminosavak elválasztását ugyancsak Kieszelgel G-n végeztem el. Felszálló kromatografálás n-butanol-25%-os ammóniaoldat (73:27) keverékében történt.

5.3 Az éteroldható DNF-aminosavak tulajdonképpeni elválasztása.

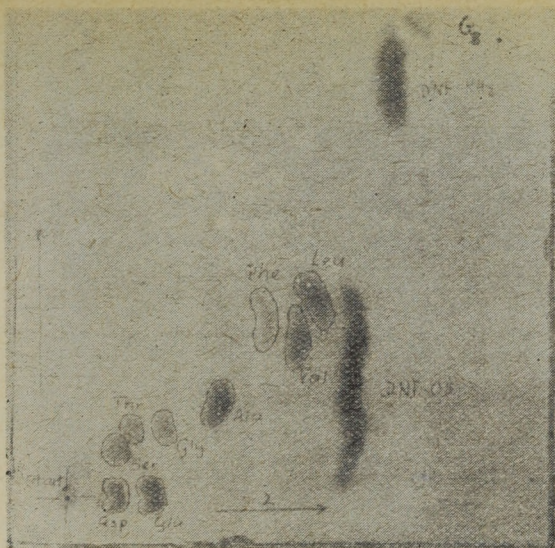
A fentiekben ismertetett módon kapott vékonyrétegre az egyik sarokba, az oldalaktól 2–2 cm-re cseppentettem fel a vizsgálandó anyagot. (Elővizsgálatokból nyert tapasztalatok alapján legalább 20 mg DNF fehérjének megfelelő ekstrak-



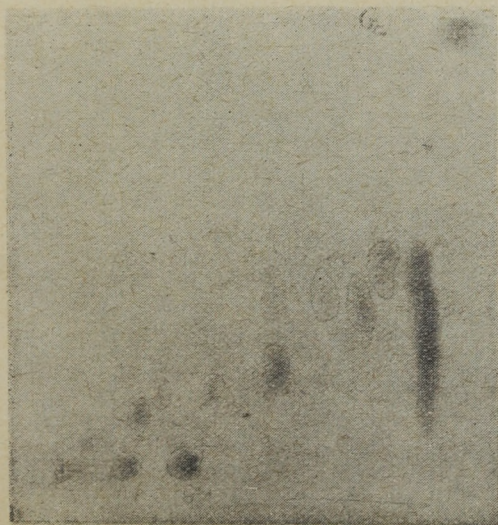
1. ábra. DNF-Albumin frakció



2. ábra. DNF-G_A globulin A frakció



3. ábra. ENF-G_B globulin B frakció



4. ábra. DNF-G_C globulin C frakció



5. ábra. DNF gliadin frakció



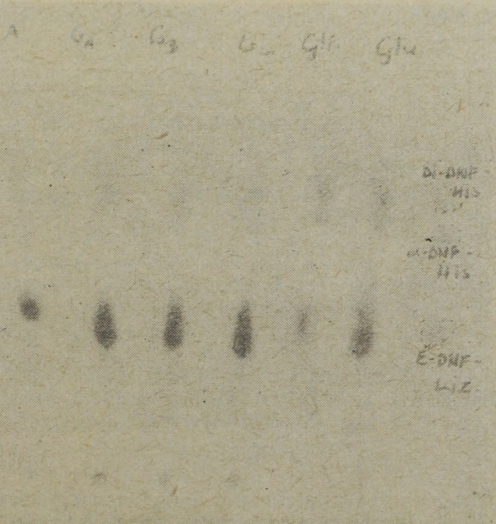
6. ábra. DNF-globulin frakció

tumot kell felvinni, hogy a legkisebb mennyiségben jelenlevő DNF-aminosavak is kimutathatók legyenek.) A 2 ml-nyi metanolos oldatból félmikropipettával 0,2 ml-t cseppentettem fel. Rászárítás után a vékonyréteglemezt az előre elkészített toluolos rendszert tartalmazó üvegcádba helyeztem. Amikor futtatószer a lemez felső széléhez kb. 1 cm-re ért, akkor a lemezt kiemeltem a kádból és meleglevegős ventillációval megszárazítottam. Igen fontos a teljes szárítás, mert különben a második irányban történő futtatást zavarja az esetleg rétegen maradt vegyszer. A második irányú futtatást a már említett kloroform-benzilalkohol-jégecet keverékében végeztem.

A toluolos rendszert legfeljebb két rövid időközű futtatáshoz célszerű használni. Később már „szakálás” foltokat eredményez. A kloroform-benzilalkohol-jégecet keveréket mindig frissen készítettem el. Így jól reprodukálható elkülönült foltokat kaptam. A kétirányú futtatás összideje 4–4,5 óra volt. A különböző DNF-fehérjefrakciók éteroldható N-terminális DNF-aminosavainak kétdimenziós kromatográfiával történt elválasztását az alábbi felvételeken láthatjuk (1–6 ábra).

5.4 A vízdíható DNF aminosavak elválasztása

Az előző vizsgálathoz hasonló módon előkészített vékonyrétegre a 2 ml-nyi desztillált vizes oldatból ugyancsak 0,2 ml-t cseppentettem fel. Rászárítás után a n-butanol 25%-os ammóniaoldat keverékébe helyeztem a lemezt és felszálló kromatografálást végeztem. A felszálló kromatografálás ideje itt lényegesen hosszabb (5 óra) volt. A vízdíható DNF-aminosavak egyszeri futtatással nem választatók jól szét. Ezért ismételt futtatást próbáltam alkalmazni és alkalmazása eredményes volt. Kétszeri futtatás igen jó elválasztást eredményezett. A vizes fázisból történő futtatás jellegzetes képét a 7. ábrán láthatjuk.



7. ábra. Vízdíható DNF-aminosavak. Valamennyi fehérje frakcióból

6. Az eredmények értékelése

A vékonyréteggromatográfiával kapott ábrákat szemlélve megállapítható, hogy az éteroldható DNF-aminosavak közül a DNF-aszparaginsavat, a DNF-glutaminsavat, DNF szerint, a DNF treonint, a DNF glikokolt, a DNF-alanint, a DNF-valint, a DNF-leucint, a DNF-fenilalanint sikerült kimutatni, mint N-terminális aminosavat. A vizes fázisból kimutatott DNF-amino savak közül csak a di-DNF-hisztidin bizonyult N-terminális aminosavnak (az ϵ -DNF-lizin és α -DNF-hisztidin láncközi aminosav).

Valamennyi fehérjefrakcióban sikerült kimutatni 10 aminosavat, melyek N-terminális aminosavak. Ez az eredmény igen érdekes, hiszen azt mutatja, hogy végcsoportok tekintetében minőségi azonosság van a különböző eddig elválasztott búzafehérje frakciók között. Az oldhatóságban mutatókozó különbségek valószínűleg így a polipeptid-láncok természetére (hosszúság, elágazások, oldalláncok stb.) vezethetők majd vissza. Hiszen a kromatogramok rátekintésre is elárulnák, hogy a kvalitatív azonosság mellett az N-terminálisok mennyiségi frakciónként már eltérnek. Erre vonatkozó mennyiségi vizsgálatokat folytatunk.

A vékonyréteggromatográfiás vizsgálat igazolta az elképzelést, mely szerint az irodalmi adatokban eddig meglevő nagy eltérések, a végcsoport aminosavak száma és minősége tekintetében, az azonosítási technika fogyatékoságára vezethetők vissza. Ahhoz ui., hogy a legkisebb mennyiségben jelenlevő DNF-amino savat biztonsággal ki tudjuk mutatni, legalább 20 mg DNF-fehérjéből származó éter oldható DNF-amino savat kell felcseppenteni. Papírkromatográfiánál ez szinte megoldhatatlan feladatot jelent, míg a vékonyréteggromatográfiában nincs akadálya. Ezután már érthető, hogy a vékonyréteggromatográfiával kimutatott glikokol és fenilalanin miért nem szerepelt a papírkromatográfiás vizsgálat eredményei között. Természetesen ezenkívül legalább ilyen jelentős tény, hogy a DNF-amino savak elválási élessége vékonyrétegen összehasonlíthatatlanul jobb, mint papíron.

A különböző búzákból származó fehérjefrakciók N-terminális aminosavainak további minőségi vizsgálata mellett mennyiségi vizsgálatok is folynak, mely eredményekről későbbi közleményben számolok be.

IRODALOM

- (1) Varga J.: ÉVIKE 12, 240, 1966.
- (2) Stahl, E.: Pharmazie 11, 633, 1956.
- (3) Osborne, T. B.: The Protein of the Wheat Kernel. Abderhalden, E.: Handbuch Biol. Arbeitsmethoden. Abt. I. 8. Berlin. 1955.
- (4) Quensel, Q.: Untersuchung über die Gerstenglobuline. Uppsala. 1942.
- (5) Pence, J. W.—Elder, A. H.: Cer. Chem. 30, 275, 1953.
- (6) Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Berlin—Göttingen—Heidelberg 1962. 432. o.
- (7) Tyihák E.—Szabó Z.-né—Vágúfalvi D.—Fehér T.: Réteggromatográfia. Budapest. 1965. 218. o.

ОТДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-ТЕРМИНАЛЬНЫХ (ДФН) АМИНО КИСЛОТ ПШЕНИЧНЫХ БЕЛКОВ ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Я. Варга

Автор исследовал N-терминальные аминокислоты фракций альбумина, глобулина А, В, С, глиадина и глютенина торговой муки БЛ—55 полученных по принципу Осборна, Кипзеля и Пенце, Элдера помощью 2,4 динитрофлюорбензольного метода Сангера. В эфире растворимые и водораствори-

мые ДНФ – аминокислоты отделял на тонком слое Г Кизелга и произвел идентификацию.

Отделение произвел в эфире растворимых ДНФ-аминокислот по двухмерной восходящей технике. В первом направлении применял толуольную систему, в другом направлении применял в смеси хлороформ – бензилалкоголь – ледяноуксусной кислоты.

В смеси *n*-бутанола и 25%-ного раствора аммония произвел наводку водорастворимых ДНФ – аминокислоты однонаправленной восходящей техникой произвел повторную наводку.

Во всех белковых фракциях обнаружил 10 *N* – терминальных аминокислот. Эти аминокислоты по качеству идентичны, но хроматограммы по взгляду свидетельствуют уже о том, что количественные различия имеются между аминокислотами одиночных белковых фракций.

Обнаруженные 10 аминокислоты следующие: из эфирной фазы аспергиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин, глюкоколл, аланин, фенилаланин, валин и лэуцин, из водяной фазы гистидин.

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UND BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN (DNF)-AMINOSÄUREN VON WEIZENEIWEISSSTOFFEN

J. Varga

Verfasser prüfte die *N*-terminalen Aminosäuren von aus Handelsmehl BL-55 nach *Osborne* bzw. *Quensel und Pence, Elder* dargestellten Albumin, Globulin, A, B, C, Gliadin- und Gluteninfraktionen mit der 2,4-Dinitrofluorbenzoldmethode *Sangers*. Er trennte und identifizierte die äther- und wasserlöslichen DNF-Aminosäuren auf einer Dünnschicht Kieselgel G.

Die ätherlöslichen DNF-Aminosäuren wurden vermittels einer aufsteigenden, zweidimensionalen Technik voneinander getrennt. In der ersten Richtung wurde mit dem Toluolsystem, in der zweiten mit einer Mischung von Chloroform-Benzylalkohol-Eisessig chromatographiert. Die wasserlöslichen DNF-Aminosäuren liefen in dem System *n*-Butanol-25% Ammonialösung. Es wurde aufsteigende Technik angewendet, wiederholtes Laufen in einer einzigen Richtung.

Verfasser wies in allen Eiweissfraktionen 10 *N*-terminale Aminosäuren nach. Diese Aminosäuren sind qualitativ identisch, doch verraten die Chromatogramme selbst durch blosse Besichtigung, dass unter den Aminosäuren der einzelnen Eiweissfraktionen quantitative Unterschiede bestehen.

Die 10 nachgewiesenen Aminosäuren sind die folgenden: Aus der ätherischen Phase wurden Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Glykokoll, Alanin, Phenylalanin, Valin und Leucin, aus der wässrigen Phase Histidin nachgewiesen.

SEPARATION AND DETERMINATION OF N-TERMINAL (DNF) AMINOACIDS OF WHEAT PROTEINS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

J. Varga

The 2,4-dinitrofluorobenzene method suggested by *Sanger* has been applied for the investigation of *N*-terminal aminoacids of the albumin, globulin A, B, C, gliadin and glutenin fractions obtained from commercial BL 55 wheat flour by

the method of Osborne, further of Quensel and Pence, Elder, respectively. The ether-soluble and water-soluble DNF amino-acids were separated with the aid of a thin-layer of Kieselgel G, and subsequently identified.

The separation of ether-soluble DNF aminoacids was carried out by a two-dimensional ascending technique. In one dimension, a toluene system while in the other dimension a system of chloroform-benzyl alcohol-glacial acetic acid was applied for chromatography. Water-soluble DNF aminoacids, in turn, were allowed to run in a system of n-butanol and 25 per cent ammonia. A one-dimensional repeated running was applied by the ascending technique.

Ten N-terminal aminoacids were detected in all protein fractions. Though these aminoacids proved to be identical from a qualitative aspect, the chromatograms showed at the first glance quantitative differences in the aminoacid composition of the single protein fractions.

The ten detected aminoacids were as follows. From the ethereal phase aspartic acid, glutamic acid, serine, threonine, glycine, alanine, phenylalanine, valine and leucine, while from the aqueous phase histidine were detected.

SÉPARATION ET DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES PROTÉINES DU BLÉ

J. Varga

L'auteur a examiné avec la méthode de Sanger au 2,4-dinitrofluorobenzine les aminoacides N-terminaux de l'albumine, de la globuline A, B, C, de la gliadine et de la gluténine obtenus à partir de la farine B L 55 du commerce par la méthode de Osborne, et respectivement, de Quensel et Pence et de Elder. Il a séparé et identifié sur une couche mince de gel silicique les aminoacides D N F solubles à l'éther et à l'eau. Il a résolu la séparation des aminoacides D N F solubles à l'éther par une technique ascendante à deux dimensions. Dans la première dimension il a employé la méthode au toluol, dans la deuxième direction il a chromatographié dans un mélange de chloroforme - alcool benzylique - acide acétique glacial. Il a fait courir dans un mélange de n-butanol solution ammonia-céle à 25% les aminoacides D N F solubles à l'eau. Il a employé une technique ascendante à une direction avec répétition.

Il a démontré dans chaque fraction de protéines 10 sortes d'aminoacides N-terminaux. Ces aminoacides sont identiques qualitativement, mais les chromatogrammes indiquent déjà à la vue qu'il y a des différences quantitatives entre les amino-acides des diverses fractions de protéines.

Les dix aminoacides démontrés sont: dans la phase à l'éther acide asparagique, acide glutamique, sérine, thréonine, glycolle, alanine, phenylalanine, valine et leucine, dans la phase aqueuse l'histidine.