

Adatok a pangaminsav (B₁₅-vitamin) természetes előfordulásához

I. Gabonamagvak pangaminsav tartalma

TELEGDY KOVÁTS LÁSZLÓ, BERNDORFERNÉ KRASZNER ÉVA, PÉTERFALVI
MÁRIA ÉS GÁBOR TAMÁS*

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémiai Tanszék

Érkezett: 1969. szeptember 11.

A pangaminsav (B₁₁-vitamin) tulajdonságaival, az élő szervezetben betöltött funkcióival, elméletileg és gyakorlatilag mind több kutató foglalkozik.

Már 1956-ban *Beard* és *Wofford* (1) állatkísérleteikben kimutatták, hogy a pangaminsav a kreatin szintézisében ténylegesen részt vesz, majd *Udalov* (2) megállapította, hogy a pangaminsav mgtílező hatása a legkülönbözőbb vegyületekre kiterjed, többek között a nikotinsav amidra is. A ma már általánosan elismert transzmetilező tulajdonság lipotróp jellege a májfunkciók védelmében jelentős szerepet játszik; mesterséges májzsugornál a pangaminsav csökkentette a vérzést és késleltette a szövetek elhalását.

A pangaminsavnak más irányú detoxikáló hatására *Bertelli és munkatársai* (3) mutattak rá, amikor a pangaminsav pl. alkoholmérgezésnél a vérben felhalmozódó piroszölősav és tejsav eliminálásának mechanizmusát katalizálja.

Végül *Cugadlla* és *Dispensa* (4) szerint, a pangaminsav adagolása oxigénhiány, légszomj esetében is eredményesnek mutatkozik.

E néhány vizsgálati adat birtokában a tudatában annak, hogy a pangaminsav igen kis mennyiségben nagy hatású, valódi biokatalizátor, általános előfordulása a természetben feltételezhetőnek látszik. Erre utal egyébként az a körülmény is, hogy jelenléte mindenütt elvárható, ahol a B-csoport többi tagjai előfordulnak.

Érdekes, hogy mindennek ellenére a pangaminsav természetes előfordulására az irodalomban csak szórványos utalások találhatók, mennyiségi adatok nélkül. A jelenség magyarázatát abban látjuk, hogy a pangaminsav meghatározására gyors és egyszerű módszer nem volt ismeretes.

Előző közleményünkben (5) röviden összefoglaltuk a pangaminsav kimutatására és meghatározására kidolgozott rétegekromatográfiai eljárásunkat, amelynek segítségével sikerült a pangaminsavat hasonló szerkezetű savaktól, pl. almal-, galakton-, glükon-, galakturon- és glükuronsavaktól elválasztani.

Ezután vizsgálatainkat tovább folytattuk a következő feladatok megvalósítására:

1. A bevezetésben foglalt fejtegetések értelmében a pangaminsav feltehetően a természetben egyéb B-vitaminokkal fordul elő. Ezért a kidolgozott rétegekromatográfiai módszer alkalmazhatóságát mindenkéltől tiamin (B₁-vitamin) és riboflavin (B₂-vitamin) jelenlétében tanulmányoztuk.

2. A magyar táplálkozásban fontos szerepet betöltő mezőgazdasági termények, elsősorban gabonamagvak pangaminsavtartalmának elkülönítésére és mennyiségi meghatározására, nagyszámú mintában vizsgálatokat végeztünk.

* Budapesti Műszaki Egyetem Szervetlen Kémia Tanszék

Kísérleti rész

A nagyszámú mintán végzett tulajdonképpeni vizsgálatsorozatot megelőzően néhány gyakorlati problémát igyekeztünk megoldani; így a pangaminsav standard biztosítását, a leghatásosabb előhívószert megválasztását és az esetleg zavaró B₁, B₂-vitaminok elkülönítését és kimutatását.

Standard-oldat készítése

A pangaminsav kalciumsójából (Szovjet Tudományos Akadémia Biokémiai Intézet Vitaminkutató Laboratóriumának készítménye) a pangaminsavat 1 n sósavval szabadítottuk fel és annak 1 mg/1 ml koncentrációjú vizes oldatával végeztük kísérleteinket.

Optimális előhívószert megválasztása

A rétegekromatográfiához a már közölt módon készítettük el a réteget és futtatószernek: n-propanol-etilacetát-víz-25 %-os NH₃ (50 : 10 : 130 : 10) arányú elegyét használtuk. A kifejlesztési idő általában 2 óra volt. Előhívószerek eleinte lúgos káliumpermanganátot alkalmaztunk. A későbbiek során egyéb előhívószereket is kipróbáltunk, mivel a lúgos káliumpermanganáttal előhívott folt pár óra múlva eltűnt. Miután a pangaminsav glükonsav származék és dimetilamin csoportot tartalmaz, a cukorszármazékokkal és a diaminokkal színreakciót adó vegyületek jöhettek számításba új előhívószerként: így pl. a trifeniltetrazóliumklorid, jód, benzidin és foszformolibdénsav.

A trifeniltetrazóliumklorid 4 %-os metanolos oldatát felhasználás előtt metanolos nátriumhidroxiddal 1 : 1 arányban elegyítettük. Befűvés után 110 C°-on szárítószekrényben tartva a pangaminsav piros foltként jött elő.

Érzékeny reagensnek bizonyult a benzidines előhívószert is. Használatánál a réteget először 0,1 %-os vizes nátriumperjodáttal, majd metanolos benzidinoldattal permeteztük be, a pangaminsav kék alapon jól körvonalazott sárga foltként jelent meg.

Jódgőzzel telített exszikkátorba helyezve a pangaminsav barna foltként pár perc alatt előjött.

20 %-os alkoholos foszformolibdénsav oldat hatására zöld háttérben kékes színű foltként jelent meg a pangaminsav.

1. táblázat

A pangaminsav kimutatása különböző előhívószerekkel

Előhívószert	Szín	Kimutatási határ (μg)	R _f × 100 érték
Trifeniltetrazóliumklorid	piros (fehér alapon)	5	45
Benzidin + Na-metaporjodát	fehér (kék alapon)	5	45
Foszformolibdénsav	kékes (zöld alapon)	2	43
Káliumpermanganát	sárga (rózsaszín alapon)	3	43

Vizsgálataink alapján úgy találtuk, hogy a 20%-os foszformolibdénsav pangaminsav kimutatására a legérzékenyebb előhívó reagens.

B₁ – B₂ – B₁₅ vitaminok elkülönítése

A B-vitamincsoport két leggyakrabban vizsgált tagját a B₁- és B₂-vitaminokat együtt futtattuk a pangaminsavval. A vitaminokból 1 mg/1 ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk. A B₁- és a B₁₅-vitamin lúgos káliumpermanganáttal, vagy jóddgőzben kimutatható. A B₂-vitamin sárga foltja szabad szemmel előhívás nélkül is látható.

Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a B₁-, B₂- és a B₁₅-vitamin az általunk alkalmazott futtatószerrel Kieselgel G (Merck) rétegen, eltérő R_f-értékük alapján jól elválaszthatók és megfelelő előhívószer alkalmazásával egymás mellett kimutathatók.

2. táblázat

B₁ – B₂ – B₁₅-vitaminok R_f × 100 értékei

Kieselgel G adszorbens n-propanol-etilacetát-víz-25%-os NH ₃ (50 : 10 : 30 : 10)	B ₁	B ₂	B ₁₅
	71	88	43

Pangaminsav (B₁₅ – vitamin) meghatározása gabonamagvakban

A kísérleti anyagok megválasztásánál az a szempont vezetett, hogy a pangaminsav feltehetően, a többi B-vitaminhoz hasonlóan nagy mennyiségben fordul elő gabonamagvakban. Így esett választásunk a magyar táplálkozásban különösen jelentős termékekre, mint: búza-búzakorpa, árpa, zab, kukoricadara, rizskorpa, továbbá BL 55-, BL 80- és BL 112 búzalisztek. A mintákat a Malomipari Vállalat bocsátotta rendelkezésünkre. A kísérleti körülményeket a pangaminsav fizikai és kémiai tulajdonságai figyelembevételével választottuk meg. A kidolgozott módszer mozzanatai ennek megfelelően a következők:

1. extrahálás
2. fehérjék eltávolítása
3. oldat tisztítása
4. pangaminsav elválasztása egyéb zavaró anyagoktól rétegekromatográfiával
5. a kromatogram előhívása
6. denzitométeres mérés.

Felhasznált anyagok és készülékek

Kalcium-pangamát (Szovjet Tudományos Akadémia Biokémiai Intézet Vitaminkutató Laboratórium készítménye, Moszkva)

Aktív szén

Kieselgel G. (Merck)

n-propanol (pro anal)

Etilacetát (pro anal)

25%-os ammoniák oldat (pro anal)

20%-os alkoholos foszformolibdénsav oldat

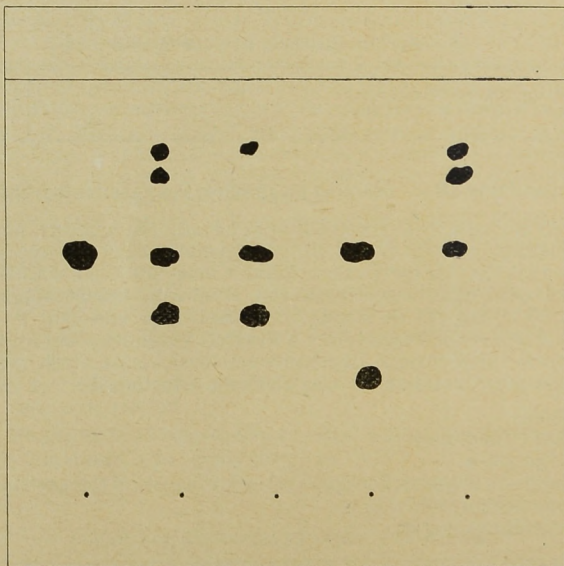
denzitométer (Vitatron)

szögcentrifuga

Eljárás

A vizsgált anyagból 10 g-ot 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba bemértünk. A lombik tartalmához 70 ml desztillált vizet öntöttünk. Lezártuk és rázógépen több órán keresztül rázattuk. (Elővizsgálatok alapján 3 órás rázatás elegendőnek bizonyult.)

A vízben oldható fehérjéket kétféleképpen próbáltuk eltávolítani, egyrészt triklórecetsavval, másrészt az oldat 70 C°-ra felmelegítésével. Úgy találtuk, hogy a felmelegítés után kapott szűrlet kevésbé zavaros, mint a triklórecetsavas kezelés után kapott oldat. Így a továbbiakban a fehérjekicsapást az oldat vízfürdőn 70 C°-ra melegítésével és 5 percig ezen a hőfokon tartásával végeztük el. Ezután 25 C°-ra hűtöttük le, majd szűrővel, illetve centrifugálással különítettük el a zavaró anyagokat. További tisztítás céljából aktív szénrel derítettünk, szűrtünk. A leszűrt oldatot, amely gabonamintáknál kb. 40 ml s a lisztmintáknál 35 ml volt, vákuumban 5 ml-re sűrítettük be.



7. ábra. Rétegekromatogram

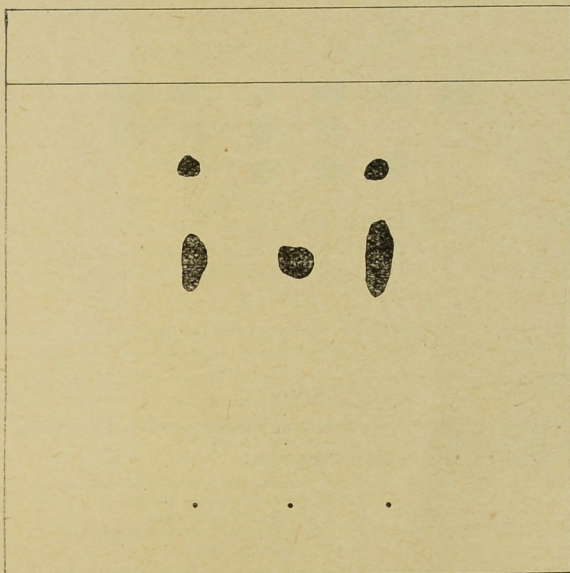
Adsorbens: Kieselgel G (Merck); Futtatószer: n-propanol-etilacetát-víz-25%-os ammóniák (50 : 10 : 30 : 10); Aktiválási idő: 30 percig 110 C°-on;
Előhívószér: 20%-os alkoholos foszformolibdén-sav

1. 15 μ l pangaminsav törzsoldat
2. 10 μ l búzakorpa kivonat
3. 10 μ l búzacsíra kivonat
4. 20 μ l BL 55 lisztminta kivonat
5. 20 μ l BL 80 lisztminta kivonat
6. 20 μ l BL 112 lisztminta kivonat

A mintákat az előre elkészített aktivált Kieselgel G. lemezre vittük fel és a már ismertetett módon futtattunk. A felvitt mennyiség különböző volt: 5–20 μ l között mozgott. Azonosításhoz minden esetben pangaminsav standardot is

felvittünk a lemezekre. 20%-os alkoholos foszformolibdénsavval történő előhívás után az egyes minták pangaminsavtartalma a megfelelő R_f -értéknél többé-kevésbé erős folttal volt kimutatható.

A lemezeken egyéb foltok is megjelentek, melyek több más vegyület jelenlétére utalnak, hiszen a tisztítási műveletek egész sora szükséges ahhoz, hogy a pangaminsavat a többi vízoldható vegyülettől el tudjuk választani. Ennek ellenére rétegekromatográfia segítségével a pangaminsav határozottan kimutatható más vegyületek mellett, amelyek egyébként a pangaminsav kémiai meghatározását zavarják.



2. ábra. Rétegekromatogram

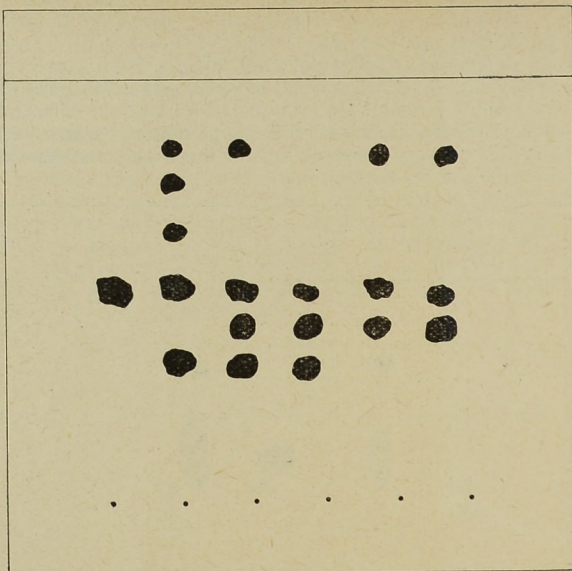
Adsorbens: Kieselgel G (Merck); Futtatószer: n-propanol-etilacetát-víz-25%-os ammóniák (50 : 10 : 30 : 10); Aktiválási idő: 30 percig 110 C°-on;

Előhívószér: 20%-os alkoholos foszformolibdénsav.

- Felvitel: 1. 8 μ l rizskorpa kivonat
2. 20 μ l pangaminsav törzsoldat
3. 5 μ l rizskorpa kivonat

A minták pangaminsav tartalmának mennyiségi meghatározására több lehetőség volt. A rétegekromatogramon a felvitt anyag mennyisége Purdy és Truner (6) szerint, a foltok nagyságából meghatározható. Ennél a kiértékelési módnál – ahol a foltterület mérése igen pontatlan – megfelelőbbnek látszott a denzitométeres mérés. Vitatron-készülék nemcsak a folt területet méri, hanem a foltok intenzitását is. Az extinkciós értékeket a készülék regisztráló berendezés papírra rögzíti. A foszformolibdénsavas színreakciónál 630 nm-nél kaptunk maximális értékeket, tehát a denzitométeres mérésnél ennek a hullámhossznak megfelelő színszűrőt alkalmaztuk.

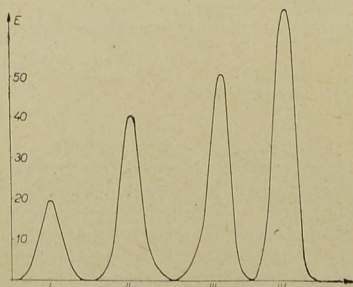
A minták mérése előtt pangaminsavval kalibrációs görbét vettünk fel, hogy megvizsgáljuk a készülék pontosságát. A rajzolt görbék csúcsmaximumai jól értékelhetők. A minták pangaminsavtartalma 10%-os pontossággal megadható.



3. ábra. Rétegekromatogram

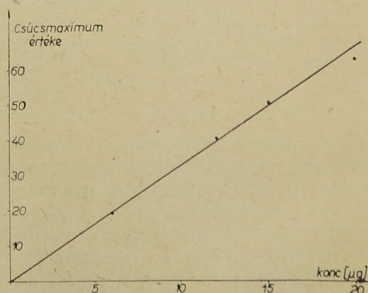
Adszorbens: Kieselgel G (Merck); Futtatószér: n-propanol-etilacetát-víz- 25%-os ammóniák (50 : 10 : 30 : 10); Aktiválási idő: 30 percig 110 C°-on;
Előhívószér: 20%-os alkoholos foszformolibdénsav.

- Felvitel: 1. 15 μ l pangaminsav törzsoldat
2. 5 μ l búzakarpa kivonat
3. 5 μ l árpadara kivonat
4. 5 μ l kukoricadara kivonat
5. 5 μ l zabdara kivonat

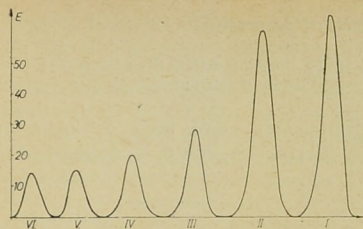


4. ábra. Pangaminsav törzsoldat mérése
(Denzitométrés görbék csúcsmaximumai
alapján)

Felvitel: 6, 12, 15 és 20 μ l pangaminsav
törzsoldat

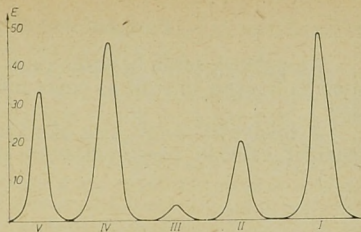


5. ábra. Kalibrációs diagram



6. ábra. Vizsgált anyagok pangaminsav tartalma

- Felvitel: 1. 15 μ l pangaminsav
 2. 10 μ l búzacsíra kivonat
 3. 10 μ l búzakorpa kivonat
 4. 20 μ l BL-112-es lisztminta kivonat
 5. 20 μ l BL-80-as lisztminta kivonat
 6. 20 μ l BL-55-ös lisztminta kivonat



7. ábra. Vizsgált anyagok pangaminsav tartalma

- Felvitel: 1. 15 μ l pangaminsav törzsoldat
 2. 5 μ l búzakorpa kivonat
 3. 5 μ l árpadara kivonat
 4. 5 μ l kukoricadara kivonat
 5. 5 μ l zabdara kivonat

A mintákból kapott értékeket összehasonlítva szembetűnő, hogy a legtöbb pangaminsavat a rizskorpa, míg legkevesebbet az árpadara tartalmazza. Ugyancsak kisebb mennyiségű a lisztminták B₁₅-vitamintartalma is. A vizsgált anyagok pangaminsavtartalmát a denzitométeres mérés alapján a 3. sz. táblázat mutatja:

3. táblázat

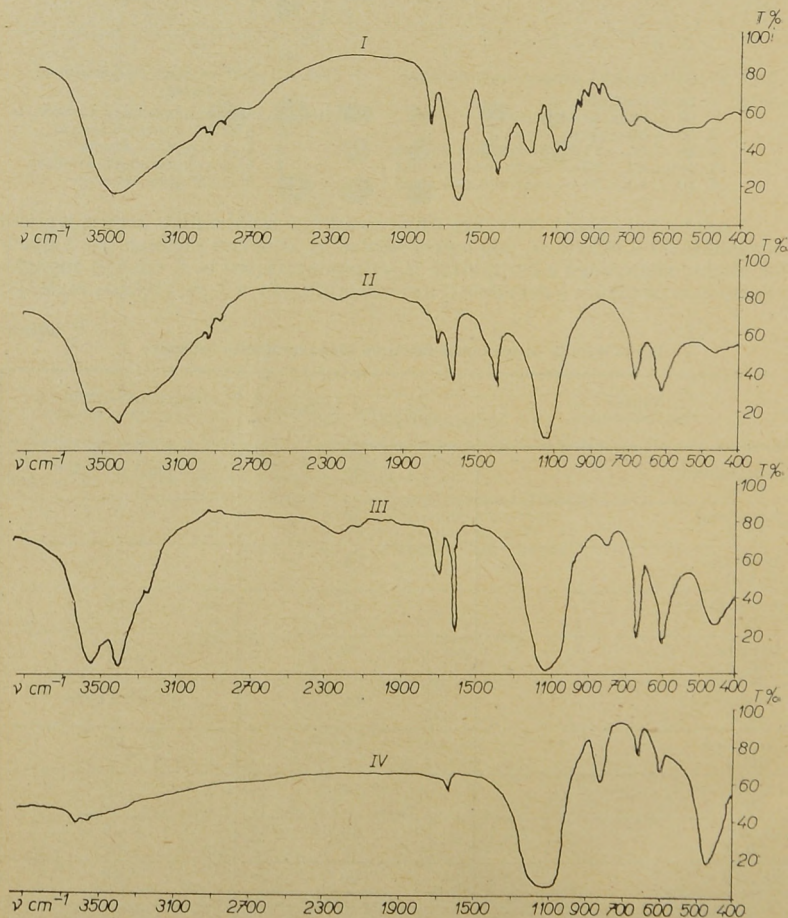
Egyes minták pangaminsavtartalma (denzitométeres mérések)

Minták (felvitel- μ l-ben)	Csúcsmax. értékek	B ₁₅ -vitamintartalom (mg/100 g anyag)
Pangaminsav 15 μ l	48	1 mg/1 ml oldat
Búzakorpa 10 μ l	20	31
Árpadara 5 μ l	4	12
Kukoricadara 5 μ l	47	150
Zabdara 5 μ l	34	106
Pangaminsav 15 μ l	65	1 mg/ml oldat
Búzacsíra 10 μ l	60	70
BL 55 20 μ l	14	8
BL 80 20 μ l	15	9
BL 112 20 μ l	20	12
Pangaminsav 20 μ l	45	1 mg/ml oldat
Rizskorpa 5 μ l	45	200

Pangaminsav (B₁₅ - vitamin) azonosítása

Az előbbieket során beszámoltunk arról, hogy hogyan nyertük ki a pangaminsavat és hogyan sikerült az egyes minták pangaminsavtartalmának meghatározása.

A továbbiak során meg akartunk bizonyosodni arról, hogy a kimutatott vegyület valóban pangaminsav-e. Mivel a kiértékelés során megállapítottuk,



8. ábra. Infravörös abszorpciós színeképek

1. Ca-pangamát
2. Ca-pangamát futtatás és eluálás után
3. Rizskorpa kivonat futtatás és eluálás után
4. Szilikagél

hogy a rizskorpa különösen jelentős mennyiségű pangaminsavat tartalmaz, ezért az azonosításhoz vizes rizskorpa kivonatot használtunk fel.

A futtatást a szokott módon végeztük és a rizskorpa kivonatot igen nagy koncentrációban futtattuk. A lemez egyik részét, ahová standardként a pangaminsavat és a rizskorpa kivonát kis mennyiségét vittük fel, előhívtuk. A pangaminsav feltjának megfelelő magasságban a nem detektált részen az adszorbenst kikapartuk. A gélről kis G_4 -es üvegszűrőn 5 ml desztillált vízzel a megkötődött pangaminsavat eluáltuk. Feltehető volt, hogy a víz egyéb anyagokat is kiold és nemcsak a pangaminsavat tartalmazza. Ezért az eluátumból néhány ml-t újból rétegekromatografálásnak vetettünk alá. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy az eluált minta az összehasonlítóként felvitt pangaminsav feltjával azonos magasságban található. Ez azt bizonyítja, hogy a rétegről desztillált vízzel eluálható a vizsgált anyag pangaminsavtartalma.

Ezután a kapott eluátumok infravörös abszorpciós szinképét UR 20. infravörös spektrofotométeren vettük fel a jellegzetes csoportok azonosítása céljából.

Feltehető, hogy a szilikagél egy részét a desztillált víz kioldja és ez zavarólag hat az eluátum szinképre. Ennek a hibának az elkerülésére a tiszta szilikagél IR-spektrumát is felvettük. Az adatokból megállapítható, hogy a szilikagél nem zavarja az eluátum spektrumát, az anyagra jellemző csúcsok helyén a szilikagél spektrumában elnyelés nem tapasztalható. Az előbbi ábra a kalciumpangamát, a rizskorpa eluátum és a szilikagél szinképét mutatja.

A szinképek összehasonlítása alapján meggyőződhetünk arról, hogy a rizskorpa szinképében jelen vannak a pangaminsav jellegzetes csúcsai. (Észtercsoport 1710–1730-as, OH-rezgések 3200–3600-as hullámszámmal.)

Ezek a vizsgálatok teljes bizonyításul szolgálnak a természetes anyagok pangaminsavtartalmára vonatkozóan. Teljesen tiszta pangaminsav birtokában az azonosítást tovább folytatjuk; továbbá vizsgálatainkat kiterjesztjük a pangaminsav fotometriás meghatározására is.

— . . . —

A pangaminsav (B_{15} -vitamin) rétegekromatográfiai módszer segítségével a szerzők által alkalmazott futtatószerezrel Kieselgel G rétegen a B_1 - és B_2 -vitaminoktól eltérő R_f -értéke alapján elválasztható.

Gabonaőrleményekből a pangaminsav kinyerhető, rétegekromatográfiával a többi vízoldható vegyülettől elválasztható és mennyisége denzitométerrel meghatározható. A vizsgált gabonaőrlemények jelentős (8–200 mg/100 g anyag) pangaminsavat tartalmaznak.

Az azonosítást ismételt rétegekromatográfiával, illetve az eluátumok infravörös abszorpciós szinképének elemzése alapján végeztük el.

I R O D A L O M

- (1) Beard, H. H., Wofford, G.: *Exper. Med. Surg.* 14, 169, 1956.
- (2) Udalov, J. F.: *Dokl. Akad. Nauk SzSzSR.* 143, 734, 1962.
- (3) Bertelli, A., Casentini, S., Lanzetta, A.: *Minerva Med.* 48, 3425, 1957.
- (4) Cupadila, E., Dispensa, E.: *Minerva Med.* 48, 3428, 1957.
- (5) Telegdy Kováts L., Berndorferné Kraszner É., Dévai A.: *EVIKE* 13, 84, 1968.
- (6) Purdy, S. J., Truter E. V.: *Chemistry and Industry*, 506, 1962.

ДАННЫЕ НАТУРАЛЬНОГО НАХОЖДЕНИЯ ПАНГАМИНОВОЙ
КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА В₁₅).
I. СОДЕРЖАНИЕ ПАНГАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ХЛЕБО-ЗЕРНАХ

Л. Телегди-Ковач, Б. Е. Краснер, М. Пэтерфалви и Т. Габор

Пангаминовую кислоту (витамин В₁₅) на основании от витамина В₁ и В₂ отклоняющихся величин R_f возможно отделить методом слоистой хроматографии и помощью авторами использованной наводкой на слое Кизельгель Г.

Пангаминовую кислоту возможно получить из помола зерна, слоистой хроматографией отделить ее от остальных водорастворимых химикатов, а количество определить денситометром. Испытанные помолы зерна содержат значительное количество пангаминовой кислоты (8–200 мг/100 г помола).

Идентификацию проводили повторной слоистой хроматографией и на основании спектрофотометрии инфракрасной абсорбции элюатов.

ANGABEN ÜBER DAS NATÜRLICHE VORKOMMEN DER
PANGAMINSÄURE (VITAMIN B – 15). I. PANGAMINSÄUREGEHALT
VON GETREIDEKÖRNERN

L. Telegdy Kováts, É. Kraszner-Bendorfer, M. Péterfalvi und T. Gábor

Die Pangaminsäure (Vitamin B₁₅) kann vermittels Dünnschichtchromatographie, mit dem von den Verfassern angewandten Laufmittel auf Kieselgel G Schicht von den Vitaminen B₁ und B₂ aufgrund seines abweichenden R_f Wertes getrennt werden.

Aus Getreidemahlprodukten kann die Pangaminsäure extrahiert, vermittels Dünnschichtchromatographie von den anderen wasserlöslichen Verbindungen getrennt und densitometrisch quantitative bestimmt werden. Die geprüften Getreidemahlprodukte enthielten eine bedeutende Menge (8–200 mg/100 g Substanz) Pangaminsäure.

Die Identifizierung erfolgte durch wiederholte Dünnschichtchromatographie, bzw. Analyse von infraroten Absorptionsspektren der Eluate.

CONTRIBUTIONS TO THE NATURAL OCCURENCE OF PANGAMIC
ACID: I. PANGAMIC ACID CONTENT OF GRAINS

*L. Telegdy Kováts, É. Kraszner-Bendorfer, M. Péterfalvi and
T. Gábor*

Pangamic acid (vitamin B₁₅) may be separated from the vitamins B₁ and B₂ by thin layer chromatography on Kieselgel G run in the solvent employed by the authors.

Pangamic acid may be extracted from the cereal products, separated by TLC from the rest of the water soluble compounds and estimated by densitometry. The cereal products investigated contain a considerable amount (8–200 mg/100 g substance) of pangamic acid. Identification was carried out by multiple TLC and analysis of the IR-spectra of the eluates.