

D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés-oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában

I. AZ ALANIL DIPEPTIDEK SZÉTVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

CSAPÓ JÁNOS*, PENKE BOTOND**,
ÉS CSAPÓNÉ KISS ZSUZSANNA*

* Agrártudományi Egyetem (Keszthely) Állattenyésztési Kar Kaposvár

** Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézet, Szeged

Az utóbbi időben régész és állattenyésztő kollégáink részéről egyre sürgetőbb igény merült fel különböző anyagokban előforduló D- és L-aminosavak szétválasztására és pontos meghatározására. Az elmúlt 25–30 év alatt többen igen sokféle módszert dolgoztak ki fossziliák aminosav racemizáción alapuló korának meghatározására, mely meghatározásnak alapja az a felismerés, hogy az élő szervezetet alkotó L-aminosavak az élőlény halála után racemizálódva részben D-aminosavakká alakulnak át. Meghatározva tehát a D- és az L-aminosavak mennyiségét például egy kőületben vagy egy megkövesedett csontmintában, a minta kora – a különböző egyéb tényezők (hőmérséklet, a talaj pH-ja, nedvesség, stb.) messzemenő figyelembe vételével megbecsülhető. Állattenyésztő kollégáinkat az alábbiak sarkalták arra, hogy a D- és L-aminosavak meghatározásával foglalkozzanak: A kérdésző állatfajokban a takarmány fehérjetartalmának egy része a bendőben lebomlik és a keletkező ammóniából a bendőlakó mikroorganizmusok felépítik saját fehérjeiket, tehát a takarmány fehérjetartalmának egy része átalakul mikrobiális fehérjévé. Ez az átalakulás hasznos lehet akkor, ha az alacsony biológiai értékű takarmányfehérjéből vagy NPN anyagokból magasabb biológiai értékű baktériumfehérje keletkezik, ezzel szemben hátrányos a nagy biológiai értékű takarmányfehérje bendőbeli lebomlása. A takarmányfehérje bendőbeli lebomlásának nyomonkövetésére az egyik legújabban kifejlesztett módszer a bendőtartalom D- és L-alanin tartalmának mérése, hisz a D-alanin csak a mikrobiális fehérjeszintézis során keletkezik, a takarmányfehérje D-aminosavakat nem tartalmaz.

A fossziliák kormeghatározásánál leginkább alkalmazott aminosav a D-aszparaginsav és a D-allo-izoleucin, a bakteriális fehérjeszintézis nyomonkövetésére pedig a D-alanin. Igényként merült fel a többi fehérjeépítő aminosav fossziliákból történő meghatározása, valamint annak kimutatása, hogy vajon a bakteriális fehérjeszintézis folyamán a D-alaninon kívül keletkezik-e más D-aminosav is, és ha igen felhasználható-e ennek mérése a bakteriális fehérjeszintézis mennyiségének becslésére. Fentiekre választ adni csak úgy lehetséges, ha rendelkezésünkre áll egy olyan eljárás, mellyel a D- és L-aminosavak szétválasztása és meghatározása megoldható.

1. Irodalmi áttekintés

A különféle anyagokból végzett aminosavmeghatározás előtt a mérendő mintákat megfelelően elő kell készíteni, a fehérjetartalmú frakciókat koncentrálni, a szennyező anyagokat pedig elválasztani szükséges. A fehérjetartalmú tisztított

frakciót az aminosavanalitikában általánosan használt 6 mólos sósavval 22–24 órán át 105–110 °C-on hidrolizálják, a hidrolízis befejezésekor a sósvat bepárolják, majd egy kation, illetve anioncserés tisztítás után az ismételtlen bepárolt minta kész a D- és L-aminosavak meghatározására.

Az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására több módszer is kidolgoztak. A tiszta aminosavak racemizációjának tanulmányozására használták a polarimetriát, majd a különböző enzimikus technikák nyertek teret. E módszerek hibája, hogy nem használhatók a D-aminosavak nyomnyi mennyiségének kimutatására, és igen jelentős hibaforrás lehet az enzimekből származó aminosavakkal történő szennyezés is.

A D- és L-aminosavak szétválasztására az egyik leggyorsabb módszer a gázkromatográfia. Az enantiomereket szét lehet választani egy megfelelő aszimmetrikus reagenssel létrehozott diasztereomer-pár formában, vagy az illékonyvá tett származékot egy optikailag aktív álló fázison lehet szeparálni. A gázkromatográfiai technikát ma már olyan tökéletesre fejlesztették, hogy az enantiomerek meghatározásának hibája kisebb mint 5%, és a reprodukálhatóság is rendkívül jó.

Az enantiomerek szétválasztására és meghatározására egyre inkább teret nyer újabban a folyadékkromatográfia. *Weinstein és Weiner* (1984) az aminosavakból a fluoreszkáló 5-dimetil-amino-naftalin-l-szulfonil (danzil) származékot képezték és fordított fázisú folyadékkromatográfiával az N,N'-di-n-propil-L-alanin és rézacetát királis töltet alkalmazásával az összes fehérjealkotó aminosav D- és L-enantiomerjét szét tudták választani egy mintából. *Marfey* (1984) az 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid segítségével – mely egy igen reakcióképes fluoratomot tartalmaz – diasztereomer származékokat hozott létre, melyek folyadékkromatográfiaival szétválaszthatók. Biológiaiaktól aktív anyagok optikai tisztaságának ellenőrzésére különböző direkt folyadékkromatográfiai módszereket is kidolgoztak. E módszer lényege a királis oszlop – mely kémiaiilag kötött L-hidroxi-prolin-Cu²⁺ komplexből áll, és a mozgó fázis, mely Cu²⁺ ion tartalmú vizes oldat. A stationáris fázis alkalmazásával mód nyílik mindazon vegyületek optikai tisztaságának ellenőrzésére, melyek kelát komplexeket képeznek a Cu²⁺ ionokkal, mint amilyenek például az aminosavak. A módszer hibája, hogy egyszerre csak egy aminosav D- és L-alakját lehet vele meghatározni.

A fehérjeépítő aminosavak közül a hidroxiprolin és a treonin mellett az izoleucin az, amely két aszimmetria centrummal rendelkezik. Az izoleucinból a racemizáció során keletkező D-alloizoleucin – mely az izoleucin diasztereomerje – a rutinszerűen alkalmazott ioncserés aminosavanalízis során az izoleucin és a metionin között eluál, azoktól jól elváló és jól értékelhető csúcsot ad. Az α -helyzetű szénatom racemizációját, a D-alloizoleucin képződését a peptidszintézis folyamán igen behatóan tanulmányozta *Bodánszky és Conklin* (1967). Vizsgálták többek között a sósavas hidrolízis és a különböző harmadrendű aminok hatását a racemizációra. Az izoleucint és a D-alloizoleucint aminosavanalizátorral választották el egymástól. *Manning és Moore* (1968) ugyancsak egy ioncserés oszlopkromatográfiai eljárást írtak le a D- és L-aminosavak szétválasztására és mennyiségi meghatározására. Az eljárást elsősorban a peptidszintézis során felhasznált aminosavak sztereokémiai tisztaságának ellenőrzésére dolgozták ki, de a módszer jól használható az L-aminosav mellett nyomokban előforduló D-aminosav mennyiségi meghatározására is. A módszer lényege egy L-aminosav N-karboxianhidridnek a vizsgálható D- és L-aminosavakkal lejátszó reakciója, melynek során diasztereomer dipeptidek keletkeznek, melyek alkalmasak az ioncserés szétválasztásra. A dipeptidek előállítására a *Hirschmann és munkatársai* (1967) által leírt eljárást alkalmazták, melynek során az N-karboxi- α -aminosav anhidridet vizes közegben 0–2 °C között pH = 10,2–10,4 tartományban adták a vizsgálható aminosavhoz.

A fenti reakciókörülmények minimális változtatásával az összes fehérjeépítő aminosavból 90% körüli kitermeléssel tudtak diasztereomer dipeptideket előállítani, és így a D- és L-aminosav tartalmat meghatározni. Fenti módszert alkalmazva, *Manning és Moore* (1968) 2μ mol aminosavtartalmú mintákból 1000 rész L-aminosav mellett 1 rész D-aminosavat is ki tudtak mutatni.

Izumiya és Muraoka (1969) a peptidszintézis során bekövetkező racemizáció mérésére egy egyszerű módszert dolgozott ki, melynek az a lényege, hogy a Gly-L-Ala dipeptidet – a peptidszintézisnél alkalmazott kísérleti körülmények között – L-leucinnal kapsolták. Amennyiben a kísérleti körülmények nem vezetnek racemizációhoz, akkor a racemizáció terméke a Gly-L-Ala-L-Leu tripeptid, ha viszont a szintézis során racemizáció következik be, úgy a keletkezett D-L-izomer aminosavanalizátoron vagy ioncserés vékonyrétegen az L-L-származéktól elválasztható és kvantitatíve mérhető. Mivel a D-L-izomer alacsonyabb R_f értékű ill. később eluál, a megjelenő két csúcs (illetve lemezen két folt) közül az első az L-L-, a második a D-L-izomernek felel meg.

A rendelkezésünkre álló szakirodalmat összevetve laboratóriumunk lehetőségeivel döntöttünk úgy, hogy a peptidkémiában az utóbbi években lejátszódott fejlődés figyelembevételével egy ioncserés oszlopkromatográfiai módszert dolgozzuk ki a D- és L-aminosavak diasztereomer dipeptid alakban történő elválasztására. A módszer kidolgozásánál arra törekedtünk, hogy az általunk leírt kísérleteket egy aminosavanalizátorral rendelkező laboratóriumban reprodukálni lehessen, a módszer lehetőleg egyszerű lépésekből álljon és sorozatvizsgálatra is alkalmas legyen. Fentiek figyelembevételével a D- és L-aminosavak szétválasztására és meghatározására általunk javasolt módszer az alábbi lépéseket tartalmazza:

- a minta előkészítése;
- a mintában levő fehérje sósavas hidrolízise;
- az aminosavak szétválasztása ioncserés oszlopkromatográfiával;
- a diasztereomer dipeptidek szintézise;
- a diasztereomer dipeptidek szétválasztása és meghatározása.

2. Anyagok és módszerek

2.1. A felhasznált anyagok

Módszerünk leglényegesebb lépése a diasztereomer dipeptidek szintézise és szétválasztása. Mivel az oldatban végzett peptidszintézisekben manapság is az egyik legáltalánosabban alkalmazott módszer az aktív észteres kondenzáció (a reakció csaknem kvantitatív, a termék tisztítása egyszerű), mi is ehhez a módszerhez folyamodtunk. Figyelembe véve azt, hogy a meghatározni kívánt aminosavak szétválasztása, valamint a diasztereomer dipeptidek elválasztása is vizes közegben történik, az aktív észterek közül az N-hidroxiszukcinimid észterre (ONSu) esett választásunk, hisz ezek az észterek vizes közegben is kiválóan kapcsolnak és a kapcsolás folyamán keletkező melléktermék az aminosav analízist nem zavarja. A következő lépésként azt kellett eldönteni, hogy az aktív észteres kondenzáció folyamán milyen csoporttal védjük az acilező aminosav aminosocportját. Mivel az L-L illetve L-D dipeptidek aminosav analízissel történő meghatározása előtt a védőcsoportot – hogy a mérendő vegyület ninhidrin pozitív legyen – el kell távolítani, választásunk a terc. butil-oxi-karbonil-csoportra (BOC) esett, A BOC-csoportot egyszerűen könnyű kiépíteni, másrészt a dipeptidszintézis után a védőcsoport hasítása trifluorecetsavval vagy 1 mólos jégecetes sósavval könnyen megoldható.

A védőcsoport és az aktív észter kiválasztása után azt kellett eldönteni, hogy melyik legyen az acilező aminosav a rendelkezésre álló fehérjeépítő aminosavak közül. Mivel fontos, hogy az acilező aminosav aszimmetria centrummal rendelkezzen valamint a kapcsolás a lehető legrövidebb időt vegye igénybe, választásunk az alaninra (Ala) esett. Az elmondottak megvalósítására szintetizáltuk a terc. butil-oxi-karbonil-L-alanin-N-hidroxiszukcinimid-észtert (terc.-BOC-L-Ala-ONSu) a peptidkémiával foglalkozó kézikönyvekben leírt módon (Bajusz, 1980).

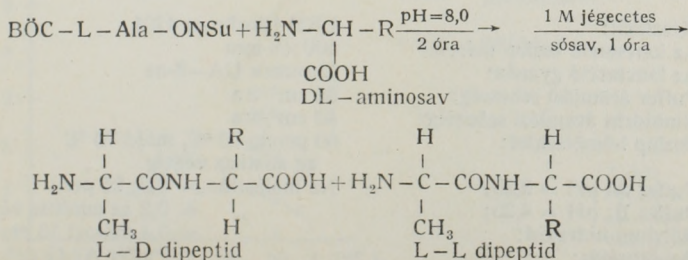
Az aktív észter szintézise után kristályos aminosavakból (standardek) illetve az aminosavanalizátoron elválasztott egyes aminosavakból állítottuk elő a diasztereomer dipeptideket.

2.2. A fehérjealkotó aminosavak szétválasztása és meghatározása

A csontminták illetve a bendőfolyadék nyersfehérje tartalmát Kjel-Foss-16200 gyors nitrogénelemzővel határoztuk meg, majd a nyers-fehérje tartalom függvényében 100–1000 mg anyagot (körülbelül megfelel 10–20 mg fehérjének) 6 mólos sósavval 24 órán át hidrolizáltunk. A hidrolízis befejeztével a sósav oldatot liofilezéssel eltávolítottuk a mintából, majd a vizes feloldás során kivált szilikátokat centrifugálással választottuk el a szabad aminosav tartalmú folyadéktól. A nyert oldat alkalmas az izoleucin és a D-allo-izoleucin meghatározására ioncserés oszlop-kromatográfiával, illetve ugyanezzel a módszerrel a fehérjealkotó aminosavak szétválasztására. A meghatározást illetve a szétválasztást LKB 4101 típusú aminosavanalizátorral és a hozzá kapcsolt LKB frakciószedővel végeztük. Az egyes aminosavaknak megfelelő kémcsoveket beazonosítottuk majd liofilezéssel szárítottuk. Ezt követően az egyes aminosavakból vagy egyenként, vagy néhány aminosavot összekeverve hoztuk létre a diasztereomer dipeptideket.

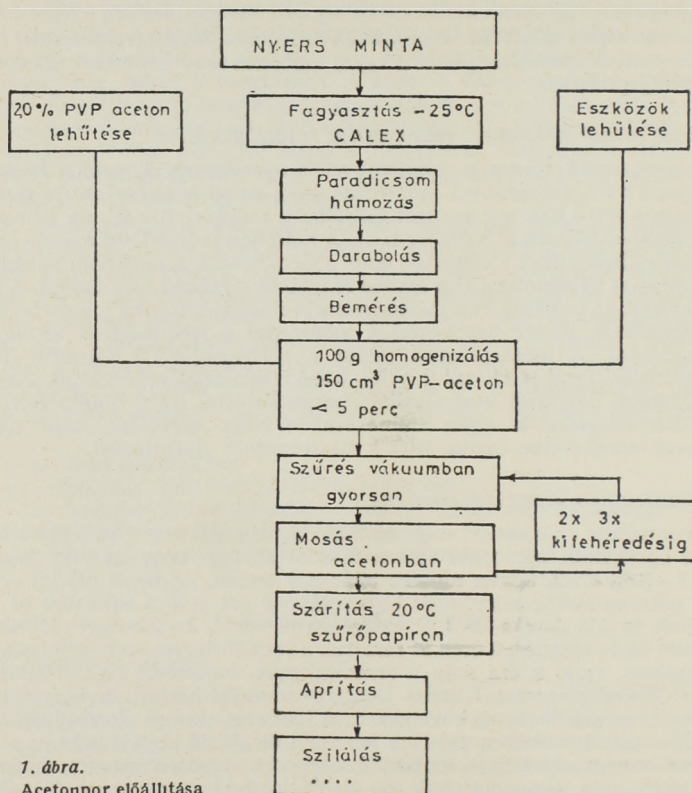
2.3. A diasztereomer dipeptidok szintézise

A szintetikus aminosavat vagy az aminosavanalizátorral elválasztott és liofilezéssel beszárított maradékot vízben feloldottuk úgy, hogy az oldat koncentrációja 1–10% körül legyen minden aminosav esetén. Az oldat pH-ját egy-két kristály nátrium-hidrogén-karbonát hozzáadásával pH = 8-ra állítottuk be majd hozzáadtuk az Ala dioxán-víz 1:1 elegyében feloldott, 2–2,5-szeres fölöslegben levő védett aktív észterét, 2 órán át rázattuk a reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy rázógépen, majd 2 óra után a reakcióelegyet liofilezővel beszárítottuk. Ez után a BOC-védőcsoportot 1 mólos jégeces sósavval hasítottuk le (reakcióidő 1 óra) majd ismételt liofilezés következett. A liofilezés után az alanil-dipeptideket pH = 2,2-es citrát pufferben oldottuk fel, majd megfelelő hígítás után az oldatot vittük az aminosavanalizátor ioncserélő oszlopára a diasztereomer dipeptidok elválasztására. Az elmondottakat az alábbi reakcióegyenletekkel foglalhatók össze:



2.4. Az alanil-dipeptidok szétválasztása és meghatározása

Az 1. ábra a DL-Asp, a 2. ábra a DL-Glu, a 3. ábra a DL-Ala, a 4. ábra a DL-Val, az 5. ábra a DL-Ile, a 6. ábra pedig a DL-Phe aminosavakból képzett L-L illetve a D-L alanil diasztereomer dipeptidok szétválasztását mutatják. Az elválasztás körülményei az alábbiak voltak:

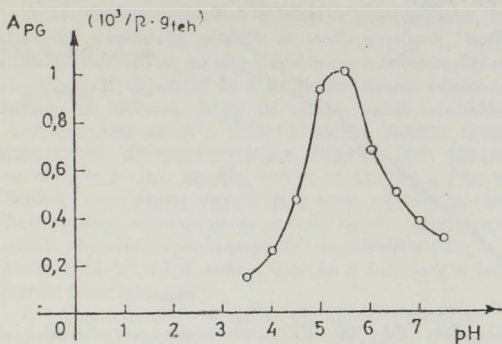


1. ábra.
Acetonpor előállítása

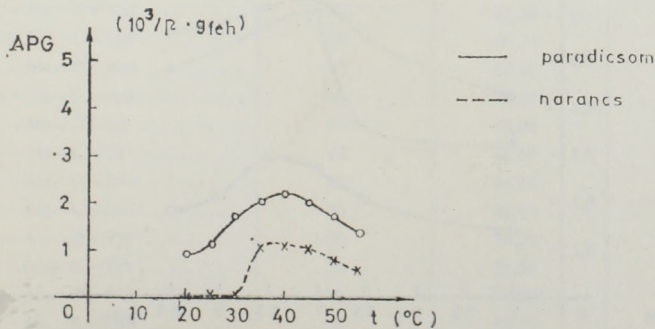
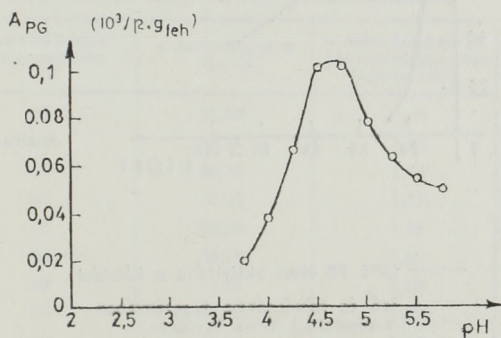
Készülék:
Az ioncserélő oszlop mérete:
Az ioncserélő gyanta:
Puffer áramlási sebesség:
Ninhidrin áramlási sebesség:
Oszlop hőmérséklet:

Puffer A: pH = 3,25;
Puffer B: pH = 4,25;
Nátrium-hidroxid:
Equilibrálás:

LKB Biochrom 4101
500×6 mm
Chromex UA -8-as
80 cm³/óra
40 cm³/óra
60 percig 50 °C, majd 70 °C
az analízis végéig
Na molaritás = 0,2; 25 perc
" = 0,2 az analízis végéig
" = 0,4 mólos; 15 perc
Puffer A; 45 perc



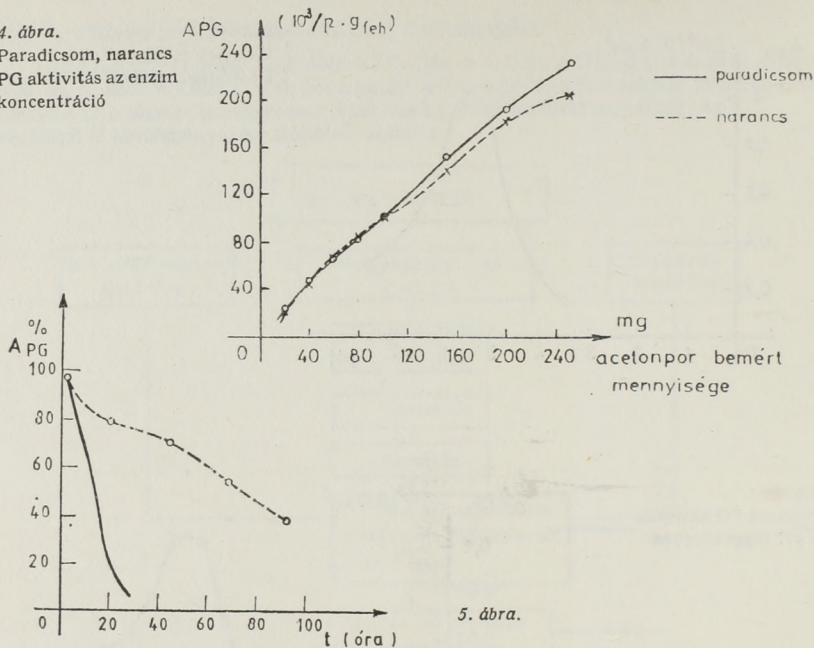
2/a ábra.
Narancs PG aktivitás
a pH függvényében



3. ábra.
Paradicsom,
narancs PG akti-
vitás a hőmérsék-
let függvényében

4. ábra.

Paradicsom, narancs
PG aktivitás az enzim
koncentráció



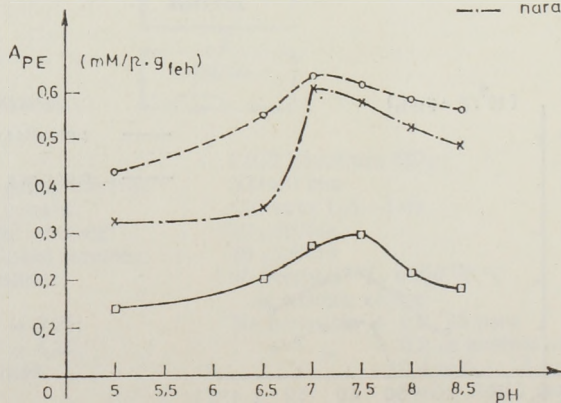
5. ábra.

— 20 °C PG oldat aktivitása a tárolási
idő és hőmérséklet függvényében
a kiindulási érték %-ában
- - - 0 °C

— alma
- - - paradicsom
- · - · narancs

6. ábra.

PE aktivitás
a PH függvényében



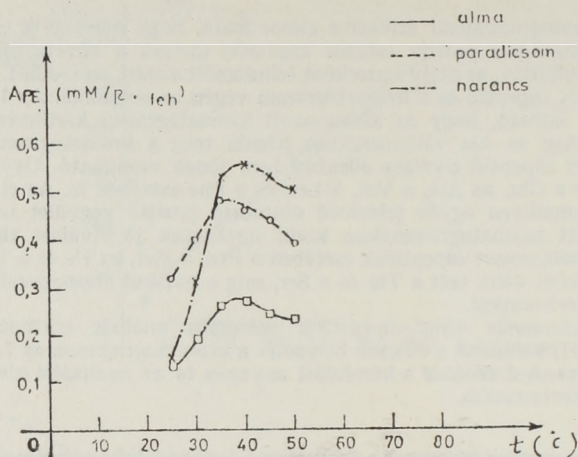
A kromatogramokat értékelve elmondható, hogy mindegyik esetben 5 jól elkülönülő ninhidrin pozitív csúcsot kaptunk, melyek a következők voltak: a kiindulási aminosav, az aktív észterként felhasznált alanin, az L-Ala-L-X dipeptid, az L-Ala-D-X dipeptid és a kromatogramm végén az ammónia. Az 1. kromatogrammon jól látható, hogy az alkalmazott kromatográfias körülmények között az L-Ala-L-Asp az Ala vállcsúcsaként jelenik meg a kromatogrammon, a két diasztereomer dipeptid elválása ellenben igen jónak mondható. Ugyancsak igen jó az elválás a Glu, az Ala, a Val, a Leu és a Phe esetében is. Az elválasztás és az értékelést semmilyen egyéb jelenlevő ninhidrin pozitív vegyület nem zavarja. A bemutatott kromatogrammon kívül ugyancsak jó elválasztást tapasztaltunk az alanil diasztereomer dipeptidek esetében a Pro, a Met, az Ile és a Tyr esetében is. Ikercsúcsként válik szét a Thr és a Ser, míg a bázikus aminosavakkal jelenleg végezzük kísérleteinket.

A diasztereomer alanil-dipeptidek optimális analízis körülményeit (hőmérséklet, pH) valamint a csúcsok helyzetét a kromatogrammon az 1. táblázatban foglaltuk össze. A 2. táblázat a kiindulási anyagok és az analízálni kívánt aminosav adatait tartalmazza.

1. táblázat

A kromatográfálási feltételek és a diasztereomer dipeptidek helye a kromatogrammon

Dipeptid	Az elválasztás hőmérséklete °C	A csúcs helyzete (perc)	A csúcs helyzete az Ala-hoz viszonyítva (Ala = 1,00)
L-Ala-D-Asp	50	33,50	1,05
L-Ala-L-Asp	50	36,75	1,16
L-Ala-D-Thr	50	36,25	1,14
L-Ala-L-Thr	50	37,25	1,17
L-Ala-D-Ser	50	38,50	1,21
L-Ala-L-Ser	50	39,75	1,25
L-Ala-D-Glu	50	41,25	1,30
L-Ala-L-Glu	50	42,50	1,34
L-Ala-D-Pro	50	42,00	1,32
L-Ala-L-Pro	50	43,75	1,38
L-Ala-D-Ala	55	44,00	1,39
L-Ala-L-Ala	55	46,00	1,45
L-Ala-D-Val	60	51,25	1,61
L-Ala-L-Val	60	53,25	1,68
L-Ala-D-Met	65	54,25	1,71
L-Ala-L-Met	65	56,25	1,77
L-Ala-D-Ile	70	62,00	1,95
L-Ala-L-Ile	70	66,50	2,09
L-Ala-D-Leu	70	64,25	2,02
L-Ala-L-Leu	70	68,00	2,14
L-Ala-D-Tyr	70	76,25	2,40
L-Ala-L-Tyr	70	78,50	2,47
L-Ala-D-Phe	70	80,00	2,52
L-Ala-L-Phe	70	82,75	2,61



7. ábra. PE aktivitás a hőmérséklet függvényében

2. táblázat

A kiindulási anyagok helye a kromatogramon

Aminosav	A csúcs helyzete (perc)	Aminosav	A csúcs helyzete (perc)
Asp	18,25	Val	38,25
Thr	20,25	Met	42,00
Ser	21,25	Ile	44,25
Glu	23,75	Leu	45,75
Pro	25,25	Tyr	51,25
Ala	31,75	Phe	52,75

A táblázat adatait értékelve megállapítható, hogy az aminosavakat illetve a diasztereomer dipeptideket csoportosítani lehet a csúcs helyzete alapján, tehát csoportokba lehet osztani azokat az aminosavakat, melyek egymás elválasztását nem zavarják, amelyeket tehát egy lépésben meg lehet határozni. Ezek a csoportok a következők:

- Asp, Ser, Pro, Ala
- Thr, Glu, Ala
- Ala, Val, Ile
- Ala, Met, Leu

A 7. ábra a Thr, Glu és Ala, a 8. ábra pedig a Val és Ile aminosavakból kapott diasztereomer dipeptidek elválasztását mutatja. Az ábrából látható, hogy az elválások jók, a csúcsok jól értékelhetők, a mennyiségi meghatározást tehát semmilyen körülmény nem zavarja.

3. Az optikai izomer aminosavak meghatározásának pontossága diasztereomer alanil dipeptid formában

A módszer kidolgozása után különböző, általunk előállított szintetikus aminosavkeverékek D- és L-aminosav összetételét határoztuk meg. Mérési eredményeinket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban közöltékhez hasonlóan minden általunk vizsgált aminosav analízisét minden koncentrációban 5 ismétléssel elvégeztük, közülük azonban csak néhányat emeltünk ki.

3. táblázat

Különböző keverékek D- és L-aminosavtartalmának meghatározása alanil diasztereomer dipeptid formában

A vizsgált anyag	Elméleti érték %		Mért érték %		A mérések száma	Szórás		Variációs koeficiens	
	D	L	D	L		D	L	D	L
Glutaminsav	50	50	48,2	51,8	5	1,59	1,61	3,30	3,11
	25	75	26,4	73,1	5	0,97	2,11	3,67	2,89
	5	95	5,8	94,3	5	0,21	2,62	3,62	3,84
	1	99	0,95	98,7	5	0,043	2,74	4,53	2,78
Alanin	50	50	51,0	49,3	5	1,62	1,58	3,18	3,21
	25	75	25,2	75,1	5	1,05	2,05	4,17	2,73
	5	95	4,6	94,3	5	0,24	2,74	5,22	2,91
	1	99	1,10	98,8	5	0,055	2,90	5,00	2,94
Valin	50	50	51,1	49,7	5	1,74	1,63	3,41	3,28
	25	75	23,9	76,1	5	1,08	2,14	4,52	2,81
	5	95	5,1	93,9	5	0,26	2,81	5,10	2,99
	1	99	1,06	99,1	5	0,062	2,91	5,85	2,94
Izoleucin	50	50	50,1	51,1	5	1,69	1,72	3,37	3,37
	25	75	25,6	74,8	5	0,99	2,23	3,87	2,98
	5	95	4,9	94,6	5	0,32	2,62	6,53	2,77
	1	99	0,98	98,9	5	0,051	2,84	5,20	2,87

A táblázat adataiból megállapítható, hogy növekvő koncentrációval csökken a variációs koeficiens nagysága, tehát a nagyobb koncentráció tartományban nő a meghatározás pontossága. Ennek ellenére még a legkisebb koncentrációk esetében sem éri el a variációs koeficiens értéke a 10-et, tehát a módszer megbízható, reprodukálhatósága megfelelő.

4. Következtetések

Annak ellenére, hogy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai módszerek egyre inkább teret nyernek az optikailag aktív vegyületek szétválasztásában és meghatározásában, laboratóriumunk – és a hazánkban működő mintegy 30 aminosavanalizátorral rendelkező takarmányvizsgáló laboratórium – adottságaihoz alkalmazkodva dolgoztunk ki ioncserés oszlopkromatográfiai meghatározást D- és L-aminosavak mennyiségi meghatározására.

Az 1. és 3. táblázatban közölt adatokból megállapítható, hogy a terc. BOC-L-Ala-ONSu igen jól használható a diasztereomer dipeptidek szintézisére, s a kapcsolás után a terc. BOC-csoportot könnyű eltávolítani, az alanil dipeptidek egymástól jól elválnak, a módszer szórása alacsony, a variációs koeficiens az esetek többségében öt alatt van. Az aminosavak megfelelő csoportosítására

lehetőség nyílik arra, hogy egy lépésben több (két-három) aminosav D- és L-izomerjét lehessen meghatározni. A módszer egyetlen hátránya az ioncserés oszlopkromatográfiás elvből adódó viszonylagos lassúság, hiszen pl. egy minta D- és L-Phe tartalmának meghatározása majdnem 90 percet vesz igénybe. Kedvezőbb természetesen a helyzet, ha – mint az pl. a 7. ábrán is látható – egy lépésben 3 különböző aminosav D- és L-izomerjét határozzuk meg, hiszen így egy aminosavra csak mintegy 30 percnyi idő jut.

Fenti hiányosság ellenére a módszer alkalmas a legalább 1%-ban jelenlevő D- (vagy L-) aminosav kimutatására a 99%-ban szereplő L- (vagy D-) aminosav mellett. Módszerünket ajánljuk mindazon laboratóriumoknak, melyek rendelkeznek aminosav analízissal és szintetikus aminosavak, peptidok vagy természetes anyagok D- és L- aminosavait kívánják meghatározni.

*

A szerzők hálás köszönetet mondanak Ferenczi Richárdnak a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézete munkatársának a védett aktív szterek előállításában nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozunk az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság Fehérje-program Irodájának az anyagi támogatásáért.

(Dr. Csapó János tudományos főmunkatárs. Agrártudományi Egyetem (Keszthely) Állattenyésztési Kar Kaposvár. 7401 Dénesmajor 2. Pf. 16.).

I R O D A L O M

- Bajusz, S. (1980): Peptidszintézis. In.: Csákvári, B. szerk.: A kémia újabb eredményei. 47. Akadémiai Kiadó, Budapest, 230. o.
- Bodanszky, M. & Conklin, L. E. (1967): A simple method for the study of racemization in peptide synthesis. *Chemical Communications*, 556. 773–774.
- Hirschmann, R., Strachan, R. G. Schwan, E. F., Schoenewaldt, H., Joshua, B., Barkenmeyer, B., Veber, D. F., Paleveda, W. J., Jacob, T. A., Beestey, T. E. & Denkwalter, R. G. (1967): The controlled synthesis of peptides in aqueous medium. III. Use of Leuchs' anhydrides in the synthesis of dipeptides. Mechanism and control of side reactions. *J. Org. Chem.*, 32. 3415–3425.
- Izumiya, N. & Muraoka, M. (1969): A racemization test in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 91. 2391–2392.
- Manning, J. M. & Moore, S. (1968): Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J. Biol. Chem.* 243. 5591–5597.
- Marfey, P. (1984): Determination of D-amino-acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.*, 49. 591–596.
- Weinstein, S. & Weiner, S. (1984): Enantiomeric analysis of mixture of the common protein amino acids and their Dns derivatives. *Chromatogr.* 303. 244–250.

D- ÉS L-AMINOSAVAK ELVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA IONCSERÉS OSZLOPKROMATOGRÁFIÁVAL DIASZTEREOMER DIPEPTID FORMÁBAN

I. AZ ALANIL DIPEPTIDEK SZÉTVÁLASZTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

Csapó J., Penke B. és Csapóné Kiss Zs.

A szerzők ioncserés oszlopkromatográfiás módszert dolgoztak ki a D- és L-aminosavak meghatározására diasztereomer dipeptid formában. A fehérjeteralmú minta 6 mólos sósavas hidrolízisét követően az egyes aminosavakat LKB 4101-es automatikus aminosav-analízissal és a hozzá kapcsolt LKB frakciószedővel

választották szét, majd a liofilezést követően az egyes aminosavakból t. BOC-L-Ala-ONSu aktív észterrel alanil dipeptideket szintetizáltak. Az alanil dipeptidek egymástól és a kiindulási aminosavaktól is jól elváltak: a D- és L-aminosavak meghatározása ebben a formában pontos, csak kissé hosszú (33–83 perc). A meghatározás pontossága kielégítő, a variációs koefficiens értéke 4–6% között alakul. Módszerüket ajánlják mindazon laboratóriumoknak, melyek rendelkeznek aminoszékkel és szintetikus aminosavkiegészítők, petidek vagy természetes anyagok D- és L-aminosavait kívánják meghatározni.

SEPARATION AND DETERMINATION OF D- AND L-AMINO ACIDS
BY IONE EXCHANGE COLUMN CHROMATOGRAPHY IN FORM
OF DIASTEREOMER DIPEPTIDE I. SEPARATION AND DETERMINATION
OF ALANILE DIPEPTIDES

Csapó, J., Penke, B. and Csapó-Kiss, Zs.

The authors worked out ione exchange column chromatography method for determination of D- and L-amino acids in form of diastereomer dipeptide. The individual amino acids were separated by means of LKB 4101 automatic amino acid analyser and LKB fraction pick-up and then were synthesized alanile dipeptides by means of BOC-L-Ala-ONSU active ester. The alanile-dipeptides separated good from each other and starting amino acids as well. The determination of D- and L-amino acid is correct in this form but long (33–83 minutes). The accuracy of the method is appropriate, coefficient of variation is 4–6%. The authors offer their method for laboratories.

РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ D- и L-АМИНОКИСЛОТ
В ДИАСТЕРЕОМЕР ДИПЕПТИДНОЙ ФОРМЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ИОНООБМЕННОЙ КОЛОНЧАТОЙ ХРОМАТОГРАФИИ I.
РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛАНИЛ ДИПЕПТИДОВ

Я. Чапо, Б. Пенке, Ж. Чапонэ-Киши

Авторы разработали метод ионообменной колончатой хроматографии для определения D- и L-аминокислот в диастереомер дипептидной форме. После гидролиза 6 мольной соляной кислотой содержащей белок пробы, с помощью автоматического аминокислотного анализатора LKB 4101 и подключенного к нему фракционного сборника LKB было проведено разделение отдельных аминокислот, затем после лиофилизации из отдельных аминокислот и активного эфира BOC-L-Ala-ONSu были синтезированы аланил дипептиды. Аланил дипептиды хорошо отделялись друг от друга а также от исходных аминокислот; определение D- и L-аминокислот в такой форме является точным, но немного продолжительным (33–38 минут). Точность поредления была удовлетворительной, значение вариационного коэффициента находилось в интервале 4–6%. Разработанный метод был предложен авторами всем тем лабораториям, в которых имеется аминокислотный анализатор и которые желают проводить определения D- и L-аминокислот синтетических аминокислотных дополнителей, пептидов и натуральных веществ.

TRENNUNG UND BESTIMMUNG VON D- UND L-AMINOSÄUREN
MIT DER IONEN-AUSTAUSCH-SÄULENCHROMATOGRAPHIE
IN FORM VON DIASSTEREOMERDIPEPTID I. TRENNUNG
UND BESTIMMUNG VON ALAMILDIPEPTIDEN

Csapó, J. und Mitarb.

Verfasser haben eine Methode mit der Ionenaustausch-Säulenchromatographie zur Bestimmung der D- und L-Aminosäuren in Form von Diastereomerdipeptid ausgearbeitet. Nach der Hydrolyse der eiweißhaltigen Probe wurden die einzelnen Aminosäuren mit einem automatischen Aminosäureanalysator LKB 4101 und mit dem damit verbundenen Fraktionssamler LKB getrennt. Dann nach der Liofilisation wurden aus den einzelnen Aminosäuren mit dem aktiven Ester BOC-L-Ala-ON Su Alanildiipeptide synthetisiert. Die Alamildiipeptide waren voneinander und auch von den Ausgangsaminosäuren gut trennbar, wobei die Bestimmung der D- und L-Aminosäuren in dieser Form exakt, aber etwas zu langwierig (33 bis 83 min) ist. Die Genauigkeit der Methode ist zufriedenstellend, der Variationskoeffizient beträgt 4 bis 6%. Die Methode wird allen Laboratorien empfohlen, die über Aminosäureanalysator verfügen sowie D- und L-Aminosäuren in den synthetischen Aminosäurezusatzen, in Peptiden oder natürlichen Stoffen bestimmen wollen.

KÜLFÖLDI LAPSZEMLE

Szerkeszti: Molnár Pál

GESLER, M.: *Megjavítja-e a tervbe vett európai ellenőrzési rendszer az élelmiszer-felügyelet hatékonyságát?*

(Verbessert das vorgesehene Europäische Kontrollsystem die Effektivität der Lebensmittelüberwachungs?) *Fleischwirtschaft* 69 (1989) 1, 45–50.

Az Európai Gazdasági Közösség (a továbbiakban: EGK) a közös belső piac megvalósítására törekszik az 1992–93 évekre, amit politikai szükségszerűségnek tart. A közös belső piac a fogyasztók számára azzal, az előnnyel fog jární, hogy a különböző élelmiszerek még szélesebb körű kínálatából választhatnak.

Ha az EGK az élelmiszerek szabadabb, nem korlátozott fogalmát akarja elérni, akkor az alábbi feltételeket kell teljesítenie.

1. Az élelmiszertörvény lényeges részeinek összhangját meg kell teremtenie.
2. A törvényt mindenegyes tagországnak azonos módon kell alkalmaznia.
3. A törvény alkalmazását mindenütt a kellő mértékben és egységes alapelvek szerint kell felügyelni.

A Német Szövetségi Köztársaság ennek megvalósításában alkotóan kíván közreműködni és igényli, hogy a fogyasztók védelmének színvonalát őrizték meg, hisz ezt országukban kedvezőnek tartják.

Az élelmiszertermelők elsődleges felelőségének a belső piac egészében hangsúlyt kell adni.

Törekedni kell arra, hogy

- az egészség védelmét,
- a fogyasztók megtévesztésének kizárását,
- az előállítók helyszíni és bizonylatokra is kiterjedő ellenőrzését,
- a hatósági és a jóváhagyott laboratóriumok munkáját,
- a szükséges hatósági intézkedések jogát

a továbbiakban javítani lehessen a meglévő ellenőrző kapacitások gondosabb, céltudatosabb kihasználásával.

Munkamegosztó együttműködés és automatikus adatfeldolgozás segítségével a hatósági élelmiszerfelügyeletet még alkalmasabbá kell tenni a fogyasztók érdekében kidolgozásra kerülő szigorú előírások betartásának ellenőrzésére.

Szarvas T. (Budapest)