

A VIDEODENZITOMETRIA ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK  
KITERJESZTÉSE KÜLÖNBÖZŐ BIOKÉMIAI PROBLÉ-  
MÁK MEGOLDÁSÁRA

Doktori értekezés

BUZÁS ZSUZSANNA  
JATE Biokémiai Tanszék

Szeged, 1980

## Tartalomjegyzék

	oldal
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Vékonyréteg-kromatogramok mennyi- ségi kiértékelése	3
2.2. Videodenzitometria	6
3. Anyagok és módszerek	14
3.1. Klorofill a és b preparatív kinye- rése spenót levélből	14
3.2. Karotinoidok preparatív kinyerése spenót levélből	16
3.3. A kromatográfiák során alkalmazott rétegek	17
3.4. A kromatografálások körülményei	18
3.5. A citrát puffer ritka aminosavak elválasztásához	19
3.6. Ninhidrin reagens aminosavak elő- hívására	19
3.7. Felhasznált vegyszerek	19
3.8. A kvantitatív értékelésben hasz- nált matematikai képletek	20
4. Kísérleti eredmények	22
4.1. Horizontális mérés technika kidolgo- zása	22
4.2. Növényi pigmentek vékonyréteg- -kromatográfiás elválasztása és kvantitatív kiértékelése	24



4.2.1. Klorofillok elválasztása és kvantitatív kiértékelés	24
4.2.2. Karotinoidok elválasztása és kvan- titatív kiértékelés	39
4.3. Hidroxiaminosavak vékonyréteg-kroma- tográfias elválasztása és kvantitatív kiértékelése	49
4.3.1. Hidroxilizín elválasztása és kvan- titatív kiértékelése	51
4.3.2. Hidroxiprolin elválasztása és kvantitatív kiértékelése	54
4.4. Epesavak és származékaik elválasztása vé- konyrétegen és kvantitatív kiértékelé- sük	56
4.5. Példák további lehetőségekre	61
5. Összefoglalás	66
6. Felhasznált irodalom	67
7. Rövidítések	69

## B E V E Z E T É S.

A biológiai kutatás legszélesebb kísérleti területe a biokémia. A biokémiai módszerek mindkivül sokfélék és még ugyanazon alapeljárás is a vizsgálandó feladattól függően jelentős változtatásokat igényel.

A biokémiai analitikában a legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy a meghatározandó anyag mennyisége gyakran mikrogramm ill. annál is kisebb tartományba esik. Ezért igen jelentősek a pontos mikroanalitikai eljárások.

Ebben a dolgozatban a vékonyréteg-kromatográfiával és annak egy új kiértékelési módjával, a videodenzitometria néhány alkalmazási lehetőségével foglalkozunk.

Három, a gyakorlati életben távol eső probléma megoldását mutatjuk be: a növényi pigmentek elemzését, amely az élelmiszervizsgálatokban, a növénynevelésben jelentős; a ritka aminosavak mennyiségi meghatározását, amely a húspari ellenőrzésben fontos és az epesavak mennyiségi meghatározását, amely a klinikai gyakorlatban bir

jelentőséggel.

Mindhárom esetben először egy videodenzitometriás szempontból megfelelő vékonyréteg-kromatográfiás módszer kifejlesztése vált szükségessé.

Mennyiségi analízisükre kidolgoztuk az u.n.a. "horizontális" mérési technikát.

A dolgozat végén két példával szeretnénk felhívni a figyelmet arra, hogy a modern genetika és molekuláris biológiai alaputatásban is jövője van a videodenzitometriás analízisnek.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Vékonyréteg-kromatogramok mennyiségi kiértékelése

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a vékonyréteg-kromatogramok mennyiségi kiértékelésének fontossága. A fejlődés eredményeként ma már a rétegekromatográfia az analitikai kémia bonyolult feladatainak megoldására alkalmas mind pontosság, mind érzékenység tekintetében. A rétegekromatográfiának a mennyiségi analitikában való felhasználására két alapvető irányzat alakult ki.

1. Közvetett módszerek: a kromatográfiás foltnak a rétegről végzett eluciót követő mennyiségi meghatározása.
2. Közvetlen módszerek: a kromatográfiás folt in situ meghatározása.

A fejlődés a közvetlen módszerek mind szélesebb körű elterjedését mutatja. Ennek alapvető oka, hogy a közvetlen módszerek munkaigényessége lényegesen kisebb, mint a közvetett módszereké, és így általában rövidebb elemzési időket érhetünk el. /1/ A közvetlen módszerek előnye a nagyobb érzékenység is. Még bonyolultabb a helyzet, ha egybevetjük a közvetlen és közvetett módszereket pontosságuk alapján. A közvetlen módszerek véletlen hibája nagyobb, míg az eluciós technikánál nagyobb rendszeres hibával kell számolni.

### Közvetett meghatározási módszerek

A rétegről eluált minta analizisére Használható techni-

- kák: a., fotometria
- b., fluorimetria
- c., polarográfia
- d., gázkromatográfia
- e., folyadékkromatográfia
- f., izotóp mérési technikák

### Közvetlen meghatározási módszerek

- a., a foltok területének mérése
- b., optikai eljárások
  - b.1., spektrodensitometria
    - b.1.1. transzmittancia mérés
    - b.1.2. remisszió mérés
  - b.2., videodensitometria
  - b.3., fluoreszcencia mérés
    - b.3.1., közvetlenül
    - b.3.2., fotografikusan
- c., termikus módszerek
- d., elektrokémiai módszerek

Az in situ módszerek közül legjobban a különböző fotometriai -- pl. densitometria -- módszereket használják.

A rétegekromatogramok denzitometriás meghatározásának pontosságát a következő tényezők határozzák meg: /2/

1. a kromatográfiás réteg egyenletessége
2. a réteg vastagsága és nedvességtartalma
3. az elválasztandó anyagok  $R_f$  értékei
4. idegen anyagok jelenléte
5. a felvitt minta mennyisége, mérete
6. az alkalmazott oldószer rendszer
7. stabil futtatási feltételek /sebesség, hőmérséklet/
8. stabil szárítási feltételek
9. színes foltok előhívásánál a háttér elszíneződésének és a reagens által okozott folt diffúziójának figyelembevétele

### Denzitometria

Rétegekromatogramok in situ denzitometriás mérését monokromatikus fényben réses műszerekkel valósíthatjuk meg, amely transzmittancia és remisszió méréssel történhet.

A transzmittancia mérésnél a folytonosan megvilágított réteg által abszorbeált fényt, míg a remisszió mérésnél a diffúz reflektált fényt mérjük. A reflektált fény intenzitása arányos a felvitt anyag koncentrációjával. A réteg háttéréről reflektált fény intenzitását 100%-nak véve, a mérési foltban lévő anyag mennyisége  $/100-X/$  %-kal van korrelációban  $/X$ -szel arányos/.



Mindkét esetben ismerni kell a felvitt anyag pontos mennyiségét /pl.  $\mu\text{g}$  vagy  $\mu\text{l}$ -ben/ ahhoz, hogy a hasonló körülmények között felvett kalibrációs görbéről ki tudjuk számítani az ismeretlen anyag mennyiségét. Ez a két denzitometriás módszer igen idő- és munkaigényes, ezért, amikor nagy számú minta meghatározása szükséges, nem alkalmazható. Dévényi és munkatársai /3/ sorozatigényeket kielégítő, néhány másodperc alatt elvégezhető denzitometriás módszert és az ehhez szükséges berendezést ismertetnek. A módszer a video-denzitometria, a mérőműszer a videodenzitóméter.

Ez az analitikai eljárás az előző módszerektől két alapvető ponton különbözik. Az egyik az, hogy az össz anyagmennyiség meghatározásával megadható a meghatározandó anyag parciális mennyisége / az össz anyagmennyiség %-ában/. Azaz szükségtelen tudni a felvitt anyag pontos mennyiségét, s ez önmagában egy sor időigényes méréstől mentesít. A másik alapvető különbség abban áll, hogy az ismeretlen anyag parciális mennyiségének meghatározása néhány másodpercet igényel csupán.

## 2.2. Videodenzitometria. A videodenzitóméter szerkezeti felépítése, működési elve és alkalmazásai.

### 2.2.1. Videodenzitometria

A rétegekromatográfia denzitometriájának új megoldását adja

a Chinoin Nagytétényi Gyáregységében kifejlesztett Telechrom OE-976 típusu videodenzitométer /1.ábra/. A berendezés egyaránt alkalmas réteg- és papirkromatogramok, elektroferogramok és diapositívok denzitometriás gyors értékelésére.

Az új megoldás lényege az, hogy a denzitometriás meghatározáshoz detektorként elektronikusan vezérelt televíziós kamerát használnak.

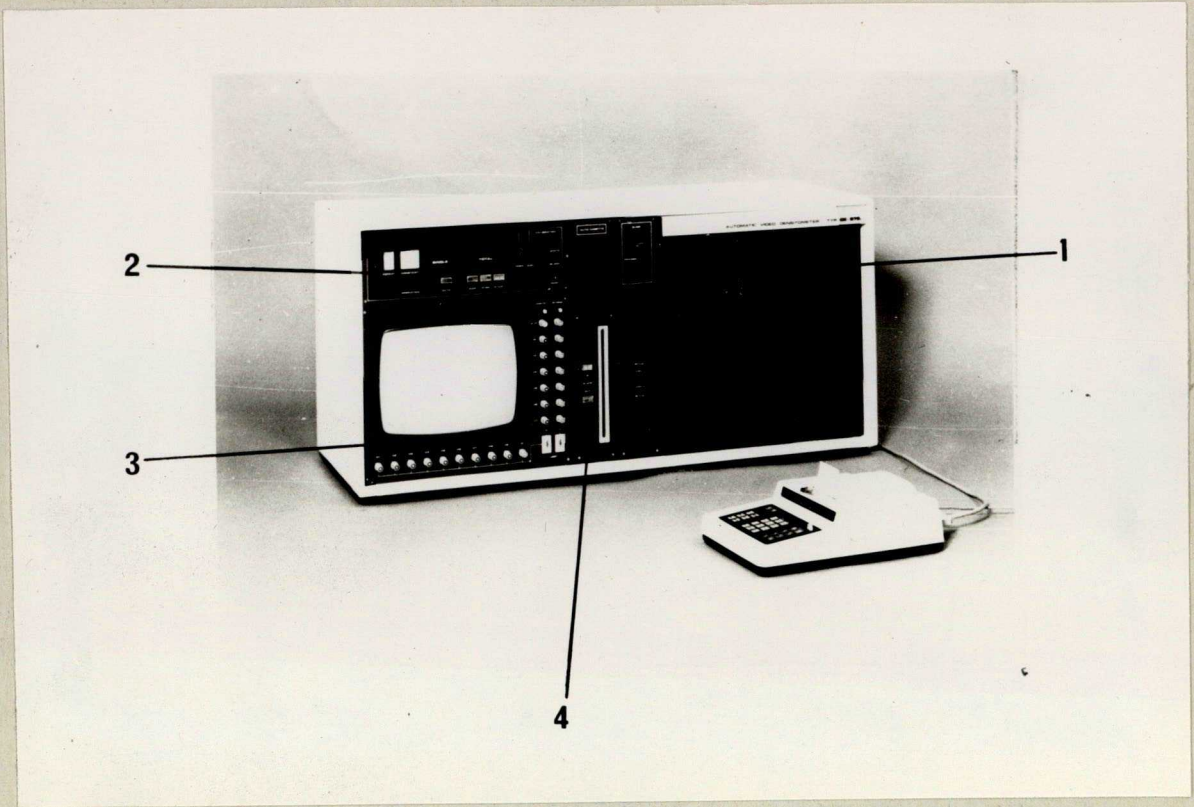
### 2.2.2. A videodenzitométer /Telechrom modell OE-976/ szerkezeti felépítése és működési elve.

A berendezés blokkdiagramja a 2. ábrán látható.

Méréskor a kromatogramot /1/ 4 db fehér fénycsővel /3/ megvilágítjuk. A kromatogramról reflektált fényt egy tükörrendszer /4/ segítségével a készülék detektorára vetítjük. /5/. A detektor egy televíziós kamera Vidikon csőve.

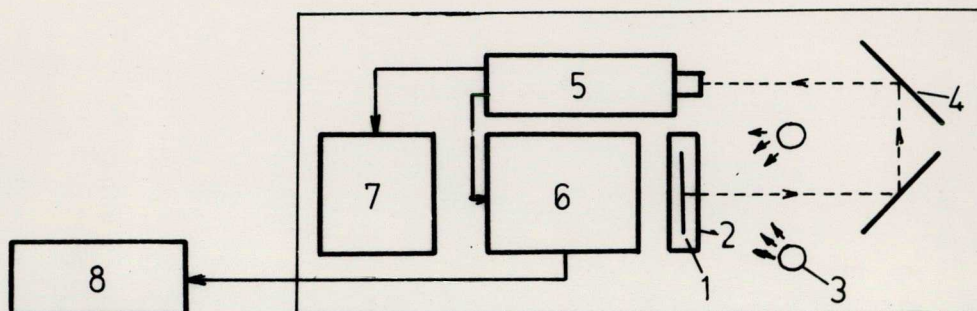
A Vidikon cső kimenő jele az u.n. video-jel a készülék elektronikus egységébe kerül /6/. Az elektronikus rendszernek két funkciója van: kiválasztja a meghatározandó foltot és feldolgozza a Vidikon cső által adott jelet. A jel először a digitális integrátorba kerül, az integrált értékeket a memória egység tárolja. Az integrál értékeket ön-kényesen megválasztott egységben fejezzük ki. Nagyságuk a foltszinintenzitásával arányos. A készülék az integrál értékeket digitális kijelzőn jelzi és kinyomtatja /8/.

A mérés során a kromatogram képe a monitoron /7/ megjelenik.



1. ábra Telechrom OE-976 típusu videodenzitóméter  
szerkezeti felépítése

1. optikai egység
2. felső elektronikus egység
3. alsó elektronikus egység
4. mintatartó



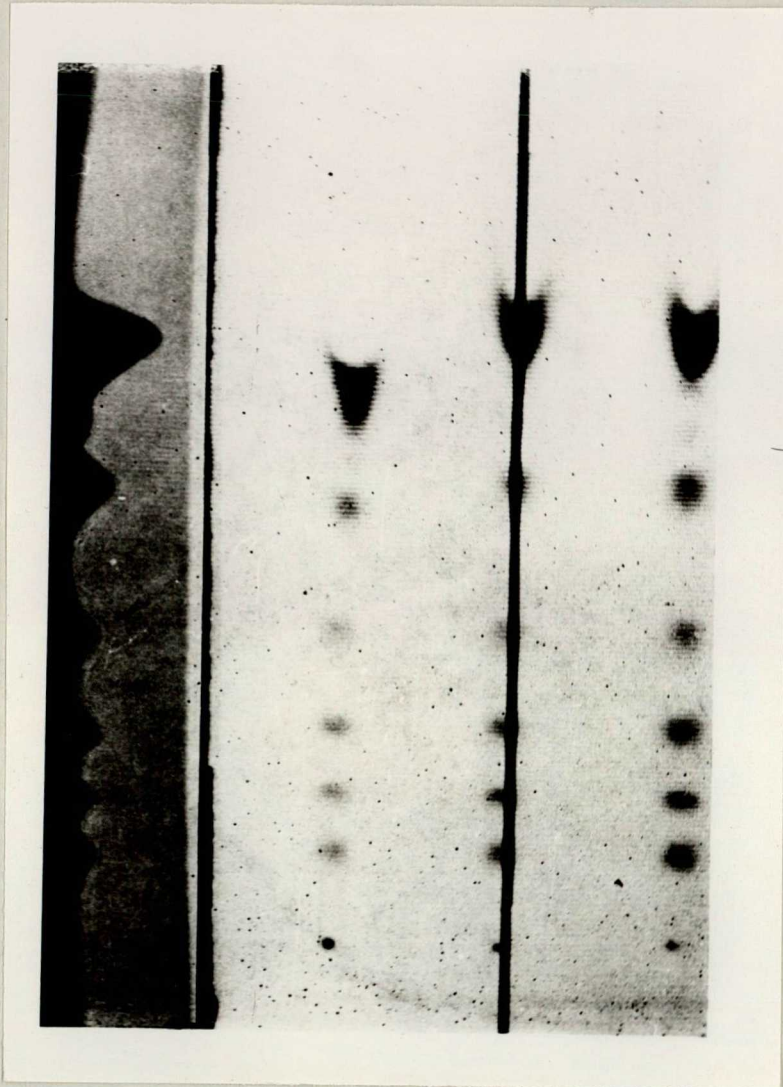
2. ábra A videodenzitóméter blokkdiagramja

1. kromatogram
2. mintatartó
3. fényforrás
4. tükörrendszer
5. detektor
6. elektronikus egység
7. monitor
8. kiíró

A monitor nincs kapcsolatban a méréssel, csak segítséget nyújt ahhoz, hogy a kromatogramot megfigyeljük és a mérés során a mérni kívánt foltot az un. elektronikus ablakkal lefedjük. Ez azt jelenti, hogy egy elektronikus rendszerrel, két potenciométer sorozat felhasználásával meghatározott helyzetű és méretű téglalap alakú mérési terület választható ki a kromatogramon. A mérés során a készülék egyszerre két "ablakot nyit", azaz az egyik ablakkal méri a kromatográfiás foltot /ez a fehér ablak/ a másik ablakkal a minta összes foltjaiból adódó denzitás összértékét /fekete ablak/. A két mérés arányát automatikusan kiírja a készülék. A kiválasztását biztosító potenciométerek száma és jellege a műszernek rendkívül nagy flexibilitást biztosít. Nevezetesen egy kromatográfiás lemezen 9 egyidejűleg futtatott anyagban 7 különböző komponens mennyisége határozható meg az összanyag %-ában automatikus üzemeltetésben. Manuális üzemmódban tetszés szerinti a mérhető komponensek száma. A felbontóképesség felső határa lényegében az elválasztás minőségétől függ.

A monitoron keresztül futó függőleges vonal az un. alapvonal a háttér színintenzitását méri, ha az alapvonal metszi a kromatográfiás foltokat, a monitor bal oldalán megjelenik a denzitogram /3. ábra/.

A kromatográfiás lemezt a futási iránnyal megegyező állásban helyezik a mintatartóba. Ilyenkor az "elektronikus ablak" egy azon minta különböző foltjait fedi le. Így pl.



3.ábra Az alapvonal helyzete a monitoron. Ha az alapvonal metszi a foltokat, a monitor bal oldalán látható a denzitogram.

mód van arra, hogy egy fehérje hidrolizátum összaminósága mennyiségének %-ában megadjunk egy konkrét aminosav %-os értékét. Ez esetben nincs szükség a mintafelvételnél pontos bemérésre, hisz csak relatív értékeket mérünk /4,5,6/. Ismerve a videodenzitométer működési elvét, olyan kromatogramok kiértékelése lehetséges ezek után, amely a következő feltételeknek tesz eleget.

1. Geometriailag szabályosan elhelyezkedő, egymástól élesen elvált foltok.
2. Kompakt, élesen körülhatárolt u.n. "farok" -mentes foltok.
3. Színes foltok, amelyek a háttérből kontrasztosan emelkednek ki.
4. Egységes, világos háttér.

### 2.2.3. A videodenzitometria alkalmazásai

Dévényi és munkatársai 1971-ben közzétett módszere az aminosavak egydimenziós elválasztására Fixion 50 x 8 lemezen /6/ már klasszikusnak számít az aminosavak videodenzitometriájában. Ez a módszer egy savas hidrolizátumban jelenlevő aminosavak elválasztására, kivéve a Ser-Thr párt, egyszeri futtatással denzitometrárlható kromatogramot biztosít. Ez az egydimenziós aminosav elválasztás nagy jelentőségre tett szert a szerkezeti analízisekben, a klinikai diagnosztikában, a peptid kémiaiban. Nagyon hasznos módszer olyan reakciók vizsgálatánál, amikor egy aminosav

koncentrációjának változásával követhető egy reakció kinetikája. /pl. karboxipeptidázos enzimes emésztés/. A módszer lényege egy pH:3.3-as, 0,4 N Na<sup>+</sup> koncentrációju és 0,4 mol/l citrát ion koncentrációju pufferben történő egydimenziós futtatás Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegén.

Az aromás és bázikus aminosavak elválasztására pH=5,23-as 0,35 N Na<sup>+</sup> koncentrációju citrát puffer alkalmas /4/.

A triptofán pH=6-os 1,5 M Na<sup>+</sup> koncentrációju citrát pufferben választható el /25/. Ebben a rendszerben a triptofán a legalacsonyabb R<sub>F</sub> értékkel fut.

Felhasználható a módszer a klinikai gyakorlatban is pl. aminoacidaemiák /fenilketonuria/ szűrővizsgálatára /26/.

A kromatografálást ebben az esetben pH=5,23-as 0,35 N Na<sup>+</sup> koncentrációju, 0,117 mol/l citrát ion koncentrációju pufferoldattal végezzük. A módszer előnye, hogy egyszerű laboratóriumi körülmények között gyors és megbízható eredményt ad. A mintaelőkészítés rendkívül egyszerű: az analizálandó vérmintákat szűrőpapírra cseppentve beszárítják, majd 0,1 N HCl etanolos oldatával eluálják az aminosavakat és ebből az oldatból közvetlenül vészik fel a mintákat a Fixion lemezre.

Innen automatikus a diagnózis - kromatográfia és videodenzitometriás kiértékelés.





### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Klorofill a és b preparatív kinyerése spenót levéből /16/

##### 3.1.1. A fotoszintetikus pigmentek kinyerése extrahálással

A levélnyéljől és nagyobb levélerekről letépett, megmosott és szűrőpapírok között megszáritott 10 g spenót levelet apróra vágunk. A felaprított leveleket pár percre forró vízbe tettük, majd metanol: petroléter /fp: 30-40°C/ 3:1 arányu elegyével extraháltuk, amíg a levél maradékok szintelenek lettek. Az egyesített extraktumokat telített konyhasó oldattal összerázva a petroléteres fázis elválik a vizes-metanolos fázistól.

A petroléteres fázist vákuum evaporátorban szárazra pároltuk, majd tárolás céljából dietiléterben, kromatográfiás felhasználás céljából kloroformban oldottuk fel a maradékot.

Az extraktum csak sötétben és -15 - -20°C-on tárolható.

##### 3.1.2. A klorofill a és b oszlopkromatográfiás szétválasztása

A pigmentek szétválasztását cukoroszlopon oldottuk meg: oszloptöltetnek golyósmalomban finomra őrölt kristálycukrot használtunk. Az így készült porcukrot egy napig 120°C-on száritottuk, végül exszikkátorban hűlni hagytuk.

A kihűlt porcukorral megtöltöttünk egy 4 cm átmérőjű és 80 cm magas oszlopot, /1000 cm<sup>3</sup> oszloptérfogat/ miközben egy megfelelően kiképzett üvegbottal tömörtettük az anyagot. Az oszlopot 500 ml benzol:petroléter / $\rho$ :40-70°C/ 1:1 arányu elegyével ekvibráltuk, majd a 3.1.1. pontban készült preparátum petroléteres oldatát beszivattuk az oszlopba. Ezután az oszlopon addig szivattunk át petrolétert, amíg az első karotinoid zóna jól el nem különült a fölötte levő klorofilltől. Ez /kb. 400 ml petroléter átszivatasakor történt meg/. Ezután ismét benzol:petroléter /1:1/ arányu elegyét szivattuk át az oszlopon addig amíg a klorofill alatti összes karotinoid pigment ki nem mosódott az oszlopból és a klorofill a és b zónák szét nem váltak egymástól. Ezt kb. 1000 ml benzol:petroléter elegy átszivatasával értük el. Ezután petroléterrel átmostuk az oszlopot, és a cákörtöltetet óvatosan kitolva az oszlopból, a klorofill a és b zónákat kivágtuk. A klorofillokat peroxidmentes dietiléterrel oldottuk le a cukorról, majd N<sub>2</sub> atmoszférában bepároltuk. Ezt követően pedig további tisztítás végett az anyagot egy újabb cukoroszlopon rekromatografáltuk. Az előzőekben leírtakhoz hasonló módon készített oszlopról eluált anyagokat spektrofotometriken azonosítottuk.

A klorofill tisztaságát éteres oldatának abszorpciós szinképe alapján ellenőritük. A tiszta klorofill a 430 és 663 nm-es abszorpciós maximumainál mért extinkciók aránya 1,306, míg a tiszta klorofill b 455 és 644 nm-es maximumainál számítva az extinkcióarány 2,822. /17/

Az ismertetett módszer alapján a következő tisztaságu anyagokat kaptunk. A klorofill a abszorpciós maximumainál mért extinkcióarány 1,285-nek, míg klorofill b esetében 2,757-nek adódott.

A spektrumok jellemző abszorpciós maximumai nm-ben.

Klorofill a esetében	irodalmi	mért
	430	430
	533,5	534
	578	579
	615	616
	662	663

Klorofill b esetében	irodalmi	mért
	450	450
	595	595
	644	644

A közölt irodalmi adatokkal való összehasonlítás alapján a spenótlevél extraktumból előállított Klorofill a és Klorofill b tisztának bizonyult.

### 3.2. Karotinoidok preparatív kinyerése spenót levélből

A karotinoidok vékonyréteg-kromatográfiás elválasztásánál a jelenlevő klorofilok és feofitinek nagy mértékben zavarják, ezért ezeket az anyagokat a kromatográfia előtt elszappanosítási eljárással eltávolítottuk. /23/

Az elszappanosítás során a klorofillok ill. bomlástermékeik a vizes fázisba kerültek, míg a karotinoidok az éteres fázisban maradtak.

A 3.1.1. pontban leírt módon készített növényi extraktumból 2 ml-t szárazra pároltunk, a maradékot 10 ml alkoholban feloldottuk, majd 1 ml 60 %-os vizes KOH-t adtunk hozzá. Szobahőmérsékleten, sötétben,  $N_2$  atmoszférában 12 órán át állni hagytuk, majd háromszorosára hígítottuk desztillált vízzel és azonos térfogatú éterrel választótölcsérben összeráztuk. A két fázis elkülönülése után a vizes fázis éteres kimosását még kétszer megismételtük. Az egyesített éteres fázisokat lugmentesre mostuk, majd vízmentes  $Na_2SO_4$ -tal szárítottuk. /5-10 g-t adva 100 ml éteres oldathoz/ Az éteres fázist  $N_2$  atmoszférában bepároltuk, a maradékot 1 ml éterben vettük fel. Ebből az oldatból közvetlenül vittünk fel mintákat a kromatográfiás lemezre.

### 3.3. A kromatográfiák során alkalmazott rétegek

3.3.1. Fixion 50 x 8 vékonyrétegkromatográfiás készlemez /20 x 20 cm/ Poliészterfóliára rögzített, szilikagél hordozóra vitt erős kationcserélő gyantaréteget tartalmaz 0,25 mm vastagságban.

A gyanta funkciós csoportja  $-SO_3^-$ , ionformája  $Na^+$ ;

### 3.3.2. Silica gel 60 Merck gyártmányu készlemez

/20 x 20 cm/

Üveglemezre vitt 0,25 mm vastag szilikagél tartalmazó kész réteg,  $\text{CaSO}_4$  kötőanyaggal.

### 3.3.3. Szilikagél lemez készítés /33/

25 g szilikagél G-t szuszpendáltunk 60 ml vízben és a keveréket egy 20 x 20 cm üvegfelületre 0,25 mm rétegvastagságban Desaga kézi réteghúzóval vittük fel.

A nedves lemezeket levegőn megszáritottuk, majd közvetlenül a felhasználás előtt  $120^\circ\text{C}$ -on 1 órán keresztül aktiváltuk.

### 3.3.4. $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ tartalmu szilikagél lemez készítés

a. 25 g szilikagél G-t 2,5 g  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -tal összekevertünk szárazon /10 %  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  tartalmu réteg/, majd 60 ml vízben szuszpendáltuk.

A továbbiakban ugy jártunk el, mint 3.3.3. esetében.

b. Silica gel 60 lemezeket 10 %  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  oldatban, felszálló technikával impregnáltunk az aktiválás előtt.

### 3.4. A kromatografálások körülményei

A kromatografálást minden esetben felszálló technikával, Desaga kádákban végeztük. A futtatásokhoz 20 x 20 cm méretű lemezeket használtunk. A mintákat a lemez aljától 2,5 cm távolságra Hamilton fecskendővel vittük fel.

### 3.5. Citrát puffer ritka aminosavak elválasztásához

24,6 g citromsav monohidrátot, 14,0 g nátriumhidroxidot és 6,5 ml 37 %-os sósavat összemérünk, az oldatot desztillált vízzel 1000 ml-re töltjük és pH-ját NaOH-dal 5,28-ra állítjuk be. Ez a puffer alkalmas hidroxilizint tartalmazó fehérjehidrolizátumok elválasztására.

### 3.6. Ninhidrin reagens aminosavak előhívására

A oldat: 2 g ninhidrin 100 ml ecetonban oldva

B oldat: 1 g Cd acetát 50 ml jégacet + 100 ml desztillált vízben oldva

A reagens összetétele:

50 ml A oldat + 20 ml B oldat + 30 ml desztillált víz

A reagens aminosavak kimutatására használható.

### 3.7. Használt vegyszerek

#### 3.7.1. Adszorbensek

Kieselgél G /Reanal/

Silica gel 60 /Merck/

#### 3.7.2. Standard minták

$\beta$  Karotin /Sigma/

Prolin, Hidroxiprolin /Reanal/

Hidroxilizin /Fluka/

### 3.7.3. Oldószerek

i-oktán /Fluka/ a.l.t.

dietiléter /Perak, Berlin/  $-\text{FeSO}_4$ -on peroxidmentesítettük, majd ledesztilláltuk

dietilamin /Reachin/ a.l.t.

Petroléter /fp: 30-40 és 40-70°C/ /Carlo Erba/ a.l.t.

Aceton, petroléter /fp: 70°C/, i-propanol, benzol, metanol, etanol, kloroform, etilacetát /Reanal/a.l.t.  
ecetsav /Erdőkémia/ a.l.t.

### 3.7.4. Előhívó reagensek

ninhidrin, Cd-acetát, izatin, p-dimetilaminobenzaldehid /Reanal/

### 3.7.5. Egyéb reagensek

citromsav monohidrát, sósav 37 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , KOH,  
 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  /Reanal/

## 3.8. A kvantitatív értékelésben használt matematikai képletek

### 3.8.1. Videodenzitometriás mennyiségi meghatározás

A kromatográfiák során az elvált foltokban található anyag mennyisége /q/ a következő egyenlethől számítható: /7/

$$q = \frac{Q d_{rel}}{D_{rel}}$$

Q = a felvitt standard anyag mennyisége

D<sub>rel</sub> = a videodenzitóméterrel mért relatív denzitás  
a standard anyagra

dd<sub>rel</sub> = a videodenzitóméterrel mért relatív denzitás  
az ismeretlen anyagra

### 3.8.2. Spektrofotometriás mennyiségi meghatározás klorofill a és b anyagokra

A klorofillok mennyiségi meghatározása óteres oldataik  
1 cm-es küvettában mért abszorpciós szinképe alapján  
/French, 1960/

$$\begin{aligned} \text{klorofill a } / \mu\text{g/ml} / &= 9,93 / E_{660} / - 0,777 / E_{642,5} / \\ \text{klorofill b } / \mu\text{g/ml} / &= 17,6 / E_{642,5} / - 2,31 / E_{660} / \end{aligned}$$

A zárójelben megadott mennyiségek az indexben jelölt  
hullámhosszértékeknél mért extinkciókat jelentik.

### 3.8.3. Standard deviáció / S. D. / meghatározása

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n}{n} (x_i - \bar{x})^2}$$

n = a mérések száma

$\bar{x}$  = a mérések számtani középértéke



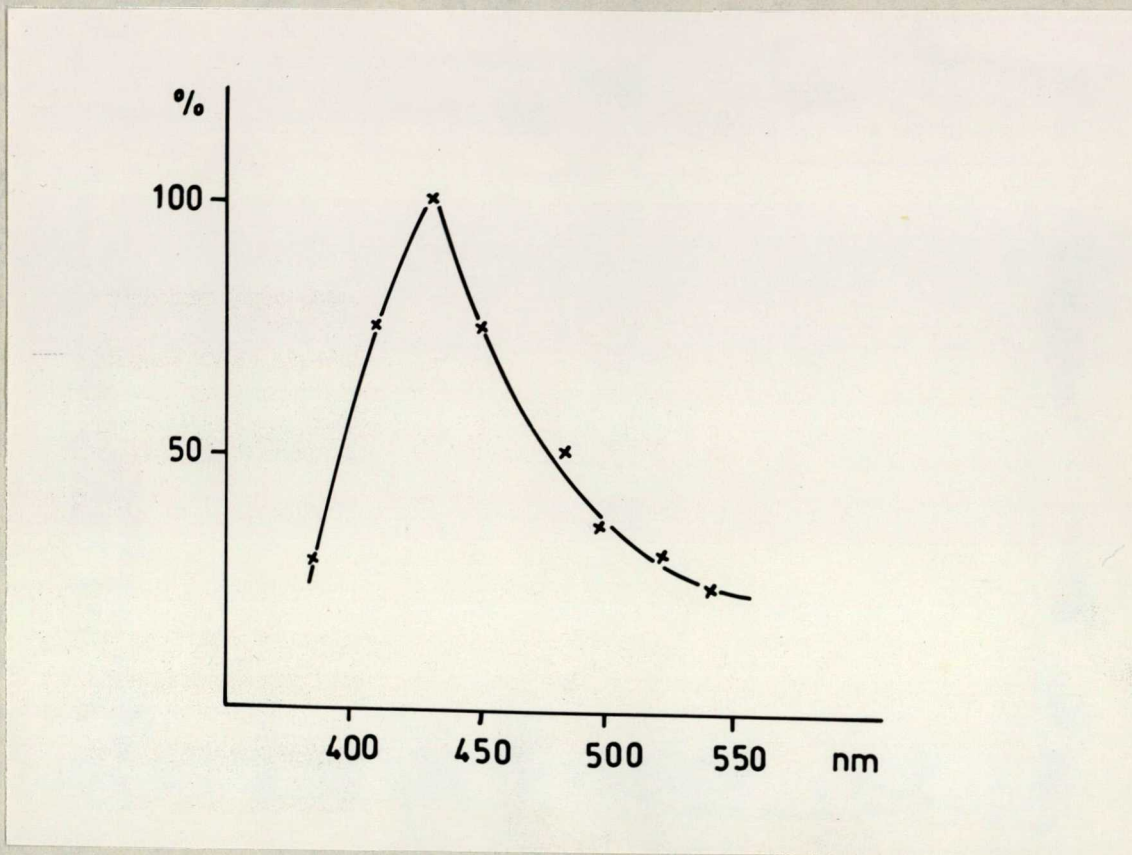
#### 4. Kísérleti eredmények

##### 4.1. Horizontális mérés technika kidolgozása

Az aminosavak denzitometriás mennyiségi kiértékelését az azonos ninhidrin pozitív szín és a közel azonos molekulaszúly miatt Dévényi és munkatársai módszerével el lehet végezni. Ezt a mérési módszert neveztük el "vertikális" üzemmódnak, mivel a kromatográfiás futtatás során az egy oszlopon belüli aminosavak egymáshoz viszonyított denzitásait tudjuk meghatározni. Felmerült a kérdés, hogy a különböző színű és molekulaszúlyú anyagok esetében milyen módszert alkalmazhatunk.

Rendkívül egyszerű módszert sikerült találnunk, az u.n. "horizontális" mérés technikát, aminek a lényege a következő.

A kromatográfiás lemezt a futási irányhoz viszonyítva  $90^{\circ}$ -kal elforgatjuk és így helyezzük be a mintatartóba. Ilyenkor az "elektronikus ablak" a különböző minták azonos  $R_f$  értékű foltjait fedi le. Ez különböző színű kromatográfiás foltok esetében az azonos színű foltokat is jelenti /7/. Ily módon kiküszöbölhető a Vidikon cső színtfüggőségéből és a különböző komponensekből álló minták össz. denzitás változásaiból eredő különbség./4 ábra/. A következőkben mindenütt ezt a mérési módot alkalmaztuk. A horizontális mérési módszerrel pontos mennyiségi meghatározáshoz kalibrációs görbéket kell felvenni.



4. ábra A Vidikon cső szinffüggősége.

Erre azért van szükség, mert külső standard anyaghoz viszonyítva számítjuk ki az anyagmennyiségeket.

A videodenzitometriás horizontális mérés megbízhatóságára a következő mérési sorozatot nézzük meg:

Készítettünk egy 5 pontból álló hidroxilizin kalibrációs görbét

μl hidroxilizin	1	2	3	4	5
	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0

$$1 \mu\text{l hidroxilizin} = 2,11 \mu\text{g}$$

A denzitometriás mérés során 6 elrendeződésben vettük fel a kalibrációs görbéket, úgy, hogy mindig más pontokat vettünk figyelembe. Ezek a következők voltak:

elrendeződés	figyelembe vett pontok száma				
1	1	2	3		
2		2	3	4	
3			3	4	5
4	1	2	3	4	
5		2	3	4	5
6	1	2	3	4	5

Mindegyik kalibrációs görbéről ismert mennyiségű  $1/2 \mu\text{l} = 4,22 \mu\text{g}$  hidroxilizint mértünk vissza.

A kalibrációs görbéről visszamért aktuális hidroxilizin mennyiségek a következők voltak:

	$\mu\text{g}$
1	3,99
2	4,22
3	4,27
4	4,43
5	4,54
6	4,54

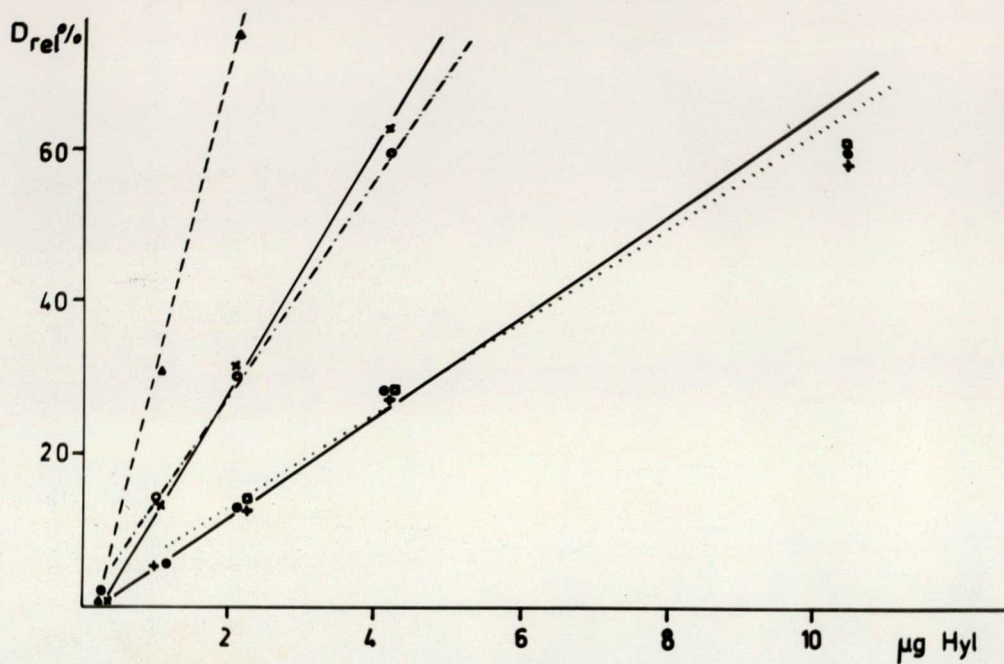
A kapott értékek átlaga  $4,33 \mu\text{g}$ , a standard deviáció  $S. D. \pm 0,195$  ami  $\pm 4,5 \%$ -nak felel meg.

Tehát a horizontális mérési módban mindegy, hogy hágy pontból álló kalibrációs görbét veszünk fel, a mérések átlagban  $5 \%$ -on belül szórnak /5 ábra/.

#### 4.2. Növényi pigmentek vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása és kvantitatív kiértékelése

##### 4.2.1. Klorofillok elválasztása és kvantitatív kiértékelése

Növényi anyagok jellemzésénél pl. az élelmiszeriparban, növénynevelésben igen gyakran szükség van a fő fotoszintetikus pigmentek, a klorofill a, klorofill b és a karotinoidok mennyiségi analizisére. A klorofillok Mg-porfirin komplexek, míg a karotinoidok konjugált kettős kötéseket tartalmazó izoprénvázas vegyületek.



5. ábra. Kalibrációs görbék a horizontális mérés megbízhatóságának vizsgálatához.

A klorofillok meghatározására alkalmazott spektrofotometriás módszerek azonban elég nagy hibát okoznak /8/ mivel a minta előkészítési folyamatában a klorofillok nagy része átalakul a nekik megfelelő feofitinné.

A probléma kiküszöbölésére több szerző javasolja a klorofillok feofitinenként való meghatározását egy előzetes savas kezelés után /9/ vagy kationcserélő kromatográfiával a klorofillból a Mg eltávolítása után /10/.

Ugyanis a feofitinek a klorofillektől csupán abban különböznek, hogy a Mg porfirin komplexek elvesztik Mg ionjaikat.

Ezek az előbb említett közvetett módszerek nem terjedtek el, mivel a keletkezett preparátumok a feofitineken kívül más pigment szinezékeket is tartalmaznak /11/.

Továbbá, a klorofillok jelenlétében végzett spektrofotometriás karotinoid meghatározások nehezen oldhatók meg ugyanabból az extraktumból, mivel abszopciós csúcsaik átfedik egymást./12/. További tisztításra van szükség /klorofillok elszappanosítása/, hogy ezt a problémát kiküszöbölhessük, amely azonban a módszert igen időigényessé teszi.

A fotoszintetikus pigmentek meghatározására ez ideig nem volt olyan vékonyréteg-kromatográfiás módszer, amely alkalmas lett volna az elválasztott foltok mennyiségi kiértékelésére.

A videodenzitometriás kiértékeléshez, mint már említettük geometriailag egységes, jól elvált foltokat tartalmazó kromatogramok szükségesek.

Az eddig alkalmazott vékonyréteg-kromatográfiás módszerek között a fenti feltételeknek eleget tevő kromatogramot nem sikerült előállítani /13, 14/.

Az eddig leírt elválasztási rendszerekben egyedül az apoláros  $\beta$  karotin helyezkedik el különálló foltként közel a frontvonalhoz, míg a klorofill a és b foltok nem válnak el sem egymástól, sem a poláros karotinoidoktól. A szilikagélen gégzett kromatografálás során feofitin a és b foltok jelentkeznek. Ezek a klorofillok enyhe savas bomlásának termékei, amelyek a vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás folyamán vagy az extrahálás során keletkeznek /15/.

Munkánk során sikerült egy olyan közvetett klorofill a és b meghatározási módszert kidolgoznunk, amely segítségével a klorofillokat a megfelelő feofitinek formájában karotinoidek jelenlétében is, vékonyrétegen történő elválasztással, videodenzitométerrel értékelhetően tudjuk meghatározni.

#### 4.2.1.1. A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás körülményei

A kromatografálást a módszerekben közölt körülmények között végeztük. A kifejlesztésre használt oldószerrendszer i-oktán-aceton-dietiléter /3:1:1/ volt /14, 18/.

A kromatografálást termosztátban/30°C/ végeztük, a front magasság 16 cm, a futási idő 45-50 perc volt. A fő pigment foltok azonosítására a Módszerek 3.1.2. fejezetében

közölt eljárás szerint készült tiszta klorofill a és b -t, valamint kereskedelmi forgalomban kapható  $\beta$  karotint használtunk.

Videodenzitometriás és spektrofotometriás méréseket is végeztünk a két különböző módszer összehasonlítására.

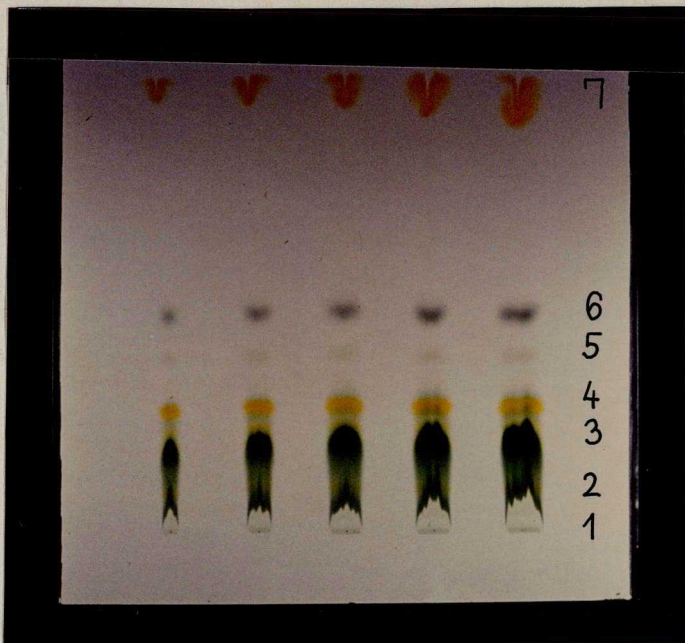
A spektrofotometriás mérésekhez a foltokat lekapartuk a lemezről, majd a feofitineket és a  $\beta$  karotint dietiléterrel extraháltuk a gélről. Az extraktumot Whatman papíron szírtük. A pigmentek abszorpciós spektrumát Specord UV-VIS spektrofotométeren vettük fel. /8. ábra/. A videodenzitometriás mérésekhez standard keverékből /módszerek 3.1.1./ 1-10  $\mu$ l-t vittünk fel különböző elrendeződésben, 10 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -t tartalmazó rétegre. A standard oldat 1 ml-e 1 mg  $\beta$  karotint, 1mg klorofill b-t és 2 mg klorofill a-t tartalmazott kloroformban oldva. Az ismeretlen minta pigment tartalmának meghatározásakor 5  $\mu$ l kloroformos spenótlevél extraktumot vittük fel a lemezre 2 és 8  $\mu$ l standard keverék mellé.

4.2.1.2. A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás függése a réteg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tartalmától és az alkalmazott hőmérséklettől

A klorofilok és karotinoidok vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása szilikagél lemezen nem ad jó elválasztást az egyes pigmentekre. A klorofill a és b foltok átfedik egymást és a poláros karotinoidokat is. /6. ábra/







6. ábra Növényi pigmentek elválasztása szilikagél G lemezen.

A futtatás körülményei:

1-oktán-aceton-éter /3:1:1/ futtatószer

30°C futtatási hőmérséklet

1. Start

2. klorofill B

3. klorofill a

4. Xantofillek

5. zeofitin b

6. zeofitin a

7.  $\beta$  karotin

Adott mennyiségű  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  jelenléte a rétegben a klorofilok bomlásához vezet és teljesen átalakulnak feofitinné. Eltűnnek az egymást átfedő foltok és jól definiált feofitin foltokat nyerünk /7. ábra/.

Az ábrán 10 %  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -tal impregnált szilikagél lemezen történt elválasztás látható.

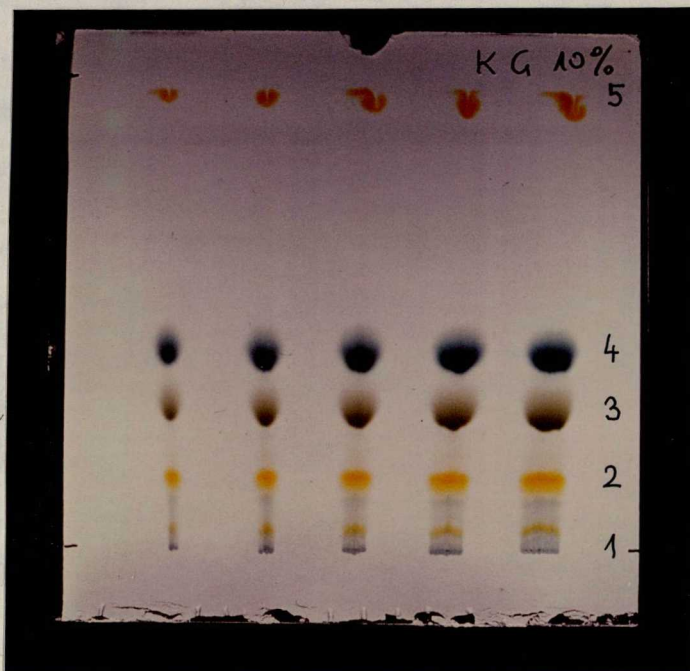
A különböző koncentrációban  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -t tartalmazó szilikagél lemezeken végzett kísérletek szerint, 10 %  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  tartalom elegendő a klorofilok kvantitatív átalakulásához feofitinné. Magasabb koncentrációban a só kikristályosodik a száradó lemezeken, ami a pigment foltok elválasztását zavarja.

Különböző hőmérsékleten végzett kromatogram kifejtés azt mutatta, hogy magasabb hőmérsékleten a foltok nagyobb  $R_f$  különbséggel váltak el, de  $30^\circ\text{C}$  fölött veszélyes a futtatást végezni az oldószer rendszer nagy gőznyomása miatt /i-oktán-aceton-éter/.

Az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -t tartalmazó rétegen keletkező feofitinek azonosításánál ugyanazt az abszorpciós spektrumot kaptuk, amit French közölt a feofitin a és feofitin b-re /8. ábra/. Ezzel szemben a karotinok spektruma nem változott az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  hatására.

Az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  hatását a klorofill átalakulására a következőkkel magyarázhatjuk. Az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -t tartalmazó kromatográfiás lemez hőaktiválása során az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  keletkezése közben részlegesen bomlik.

Ennek a savas hatásnak tulajdonítható a feofitin képződése /9. ábra/. A vékonyréteg-kromatográfiás analízisben az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -nek ezt a hő hatására bekövetkező kénsavvá alakulását általánosan használják szintelen



7. ábra Növényi pigmentek elválasztása 10 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó szilikagél G lemezen.

a futtatás körülményei:

1-oktán-aceton-éter /3:1:1/ futtatószer,  $30^\circ\text{C}$

futtatási hőmérséklet

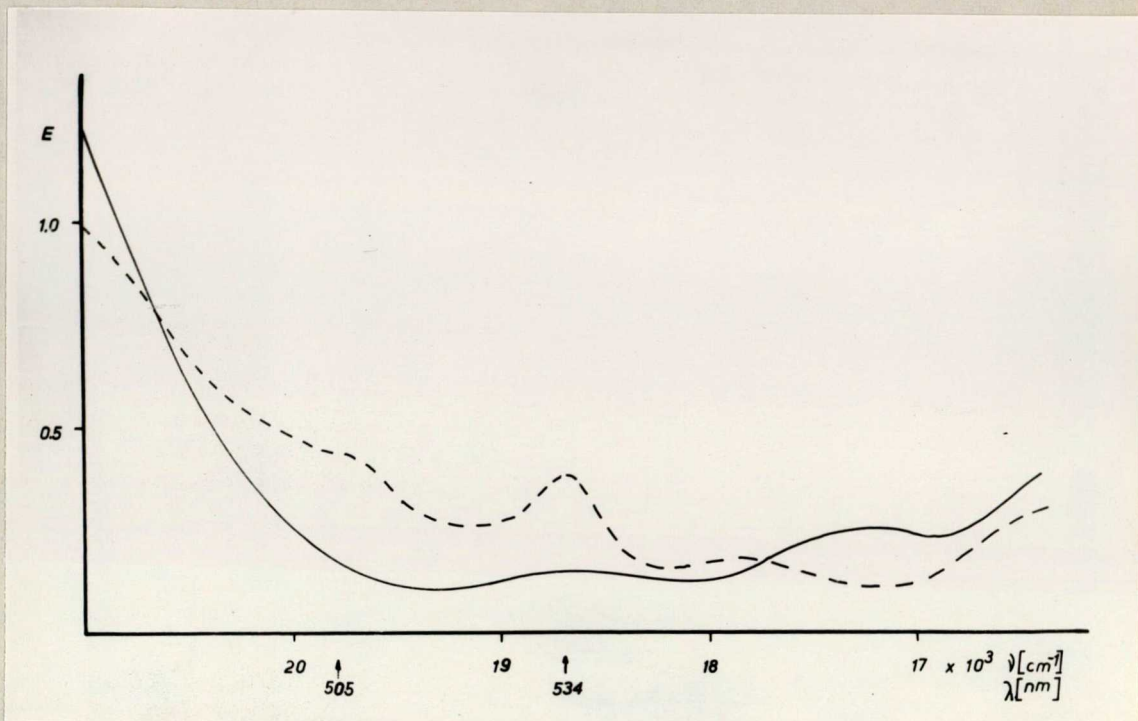
1. start

2. xantofillek

3. zeaxantin b

4. zeaxantin a

5.  $\beta$  karotin



9. ábra Feofitin a képződés klorofill a-ból sav hatá-  
sára.

—————

klorofill a abszorpciós spektrum  
részlet dietiléterben

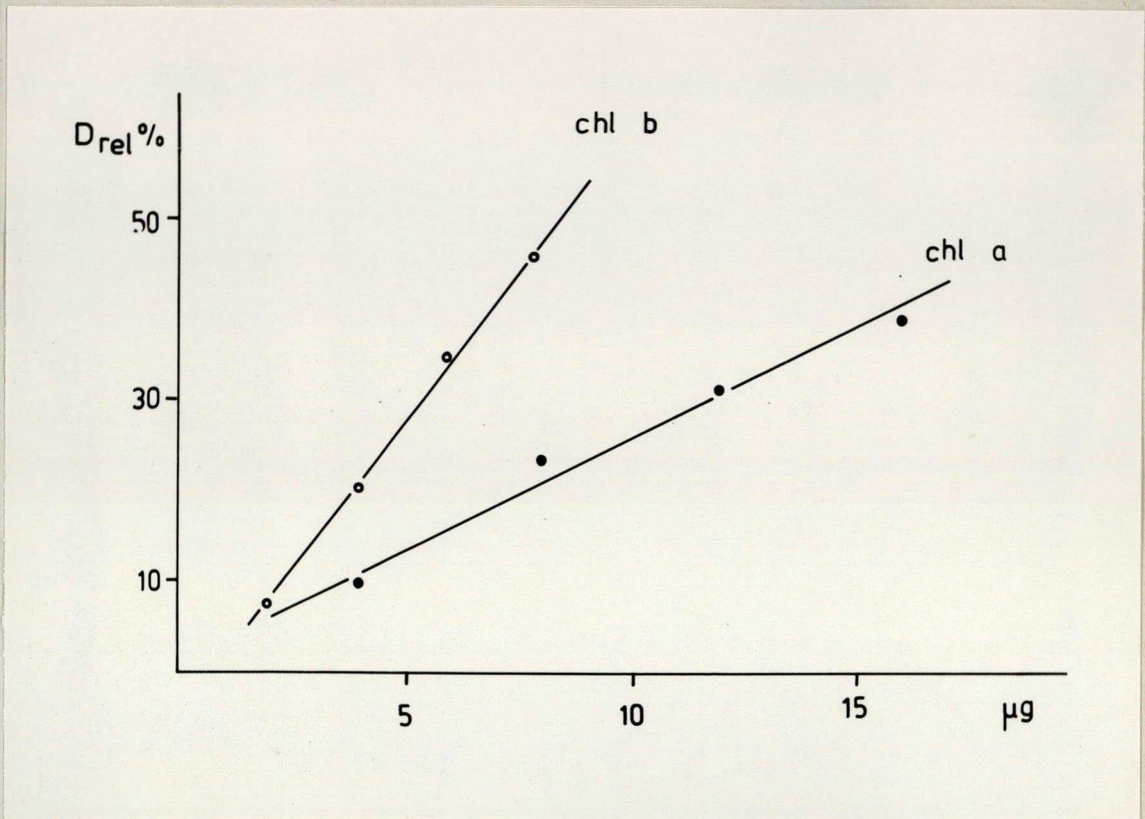
-----

feofitin a abszorpciós spektrum  
részlet dietiléterben

szerves anyagok elszenesítésére /19, 20/. A savas hatást szemléletessé tehetjük indikátor oldatok segítségével /brómfenolkék, metilnarancs/. Az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -t tartalmazó réteget indikátor oldattal kezelve, hőaktiválás hatására az indikátor színe a savas tartomány felé változik. Ez a színváltozás a hőaktiválás előtt nem figyelhető meg. Az  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -ot nem tartalmazó rétegek esetében sem a hőaktiválás előtt, sem utána nem tapasztalható az indikátor színváltozása. Más sókat használva, mint  $\text{MgSO}_4$  és  $\text{CaSO}_4$  nem tapasztaltuk a klorofilleket feofitinné átalakító hatást.

4.2.1.3. Az optimális feltételek között elválasztott növényi pigmentek kvantitatív meghatározása, a videodenzitometriás mérés pontossága és előnyei

Az optimális feltételek között futtatott lemezek /10%  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó szilikagél réteg,  $30^\circ\text{C}$  hőmérséklet, i-oktán-aceton-éter 3:1:1 arányú keveréke, mint futtatószer/ videodenzitometriás meghatározáshoz megfelelő, jól elváló foltokat eredményeznek. A videodenzitometriás mérések érzékenysége a növényi pigmentekre hasonló, mint az aminosavak esetében. /21, 22/. A mért relatív denzitások és az alkalmazott különböző pigment koncentrációk között lineáris összefüggés van /10 ábra/.



10. ábra Klorofill a és b kalibrációs görbék mennyiségi kiértékeléshez.

Magasabb pigment koncentrációk esetében a kromatogramok teltelítettek, a foltok nem válnak el rendesen, és a videodenzitometriás kiértékelést zavarják.

Fontos megjegyezni, hogy az elvált pigment foltok fakulnak, de 15 percig a fakulás mértéke elhanyagolható.

A 11. ábrán a fakulás időbeli függését ábrázoltuk.

Figyelembe véve a denzitometriás mérés gyorsaságát /5 sec egy folt megmérése és kinyomtatása/ módszerünk jól alkalmazható.

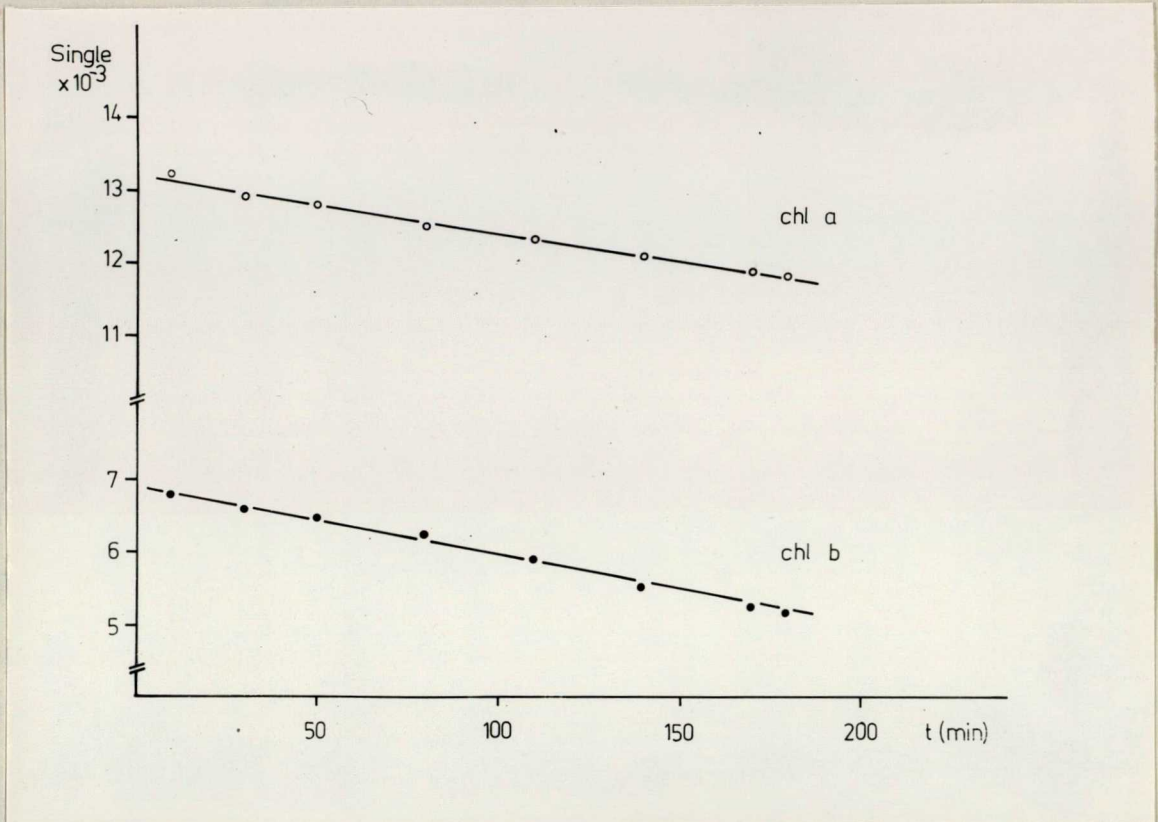
A spektrofotometriás és videodenzitometriás mérésekkel meghatározott klorofill a és klorofill b mennyiségek jó egyezést mutatnak /1. táblázat/.

A standard deviáció meghatározásával a videodenzitometriás pigment meghatározások reprodukálhatósága  $\pm 5-10\%$  minden esetben /1. táblázat/.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a növényi anyagok klorofill a klorofill b és  $\beta$  karotin tartalma az általunk kidolgozott videodenzitometriás technikával vékonyréteg-kromatogramon meghatározható.

A módszernek a következő előnyei vannak:

1. A módszert nem zavarja a mintaelőkészítés során klorofillból keletkező feofitin.
2. A  $\beta$  karotin tartalom meghatározása klorofill a és b jelenlétében lehetséges.
3. Naponta több száz minta analizálható, és a hiba a spektrofotometriás méréseknél kapott értéknél nem nagyobb.



11. ábra A pigment foltok fakulása a vékonyréteg-kromatográfiás lemezen az idő függvényében.



	Koncentráció $\mu\text{g}/\mu\text{l}$							
	Spektrofotometriчески				Videodenzitometriчески			
	1	2	3	átlag $\pm$ SD	1	2	3	átlag $\pm$ SD
chl a	2.01	1.91	1.84	1.92 $\pm$ 0.09	1.70	1.88	1.86	1.81 $\pm$ 0.10
chl b	0.75	0.71	0.63	0.69 $\pm$ 0.06	0.66	0.68	0.59	0.64 $\pm$ 0.05

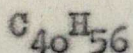
I. táblázat Klorofillok mennyiségi meghatározása  
videodenzitométerrel és spektrofotometriчески.

#### 4.2.2. Karotinoidok elválasztása és kvantitatív kiértékelése

A növényi extraktumokban a klorofilok mellett a legjelentősebb pigmentek a karotinoidok. Ezeket a vegyületeket két nagy csoportba sorolhatjuk.

a. apoláros szénhidrogének: karotinok

A zöld növényi szövetekben csak  $\beta$  karotin van és nyomokban  $\alpha$  karotin. 40 szénatomot tartalmazó szénhidrogének a következő összegképlettel írhatók le:



b. Poláros, oxigént tartalmazó karotinoidok: xantofillek

Az oxigén előfordulhat hidroxil, metoxil, epoxil, karboxil, és karbonil formában.

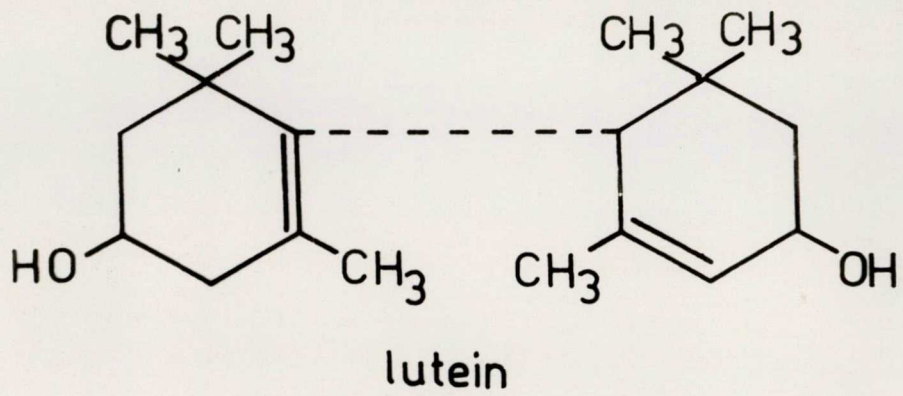
Levélextraktumból a következő xantofilleket azonosítottuk:

a. hidroxil származék: lutein /3,3<sup>°</sup> dihidroxil  $\alpha$  karotin/  
/12. ábra/

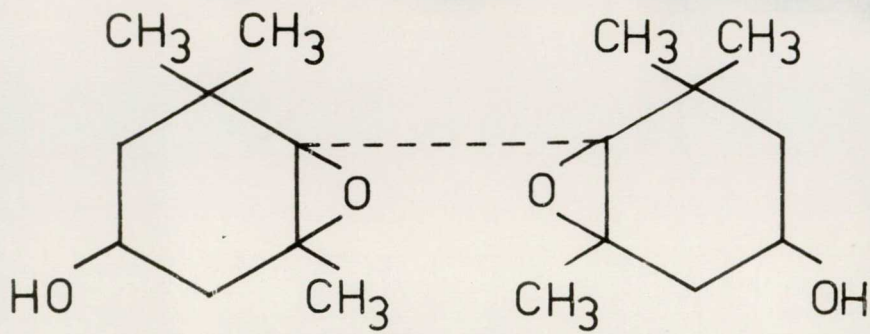
b. epoxil származék: violaxantin /5,5,5,6<sup>°</sup> diepoxil-  
zeaxantin 13. ábra/.

c. allén származék: neoxantin /3,5 dihidroxil, 5<sup>°</sup> 6<sup>°</sup>  
epoxil  $\beta$  karotin 14. ábra/.

Azonosítottuk továbbá a levélextraktumban a karotinok közül a  $\beta$  karotint /15. ábra/. A képletekben a szaggatott vonallal egy 4 izoprén láncból felépült szénhidrogén láncot jelöltünk /16. ábra/.

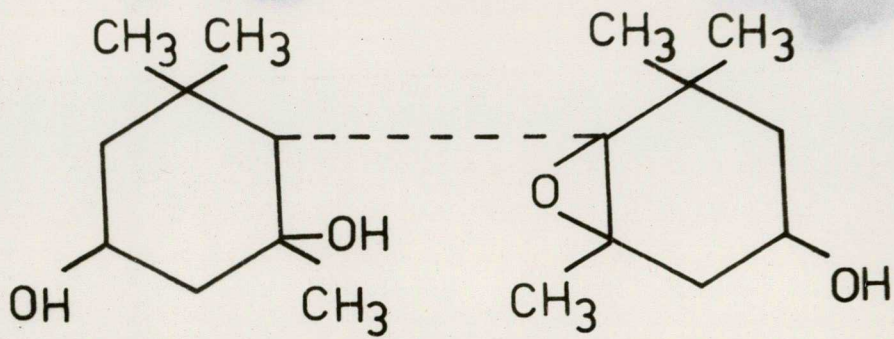


12. ábra A lutein szerkezeti képlete.



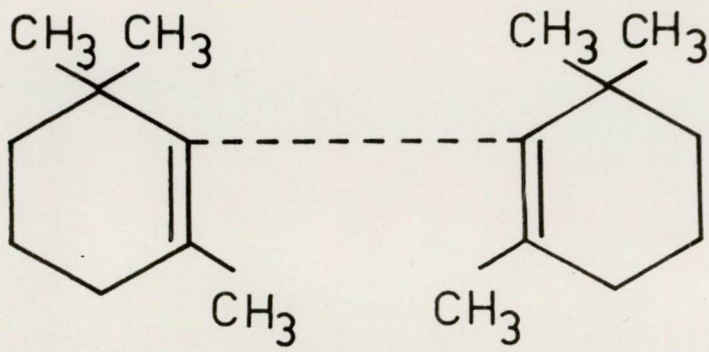
violaxantin

13. ábra A violaxantin szerkezeti képlete.



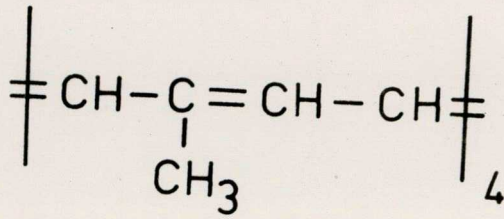
neoxantin

14. ábra A neoxantin szerkezeti képlete.



$\beta$  karotin

15. ábra A  $\beta$  karotin szerkezeti képlete.



16. ábra Az izoprén egység szerkezeti képlete.

#### 4.2.2.1. A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás körülményei

A módszerek 3.2. pontban közölt módon készített extraktumból, Silica gel 60 lemezen a következő oldószerrendszerben végeztük az elválasztást:

petroléter- /fp. 70°C/ - etilacetát-dietilamin /58:30:12/.

A lemezeket felhasználás előtt 1 órán át 110°C-on aktiváltuk. 30°C-on a kromatogram kialakulása 60-70 percet vesz igénybe. Az elválasztás során 4 domináns foltot kaptunk. /17. ábra/.

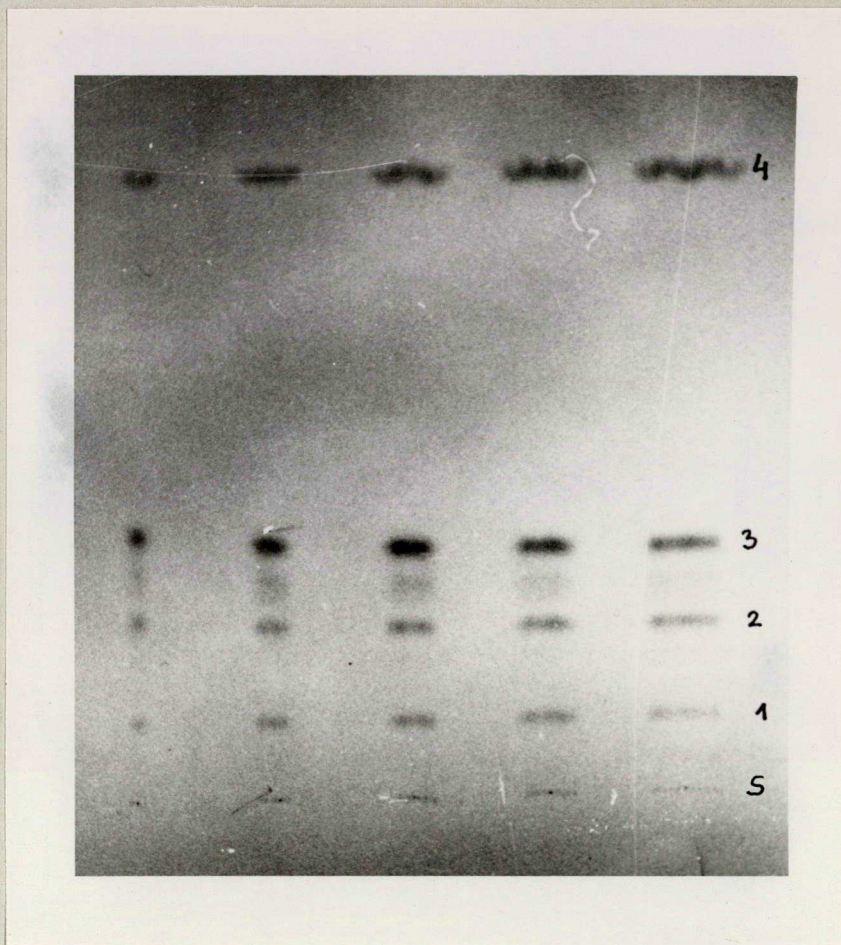
#### 4.2.2.2. A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás során kapott karoténoidok azonosítása

A felfuttatott kromatográfiás lemezről lekapartuk a foltokat és a pigmenteket kloroformmal eluáltuk a szilikagélről. A pigmentek spektrumát SPECORD UV-VIS regisztráló spektrofotométeren vettük fel.

Az egyes izolált pigmentek abszorpciós spektrumait a 18. ábrán tüntettük fel. A pigmenteket abszorpciós maximumaik alapján azonosítottuk /2. táblázat/. A kapott eredmények jó egyezést mutatnak az irodalomban közölt értékekkel /24/. Ezek szerint a 4 domináns folt a  $\beta$  karotin, a lutein, a violaxantin és a neoxantin.







17. ábra Karotinoidok elválasztása Silica gel 60  
/Merck/ lemezen.

futtatószer: petroléter /70°C/ -etilacetát-  
-diethylamin /58:30:12/

futtatás hőmérséklete: 30°C

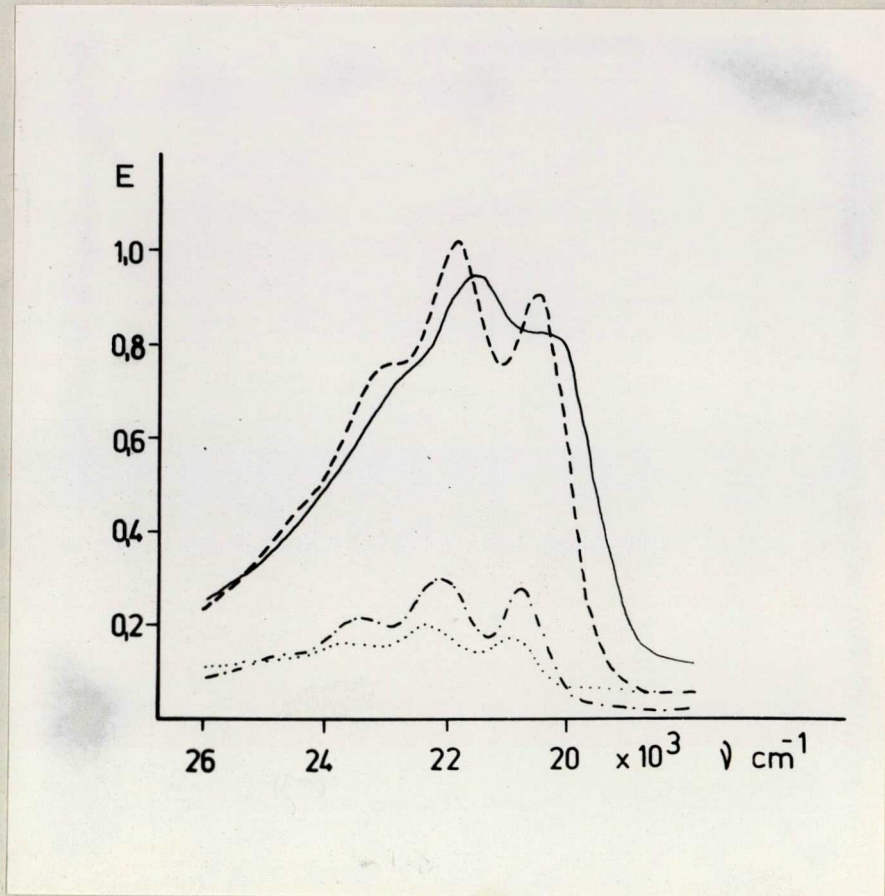
s start

1 neoxantin

2 violaxantin

3 lutein

4  $\beta$  karotin



18. ábra Szilikagél rétegen elválasztott, karotinoidok abszorpciós spektrumai kloroformban felvéve.

- β karotin
- lutein
- .-.-.-.- violaxantin
- ..... neoxantin

lutein	irodalmi	428	456	487
	mért	431	457	486
$\beta$ karotin	irodalmi	466	497	
	mért	465	498	
violaxantin	irodalmi	424	451	482
	mért	425	452	482
neoxantin	irodalmi	447	476	
	mért	448	479	

II. táblázat Karotinoidok abszorpciós maximumai nm-ben kloroformban felvéve.

Az irodalmi értékeket Goodwintól /24/ vettük át.

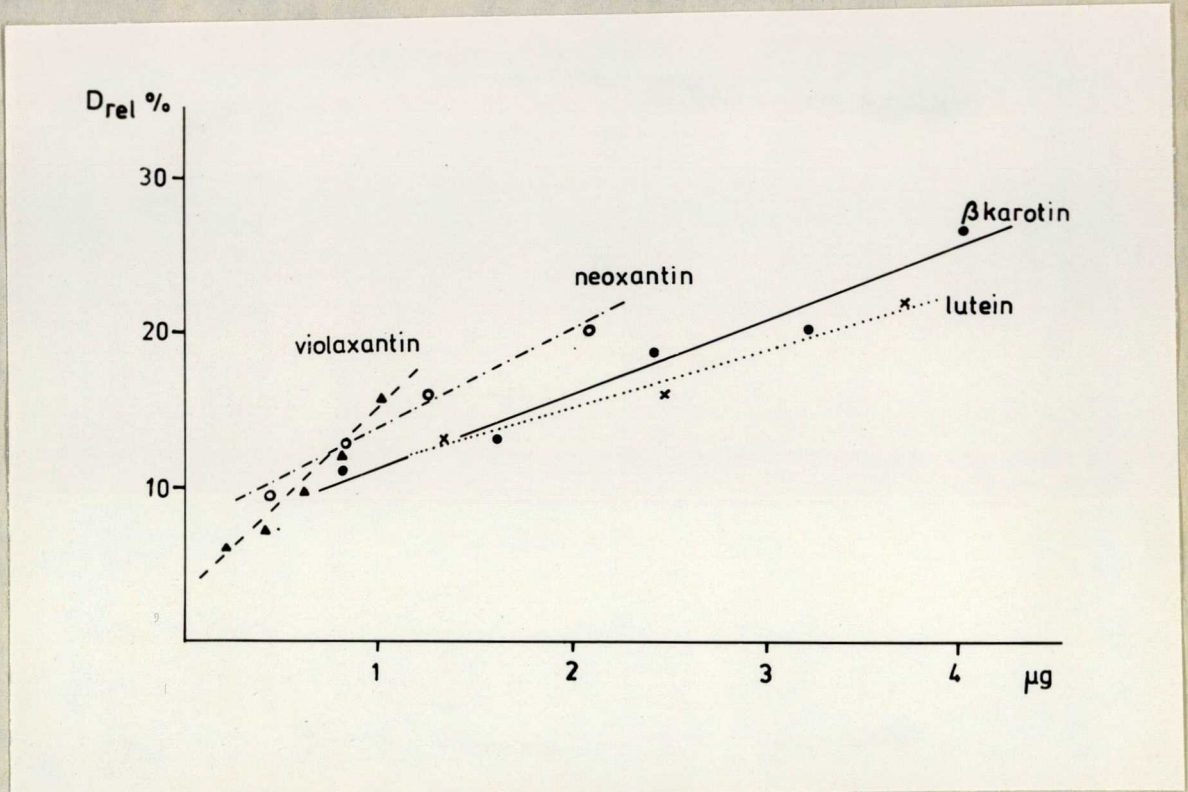
#### 4.2.2.3. A karotinoidok mennyiségi meghatározása közvetlen denzitometrával.

A négy pigment segítségével kalibrációs görbéket készítettünk a mennyiségi meghatározáshoz /19. ábra/.

Az ábránól leolvasható az egyes pigmentekre az a denzitometrával szemponyjából optimális koncentrációtartomány, amelynél a denzitás lineárisan nő a felvitt anyag mennyiségével. Ezek az értékek luteinre 1.0 - 4.0  $\mu\text{g}$ , violaxantinra 0.2 - 1.0  $\mu\text{g}$ , neoxantinra 0.5 - 2.0  $\mu\text{g}$  és  $\beta$  karotinra 1.0 - 4.0  $\mu\text{g}$ .

#### 4.3. Hidroxiaminosavak vékonyrétegkromatográfiás elválasztása és kvantitatív kiértékelése

A közönséges aminosavak vékonyréteg-kromatográfiás elválasztására sok módszer ismeretes. Az ioncserés vékonyréteg-kromatogramok videodenzitométerrel történő kiértékelése jól bevált, gyors, mennyiségi analízist tesz lehetővé /6, 25, 5/. Ilyen egyszerű gyors módszerek azonban az un. ritka aminosavak meghatározására nincsenek. Egyes ritka aminosavak ugyanakkor jellemzőek bizonyos fehérjékre, mint pl. a hidroxiprolin és a hidroxilizin, amelyek viszonylag nagy mennyiségben találhatóak a kollagémben. Husipari termékek vizsgálatánál a hidroxiprolin és hidroxilizin arányából a termék minőségére lehet következtetni.



19. ábra Karotinoidok kalibrációs görbéi mennyiségi kiértékeléshez.

#### 4.3.1. Hidroxilizin elválasztása és kvantitatív kiértékelése

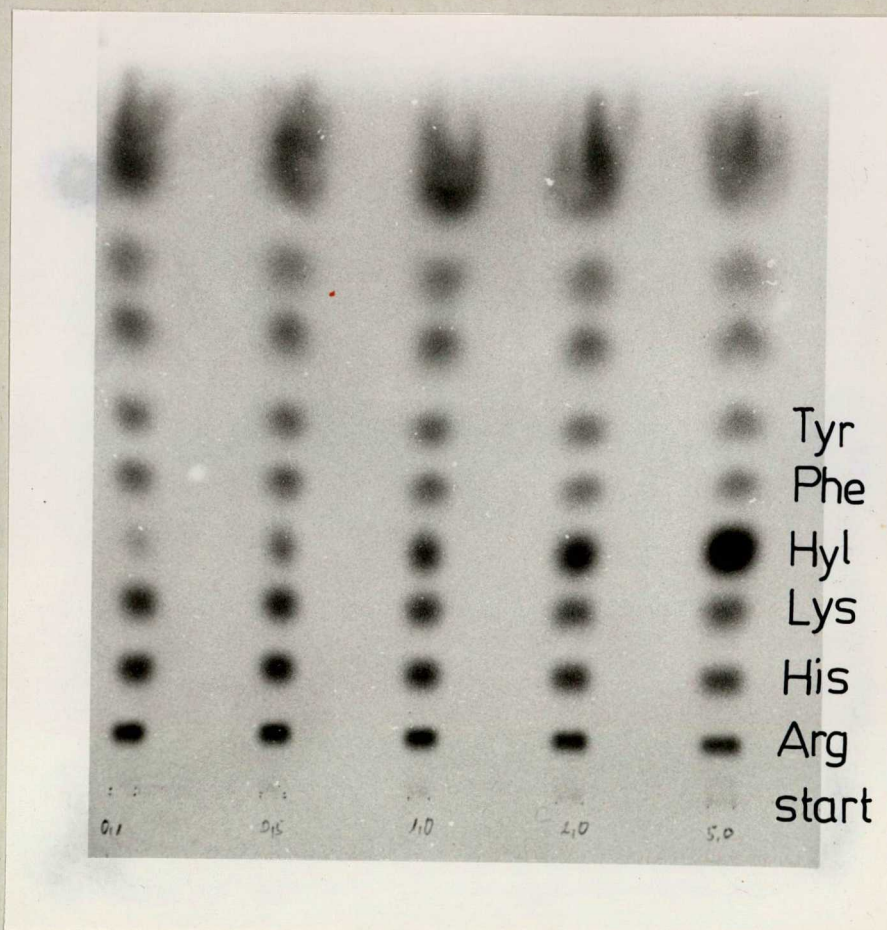
Az elválasztást Fixion 50 x 8-as rétegen pH:5.28-as citrát pufferben /26/ szobahőmérsékleten végeztük. A kromatografálási idő ilyen körülmények között 3 órát vesz igénybe. A foltokat ninhidrin reagenssel /3.6. pont a módszerekben/ hívtuk elő, és horizontális mérési módban denzitométeren értékeltük ki.

A 20. ábrán egy hidroxilizint is tartalmazó aminosav keverék kromatogramját láthatjuk. A hidroxilizin jól elváló foltként fut a lizin és a fenilalanin között. Ez a módszer abban az esetben használható, ha ornitin nincs a rendszerben, mivel az utóbbi aminosav szintén a lizin és fenilalanin között fut. A kollagén és a hozzá hasonló fehérjék ugyanakkor nem tartalmaznak ornitint /27/.

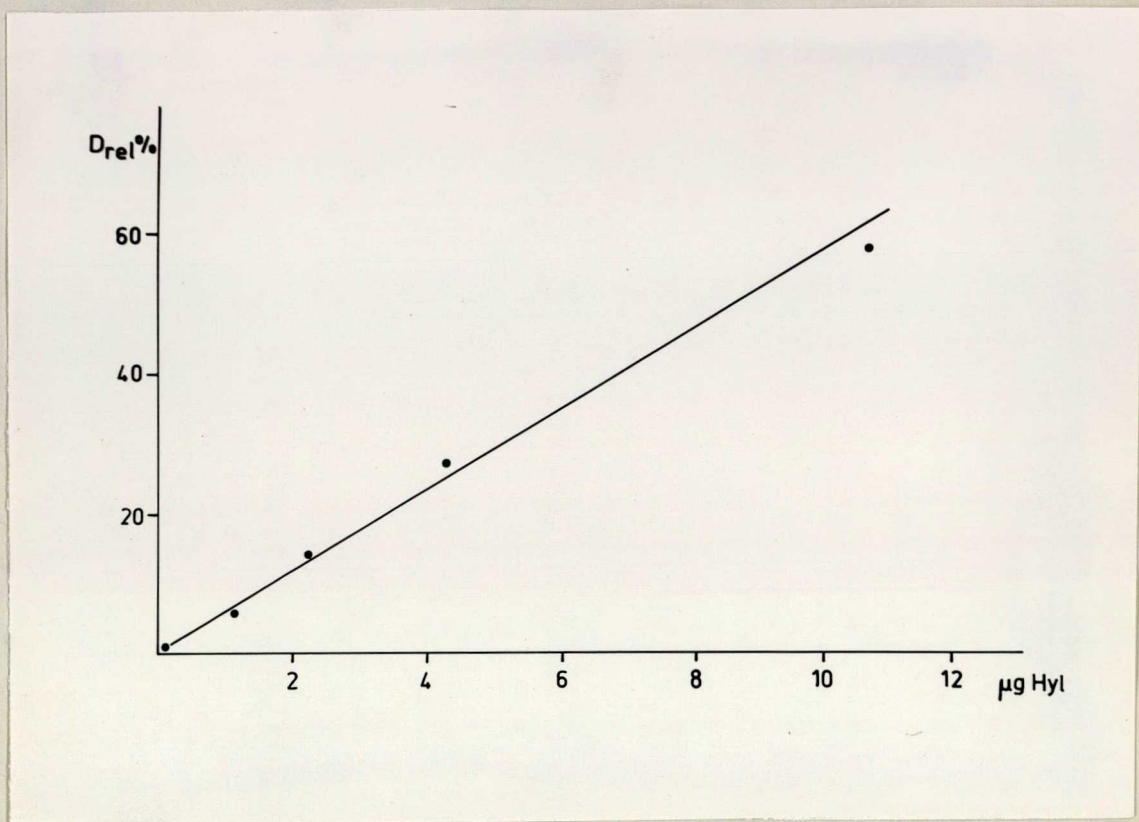
A denzitometriás méréssel kapott kalibrációs görbe egy adott koncentráció tartományban 70,5-5  $\mu\text{g}$  hidroxilizin/lineáris /21. ábra/.

Mivel a fehérje hidrolizátumok általában nem tartalmaznak nagyon nagy mennyiségben hidroxilizint, előnyösnek látszott 2  $\mu\text{g}$  standard hidroxilizint adni a mintákhoz és a relatív denzitásban bekövetkező változásokat összehasonlítani a csak hidroxilizint tartalmazó kontrol folttal. Ezzel a "fogással" a következő előnyt érjük el:

Tapasztalatunk szerint a videodenzitométer nagyon kis anyagmennyiséget /kicsi és halvány kromatográfiaiás foltok/ már nem mér megbízhatóan / nulla értéket ír ki a



20. ábra Hidroxilizint is tartalmazó aminosav keverék  
ioncserés elválasztása Fixion 50 x 8 lemezen.  
futtatószer pH=5,28 citrát puffer  
futtatás hőmérséklete: 25 °C  
előhívószer: kadmiosos ninhidrin reagens.



21. ábra Kalibrációs görbe hidroxilizin mennyiségi meghatározásához.



készülék/, ugyanakkor ha ez az anyagmennyiség különbségként jelentkezik két kromatográfiás folt között, amikor már elég érzékenyen reagál és a denzitásbeli különbséget mérni tudja.

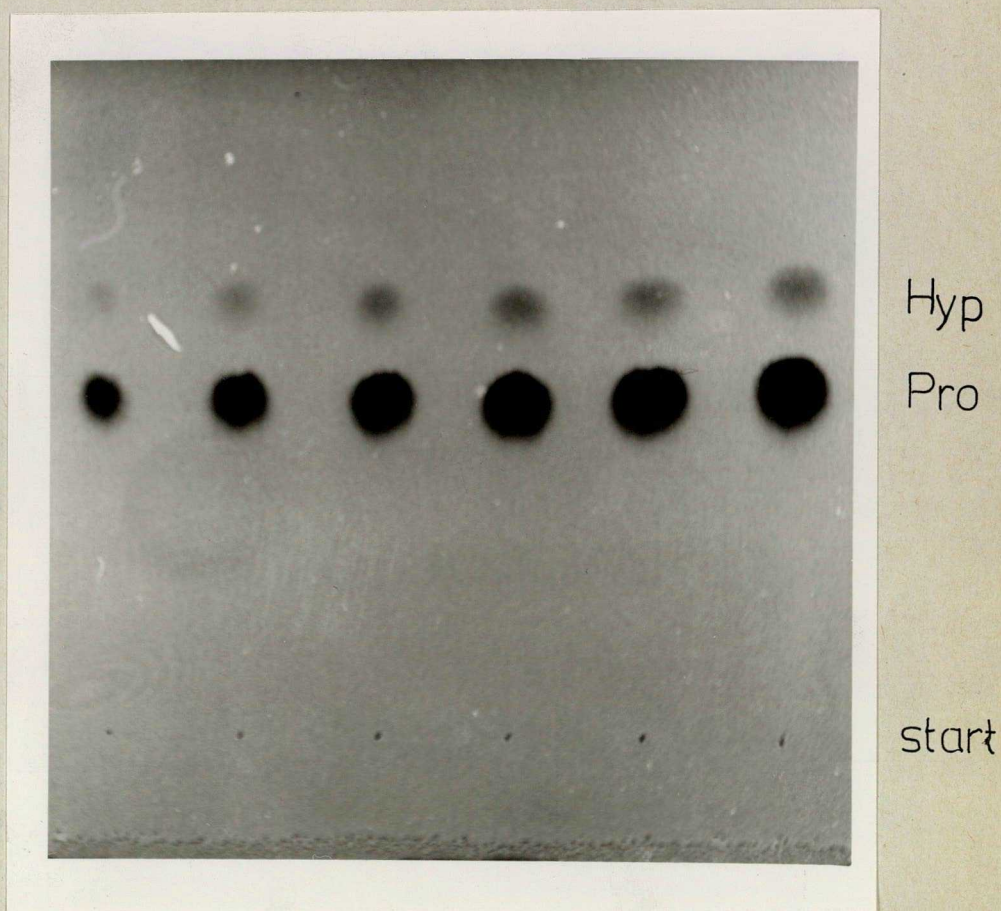
#### 4.3.2. Hidroxi-prolin elválasztása és kvantitatív kiértékelése

Az elválasztást szilikagél G lemezen /Módszerek 3.3.3/ szobahőmérsékleten végeztük a következő oldószerrendszerben:

i-propanol-víz /7:3/, amely 0.1 % izatint és 0.2 % p-dimetilamino-benzaldehydet tartalmazott oldott állapotban. Azt tapasztaltuk, hogy a kromatografálás reprodukálhatósága miatt célszerű az előhívószert /izatin és p-dimetilamino-benzaldehyd/ az oldószerben feloldani. Ez a lépés a háttér és az előhívás egyenletességét biztosította. Ha u.i. az előhívást utólag végezzük /először izatinnal, majd p-dimetilamino-benzaldehyddel/ lefújva a lemezeket /az egyenletes előhívás nem oldható meg, ami a denzitometriás mérésben az egyik nagy hibaforrás.

Két órás kromatografálás után a lemezeket 80°C-on 15 percig tartottuk, ekkor a prolin foltja megjelenik. Ezt követően HCl gőztérben inkubáltuk a lemezt 80°C-on, ami a hidroxiprolin lila foltjának megjelenését eredményezte.

A 22. ábrán egy prolin és hidroxiprolin keverék kromatogramja látható. A prolin és hidroxiprolin mennyiségét selektíven meghatározhatjuk, mivel jól elvált foltokat adnak.



22. ábra Prolin és hidroxiprolin elválasztása szilikagél G lemezen.

Futtatás: i-propanol-víz /7:3/, amelyben 0,1 % izatin és 0,2 % p-dimetilamino-benzaldehid van oldott állapotban

futtatás hőmérséklete: 25°C

előhívás: 80°C 15, perc, majd HCl gőztér.

A két aminosav  $R_F$ -beli különbsége 0.14 / $R_F$  Pro:0.43,  $R_F$  Hyp:0.57/. Ez a különbség nagyobb, mint amit Brenner és Niederwieser n-propanol-víz /7:3/ oldószerrendszerben kapott /28/, azaz az i-propanolt használva n-propanol helyett jobb elválást kapunk. Más aminosavak nem befolyásolják az analízist, mivel ilyen körülmények mellett a prolinon kívül más aminosav nem ad színes foltot. A mennyiségi értékelésnél a denzitometriás kalibrációs görbe 1-15  $\mu$ g hidroxiprolin tartományban lineáris. Így módszerünk a gyors rutinszerű, kvantitatív meghatározására alkalmas /23. ábra/.

#### 4.4. Epesavak és származékaik elválasztása vékonyrétegen és kvantitatív kiértékelésük

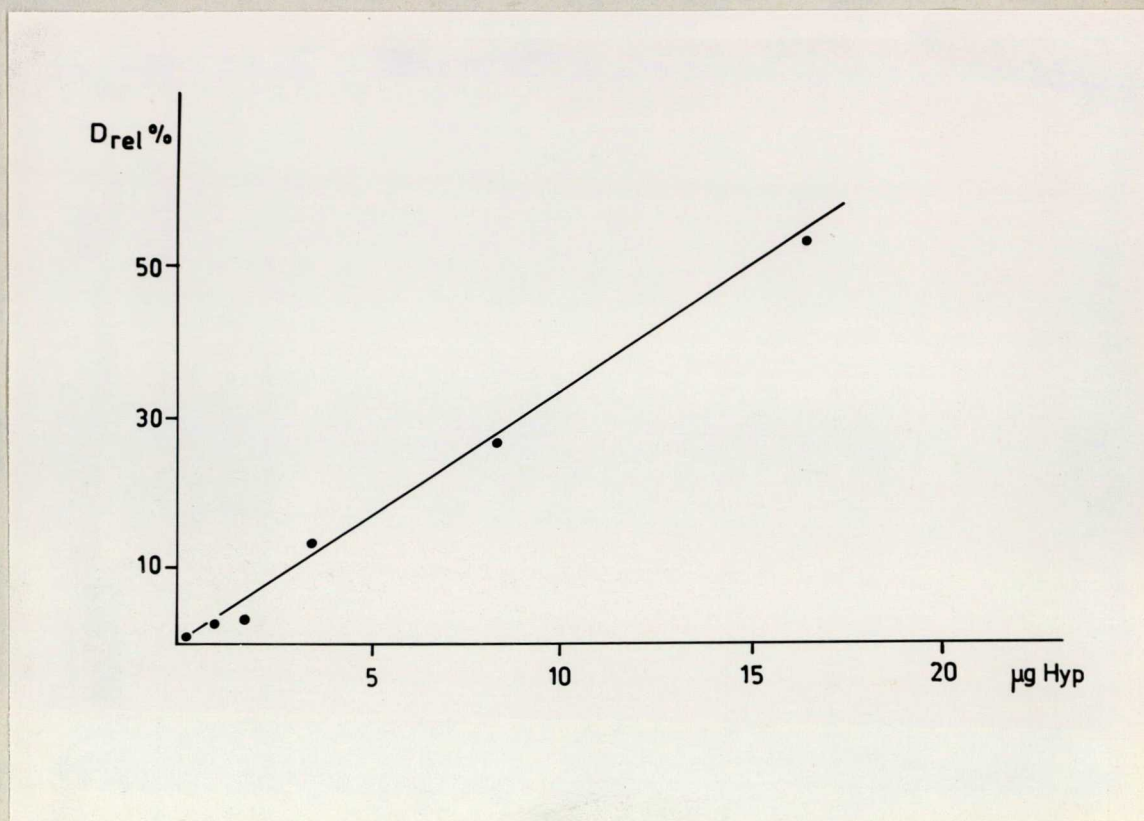
##### Klinikai jelentőségük

Az epesavak nélkülözhetetlen vegyületek az emésztés folyamatában, hiányuk esetén a bélemésztés tökéletlen. Az epeutak elzáródásakor az epesavak felszaporodnak a vérben, megjelennek a vizeletben. Klinikai vizsgálatuk célja az emésztőrendszeri rendellenességeik kimutatása.

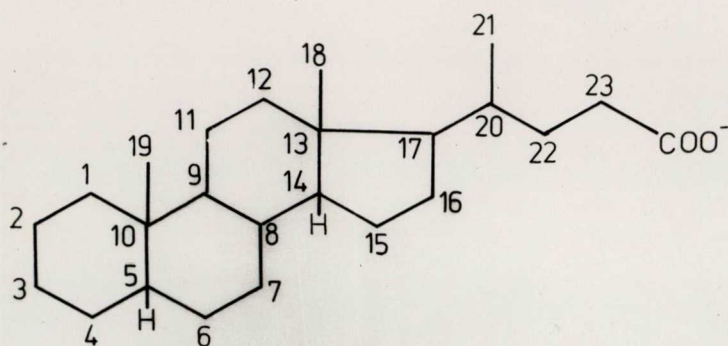
Szerkezeti felépítésük a 24. ábrán látható.

A szabad epesavak glicinnel és taurinnal képzett származékai a konjugált epesavak.





23. ábra Hidroxiprolin kalibrációs görbe mennyiségi kiértékeléshez.



kolánsav

Kólsav	$3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ - trihidroxi- kolánsav
Kenodeoxikólsav	$3\alpha, 7\alpha$ - dihidroxi- kolánsav
Deoxikólsav	$3\alpha, 12\alpha$ - dihidroxi- kolánsav
Litokólsav	$3\alpha$ - hidroxi- kolánsav

24. ábra Az epesavak szerkezeti felépítése.

### Rétegekromatográfiás elemzésük

A szabad epesavak elválasztása szilikagélen megvalósítható /29/. Problémát főleg a deoxi és kenodeoxikolsav, valamint ezek gliko -és tauro-konjugált formáinak elválasztása jelent.

Célunk olyan vékonyréteg-kromatográfiás rendszer kidolgozása volt, amelyben egy lemezen a fent említett epesav származékok elválnak és videodenzitóméterrel mennyiségük is meghatározható.

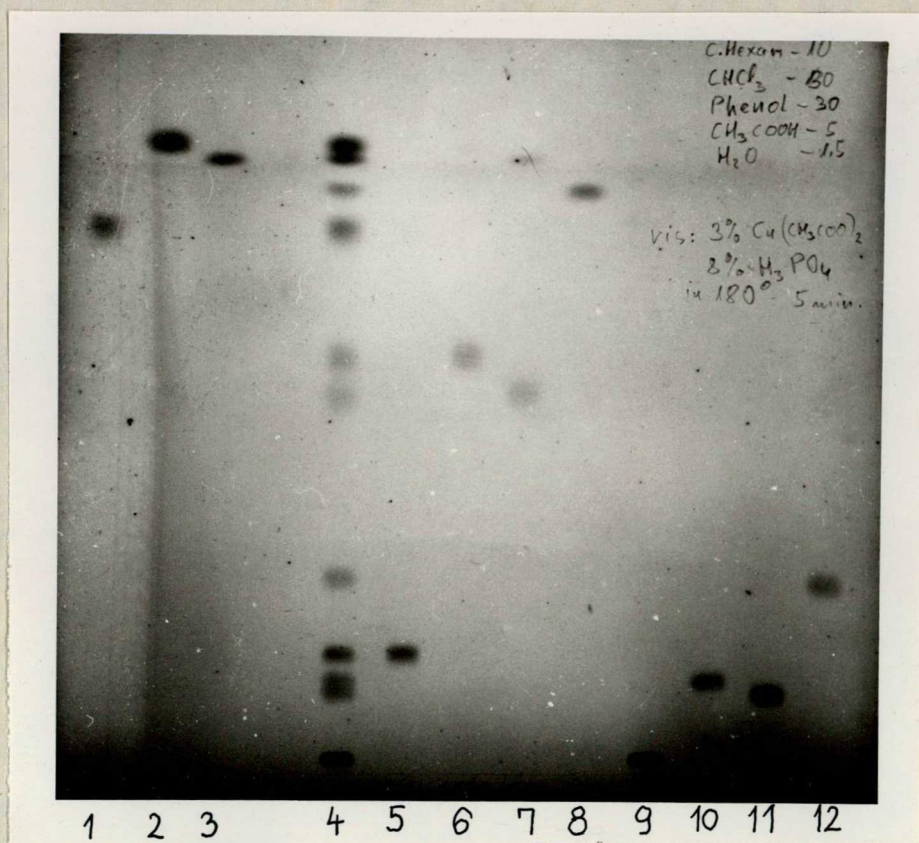
A konjugált epesavak elválasztására Batta és munkatársai /30/ alkalmazott rendszert választottuk kiindulásul.

Azonban ebben a rendszerben /kloroform-i-propanol-ecetsav-viz/30:30:4:1 arányu elegye többszöri futtatásra nem váltak el kellőképpen a deoxi és kenodeoxi vegyület-párok.

A futtatóelegy poláros és apoláros komponenseinek optimális megválasztásával sikerült olyan vékonyréteg-kromatográfiás rendszert találnunk, amelyben az epesavak és származékaik egyszerű futtatással elválaszthatók és mennyiségük videodenzitóméterrel meghatározható. Ez a rendszer a következő volt:

Silicagel 60 lemezen, c hexán-kloroform-fenol-ecetsav-viz 10:30:30:5:1,5 arányu elegye.

A 25. ábrán látható egy ebben a rendszerben futtatott kromatogram, amely standard epesavakat és azok keverékét ábrázolja.



25. ábra Epesavak elválasztása szilikagél G lemezen

futtatószer: c-hexán-kloroform-fenol-ecetsav-víz

/10:30:30:5:1,5/

futtatás hőmérséklete: 2°C

előhívószér: 8 %-os foszforsavban oldott 3 %

Cu-acetát

1. Kólsav;
2. Kenodeoxikólsav;
3. Deoxikólsav;
4. Epesav keverék;
5. Glikokólsav;
6. Glikokenodeoxikólsav;
7. Glikodeoxikólsav;
8. Glikolitikólsav;
9. Taurokólsav;
10. Taurokenodeoxikólsav;
11. Taurodeoxikólsav;
12. Taurolitokólsav.

A kromatogramot előhívás végett a futtatás után 8 %-os foszforsavban oldott 3 %-os Cu-acetáttal fujtuk le.

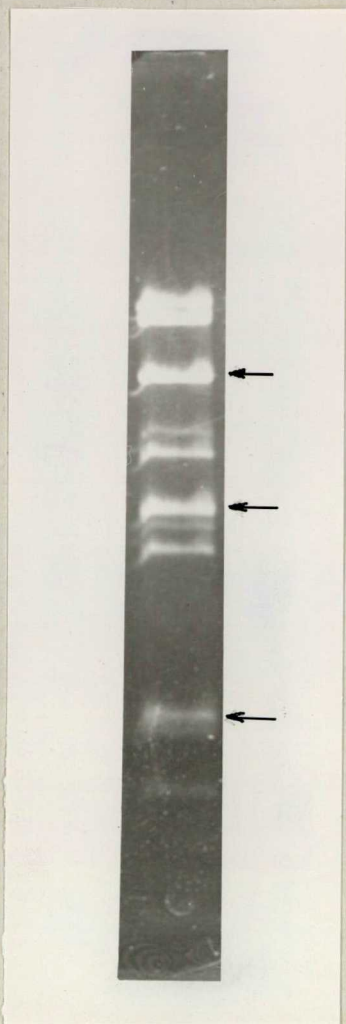
8-10 percig  $150^{\circ}\text{C}$ -on tartva a kromatogramot szárítószekrényben, az epesavak fehér háttérből szürke foltokként jelentek meg.

A videodenzitometriás mennyiségi meghatározásnál minden epesavszármazékból meghatároztuk az optimális koncentrációtartományt. Azt tapasztaltuk, hogy 1-10 µg tartományban jelenlevő epesavakat tudunk reprodukálhatóan mérni. Ennél kisebb mennyiségre a műszer érzéketlen, ezért biológiai minták elemzésekor célszerű előbb feldúsítani a meghatározandó epesavszármazékokat.

#### 4.5. Példák további lehetőségekre

Ebben a fejezetben fel szeretnénk hívni a figyelmet két olyan lehetőségre, amely abból fakad, hogy a videodenzitométer alkalmas diapozitívok, autoradiogramok analízisére is. Mindkét példát a molekuláris biológiai kutatás területéről vettük. A 26. ábrán a 15-3 bakteriofág kromoszóma restrikciós hasítási képe látható [31]. A tiszta DNS preparátumot először II. típusu restrikciós endonukleázzal emésztették, majd agaróz gélelektroforézissel elválasztották az egyes fragmentumokat. A fragmentumok kimutatása azon alapszik, hogy etidium-bromiddal "festik" a DNS-t amely azután 254 nm-hullámhosszúságú UV fényben fluoreszkál. Ennek mértéke arányos a DNS fragmentum hosszával. Mivel a DNS fragmentumok elválasztása is hosszuk /molekulásúlyuk/ alapján történik, gyakran előfordul, hogy a kromoszóma teljesen más területeiről származó,



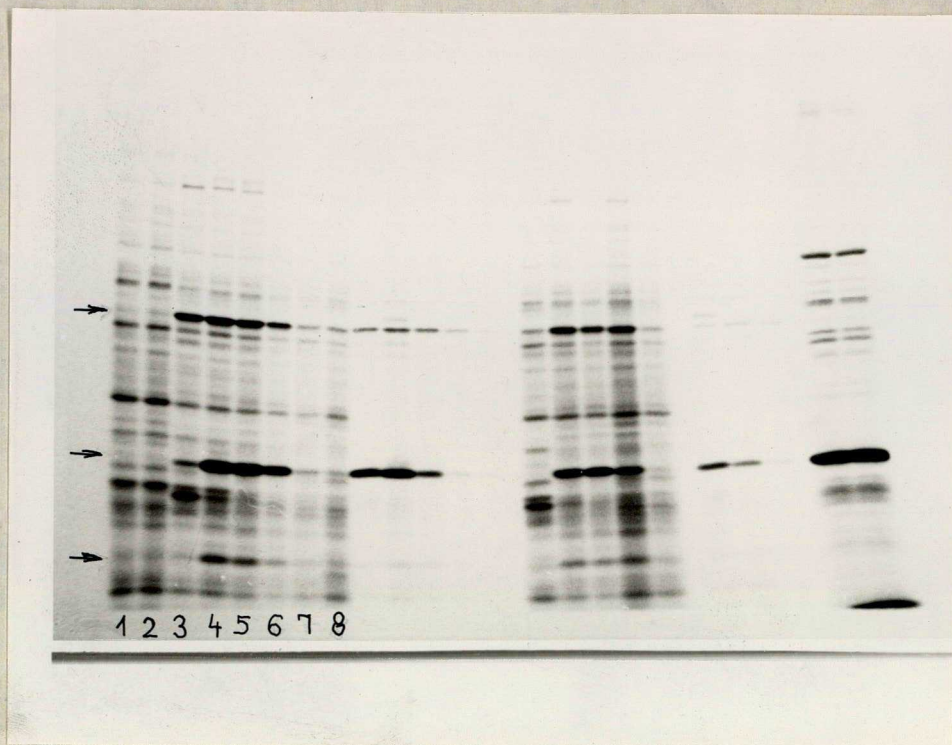


26. ábra A *Rhizobium meliloti* 16-3 fág kromoszóma /DNS $\phi$  fragmentálása Eco RI restrikciós endonukleázzal és az elválasztott fragmentumok agaróz gélelektroforézis képe. A nyállal jelölt sávokban két független fragmentum vándorol együtt.

de azonos méretű fragmentumok egy sávban vándorolnak az elektroforézis során. Azt, hogy egy ilyen sáv két vagy több független fragmentumot tartalmaz, csak a fluoreszkálás intenzitása jelzi. Két független fragmentum esetén a sáv kétszer olyan intenzitású, mint amelyet az elektroforetikus vándorlás távolsága alapján várnánk. A videodenzitométer alkalmas ennek kimutatására, ha az elektroforézisről készült negatív vagy pozitív képet elemezzük. A 26. ábrán a nyilakkal jelölt kettős fragmentumokat megbízhatóan ki lehetett mutatni a műszerrel.

A 27. ábrán egy bakteriofág feji fehérje alegységének szintézisét /ill. a szintézis kinetikáját/ követték. /32/. Részletesebben: a gazdabaktériumot megfertőzték a bakteriofággal, s emellett  $S^{35}$  jelzett metionint adtak a rendszerhez. A későbbiekben a sejteket feltárták és a fehérjéket SDS akrilamid gélelektroforézissel elválasztották.

A gélről autoradiogramot készítettek. A radioaktív aminosav beépült a fehérjékbe, többek között a fág feji fehérjébe is. A kísérletikörülményei között a beépülés arányos a feji fehérje alegység szintézisével. Az ábrán az látható, hogy ez a fehérje csak kb. 50 perccel a fertőzés után kezd szintetizálódni. A szintézis kinetikája ebben az esetben /és a legtöbb fág fehérje esetén/ csakis a beépült izotóp mennyiségének megállapításával lehetséges, mivel a képződött fehérje mérhető enzimaktivitással nem rendelkezik. A videodenzitométerrel az autoradiogramok



27. ábra A *Rhizobium meliloti* 16-3 fág fehérjéinek izotóp / $S^{35}$ metionin/ 10 perces pulzus jelölése. Az első hat oszlopban a fággal fertőzött sejtekhez a 0. 15. 30. 45. 60. és 75. percen vették az izotópot /mielőtt a fágok kiszabadulnának a közegbe/. Nyíllal jelölt sávokban három kései fág fehérje /feji fehérje alegység, farki rost és fark fehérje/ izotóp jelölődése látható.

kiértékelhetők, s így megoldható egy ilyen fehérje szintézisének követése is. A bakteriofág fehérjék szintézisének, kinetikájának ismerete pl. a genetikai szabályozás kutatásában alapvető fontosságu.

Az itt bemutatott két lehetőségre azért szeretnénk felhívni a figyelmet, mert azt példázzák, hogy a videodenzitóméter alkalmazásával rendkívül egyszerűen végezhető el olyan mérések, amelyeket más eszközökkel /pl. radioaktivitás méréssel/ csak nagyon költségesen nehézkesen és megbizhatatlanul lehet megoldani.

## Összefoglalás

Az aminosavak videodenzitometriás mennyiségi analizisének jól reprodukálható eredményei felvetették azt a kérdést, hogy ezt az analizis technikát felhasználjuk más, eddig megoldatlan biokémiai analitikai problémák megoldására. Egy új mérési mód, a horizontális technika segítségével a videodenzitometriás analizist sikerült a következő területekre kiterjeszteni.

Kidolgoztunk egy módszert a növényi pigmentek vékonyréteg-kromatográfiás elválasztására és kvantitatív kiértékelésükre. Ez a módszer a növénynevelésnél, az élelmiszervizsgálatoknál jól használható.

Az élelmiszerbiokémiában jelentős szerepet játszó "ritka" aminosavak közül a hidroxiprolin és hidroxilizin vékonyréteg-kromatográfiás elválasztását és mennyiségi meghatározását oldottuk meg.

A klinikai diagnosztikában felhasználható módszert dolgoztunk ki az epesavak és származékaik vékonyréteg-kromatográfiás elválasztására és mennyiségi meghatározására. Diapozitívok kiértékelésével a videodenzitometria további kiterjesztését javasoljuk két különböző területen; DNS restrikciós hasítása, bakteriofág fehérjék szintézisének mérése.



6. Felhasznált irodalom

1. Jork, H.: Fresenius' Z. Anal. Chem. 236, 310 /1968/
2. Kirchner, J. G.: J. Chrom. 63, 73 /1971/
3. Dévényi, T., Kerényi, Gy., Pataki, T.: Internat. Atomic Energy Agency Bull. Viena, /1975/.
4. Dévényi, T.: Acta Biochim, Biophys. Acad. Sci. Hung. 5, 435 /1970/
5. Ferencsik, S., Bárti, J., Dévényi, T.: Acta Biochim, Biophys. Acad. Sci. Hung 6, 123 /1971/.
6. Dévényi, T., Hazai, S., Ferenczi, B., Bárti, J.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 385 /1971 b/
7. Csorba, I., Buzás, Zs., Polyák, B., Boross, L.: J. Chrom. 172, 287 /1979/.
8. Strain, H. H., Cope, B. T., Svec, W. A.: Methods Enzymol. 23, 452 /1971/
9. Wickliff, J. L., Aronoff, S.: Plant Physiol. 37, 584 /1962/
10. Wilson, J. R., Nutting, M. D.: Anal. Chem. 35, 144 /1963/
11. Holden, M., in T. W. Goodwin /Editor/ Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Academic Press, London 461 /1965/
12. Liaaen, S. J., Jensen, A.: Methods Enzymol. 23 /1971/
13. Sesták, Z.: Photosynthetica 1, 269 /1967/
14. Sherma, J., Lippstone, G. S.: J. Chrom; 41, 220 /1969/
15. Bacon, M. F., Holden, M.: Phytochemistry 6, 19 /1967/
16. Strain, H. H., Svec, W. A., In L. P. Vernon and G. R. Seely /Editors/ The Chlorophylls, Academic Press New York 22 /1966/.

17. French, C.S., in W. Ruhland /Editor/ Encyclopedia of Plant Physiology, Springer Verlag, Berlin 279/1960/
18. Anwar, M.H.: J. Chem. Educ. 40, 29 /1963/
19. Walker, B.L.: J. Chrom. 56, 320 /1971/
20. Hojnacki, J.L., Nicolosi, R.L., Hayes, K.C.: J. Chrom. 128, 133 /1976/
21. Dévényi, T.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. 11, 1/1976/
22. Pongor, S., Penczi, E., Sirokmán, F., Dévényi, T.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 11, 75 /1976/
23. Goodwin, T.W., in K. Paech and M.Y. Tracey /Editors/ Modern Methods of Plant Analysis, Springer Verlag, Berlin 282 /1955/
24. Goodwin, T.W., in K. Paech and M.Y. Tracey /Editors/ Modern Methods of Plant Analysis, Springer Verlag, Berlin 297 /1955/
25. Dévényi, T., Báti, J., Fábrián, F.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 133 /1971 a/
26. Dévényi, T., Báti, J., Kovács, J., Kiss, P.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, 237 /1972/
27. Hrabák, A., Ferenczi, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 383 /1971/
28. Brenner, M., Niederwieser, A.: Experientia 16, 378/1960/
29. Fehér, T., Kazik, H.M.: Magy. Kém. Folyóirat 78, 186/1972/
30. Batta, A.K., Salem, G., Shefer, S.: J. Chrom. 168, 557 /1979/
31. Dallmann, G., Orosz, L., Sain, B.: Molecular and General Genetics 176, 439 /1979/.
32. Erdei, S., Dudás, B., Duda, E., Orosz, L.: J. Virology-nyomdában.
33. Vernin, G.: Vékonyréteg-kromatográfia a szerves kémiában Műszaki Könyvkiadó Budapest 36 /1973/

7. Rövidítések

chl a	klorofill a
chl b	klorofill b
Hyl	hidroxilizin
Hyp	hidroxiprolin
Arg	arginin
His	histidin
Lys	lizin
Phe	fenilalanin
Tyr	tirozin
Ser	szerin
Thr	treonin
S.D.	standard deviáció
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát



Ezuttal szeretném megköszönni Dr. Boross  
László tanszékvezető egyetemi tanárnak,  
kísérleteim elvégzéséhez adott szellemi  
és gyakorlati irányítását, s dolgozatom  
megírásához nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Polyák Bélának  
és a Biokémiai Tanszék Minden Dolgozó-  
jának munkámhoz nyújtott tanácsaikat  
és gyakorlati segítségüket.

