

Stanovení aminokyselin plynovou chromatografií

Ing. HELENA ŠEDOVÁ, Ing. MIROSLAV KAHLER, CSC., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Aminokyseliny jsou důležitou složkou extraktu při výrobě piva, zejména pro kvasný proces, neboť jsou zdrojem dusíkatých látek pro kvasinky. Na jejich koncentraci v mladině je v mnoha případech závislý i obsah sekundárních metabolitů v pivě. Proto znalost kvalitativního a kvantitativního zastoupení aminokyselin umožňuje posoudit např. vliv surogace na průběh kvašení, jakost svařovaných sladů, vhodnost použití různých kmenů kvasinek apod.

Ke stanovení aminokyselin se velmi často používá automatický analyzátor [1, 2], jeho výhody se však mohou uplatnit pouze při sériových analýzách. V opačném případě vyžaduje při delších přestávkách poměrně dlouhou dobu k uvedení do provozu (příprava ninhydrinového roztoku, kalibrace standardní směsi aminokyselin). Jiné chromatografické metody, kromě plynové chromatografie, jsou méně přesné a časově náročné. Plynová chromatografie poskytuje srovnatelnou náhradu za automatický analyzátor, především při zpracování menšího počtu vzorků. Metoda, kterou jsme aplikovali při řešení výzkumných úkolů, vyhovuje nejen požadovanou přesností stanovení, nýbrž i časovou nenáročností.

Aminokyseliny nelze stanovit plynovou chromatografií přímo, protože nejsou dostatečně těkavé, a proto se musí nejdříve převést na vhodné deriváty. V odborné literatuře je popsán velký počet různých způsobů derivatizace aminokyselin [např. 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Nejčastěji používaným postupem je esterifikace karboxylové skupiny (první stupeň derivatizace) a acylace funkční skupiny aminokyselin (druhý stupeň derivatizace). Kromě tohoto postupu se využívá např. silylace alkylesterů, alkylace alkylesterů, kondenzace alkylesterů s karbonylovými sloučeninami, nebo jediné reakce aminoskupiny a karboxylové skupiny s karbonylovými sloučeninami za vzniku heterocyklického derivátu. K poslední jmenované reakci lze zařadit kondenzaci aminokyselin s 1,3-dichlor-1,1,3,3-tetrafluoroacetone, která poskytuje stabilní deriváty s pětičlenným kruhem [9]. Reakci s halogenovaným acetone prvně popsal Simmons a Wiley [10]. Cyklický de-

rivát 2,2-bis-chlordifluoromethyl-4-subst.-1,3-oxazolidin-5-on vzniká téměř u všech aminokyselin s výtěžkem větším než 95 %. U histidinu, argininu a některých dalších aminokyselin se musí ještě heterocyklické deriváty acylovat.

Při sledování možností stanovení aminokyselin plynovou chromatografií jsme přezkoušeli několik derivatizačních postupů, nejlépe se nám osvědčila acylace alkylesterů.

1. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Při svých pokusech jsme vycházeli z derivatizačního postupu podle Mac Kenzieho a Tenaschuka [3, 11, 12]. Esterifikací vznikají isobutylestery a následnou acylací deriváty N-heptafluorobutyrylisobutylestery jednotlivých aminokyselin. Touto původní metodou nebyla zjištěna odezva na tryptofan a v některých případech i na arginin. Z tohoto důvodu se metoda modifikovala, aby derivatizace obou jmenovaných kyselin byla dostatečně účinná.

Před stanovením volných aminokyselin v mladině, v pivě nebo ve víně je nutné nejdříve odstranit ze vzorku balastní látky (např. sacharidy, bílkoviny, polyfenoly, hořké látky), které by rušily derivatizaci a samotné chromatografické dělení.

1.1 Příprava vzorku, čištění a derivatizace

Vzorek mladiny, piva nebo vína se nejdříve přefiltruje přes slabou vrstvu křemeliny a z dokonale čirého filtrátu se odpipetují buď 2 ml mladiny nebo 3 ml piva, popřípadě 5 ml vína do malé kádinky. K tomuto vzorku se přidají 2 ml pufru (5 mg SnCl_2 se rozpustí ve 100 ml 50% kyseliny octové) a 0,3 ml vnitřního standardu (kyselina 6-aminokapronová; navažuje se 20 mg do 50 ml odměrné baňky). Takto upraveným vzorkem se kvantitativně převrství sloupek iontoměniče.

K čištění aminokyselin se použije iontoměnič Dowex 50 WX 8, 100/200 mesh, H^+ -cyklus (Fluka), který se na-

Tab. 1. Relativní molární odezvy butylderivatů aminokyselin jako funkce teploty a času při esterifikaci

Označení aminokyselin	Teplota 100 °C		
	doba esterifikace (min)		
	15	30	60
Ala	0,65	0,63	0,64
Gly	0,52	0,42	0,51
Val	0,86	0,88	0,86
Thr	0,77	0,77	0,77
Ser	0,66	0,64	0,64
Leu	1,00	1,00	1,00
Ile	0,85	0,99	1,02
Pro	0,88	0,88	0,85
OH-Pro	0,92	0,91	0,90
Met	0,65	0,64	0,62
Asp	1,11	1,12	1,09
Phe	1,38	1,39	1,35
Glu	1,20	1,23	1,22
Tyr	1,14	1,20	1,16
Lys	1,04	1,05	1,02
Arg	0,75	0,77	0,76
His	0,76	0,79	0,77
Try	1,17	0,96	0,90
Cys	1,06	1,13	1,11

Tab. 2. Relativní molární odezvy isobutylderivatů aminokyselin jako funkce teploty a času při esterifikaci

Označení aminokyselin	Teplota 100 °C			Teplota 120 °C		
	doba esterifikace (min)			doba esterifikace (min)		
	15	30	60	15	30	60
Ala	0,62	0,64	0,65	0,65	0,66	0,65
Gly	0,53	0,59	0,59	0,60	0,61	0,61
Val	0,77	0,90	0,91	0,90	0,93	0,92
Thr	0,93	0,97	0,97	0,98	0,99	0,97
Ser	0,76	0,88	0,89	0,88	0,89	0,88
Leu	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ile	0,77	1,01	1,07	1,05	1,08	1,08
Pro	0,90	0,90	0,90	0,93	0,94	0,94
Met	0,94	0,89	0,90	0,90	0,90	0,88
Asp	1,12	1,19	1,19	1,81	1,19	1,19
Phe	1,41	1,36	1,36	1,37	1,38	1,38
Glu	1,22	1,23	1,23	1,26	1,26	1,26
Lys	0,87	1,12	1,12	1,13	1,13	1,11
Tyr	1,47	1,40	1,42	1,53	1,42	1,41
Arg	0,95	1,17	1,16	1,19	1,19	1,17
His	0,67	0,94	0,94	0,97	0,97	0,97
Cys	0,75	1,04	1,04	1,08	1,08	1,03

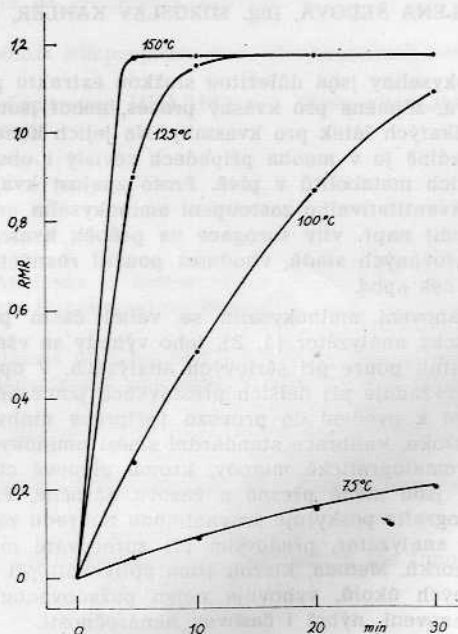
vrství do stonku malé laboratorní nálevky (\varnothing nálevky 4 cm), uzavřené na konci skelnou vatou. Potom se iontoměnič převede do H^+ -cyklu pětinašobným objemem roztoku kyseliny chlorovodíkové [$c(HCl) = 6 \text{ mol/l}$]. Po protěžení roztoku kyseliny chlorovodíkové se sloupek iontoměniče promývá deionizovanou vodou (popřípadě redistilovanou) až do zmizení reakce na Cl^- ionty. Kolonka iontoměniče musí být stále převrstvena deionizovanou vodou [13, 14].

Zachycené aminokyseliny na iontoměniči se nejdříve promyjí 5 ml redistilované vody, potom se vylouží 3 ml roztoku hydroxidu amonného [$c(NH_4OH) = 2 \text{ mol/l}$] a sloupek iontoměniče se promyje 1 ml redistilované vody. Objem eluátu se zaznamená a k derivatizaci se odpipetuje 1 ml.

Vlastní derivatizace, která je rozdělena do dvou stupňů, se provádí v malé zkumavce (objem asi 2,5 ml) se

Tab. 3. Některé chromatografické údaje N-trifluoracetyl-isobutylderivatů aminokyselin

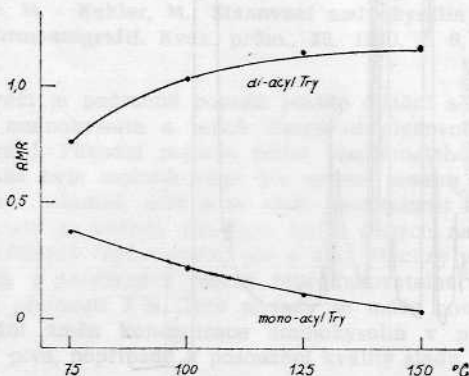
Označení aminokyselin	Specifický eluční objem	Relativní eluční objem	Relativní molární objem
Ala	61,06	0,47	1,04
Gly	63,80	0,49	0,92
Val	70,71	0,55	0,65
Thr	72,51	0,56	0,47
Ser	74,77	0,58	1,49
Leu	81,64	0,63	1,57
Ile	82,38	0,64	0,89
γ -NH ₂ -máselná kyselina	89,71	0,69	0,98
Pro	91,59	0,71	0,94
OH-Pro	96,37	0,74	0,85
Met	101,82	0,79	0,74
Asp	106,14	0,82	1,14
Phe	108,45	0,84	1,42
Orn	109,99	0,85	0,71
Glu	113,15	0,87	1,19
Tyr	114,42	0,88	0,49
Lys	115,30	0,89	0,79
Arg	120,43	0,93	0,52
His	123,35	0,95	1,28
Try	125,76	0,97	0,66
Cys	133,95	1,04	0,48



Obr. 1. Vliv teploty při acylaci a doby působení na RMR N-heptafluorobutyryl-isobutyl-argininu [12]

zábrusovým uzávěrem (NZ 14,5/23). Odpipetovaná část eluátu se nejdříve odpaří ve vakuové rotační odparce při teplotě do 50 °C a výparek se potom azeotropicky vysuší CH_2Cl_2 v proudu dusíku. K vysušenému vzorku se přidá 300 μ l 2-methylpropanolu, ve kterém je rozpouštěn chlorovodík [$c(HCl) = 3 \text{ mol/l}$]. Zkumavka se dobře uzavře zábrusovou zátkou a její spodní část (pouze do výše kapaliny ve zkumavce) se ponoří do glycerolové lázně, která se udržuje na teplotě v rozsahu 117 až 120 °C. Za 5 minut se zkumavka z lázně vyjme, několikrát se s ní poklepe, aby se dokonale rozpustil výparek, a znovu se ponoří do lázně. Celková doba esterifikace trvá přesně 15 minut (včetně promíchá-

ní po 5 minutách]. Po této době se zkumavka ochladí a přebytek kapaliny se odpaří do sucha proudem dusíku (první stupeň derivatizace). Přímou esterifikaci popsali prvně Roach a Gehrke [15].



Obr. 2. Vliv teploty při acylaci na tvorbu mono- a di-heptafluorobutyryl-isobutylyryptofanu [12]

Druhým stupněm derivatizace je acylace isobutyl-esterů aminokyselin. K odparku po esterifikaci se přidá 80 μ l acylačního činidla TFAA [anhydrid kyseliny trifluoroctové], zkumavka se dobře uzavře a vloží se stejným způsobem jako při esterifikaci do glycerolové lázně na 10 minut. Teplota v lázni se udržuje v rozsahu 148 až 151 °C. Při esterifikaci a acylaci je vhodné chladit zátku zkumavky, aby páry pod zátkou kondenzovaly a vracely se zpět do reakční směsi. Chlazení zátky se zajišťí obalením vatou namočenou v methanolu. Po uplynutí uvedené doby se zkumavka ochladí na laboratorní teplotu a přebytek činidla se odpaří proudem dusíku. Výparek se rozpustí v 15 μ l ethylacetátu a část tohoto roztoku [2–3 μ l] se použije k nástřiku do plynového chromatografu. Zároveň se nastříkne 1 μ l anhydridu kyseliny octové.

1.2 Příprava esterifikačního činidla

Esterifikační činidlo se může uchovávat v chladničce pouze jeden týden, potom se musí připravit čerstvé. Do reakční baňky s postranním tubusem, ve které je koncentrovaná kyselina chlorovodíková, se přikapává koncentrovaná kyselina sírová a uvolněný HCl se jímá ve vychlazeném bezvodém 2-methylpropanolu (p. a.). Baňka s 2-methylpropanolem je umístěna v ledové lázni

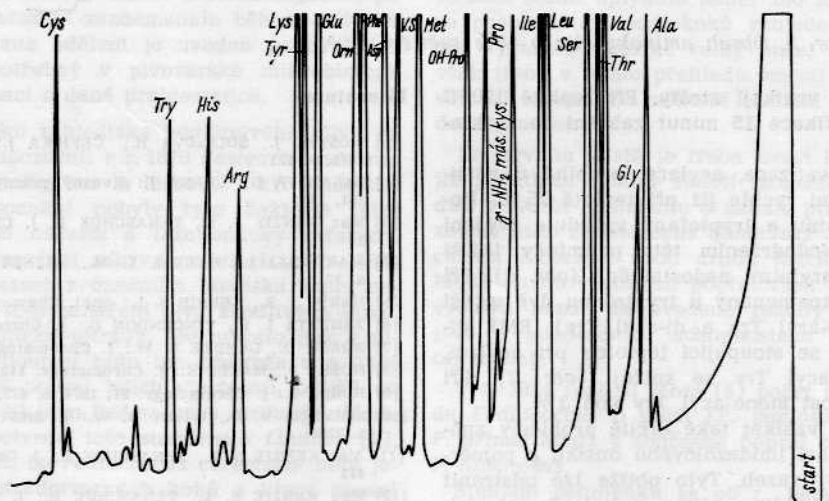
(teplota -5 až -15°C). K získání požadované koncentrace chlorovodíku [$c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$] je nutné odměřit do reakční baňky 15 ml koncentrované HCl a přikapávat 10 ml koncentrované H_2SO_4 . V jímací baňce je 50 ml 2-methylpropanolu.

1.3 Podmínky při chromatografickém dělení

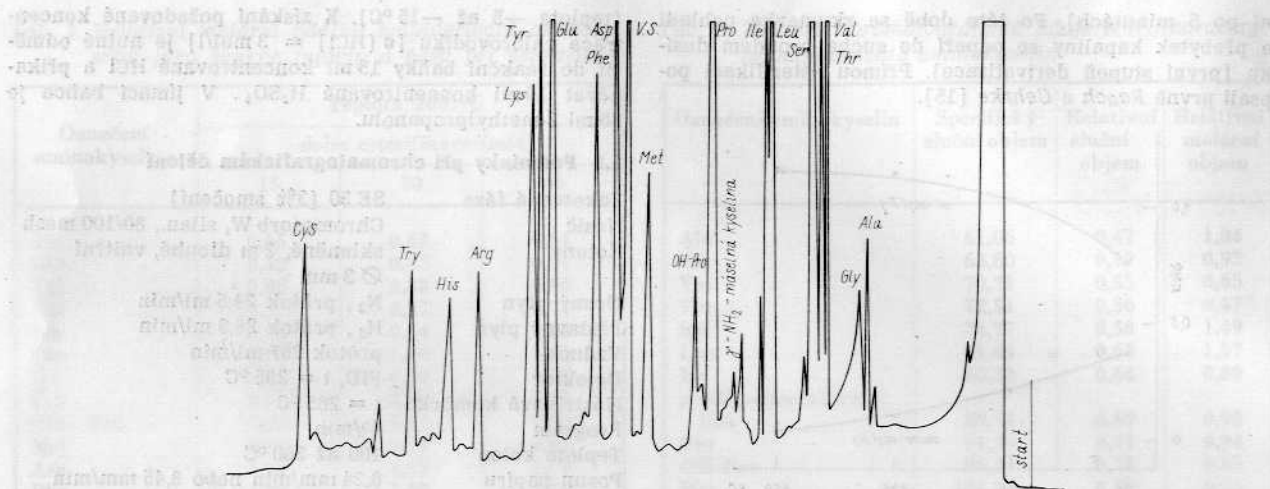
Zakotvená fáze	SE 30 (3% smočení)
Nosič	Chromosorb W, silan., 80/100 mesh
Kolony	skleněné, 2 m dlouhé, vnitřní Ø 3 mm
Nosný plyn	N ₂ , průtok 24,5 ml/min
Přídavný plyn	H ₂ , průtok 26,3 ml/min
Vzduch	průtok 257 ml/min
Detektor	FID, t = 295 °C
Nástřiková komůrka	t = 265 °C
Program	4°/min
Teplota kolon	100 až 260 °C
Posun papíru	6,24 mm/min nebo 8,45 mm/min
Citlivost	10 ² /4
Nástřik	2 až 3 µl
Přístroj	Carlo Erba, Fractovap model GV

2. DISKUSE

K esterifikaci se nejčastěji používá butanol. Pokusy prováděné s methanolem nebyly uspokojující [16], protože vzniklé estery jsou poměrně těkavé a při dalším zpracování vzorku vznikají ztráty. Butylestery jsou výhodnější vzhledem k menší těkavosti. Obtížnější rozpustnost všech aminokyselin v butanolu, kromě prolinu a cysteinu, je způsobena jejich polárním charakterem. V 2-methylpropanolu se aminokyseliny lépe rozpouštějí než v butanolu a také rozdělení těchto alkylesterů při chromatografii je lepší. Aby účinnost esterifikace byla okolo 100 %, musí se pracovat při vyšší teplotě. V *tabulce 1* jsou uvedeny hodnoty RMR [relativní molární odezva] v závislosti doby trvání esterifikace při dané teplotě (butylestery) a v *tab. 2* pro isobutylestery. Z uvedených hodnot je patrný rozdíl mezi esterifikací butanolem a 2-methylpropanolem. U většiny aminokyselin se dosahuje maxima RMR již za 15 minut, u isoleucinu za tuto dobu je však výtežek esterifikace pouze okolo 80 %. Teprve prodloužením doby na 30 minut je esterifikace isoleucinu téměř 100 %. Při delší esterifikaci nastává však částečný rozklad především tryptofanu. Zvýšením teploty na 110 °C zvýší se i účinnost esterifikace u isoleucinu na 91 % a při 120 °C za stejnou dobu (15 min) asi na 98 %. Z *tabulky 2* vyplývá, že je výhod-



Obr. 3. Směs čistých aminokyselin

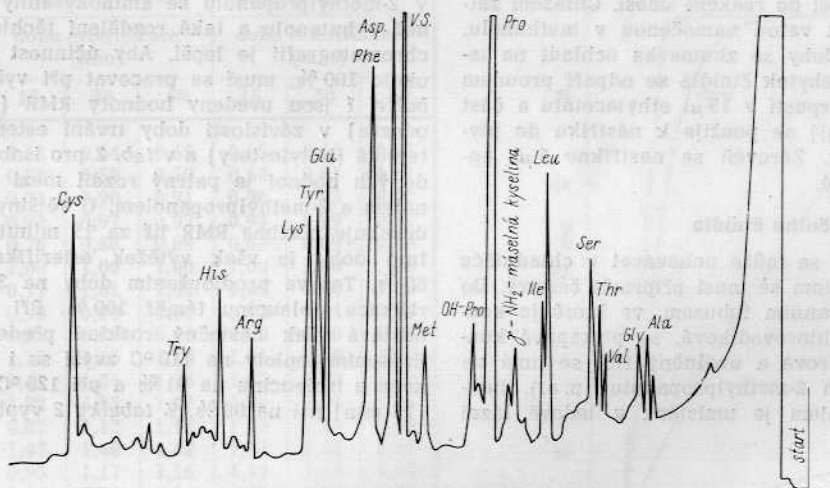


Obr. 4. Obsah aminokyselin v 10% mladíně

nější zvýšit částečně teplotu při esterifikaci, než prodlužovat dobu působení při nižší teplotě.

Důležitým faktorem je také koncentrace HCl v příslušném alkoholu. Při našich pokusech jsme přezkoušeli vliv teploty, doby působení a koncentraci HCl a zjistili jsme, že při nižší koncentraci HCl než $[c \text{ HCl}] = 2 \text{ mol/l}$ nebývá u některých aminokyselin (Val, Ile) esterifikace dokonalá. Naopak při vyšší koncentraci než

Popsanou metodou jsme rozdělili směs 21 aminokyselin (obr. 3) a některé chromatografické údaje jsou uvedeny v tabulce 3 (průměr z pěti záznamů). Vhodnost využití metody pro analýzu pivovarských surovin, mezproduktů a hotových výrobků se ověřila při provozních a výzkumných pokusech. Některé chromatografické záznamy obsahu aminokyselin v mladínách a pivech jsou uvedeny na obrázcích 4 a 5.



Obr. 5. Obsah aminokyselin v 10% světlém pivě

$[c \text{ HCl}] = 5 \text{ mol/l}$ vznikají ztráty. Při teplotě 120°C a době trvání esterifikace 15 minut zabrání se rozkladu tryptofanu.

Druhý stupeň derivatizace, acylace, probíhá u většiny aminokyselin velmi rychle již při teplotě 75°C . Dokonalá acylace argininu a tryptofanu vyžaduje zvýšení teploty na 150°C . Nedodržením této podmínky (nižší teplota) je acylace argininu nedostatečná (obr. 1). Při nižší teplotě jsou zaznamenány u tryptofanu dvě menší eluční křivky (mono-aryl Try a di-acyl Try). RMR di-acyl Try se zvyšují se stoupající teplotou při acylaci, zatímco RMR mono-acyl Try se snižují (obr. 2). Při 150°C klesá přítomnost mono-acyl Try pod 3 %.

U histidinu mohou vznikat také určité problémy způsobené obtížnou acylací imidazolového dusíku a poměrnou nestálostí N-acyl vazeb. Tyto obtíže lze odstranit dodatečnou acylací histidinu přímo v koloně anhydridem kyseliny octové.

Literatura

- [1] MOŠTEK J., ŠOLINOVÁ H., ČEPIČKA J.: Kvasný průmysl 17, 1971, s. 121
- [2] BASAŘOVÁ G., ČERNÁ J.: Kvasný průmysl 18, 1972, s. 55, 78, 101, 145
- [3] Mac KENZIE S. L., TENASCHUK D. J. Chromatogr. 97, 1974, s. 19
- [4] MARINELLI L., HECKEL L. M., WITNEY D.: Proc. ASBC 1967, s. 37
- [5] HARDY J. R., KERRIN S. L.: Anal. Chem. 44, 1972, s. 1497
- [6] ZANETTA J. P., VINCENDON G.: J. Chromatogr. 76, 1973, s. 91
- [7] ROACH D., GEHRKE C. W.: J. Chromatogr. 43, 1969, s. 303, 311
- [8] HUŠEK P., MACEK K.: J. Chromatogr. 113, 1975, s. 139
- [9] HUŠEK P.: J. Chromatogr. 91, 1974, s. 475, 483
- [10] SIMMONS H. D., WILEY D. W.: J. Amer. Chem. Soc. 82, 1960, s. 2288
- [11] Mac KENZIE S. L., TENASCHUK D.: J. Chromatogr. 111, 1975, s. 413
- [12] Mac KENZIE S. L., TENASCHUK D.: J. Chromatogr. 171, 1979, s. 195, 173, 1979, s. 53
- [13] ADAMS R. F.: J. Chromatogr. 95, 1974, s. 189

- [14] ADAMS R. F., VANDEMARK F. L., SCHMIDT G. J.: J. Chromatogr. Science **15**, 1977, s. 63
[15] ROACH D., GEHRKE C. W.: J. Chromatogr. **44**, 1969, s. 269
[16] ISLAM A., DARBRE A.: J. Chromatogr. **43**, 1969, s. 11

Šedová, H. - Kahler, M.: Stanovení aminokyselin plynovou chromatografií. Kvas. prům., **26**, 1980, č. 9, s. 193 až 197.

V práci je podrobně popsán postup čištění a derivatizace aminokyselin a jejich stanovení plynovou chromatografií. Původní metoda podle Mac Kenzieho a Tenaschuka byla modifikována pro určení obsahu aminokyselin v mladíně, pivě a ve víně. Použitelnost upravené metody se ověřila analýzou směsi čistých aminokyselin, různých typů mladín, piv a vín. Všechny analýzy poskytly u paralelních vzorků reprodukovatelné výsledky při přesnosti 3 %. Této metody se může použít při sledování změn koncentrace aminokyselin v průběhu výroby piva, popřípadě k posouzení kvality sladu.

Шедова, Х. — Каглер, М.: Применение газовой хроматографии для определения аминокислот. Квас. прум. **26**, 1980. № 9. стр. 193—197.

В статье подробно описан метод очистки и дериватизации аминокислот и их определение с помощью хроматографии. Метод, предложенный Мак Кэнзи и Тенасчуко был модифицирован и дает возможность определения содержания аминокислот в сусле, пиве и вине. Применимость метода и достоверность получаемых результатов проверялась путем анализа смеси чистых аминокислот, разных сортов сусла, пива и вина. Анализы показали воспроизводимость результатов с отклонениями не превышающими 3 %. Метод может быть использован для наблюдения за изменениями концентрации аминокислот в ходе процессов пивоварения, а также для оценки качества солода.

Šedová, H. - Kahler, M.: Application of Gas Chromatography to Analyses of Amino Acids. Kvas. prům., **26**, 1980, No. 9, pp. 193—197.

The article deals in detail with the sequence of operations required for cleaning and derivatisation of amino acids and their estimation by applying gas chromatography methods. The Mac Kenzie-Tenaschuka method has been modified and permits now to determine the amount of amino acids in wort, beer and wine. The applicability and reliability of the method have been verified through a series of analyses covering mixtures of pure amino acids, various sorts of wort, beer and wine. All analyses give reproducible results with deviations not exceeding 3 %. The method can be used to study changing concentrations of amino acids in the course of brewing processes or to evaluate the quality of malt.

Šedová, H. - Kahler, M.: Bestimmung der Aminosäuren mittels Gaschromatographie. Kvas. prům., **26**, 1980, No. 9, S. 193—197.

In der Arbeit wird ausführlich das Verfahren zur Reinigung und Derivatisation der Aminosäuren und ihrer chromatographischen Bestimmung beschrieben. Die ursprüngliche Methode nach Mac Kenzie und Tenaschuko wurde für die Bestimmung der Aminosäuren in Würze, Bier und Wein modifiziert. Die Anwendbarkeit der modifizierten Methode wurde durch Analysen der Gemische reiner Aminosäuren, verschiedener Typen von Würze, Bier und Wein überprüft. Alle Analysen lieferten bei parallelen Proben reproduzierbare Ergebnisse mit einer Genauigkeit von 3 %. Die beschriebene Methode kann bei der Verfolgung der Änderungen der Aminosäurenkonzentration im Verlauf der Biererzeugung, bzw. zu der Beurteilung der Malzqualität angewenden werden.