

Bílkoviny a aminokyseliny

Proč v potravinách analyzujeme bílkoviny ?

- Posouzení nutriční hodnoty
 - celkový obsah bílkovin
 - aminokyselinové složení, volné aminokyseliny
 - obsah cizorodých a neplnohodnotných bílkovin
 - trávitelnost bílkovin
- Kontrola dodržení receptury
 - celkový obsah bílkovin
 - přítomnost cizorodých bílkovin
- Určování původu suroviny, autenticita
 - aminokyselinové složení
 - stanovení frakcí bílkovin

Ukazatele obsahu bílkovin

- Hrubý obsah bílkovin
- Čistý obsah bílkovin
- Obsah trávitelných bílkovin

Stanovení bílkovin – metody založené na stanovení dusíku

- ve vzorku se stanoví dusík
- obsah dusíku se násobí pře počítávacím faktorem (obvykle 6,25) součin je hrubý obsah bílkovin

(obsah dusíku ve většině bílkovin je cca 16 %; $100/16 = 6,25$)

Potravina	Faktor	Potravina	Faktor
Pšenice		Ořechy	
celozrnná mouka	5,83	para ořechy, arašídý	5,41
ostatní mouky, těstoviny	5,70	mandle	5,18
otruby	6,31	ostatní ořechy	5,30
Rýže	5,95	Mléko, mléčné výrobky	6,38
Ječmen, oves, žito	5,83	Kolagen, želatina	5,55
Sója	5,71	Ostatní potraviny	6,25

Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny podle KJELDAHLA

Význam: univerzální, mezinárodně akceptovaná metoda

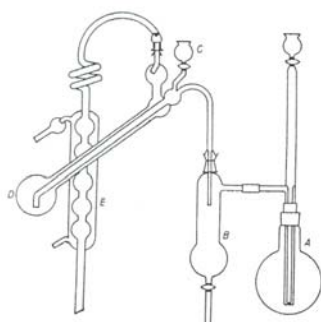
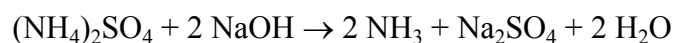
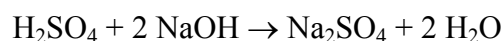
Podstata: mineralizace vzorku kys. sírovou → konverze org. sloučenin dusíku na $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, alkalizace a oddělení NH_3 destilací, titrační stanovení amoniaku

Provedení:

- záhřev vzorku s konc. H_2SO_4 a katalyzátorem (Se, Se+ K_2SO_4 , HgO, bezvodý CuSO_4 , $\text{K}_2\text{SO}_4+\text{CuSO}_4$, $\text{TiO}_2+\text{CuSO}_4$) v KJELDAHLOVĚ baňce nebo silnostěnné zkumavce
- max. teplota 340-390 °C (t.v. H_2SO_4 je 338°C)
- doba běžně 20-60 min, úplný rozklad Lys, Trp, Tyr nastává až po dalších 30-40 min po vyčiření,
(dusík obsažený v derivátech pyridinu, chinolinu, triazolu,... nelze stanovit, dusičnany, dusitany, nitro- a nitrososloučeniny až po redukci)

KJELDAHLOVA metoda

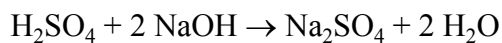
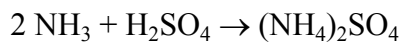
- zalkalizování mineralizátu, uvolnění amoniaku a jeho oddělení destilací s vodní parou:



Destilační aparatura
dle PARNASE a WAGNERA

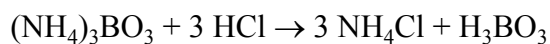
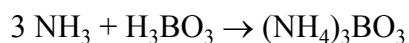
KJELDAHLOVA metoda

- titrační stanovení amoniaku
 - a) amoniak se při destilaci jímá do předlohy s odměrným roztokem H_2SO_4 , nadbytek kyseliny se stanoví titrací hydroxidem:



Tashirův indikátor (methylčerveně + methylenová modř)

- b) amoniak se při destilaci jímá do předlohy s roztokem kyseliny borité, vzniklý boritan amonný se titruje kyselinou (WINKLER):



Tashirův indikátor

KJELDAHLOVA metoda

Výpočet obsahu dusíku a bílkoviny:

ad a)

$$n_{\text{NH}_3} = 2 \cdot (c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - 0,5 \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}) \quad \text{mmol}$$

$$m_{\text{N}} = 14 \cdot n_{\text{NH}_3} \quad \text{mg}$$

$$m_{\text{bílkovina}} = 6,25 \cdot m_{\text{N}} \quad \text{mg}$$

ad b)

$$n_{\text{NH}_3} = n_{\text{HCl}} = c_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} \quad \text{mmol}$$

Jiné metody stanovení dusíku

- CONWAYOVA metoda: mikrometoda, shodný princip s KJELDAHLOVOU metodou, absorpce NH_3 v CONWAYOVĚ nádobce v roztoku H_3BO_3
- HANUŠOVA metoda: po mineralizaci se roztok zneutralizuje hydroxidem na fenolftalein, amonné ionty se převedou reakcí s formaldehydem na hexamethylentetramin, uvolněná kyselina v odbarveném roztoku se ztitruje hydroxidem:
$$4 \text{NH}_4^+ + 6 \text{CH}_2=\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 + 6 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+$$
- NESSLEROVA metoda: po mineralizaci se stanoví amonné ionty spektrofotometricky ($\lambda=450 \text{ nm}$) po reakci s NESSLEROVÝM činidlem ($\text{K}_2\text{HgI}_4 + \text{NaOH}$) \rightarrow žlutohnědý produkt $[\text{Hg}_2\text{I}_3\text{NH}_2]_n$
kalibrační standard: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, rozsah 20-60 $\mu\text{g N}$
- DUMASOVA metoda: pyrolýza vzorku záhřevem s $\text{CuO} \rightarrow$
 \rightarrow konverze org. slouč. N na elementární dusík, určení objemu N_2

Stanovení čistého obsahu bílkovin

ze suspenze rozmělněného vzorku se bílkoviny srážejí taninem (v prostředí zředěné H_2SO_4) nebo vysráženým hydroxidem měďnatým (po přidavku $CuSO_4$ do prostředí zředěného NaOH), po filtraci se ve sraženině stanoví dusík podle KJELDAHLA a přepočítá se na bílkovinu

Stanovení travitelných bílkovin

vzorek se inkubuje s příslušným enzymem (pepsin – kyselé prostředí, trypsin – alkalické prostředí) při $37^\circ C$ (24-48 hod); v nerozpustném zbytku se stanoví bílkoviny podle KJELDAHLA, výsledek se odečte od celkového obsahu a získá se obsah travitelných bílkovin

Spektrometrické metody stanovení bílkovin

- UV a VIS spektrofotometrie – stanovení v roztocích
- NIR (*near infrared*) spektrometrie – měření v původním vzorku

Stanovení bílkovin ultrafialovou spektrofotometrií

- a) využití absorpce vyvolané přítomností aromatických AK (Phe, Tyr, Trp), $\lambda = 280 \text{ nm}$
- vliv interferentů (nukleové kyseliny...) se koriguje měřením při 260 nm (nutný alespoň 5 násobný přebytek bílkovin vůči nukleovým kyselinám)
přibližný výpočet:
$$c_{\text{bílk}} = (1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}) / b \quad [\text{mg/ml}]$$
 - absorbance závisí na aminokyselinovém složení bílkoviny a hodnotě pH roztoku

UV spektrofotometrie bílkovin

Absorptivity některých bílkovin při 280 nm

Bílkovina (původ)	M_r	ϵ_{280} ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	a_{280} ($\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
myosin (sval prasete)	470 000	$32,2 \cdot 10^4$	0,685
β -laktoglobulin (kravské mléko)	18 000	$(1,6-1,9) \cdot 10^4$	0,90-1,04 (pH 2,6)
laktoferrin (kravské mléko)	86 000	$10,9 \cdot 10^4$	1,27
ovomukoid (vaječný bílek)	76 000	$3,9 \cdot 10^4$	0,51
lysozym (vaječný bílek)	14 300	$3,8 \cdot 10^4$	2,64

UV spektrofotometrie bílkovin

b) využití absorpce peptidových vazeb v intervalu 205-235 nm

- měření při 215 a 225 nm:

$$c_{\text{bilk}} = 144 (A_{215} - A_{225}) / b \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (\text{platí v prostředí pH 4-8})$$

- velmi vysoká citlivost (možno stanovit až jednotky ng/ml)
- interferují acetáty, sukcináty, citráty, ftaláty, barbituráty
stanovení neruší fosfáty, boráty, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tris

c) měření absorpce peptidových vazeb při 235 s korekcí na obsah aromatických aminokyselin při 280 nm:

$$c_{\text{bilk}} = 0,3984 (A_{235} - A_{280}) / b \text{ [mg/ml]} \quad (\text{platí ve fosfátovém pufru, pH=6,8})$$

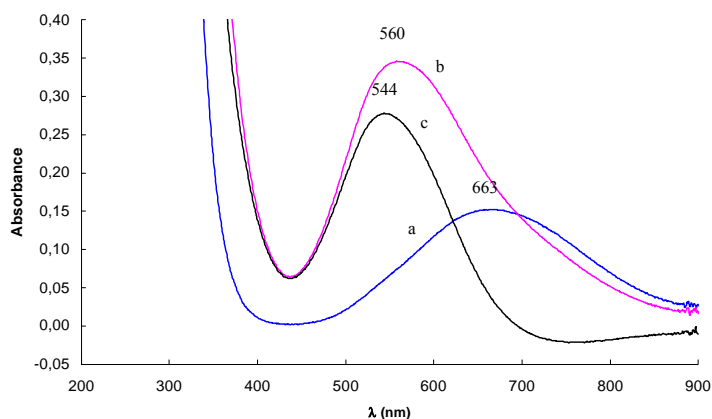
Koeficient 0,3984 je převrácená hodnota rozdílu průměrných hodnot absorptivit různých bílkovin při 235 a 280 nm

- Výhody metody:
- nukleové kyseliny neruší (mají stejné A při 235 a 280 nm)
 - bezkalibrační měření
 - výsledek jen málo závisí na AK složení (chyba do 20 %)

Stanovení bílkovin s biuretovým činidlem

- bílkoviny tvoří s biuretovým činidlem (CuSO_4 + vinan sodno-draselný + NaOH) fialově zbarvené měďnaté komplexy měření při 540-560 nm nebo 310 nm
- reakce probíhá 30-40 min
- stanovení není specifické (reagují i peptidy, ruší NH_3 a Tris)
- výsledky nezávisí na aminokyselinovém složení
- citlivost je při měření ve viditelné oblasti relativně malá (pracovní rozsah cca 0,1- 10 mg bílkoviny)

Stanovení bílkovin s biuretovým činidlem – absorpční spektra



- a 4 ml činidla + 1 ml vody
- b 4 ml činidla + 1 ml vzorku (vaječný albumin 5 mg/ml)
- c rozdílová křivka

LOWRYHO metoda stanovení bílkovin

- FOLIN-CIOCALTEOVO činidlo (směs kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové) poskytuje za přítomnosti Cu^{2+} v alkalickém prostředí (pH 10-10,5) s bílkovinami modře zbarvený produkt ($\lambda_{\text{max}} = 745-750 \text{ nm}$)
- činidlo reaguje se zbytky aromatických aminokyselin (odezvu dává i samotný Tyr)
- výsledky jsou závislé na aminokyselinovém složení
- vysoká citlivost (pracovní rozsah 10-200 μg bílkoviny)

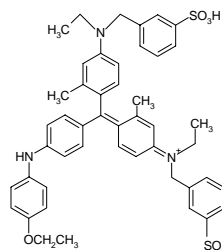
Stanovení bílkovin po reakci s organickými barvivy

Principy:

- a) bílkovina se váže na rozpustné barvivo a vzniká nerozpustný produkt \rightarrow roztok se odbarvuje, tj. klesá absorbance (amidočern, oranž G)
- b) vazbou bílkoviny na rozpustné barvivo se mění absorpční spektrum (Coomassie)

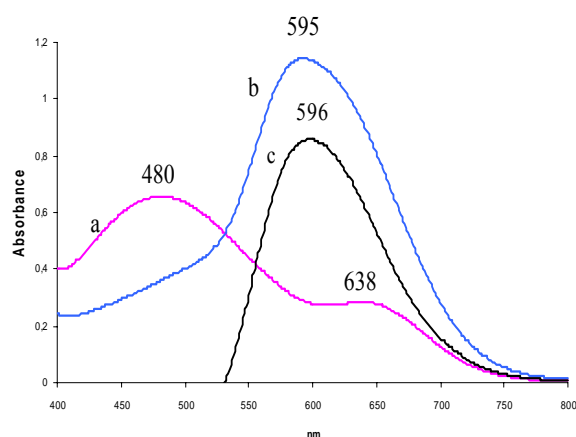
BRADFORDOVA metoda

využívá reakce s bílkovin
s trifenylmethanovým barvivem
Coomassie brilliant blue G 250



- reakce probíhá v kyselém prostředí
- v důsledku reakce barviva s bílkovinou dochází k posunu absorpčního maxima k delší vlnové délce (480 nm → 595 nm) → modré zbarvení
- A_{595} měřená proti slepému pokusu je úměrná koncentraci bílkoviny
- výsledky prakticky nezávisí na aminokyselinovém složení
- stanovení je citlivé a rychlé (doba reakce cca 2 min)
- povrchově aktivní látky ruší stanovení
- použití barviva také k detekci bílkovin v gelové elektroforese

BRADFORDOVA metoda – absorpční spektra



- a – činidlo
- b – činidlo + bílkovina
- c – rozdílová křivka

Stanovení aminokyselinového složení bílkovin

Důvody pro stanovení aminokyselinového složení:

- zjištění nutriční hodnoty potraviny, suroviny (esenciální vs. relativně postradatelné AK)
- marker druhu suroviny
- charakterizace bílkovinné frakce nebo konkrétní bílkoviny (první krok před určováním struktury bílkoviny)

Postup při stanovení aminokyselinového složení:

1. izolace bílkovin (přítomnost lipidů a sacharidů komplikuje další kroky)
2. hydrolýza bílkovin
3. stanovení jednotlivých AK v hydrolyzátu

Hydrolýza bílkovin

zajistí rozštěpení makromolekul bílkovin (a peptidů) na stavební jednotky – aminokyseliny.

Možnosti provedení: kyselá, alkalická nebo enzymová hydrolýza

Kyselá hydrolýza bílkovin

- nejčastěji hydrolýza 6M HCl při 110 °C, 16-72 h (nebo mikrovlnný ohřev 145-155 °C, 4 h)
- při hydrolýze dochází ke změnám některých AK:
 - destrukce Trp (zčásti Ser, Thr)
 - částečná oxidace siřných AK
 - hydrolýza amidových vazeb Gln a Asn → Glu resp. Asp
- předběžná oxidace vzorku kys. permravenčí zajistí konverzi siřných AK na jednotné ox. produkty:
 - Cys (-SH) → kyselina cysteová (-SO₃H)
 - Met → methioninsulfon

Alkalická hydrolýza bílkovin

- 4,2 M NaOH nebo 2M Ba(OH)₂ nebo 4M LiOH při 110 °C, 22 h (nebo mikrovlnný ohřev 1h)
- zpravidla se používá jen pro stanovení Trp (chybu minimalizuje použití 5-methyltryptofanu jako interního standardu)

Analýza aminokyselin

- Aminokyseliny**
- volné
 - vázané v bílkovinách a peptidech

Důvody pro analýzu aminokyselin:

- nutriční hodnota, AK složení bílkoviny
- kontrola receptury výrobku
- Phe vs. potraviny pro fenylketonuriky
- potraviny fortifikované esenciálními AK
- Glu jako ochucující přísada
- určování druhu suroviny

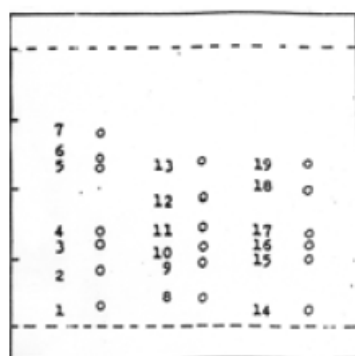
Planární chromatografie aminokyselin

- zejména TLC, HPTLC (PC se používá málo)
- TLC, PC – kvalitativní, popř. semikvantitativní analýza
- porovnání skvrn na chromatogramu vzorku se skvrnami standardních látek
- spektrofotometrické měření po eluci látky ze skvrny
- HPTLC – kvantitativní analýza
- denzitometrické měření

Příklady podmínek pro TLC aminokyselin

- silikagel, mobilní fáze: butanol-kys. octová-voda (4:1:1)
- dvourozměrná chromatografie na Si-gelu
 1. směr: CHCl_3 -MeOH-17% NH_3 2:2:1 (V/V)
 2. směr: fenol-voda 3:1 (m/m)

Příklad TLC aminokyselin



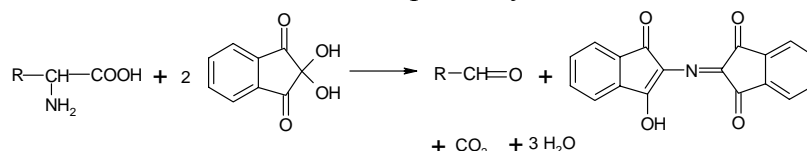
detekce: ninhydrin
stac. fáze: silikagel
mobil. fáze: 1-butanol - octová
kyselina - voda (4:1:1)

1 = histidin,
2 = cystin,
3 = serin,
4 = alanin,
5 = isoleucin,
6 = fenylalanin,
7 = tryptofan,
8 = arginin,
9 = prolin,

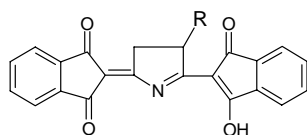
10 = asparagová kys.,
11 = glutamová kys.,
12 = valin,
13 = leucin,
14 = lysin,
15 = hydroxyprolin,
16 = glycin,
17 = threonin,
18 = methionin,
19 = tyrosin

Detekce aminokyselin v planární chromatografii

Reakce s **ninhydrinem** (postříkání chromatogramu acetonovým roztokem, odpaření, záhřev): většina AK poskytuje červenofialové až modrofialové produkty:



prolin a hydroxyprolin poskytují žlutě zbarvený produkt:



Detekce ninhydrinem je **neselektivní**: reagují peptidy, bílkoviny, aminy, amoniak

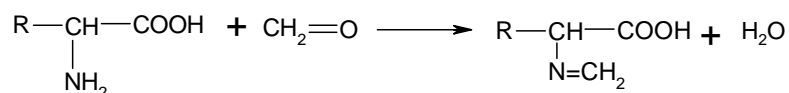
Další činidla pro detekci (resp. derivatizaci) aminokyselin

- trinitrobenzensulfonová kyselina (→ žluté produkty)
- 2,4-dinitrofluorbenzen (→ žlutě zbarvené deriváty, dělení TLC)
- *p*-toluensulfonová kyselina (→ tosylderiváty)
- dansylchlorid (→ fluoreskující dansylderiváty)

Stanovení celkového obsahu aminokyselin

Formolová titrace aminokyselin

po reakci AK s formaldehydem (aduje se na aminoskupinu)



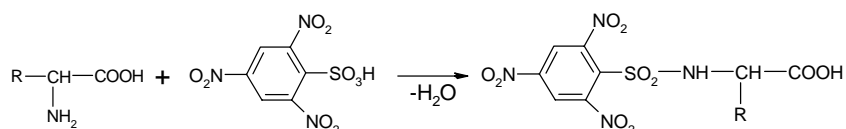
se uplatní kyselý charakter karboxylu a kyseliny lze titrovat odměrným roztokem hydroxidu na fenolftalein.

Vyjádření výsledku: – procentní obsah dusíku aminoskupin
– látkový obsah aminokyselin (mmol/kg)
– formolové číslo (u nápojů): spotřeba 0,1M NaOH při titraci 100 ml vzorku

Stanovení celkového obsahu aminokyselin

Spektrofotometrické metody

- po reakci s ninhydrinem:
červenofialové zbarvení ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$)
Pro a Hyp – žluté zbarvení ($\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$)
- po reakci s trinitrobenzensulfonovou kyselinou:
v alkalickém prostředí vznikají žluté produkty,
měření v UV oblasti ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$)



Stanovení aminokyselin vysokoučinnou kapalinovou chromatografií

Nejčastější varianty:

- iontoměničová chromatografie (IEC): dělení ve formě aminokyselin, pokolonová derivatizace
- chromatografie na obrácené fázi (RP-HPLC): zpravidla dělení derivátů aminokyselin – předkolonová derivatizace

Detekce aminokyselin v HPLC

Aminokyseliny samy o sobě neabsorbují v UV nad 240 nm (výjimky: Phe, Tyr, Trp) ani nefluoreskují (výjimka Trp). Proto se před detekcí *derivatizují* (tj. chemicky konvertují na deriváty absorbující, fluoreskující nebo deriváty elektrochemicky aktivní).

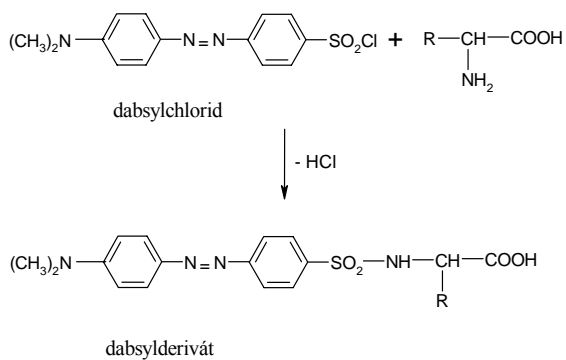
Derivatizace může být

- pokolonová – separované AK vystupují z kolony a reagují s tokem derivatizačního činidla (ninhydrin)
- předkolonová – deriváty se vytvoří reakcí AK s činidlem před nástřikem do chromatografické kolony

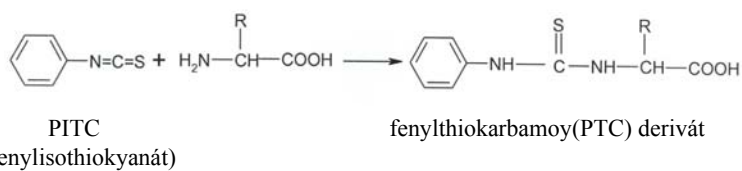
Příklady detekce AK s použitím derivatizace

Detekce	Činidlo	Pozn.
UV/VIS	ninhydrin dabsylchlorid PITC	pokolonová deriv. 570 a 440 nm předkolonová deriv. 425 a 436 nm předkolonová deriv. 254-280 nm
fluorimetrická	OPA dansylchlorid AQC FMOC	ex. 330 nm, em. 455 nm předkolonová deriv., ex. 340, em. 510 nm předkolonová deriv., ex. 245, em. 395 nm předkolonová deriv. ex. 263, em. 313 nm
elektrochemická	OPA	0,4-0,7 V

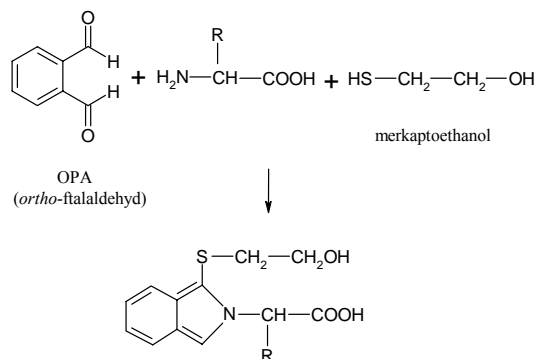
Chemické reakce probíhající při derivatizaci aminokyselin v LC



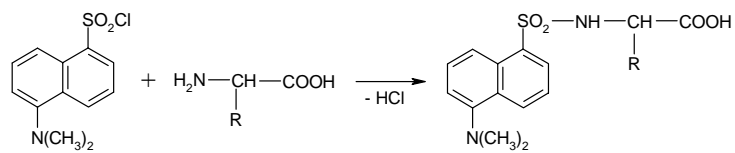
Pozn.: dabsylchlorid reaguje i se sek. aminokyselinami (Pro) a aminy



Pozn.: PITC se používá také při Edmanově odbourání peptidů – vznikají fenylthiohydantoiny

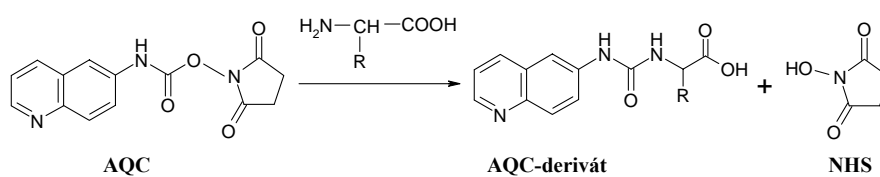


Pozn.: OPA lze použít i k detekci sek. aminokyselin (Pro) po oxidaci chlornanem (konverze na primární amin)



dansylchlorid

dansylderivát

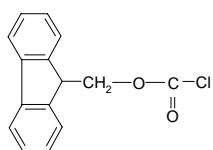


AQC

AQC-derivát

NHS

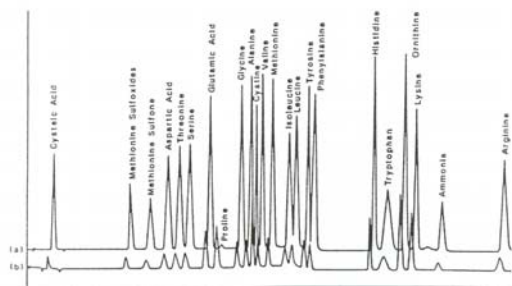
Další činidlo – FMOC (FMOC-Cl)



Stanovení aminokyselin iontoměničovou chromatografií

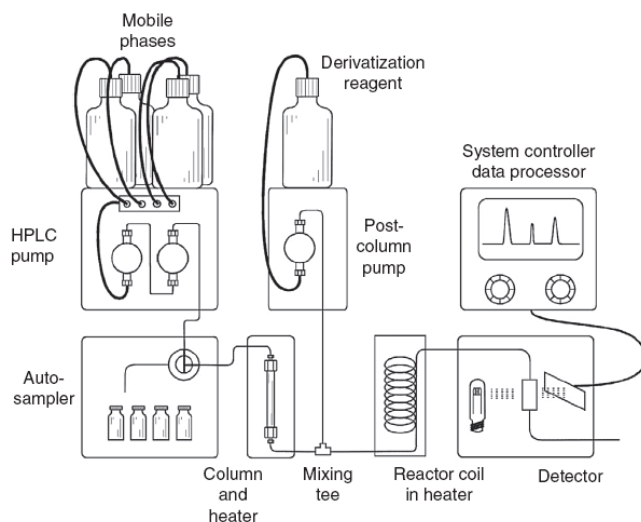
Klasický přístup (automatické analyzátoři aminokyselin)

- dělení AK na silně kyselém katexu
- eluce řadou pufrů o rostoucí hodnotě pH (3,3-10,5) v několika krocích, nezbytný je i postupný růst iontové síly
- pokolonová derivatizace ninhydrinem (reakční cívka 130-135°C)
- detekce měřením absorbance při 570 a 440 nm



HPLC směsi aminokyselin
pokolonová derivatizace
ninhydrinem
horní křivka: A₅₇₀
spodní křivka: A₄₄₀
nástřík jednotlivých AK: 10 nmol

Chromatografická aparatura pro pokolonovou derivatizaci

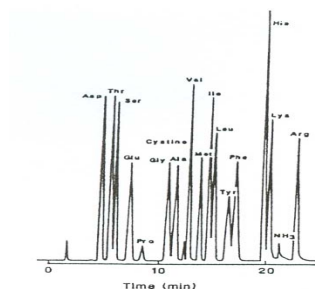


Intoměničová chromatografie aminokyselin

Alternativy provedení:

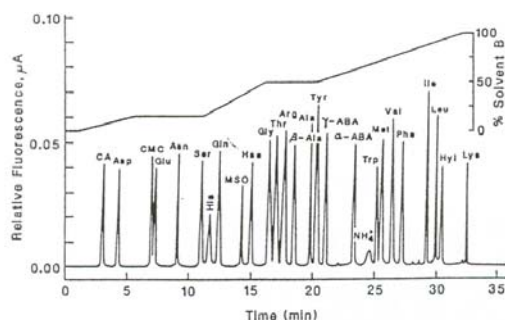
- gradientová eluce
- použití jiných činidel pro pokolonovou derivatizaci (*o*-ftalaldehyd, fluorimetrická detekce → vysoká citlivost)
- vnitřní standard: např. norleucin nebo γ -aminomáselná kys.

Rychlá IEC analýza 16 aminokyselin;
pokolonová derivatizace
o-ftalaldehydem a merkptoethanolem;
fluorescenční detekce:
excitace 360 nm, emise 418-700 nm;
nástřik jednotlivých AK: 2,5 nmol

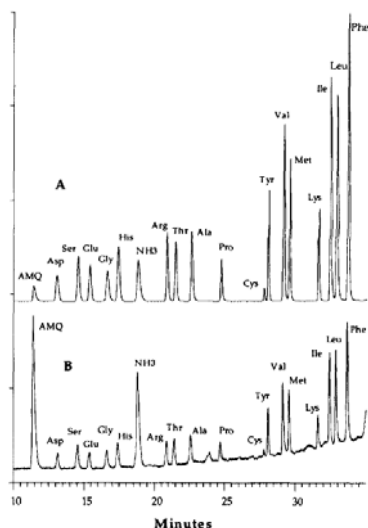


Stanovení aminokyselin chromatografií na obrácené fázi

- předkolonová derivatizace (dabsylchlorid, dansylchlorid, OPA, AQC, FMOC...)
- gradientová eluce derivátů aminokyselin
- detekce UV/VIS, fluorimetrie



RP-HPLC směsi derivátů
aminokyselin s OPA a ME
kolona C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm,
předkolona C18, 40 μ m, 80 \times 4,6 mm
mobilní fáze A: THF+ MeOH+
0,05M NaOAc (pH 5,9) 1+19+80
mobilní fáze B: MeOH + 0,05M
NaOAc (pH 5,9) 80+20
průtok 1,7 ml/min
fluorescenční detekce
nástřik 5 pmol (aminokyseliny),
NH₃ (20 pmol)



Chromatogram standardní směsi

AQC-derivátů aminokyselin

A – nástřik 50 pmol

B – nástřik 1 pmol

kolona: C18 3,9 × 150 mm (4 μm)

mob. fáze A: 140 mM NaOAc + 17 mM TEA + H₃PO₄ (pH 5,05)

mob. fáze B: CH₃CN – voda (60:40)

průtok 1 ml/min

gradient:

start: 100 % A, 0,5: min 2 % B,

15 min: 7 % B, 19 min: 13 % B,

33 min: 32 % B, 33-38 min: 100 % B,

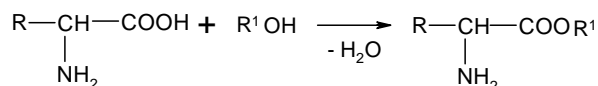
38-48 min: 100 % A

Stanovení aminokyselin plynovou chromatografií

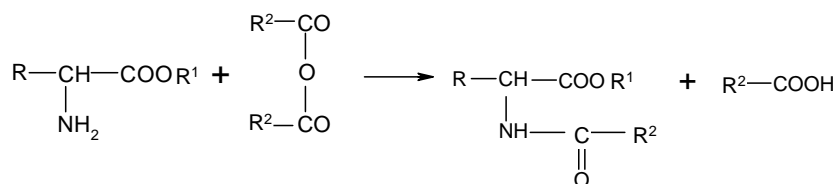
pro dosažení potřebné těkavosti je nutná derivatizace

Obvyklý způsob – dvoustupňová derivatizace

- 1) esterifikace aminokyseliny alkoholem (MeOH, PrOH, iPrOH, BuOH, iBuOH, iAmOH) v prostředí 3M HCl

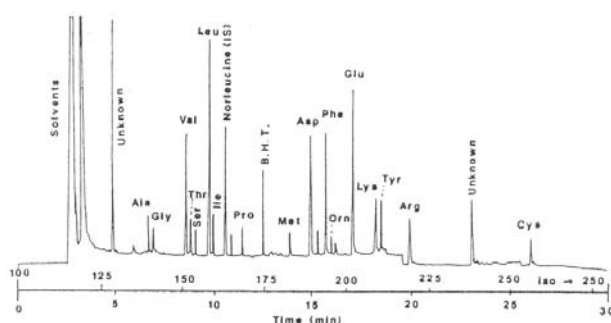


- 2) acylace aminoskupiny esteru anhydridem kyseliny (octové, trifluoroctové, pentafluorpropanové, heptafluorbutanové)



Příklad plynové chromatografie aminokyselin

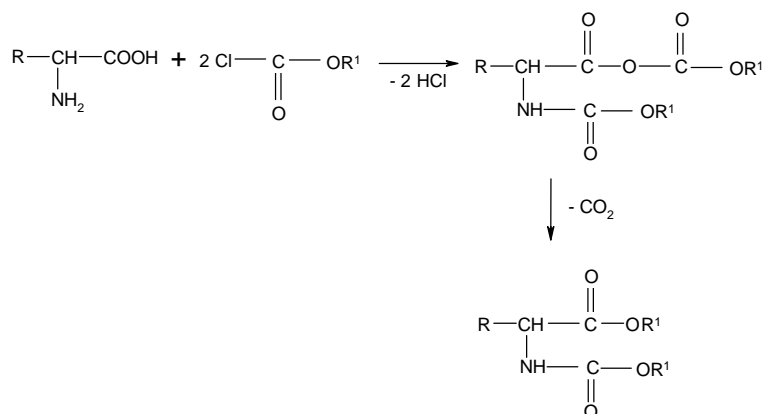
Příprava derivátů: – esterifikace butanolem
– acylace anhydridem heptafluorbutanové kys.



Podmínky GC:
kapilární kolona WCOT
50 m × 0,22 mm
stacionární fáze SE 30
teplota kolony 100-250°C

Alternativní způsoby derivatizace pro GC aminokyselin

a) reakce s alkyl-chloroformiátem



N-alkoxykarbonylderivát esteru aminokyseliny
(R¹ = Me, Et)

Alternativní způsoby derivatizace pro GC aminokyselin

b) silylace bis(trimethylsilyl) trifluoracetamidem (BSTFA)

