

Lengyelne Kónya Éva, Berki Mária, Tömösköziné Farkas Rita, Abrankó László

## Aminosav-vizsgálatok az élelmiszeriparban – analitikai kihívások és megoldási lehetőségek

### A szerzők elérhetősége

Lengyelne Kónya Éva | tudományos munkatárs  
lengyelne.konya.eva@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-9022-3392> | lev. szerző

Berki Mária | kutatási munkatárs  
berki.maria@uni-mate.hu

Tömösköziné Farkas Rita | tudományos főmunkatárs  
tomoskozine.farkas.rita@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-2479-0292>

Abrankó László | egyetemi tanár  
abranko.laszlo@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-0160-7280>

### A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék  
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



### Összefoglalás

Az egészséges táplálkozás fontos része a megfelelő fehérjebevitel is, mely mára már nem csupán az elfogyasztott fehérje mennyiségét, hanem a minőségét (emészthetőség, felépítő aminosavak minősége és mennyisége, egyéb antinutritív komponensek jelenléte) is jelenti. A fehérjéket felépítő aminosavak vizsgálatára egyre nagyobb igény mutatkozik, mely a fehérje és az aminosav molekulák sokféleségéből adódóan kihívások elé állítják mind a kutatókat, hatóságokat, mind pedig a műszergyártó cégeket is. Munkánk célja összefoglalást adni a fehérje hidrolízis, mint az aminosav analízis egyik kulcslépésének követelményeiről és nehézségeiről, a felszabadított aminosavak elválasztásának és detektálásának sokrétűségéről a hagyományos és újonnan fejlesztett módszerek bemutatásával arra keresve a választ, hogy lehetséges-e egy egységes, szabványosított módszer kialakítása az aminosavak meghatározására.

**Kulcsszavak:** aminosav, fehérje-hidrolízis, kromatográfia, származékképzés

### Aminosav vizsgálatok jelentősége

Az aminosavak kémiailag sokszínű, és így eltérő fiziko-kémiai sajátságokkal rendelkező molekulacsalád. A legismertebb 20 fehérjeépítő aminosav mellett több tucat további természetes és egyéb szintetikus aminosavat ismerünk (Zarándi & Szolomájer, 2017). Ezek vizsgálatára irányuló módszerek az élelmiszeriparban és takarmányozásban egyaránt egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Legfontosabb alkalmazási területük talán az élelmi fehérjék táplálkozási

minőségének, tápértékének vizsgálatához kapcsolódik. Mára egyre szélesebb körben elfogadott az a nézet, hogy az egészséges táplálkozáshoz szükséges napi fehérjebeviteli mennyiség, illetve az ehhez tartozó referenciaértékek megítéléséhez, az elfogyasztott fehérje mennyisége önmagában nem nyújt elegendő információt. A fehérje tápértékét több tényező együttesen határozza meg. Ezek közül kiemelendő i) az aminosav összetétel, ii) a fehérje/aminosav emészthetősége és iii) a fehérje/aminosav emésztést befolyásoló, az elfogyasztott fehérjével együtt elfogyasztott ún. antinutritív összetevők minősége és

mennyisége. Az élelmi fehérjék minőségének jellemzéséhez tehát kulcsfontosságú, hogy ismerjük annak aminosav összetételét, illetve legalább bizonyos esszenciális aminosavak mennyiségét.

A fehérje, illetve abban található aminosavak emészthetőségének meghatározása során szintén szerepet kaphat az aminosav-tartalom meghatározása. A fehérjeminősítési mutatók egy csoportja a fehérjét aminosav-forrásnak tekinti, így ezen mutatók esetében a fehérjeminősítést az aminosav összetétellel hozzák összefüggésbe. A humán táplálkozástudományban a fehérjék aminosav alapú értékének meghatározására hosszú ideig a PDCAAS (Protein Digestability Corrected Amino Acid Score / Fehérje emészthetőséggel korrigált aminosavérték) mutató alkalmazása volt a standard. E mutató alapja az aminosav érték (amino acid score, AAS) meghatározásakor a minősítendő fehérje 7 esszenciális aminosav-tartalmának (hisztidin, izoleucin, lizin, leucin, treonin, triptofán, valin), illetve az összesített kéntartalmú (metionin és cisztein) és összesített aromás aminosavak (fenilalanin és tirozin) mennyiségét (mg/g) összevetjük az „ideális elvi” referenciafehérje azonos mutatóinak mennyiségével (mg/g). Ezen arányok legkisebb értékét tekintjük az aminosav értéknek. A vonatkozó WHO/FAO útmutatóban rögzített „ideális elvi” referenciafehérje aminosav összetétele – az eltérő igények alapján – korcsoportfüggő módon került megállapításra. Az így kapott AAS értéket ezt követően a teljes fehérje emészthetőségi faktorával kell korrigálni ahhoz, hogy megkapjuk a PDCAAS értéket. Ennek az átlagos emészthetőségi korrekciós faktornak az alkalmazása jelenti a PDCAAS mutató egyik legjelentősebb korlátját. Ennek oka, hogy jelentős mennyiségi eltérés mutatkozhat a teljes fehérje nyersfehérje alapon számolt emészthetőségében az egyes nélkülözhetetlen (esszenciális) aminosavak egyedi emészthetősége között.

A PDCAAS mellett, a WHO/FAO 2011-es szakmai konzultációja nyomán 2013-ban megjelent javaslat alapján a DIAAS (Digestible, indispensable amino acid score/Emészthető nélkülözhetetlen aminosavérték) mutatót helyezi előtérbe, hiszen ez élettani szempontból relevánsabb információt szolgáltathat az esszenciális aminosavak hasznosíthatóságáról (FAO/WHO, 2011). A PDCAAS és a DIAAS mutatók közötti leglényegesebb különbség, hogy míg a PDCAAS esetében az aminosav értéket (AAS) a teljes fehérje eredő emészthetőségi faktorával kell korrigálni, a DIAAS mutató esetén, az emészthetőséget aminosav-specifikusan kell meghatározni és aminosav-specifikus korrekciót kell alkalmazni. A fent említett két fehérjetápérték-mutató meghatározásához elengedhetetlen a termék, illetve DIAAS esetén annak emésztményéből származó minták

aminosavprofilozása is.

Az aminosav profil, illetve az aminosavak mennyiségének ismerete, a fehérje tápérték mutatók meghatározásán túl, további információt nyújthat az élelmiszer minőségére vonatkozóan.

Fényt deríthetünk például az élelmiszer-feldolgozás során alkalmazott magas hőmérséklet okozta – akár aminosav szintű kémiai változásokra, melyek szintén kedvezőtlen hatással lehetnek a tápértékre (Mehta & Deeth, 2016). Ezen túl, az aminosavak vizsgálatával közelebb juthatunk akár hamisításra utaló jelek feltáráshoz. Ennek legismertebb példája a hús és hústermékek kötőszövet-arány meghatározására kidolgozott rutinszerű élelmiszerminőségi vizsgálat. A fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról szóló EU-rendelet [1169/2011/EU rendelet] ugyanis előírásokat fogalmaz meg a maximálisan megengedhető kötőszövet-tartalomra (egész pontosan a kollagén/izomfehérje arányra) a „hús” kifejezéssel jelölt élelmiszer-összetevők esetében. E mutató meghatározásához a nyersfehérje tartalom ismerete mellett szükség van a kollagéntartalom vizsgálatára is. Ez utóbbit, konszenzusos módon, a hidroxiprolin-tartalom 8-szorosaként, számítással becsülhetjük.

Élelmiszerminőség és -biztonság szempontjából szintén érdekesek az aminosavak deaminálási vagy dekarboxilezési reakcióinak termékei, amelyek módosítják az aminosavprofil, illetve olyan vegyületeket hoznak létre, amelyek szerepet játszanak az élelmiszerromlási folyamatokban, illetve élettani szempontból is aktívak. Ezek közé tartoznak a biogén aminok, amelyek az aminosavak dekarboxilezésével alakulnak ki és a dezaminálás során keletkező  $\alpha$ -ketosavak. Ezek vizsgálatára alkalmazható analitikai módszerek nagymértékben hasonlítanak az aminosavak vizsgálati módszereire (Önal, 2007).

Végül az aminosav vizsgálatok (mért aminosavak összesített mennyiségét alapul véve) hasznos információt nyújthatnak mintában lévő fehérje mennyiségének meghatározásához olyan esetekben amikor a nyersfehérje-tartalom vizsgálati módszerek csak korlátozottan alkalmazhatók (pl rovarfehérjék, gombák vizsgálata), illetve ilyen módszerekkel kapott eredmények (korrekciós faktorok) validálása során.

A fenti példákból látható, hogy az aminosavak vizsgálata széles körben alkalmazható az élelmiszeriparban, ugyanakkor meghatározásuk a ma napig számos kihívást tartalmaz. Az ezekre adott különböző válaszok és megközelítések miatt ezért nem létezik olyan domináns, vagy akár egyeduralkodó analitikai módszer, amely széles körben rutinná vált volna. E munkában az ismertebb módszerek sajátosságait, kulcsfontosságú lépéseit, a legelterjedtebb megoldási lehetőségeit, megközelítéseket tekintjük át.

## Aminosav vizsgálati módszerek áttekintése

A fentiekben említett élelmiszeripari, táplálkozástudományi kérdéseken túl, számos egyéb területről érkező igény mutatkozik az aminosavak vizsgálatára. Általánosságban elmondható, hogy a több (sok) aminosav együttes szelektív meghatározására alkalmas műszeres analitikai módszerek három plusz egy kulcspontja i) a fehérje aminosavakká történő hidrolízise, ii) a keletkezett aminosavak kromatográfiás elválasztása, iii) az aminosavak kimutatása és mennyiségi meghatározására alkalmazott detektálási eljárás, valamint plusz egy faktorként, az elválasztásra és a detektálásra is hatással lévő kémiai származékképzési eljárás jelenti.

Az élelmiszervizsgálati gyakorlatban számos, a fenti megközelítésen alapuló, döntően kromatográfiás technikán alapuló aminosav vizsgálati protokoll terjedt el. Vannak általánosabb érvényű szabványos, vagy szabványszerű módszerek, és gyakran találkozunk gyártói applikációkon alapuló módszerekkel is. Ez utóbbiak legtöbbször a derivatizációs, és/vagy elválasztástechnikai kulcslépésekhez eszközt, reagenseket fejlesztők módszerei. Fontos megjegyezni, hogy a módszerek nagy része egyedi termékcsoportra és sokszor csak bizonyos aminosavakra kidolgozott és validált aminosav meghatározási vizsgálati módszertakar. Mi több, egy részük csupán a vizsgált termékekben, mintákban előforduló szabad aminosavak (illetve ezek közül néhány) meghatározására összpontosít, azaz nem ad útmutatást a hidrolízis lépésre vonatkozóan. Az **1. táblázatban** néhány ismertebb, szabványos (szabványszerű) módszert foglaltunk össze.

### 1. táblázat: Néhány ismertebb, szabványos (szabványszerű) aminosav vizsgálati műszeres analitikai módszer

Módszer azonosító	Alkalmazott analitikai technika
MSZ EN ISO 13903:2005 Takarmányok. Az aminosav-tartalom meghatározása	HPLC
MSZ EN 12742:2000 Gyümölcs- és zöldséglevék. A szabadaminosav-tartalom meghatározása. Folyadékromatográfiás módszer	HPLC
AOAC 60.47 Amino Acids in Vitamin Preparations	titrálás, fotometria
AOAC 975.44 Lysine (Available) in Nutritional Supplements	HPLC
AOAC 985.28 Sulfur Amino Acids in Food and Feed Ingredients	ioncserés kromatográfia
AOAC 965.31 Lemon Juice	spektroszkópia
AOAC 99412 Amino Acids in Feeds	aminosav analízátor (ioncserés kromatográfia)
AOAC 99913 Lysine, Methionine, and Threonine in Feed Grade Amino Acids and Premixes	Aminosav analízátor (ioncserés kromatográfia) – elválasztást követő ninhidrin vagy OPA származékképzéssel
AOAC 201207 Calculation of Whey Protein Fraction in Milk-Based Infant Formula	HPLC
AOAC 2018.06 Total Amino Acids in Infant Formulas and Adult Nutritional	UHPLC-UV
AOAC 2019.09 Total Proteinogenic Amino Acids and Taurine in Infant Formula and Adult/Pediatric Formula	UHPLC

Összességében elmondható, hogy az érzékelhető igény és az ezt kiszolgálni szándékozó törekvések ellenére, jelenleg nem létezik átfogó, azaz minden élelmiszertípusra, és táplálkozási szempontból minden lényeges aminosav vizsgálatára egyaránt alkalmasnak tekinthető egységes, validált módszer, kiváltképp az első kulcslépésnek tekinthető hidrolízis tekintetében.

## Fehérje hidrolízis

Az aminosavak meghatározásának első kulcslépése az élelmiszerekben lévő fehérjék hidrolízise, a peptidkötések bontásával az aminosavak felszabadítása. A hidrolízis körülményeinek megválasztása során figyelembe kell venni az egyes aminosavak stabilitását és a különböző peptidkötések ellenállását. Olyan peptidkötések, ahol valin, izoleucin vagy leucin van jelen, ott a hidrolízis nehézkes, hosszabb időt igényel, hogy a teljes aminosav mennyiséget kinyerjük. Ezzel ellentétben, a savérzékeny aminosavak, mint a szerin, treonin ilyen hidrolízis idő mellett még a mérés előtt részben roncsolódhatnak, így ott rövidebb hidrolízis időt kell választani. Következésképpen az egyes fehérjék különbözőképpen fognak reagálni – más-más arányban szabadulnak fel vagy vesznek el/sérülnek az aminosavak – a hidrolízis folyamatára attól függően, hogy milyen az eredeti aminosav szekvenciájuk, így szükséges valamilyen korrekciós faktorokat alkalmazni, rosszabb esetben ugyanazon fehérje pontos aminosav összetételének meghatározásához különböző hidrolízis folyamatoknak van alávetve a minta, majd ezekből külön történik a mennyiségi analízis. Az aminosavak vizsgálata így is időigényes és sokszor drága laboratóriumi vizsgálat, de a hidrolízis módszerek fejlesztése és a mérési idő optimalizálása lehetővé tenné a rutin alkalmazást (Darragh & Moughan, 2008).

A klasszikus, általánosan alkalmazott eljárás során a minta hidrolízise 6 M sósavval 100-165 °C-on, vákuumban, oxigénmentes közegben 24-72 h alatt történik meg. A módszer nagy hátránya a hosszú hidrolízis idő illetve bizonyos aminosavak instabilitása és érzékenysége. A kéntartalmú aminosavak (cisz(t)ein, metionin) illetve triptofán meghatározása esetén a fenti módszer nem megfelelő. A cisz(t)ein és metionin méréséhez egy előoxidációs lépésre van szükség az érzékeny aminosavak megvédéséhez, mely egy perhangyasavas reakciót jelent jeges körülmények között, így ciszteinsav illetve metionin-szulfon formában történik az analízis. Hasonlóképpen a triptofán is különleges eset, melyhez viszont lúgos hidrolízis alkalmazható 4,2 M NaOH segítségével. A tirozin meghatározásának elősegítésére pedig fenol (0,1%-os arányban) hozzáadása ajánlott. Egyéb hidrolízis módszerek például a proteázok alkalmazása csak

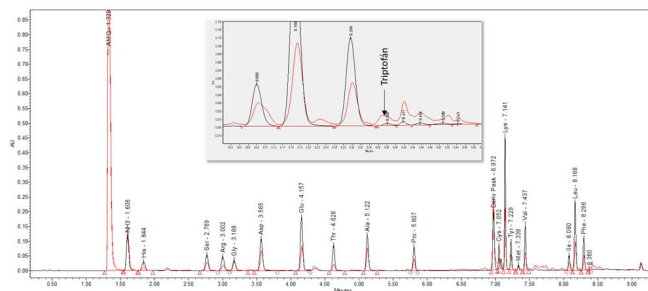
kisebb jelentőséggel bírnak (Gilani et al., 2008; Otter, 2012). Egy szabványosított, széles termékkörre alkalmazható hidrolízis módszer kifejlesztése felé irányul több kutatás is, hogy a fenti nehézségek kiküszöbölhetőek legyenek (Marino et al., 2010; Rutherford & Dunn, 2011). Elsődleges cél a léptékcsoökkentés, mint a minta és felhasznált vegyszer mennyiségének redukálása, másrészt a hidrolízis időbeli rövidítése, ugyanakkor az aminosavak védelmét, megfelelő feltárást is figyelembe véve.

A mikrohullámú vákuumroncsolás alkalmas lehet kisebb mintamennyiségek felhasználásával, jóval rövidebb hidrolízis idővel az aminosavak kötésből való felszabadítására. A hidrolízis idejét, hőmérsékletét illetve bemért mintamennyiséget optimalizálva teljes búzaszem fehérje hidrolízisét végezték 6M HCl jelenlétében mikrohullámú roncsolást alkalmazva. A 200 mg-os mintamennyiség 150°C-on 3 órán át tartó hidrolízise, mint optimált hidrolízis paraméterek ellensúlyozták az aminosav maradékok felszabadítását a búzamatrixból valamint limitálták a későbbi degradációt illetve transzformációt amellet, hogy 85%-os teljes aminosav visszanyerést eredményezett a teljes fehérjére vonatkoztatva (Kabaha et al., 2011).

Messia és munkatársai (2008) húsok és hústermékek hidroxiprolin vizsgálatára alkalmaztak 20 perces hidrolízis időt mikrohullámú roncsolással, ahol ebben a speciális esetben hasonló precizitást és pontosságot kaptak, mint a hagyományos módszerrel. Így a 24 órás hidrolízis időt lényegesen le tudták csökkenteni, melynek során bár csak a hidroxiprolin mennyiségét mérték, a többi aminosav esetén is hasonlóan jó pontosságot értek el nagy hatékonyságú anion cserélő kromatográfiával amperometriás detektálással, ahol a hidroxiprolin meghatározásához nincs szükség sem oszlop előtti, sem pedig oszlop utáni származékképzésre.

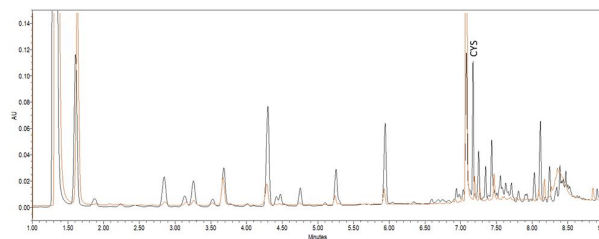
Kutatási tevékenységünk során magunk is több esetben szembesültünk a fehérje hidrolízis, valamint az egyes aminosavak meghatározásának nehézségeivel. A fehérjéket felépítő aminosavak kémiai diverzitása, eltérő stabilitása és a rendelkezésre álló mérési rendszer ajánlása alapján többféle hidrolízis módszer segítségével optimalizáltuk az aminosavak minél pontosabb meghatározásához szükséges fehérje bontási lépést. A rendelkezésre álló mikrohullámú vákuumroncsolóhoz (Milestone Ethos One) fejlesztett külön rotor alkalmassá teszi a készüléket fehérje hidrolízis kivitelezéséhez. A mikrohullámú vákuumroncsolóban történő hidrolízis lényegesen lerövidíti a feltárást idejét, kevesebb mint egy óra alatt, kis mintamennyiségek (10–50 mg) és kevesebb vegyszerhasználat (<50 ml HCl) mellett megy végbe a peptidkötések felbontása. Munkánk során figyelme véve a fentebb említett aminosavak eltérő stabilitását és a

készülékgyártó ajánlását, rövidebb – csak felmelegítés, illetve hosszabb – felmelegítés után 20 perces hőntartás hidrolízis időt alkalmaztunk 1% fenolt tartalmazó 6M HCl oldattal végezve a hidrolízist. Tapasztalataink alapján mindkét roncsolási módszerre szükség van a megfelelő pontosságú mérésre, mert a triptofán hosszabb idő elteltével nagyrészt elroncsolódik, nem detektálható (1. ábra).



**1. ábra:** BSA minta 6M HCl, 1% fenolos közegben végzett rövid (piros) és hosszú (fekete) mikrohullámú roncsolással (részletek a szövegben) és AQC származékképzést követően felvett RP-UHPLC-DAD kromatogramja

A kéntartalmú aminosavak instabilitása miatt perhangyasavas előreakciót követően végeztük el a mikrohullámú feltárást. A perhangyasavas reakció többféle fehérje molekula esetében sem eredményezett szignifikánsan jobb kimutathatóságot (2. ábra), így saját tapasztalataink alapján, az AQC derivatizációt (részletesebben lásd később) alkalmazó UHPLC-DAD módszerrel történő méréseinkhez rutinszerűen, az 1% fenolt tartalmazó 6M HCl oldattal végzett a rövidebb és hosszabb hidrolízist alkalmazzuk.



**2. ábra:** BSA minta 6M HCl, 1% fenolos közegben, perhangyasavas előreakciót követő (bordó) illetve anélküli (fekete) hidrolízis kromatogramja

## Aminosavak kromatográfiás elválasztása és detektálása

A hidrolízist követi a felbontott peptidkötésekből felszabaduló aminosavak elválasztása, azonosítása és mennyiségi meghatározása. Az aminosavak elválasztása, minőségi és mennyiségi meghatározása többféle módszer terjedt. Az elválasztás történhet kapillaris elektroforézissel, illetve vékonyréteg kromatográfiával, gázkromatográfiával, ioncserés és

fordított fázisú folyadék kromatográfiával. A legelterjedtebb technika az ioncserés és a fordított fázisú HPLC, illetve az utóbbi időben a fordított fázisú UHPLC technika is egyre inkább előtérbe kerül (Gilani et al., 2008, Kaspar et al., 2009, Rutherford & Gilani, 2009).

Az alkalmazandó módszerek sokszínűségének egyik oka, hogy az aminosavak többsége – az aromás gyűrűvel rendelkező aminosavak kivételével (fenilalanin, triptofán, hisztidin, tirozin) – gyenge kromofor és nem fluoreszkál, ezért a legtöbb széleskörben és rutinszerűen alkalmazott folyadékkromatográfiás detektorral, úgymint ultraibolya (UV), illetve a fluoreszcenciás detektálással (FLD), származékképzés nélküli detektálásuk nem megoldott. Alternatíva lehet a tömegspektrometriás meghatározás, amely esetén az aminosavak kis iontömegei és ikerionos szerkezete okoz nehézséget. (Violi et al. 2020).

Származékképzés nélkül a meghatározás kevésbé időigényes és a származékképzés lehetséges hibái (részlegesen végbement reakció, származékok stabilitása, esetleges mellékreakciók és azok termékei) sem lépnek fel.

A kémiai származékképzés fent említett sajátágai ellenére, rutinszerű kromatográfiás aminosav elemzés során, az UV és FLD detektálás robusztusságának előnyéért „cserébe” a leginkább elterjedt módszerek általában alkalmaznak valamiféle származékképzési eljárást. A származékképzést alkalmazó kromatográfiás módszerek esetében a derivatizáció kapcsán két általános megközelítés létezik. Egyik, hogy az aminosavak elválasztását natív formájukban végezzük és a származékképzést a kolonnán történő elválasztást követően, de a detektálást megelőzően hajtjuk végre. Ez a megközelítés az oszlop utáni származékképzés (post-column derivatisation). E megközelítés során a kémia reakció a derivatizálószer effluenshez történő adagolásával, áramlás közben (in-line) valósul meg. Az ún. aminosav analizátorok ezt a megközelítést alkalmazzák. Jellegzetes elválasztási módszer a kationcserés kromatográfia és az elválasztást követő ninhidrines származékképzésen alapuló spektrofotometriás detektálás (Berisha et al., 2021). Az oszlop utáni származékképzési megközelítés előnye, hogy oszlopkromatográfiás módszereknél jól automatizálható megoldást jelent, ugyanakkor a detektorba kerülő, feleslegben lévő derivatizálószer ronthatja a detektálás minőségét.

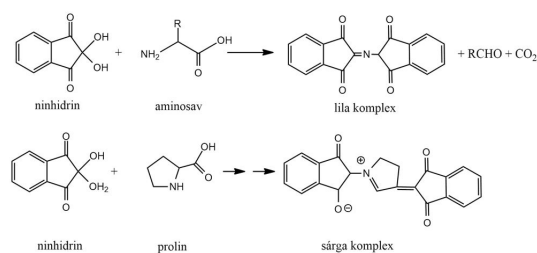
Másik megközelítés lényege, hogy a származékképzés a kromatográfiás elválasztást megelőzően történik meg. Ez az oszlop előtti származékképzés (pre-column derivatisation). Ebben az esetben a kromatográfiás elválasztás „alanya” immáron nem a natív aminosavak, hanem az azokból képzett származékok. Ebben az esetben, a

legalkalmasabb kromatográfiás módszer kiválasztásánál, illetve optimalizálásánál figyelembe kell venni az alkalmazott derivatizálószer és a kialakuló származék kromatográfiás sajátágait. Az oszlop előtti származékképzést alkalmazó módszerek esetén leginkább a fordított fázisú, C18 oldalláncokkal fedett kolonnákkal végrehajtott HPLC és UHPLC elválasztás alkalmazása terjedt el. (Aristoy & Toldrá, 2016).

## Származékképzés

A származékképzésnél elvárás, hogy (i) a reakció legyen gyors és kvantitatív, (ii) lehetőség szerint vizes közegben menjen végbe, (iii) a reagens a primer-, és a szekunder aminocsoportokkal is reagáljon, (iv) a keletkezett származékok stabilak legyenek (Illisz et al. 2008). Általánosságban elmondható, hogy az oszlop előtti, és oszlop utáni származékképzési módszerek közül az oszlop előtti származékolás az elterjedtebb. Az oszlop utáni származékképzésnek megvannak a maga előnyei, mint (i) a mellékreakciók nem fontosak, (ii) nem elvárás, hogy a folyamat teljesen végbe menjen, mivel a származékképzés mértéke reprodukálható, (iii) nincs szükség stabil származéokra. Az oszlop utáni származékképzés hátrányai között érdemes megemlíteni a reakció paramétereinek körülményesebb, korlátozottabb kontrollálását, a reagens-bevezető rendszer miatti többletköltséget, a minta hosszabb áramlási útját és ebből eredő csúcshévesedési jelenségeket, valamint a reagens lehetséges interferenciáját a detektálás során. Az oszlop előtti származékképzés esetén is felmerülhet a melléktermékek vagy a nem reagált, visszamaradt reagens által okozott interferencia, de a rendszerbe jutott mennyiség ebben az esetben lényegesen kisebb.

Az 1950-es években elsők között kifejlesztett aminosav meghatározásra alkalmas eljárás ioncserés kromatográfiára épült oszlop utáni ninhidrines származékképzéssel (Moore & Stein, 1948). Az aminosavak ninhidrinnel való reakciójának terméke egy olyan komplex, mely erős lila színével teszi lehetővé a meghatározást 570 nm hullámhosszon. A színreakció sárga komplexet eredményez prolin illetve hidroxiprolin esetén, mely 440 nm-en detektálható (**3. ábra**).

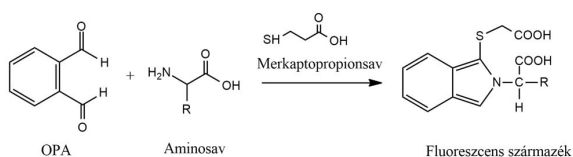


**3. ábra:** Aminosavak reakciója ninhidrinnel

A ninhidrin mellett máig a legjellemzőbb származékképzők még az orto-ftálaldehid (OPA), a fenil-izotiocianát (PITC), a 9-fluorenilmetil-kloroformát (FMOC), és a 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamát (AQC).

### OPA

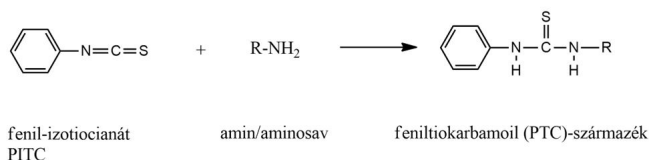
Az orto-ftálaldehid mind oszlop előtti, mind pedig oszlop utáni derivatizálószerként is alkalmazható és széles körben elterjedt. A keletkezett származék fluoreszcensen jól detektálható, míg maga az OPA nem ad jelet (**4. ábra**). A ninhidrinnel ellentétben az OPA nem reagál a prolinnal vagy csak egyéb reagens jelenléte mellett, akkor is csak kis mértékben.



**4. ábra:** Aminosavak reakciója orto-ftálaldehiddel

### PITC

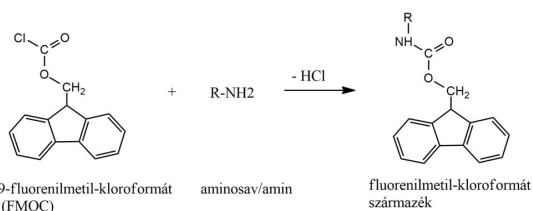
Fenil-izotiocianát (PITC) az N-terminális aminosavakkal reagál jól – ideértve a prolint is – feniltio-karbamoil(PTC)-aminosavat képezve, melynek abszorbancia maximuma 254 nm-en van (**5. ábra**).



**5. ábra:** Aminosavak reakciója fenil-izotiocianáttal

### FMOC

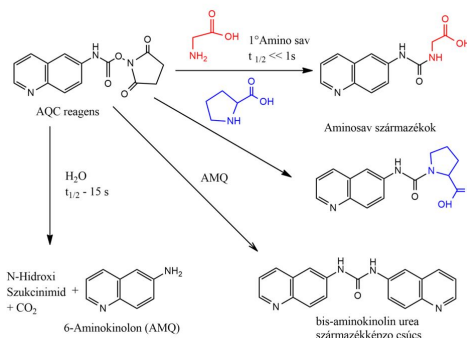
A 9-fluorenilmetil-kloroformát az elsődleges és a másodlagos aminosavakkal is reagál. A gyorsan lejátszódó reakció eredményeként stabil, fluoreszcens származék képződik (**6. ábra**). Az FMOC reakció hátránya, hogy a reagens vizes közegben hidrolizálódhat illetve dekarboxileződik fluoreszcens alkoholt képezve, mely együtt eluálódik az aminosavakból képzett származékokkal (Bank et al, 1996).



**6. ábra:** Aminosavak reakciója 9-fluorenilmetil-kloroformáttal

### AQC

Az aminosavak 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamáttal (AQC) történő gyors reakciója szintén egy erősen fluoreszcens származéket eredményez elsődleges és másodlagos aminosavak esetén is. Derivatizációt követően egy 55°C-on történő hőtartás szükséges, hogy egyrészt a tirozin kis mellékterméke monoszármazékká alakuljon, másrészt a maradék AQC reagenst 6-aminokilononná, n-hidroxi-szukcinimiddé és szén-dioxidá hidrolizálja. Az aminosavak AQC-származékai stabilak, UV-aktívak és a maradék AQC valamint a keletkező melléktermékek nem okoznak gondot az aminosavak detektálásánál (**7. ábra**).



**7. ábra:** Aminosavak reakciója 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamáttal

Összefoglalásként elmondható, hogy az aminosavak vizsgálatára számos analitikai megközelítés egyszerre van jelen a gyakorlatban, vagyis nem beszélhetünk egyeduralgoló szabványosított, egységes aminosav analízis módszerről. Az elmúlt 50-70 évben kidolgozott, rutinszerű analitikai eljárások, derivatizációs technikák továbbra is jól alkalmazhatók, ugyanakkor a fejlesztések célja robusztusabb, gyorsabb és szélesebb körben alkalmazható származékképzési módszerek létrehozása. A mintaelőkészítési eljárások tekintetében az idő- és vegyszerszükséglet csökkentése, valamint az automatizálás jelenti a fő fejlesztési célokat. E területen a mikrohullámú roncsolási technika és a stabil származékképzésen alapuló UHPLC módszer ötvözése egy jól működő koncepciót jelenthet a különböző fehérjetartalmú minták vizsgálatokor és jelentősen egyszerűsítheti, lerövidítheti a hagyományos minta-előkészítési eljárásokat, a megfelelő reprodukálhatóság elérése mellett.

### Irodalomjegyzék

- Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2016): Amino Acids: Determination. In Encyclopedia of Food and Health (Eds.: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F.) Academic Press, 2016, 141-148.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00027-1>  
 Bank, R.A., Jansen, E.J., Beekman, B., te Koppele, J.M. (1996): Amino acid analysis by reversephase high-

- performance liquid chromatography: Improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytical Biochemistry*, 240(2):167-176.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0346>
- Berisha, K., Bytyçi H., Mednyánszky, Zs., Kiss, E., Simon-Sarkadi, L. (2021): Amino acid and biogenic amine composition of busha cattle milk. *Acta Alimentaria*, 50(1):144-152. <https://doi.org/10.1556/066.2020.00226>
- Darragh, A.J., Moughan, P.J (2008): The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International*, 88(3):888-893.  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.888>
- FAO/WHO (2011): Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO food and nutrition paper 92.
- Gilani, G.S., Xiao, C., Lee, N. (2008): Need for accurate and standardized determination of amino acids and bioactive peptides for evaluating protein quality and potential health effects of foods and dietary supplements. *Journal of AOAC International*, 91(4):894-900. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.894>
- Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A. (2008): Application of chiral derivatizing agents in the high performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1):1-15.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.013>
- Kabaha, K., Taralp, A., Cakmak, I., Ozturk, L. (2011): Accelerated hydrolysis method to estimate the amino acid content of wheat (*Triticum durum* Desf.) flour using microwave irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7):2958-2965.  
<https://doi.org/10.1021/jf103678c>
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., Oefner, P.J. (2009): Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2):445-452.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2421-1>
- Marino, R., Iammarino, M., Santillo, A., Muscarella, M., Caroprese M., Albenzio M. (2010): Technical note: Rapid method for determination of amino acids in milk. *Journal of Dairy Science*, 93(6):2367-2370.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-3017>
- Mehta, B.M., Deeth, H.C. (2016): Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15:06-218.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12178>
- Messia, M.C., Di Falco, T., Panfili, G., Marconi, E. (2008): Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline. *Meat Science*, 80(2):401-409.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.003>
- Moore, S., Stein, W.H. (1948): Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(1):367-388. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)51034-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)51034-6)
- Otter, D.E. (2012): Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition*, 108:S230-S237. <https://doi.org/10.1017/s0007114512002486>
- Önal, A. (2007): A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4):1475-1486.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- Rutherford, S.M., Dunn, B.M. (2011): Quantitative amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*, 63(1):3.2.1-3.2.6.  
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0302s63>
- Rutherford, S.M., Gilani, G.S. (2009): Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*, Suppl. 58, Unit 11.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1109s58>
- Violi, J.P., Bishop, D.P., Padula, M.P., Steele, J.R., Rodgers, K.J. (2020): Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131:116018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116018>
- Zarándi M., Szolomájer, J. (2017): Amino acids: chemistry, diversity and physical properties, *Amino Acids, Peptides and Proteins*, 42:1-84.  
<https://doi.org/10.1039/9781788010627-00001>

## Amino acid analysis in food industry – analytical challenges and optional solutions

Lengyelne Kónya É., Berki M., Tömösköziné Farkas R., Abrankó L.

### Abstract

Protein consumption is important and essential part of the balanced diet, and nowadays it means not only the amount of protein is itself, but the quality of the protein consumed (digestibility, quality and quantity of the amino acids, other possible antinutritive compounds). There is an even higher demand on determination of amino acid composition of the protein as assessing the protein quality. Proteins, peptides and amino acids are a chemically diverse set of molecules, so the accurate analysis is difficult and challenging for researches, authorities and instrument producers as well. Our aim is to give summary on protein hydrolysis methods' requirements and limitations as a first step of amino acid analysis, and collect the difficulties of separation and detection of amino acids through classical and new methods searching for answer on the question of the possibility of a standardized, validated amino acid analysis method.

**Keywords:** amino acid, protein hydrolysis, chromatography, derivatisation