

**ELEKTROCHROMATOGRAFICZNE BADANIA SKŁADU WOLNYCH
AMINOKWASÓW W NIEKTÓRYCH ODMIANACH MIODÓW**

Piotr Masłowski i Irena Mostowska

Katedra Biochemii — Zakład Pszczelarstwa — W. S. R. Olsztyn

Białkami miodu interesowali się różni badacze już od bardzo dawna. Jak podaje White (1957) prace na ten temat były prowadzone jeszcze w początkach bieżącego wieku przez Lund'ego (1909, 1910), Moreau (1911), Langerę (1910) i innych.

Nowy kierunek badań, poświęconych wolnym aminokwasom, zapoczątkowały prace Tillmansa i Kiesgena (1927), którzy przy pomocy metody formolowej określali zawartości azotu aminowego, służącego z kolei za wskaźnik czystości miodu. Podobne prace prowadzili w późniejszych latach Lothrop i Gertler (1933) oraz Schuette i Baldwin (1944).

Pierwsze próby rozdziału aminokwasów przy zastosowaniu chromatografii bibułowej były podjęte przez Vavrucha (1952) dla niektórych gatunków miodów z Czech i Moraw. Autor rozdzielił i zidentyfikował 9 aminokwasów hydrolizatu białkowego. Nie udało mu się natomiast uzyskać rozdziału wolnych aminokwasów, ze względu na znikomą ich ilość. Dopiero Baumgarten i Möckesch (1956) podjęli próbę rozdziału tych związków drogą dwukierunkowej chromatografii bibułowej przy wcześniejszym zastosowaniu adsorpcji aminokwasów na Amberlicie IR 120, a następnie elucji ich roztworem 2 n kwasu solnego.

W niniejszej pracy pragnęliśmy uzyskać rozdział wolnych aminokwasów niektórych miodów krajowych, przy zastosowaniu wysokonapięciowej elektrochromatografii bibułowej wg. Masłowskiego (1960). Adaptując powyższą metodę do rozdziału aminokwasów miodu wprowadzono pewne modyfikacje, dotyczące głównie techniki rozdziału. Zamiast bowiem oddzielać aminokwasy obojętne od kwaśnych i zasadowych drogą rozdziału elektroforetycznego przy pH 6,5, następnie je eluować, zagęszczać i powtórnie rozwijać elektrochromatograficznie przy pH 1,9 zastosowano technikę rozdziału wszystkich aminokwasów na jednym

elektrochromatogramie. W ten sposób skrócono czas rozdziału przynajmniej trzykrotnie i uniknięto strat wynikających z elucji aminokwasów obojętnych z bibuły.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

MATERIAŁY I METODY

1. Przygotowanie materiału

Miód do analizy wolnych aminokwasów uzyskano od pszczelarzy z 18 miejscowości woj. olsztyńskiego. Do każdej próbki dołączono ankietę z następującymi informacjami:

1. Nazwisko i imię pszczelarza
2. Miejscowość, w której znajduje się pasieka
3. Data pobrania danej próbki miodu
4. Z jakiej rośliny pochodzi dana próbka
5. Czy oprócz rośliny stanowiącej podstawę źródła nektaru — kwitły jeszcze inne rośliny i czy pszczoły z nich korzystały.

Tabela 1

Charakterystyka miodów
Honey characteristic

Nr próbki N° of sample	Miejscowość Locality	Data zbioru Time of harvest	Udział pyłku / odmiana miodu % of pollen from plant
1	Giżycko	28. 6. 60	68 koniczynowy
2	Giżycko	30. 6. 60	niezidentyfikowany
3	Giżycko	27. 6. 60	53 gryczany
4	Pasłęk	23. 7. 60	64 lipowy
5	Lidzbark Warmiński	27. 7. 60	niezidentyfikowany
6	Romaliny, pow. Bartoszyce	10. 8. 60	mieszany
7	Romaliny, pow. Bartoszyce	8. 8. 60	68 lipowy
8	Bartoszyce	25. 6. 60	78 koniczynowy
9	Żegoty, pow. Lidzbark Warm.	15. 7. 60	mieszany
10	Żegoty, pow. Lidzbark Warm.	18. 8. 60	51 wrzosowy
11	Braniewo	3. 8. 60	niezidentyfikowany
12	Braniewo	20. 5. 59	88 rzepakowy
13	Braniewo	3. 8. 60	50 koniczynowy
14	Lidzbark Warmiński	10. 8. 60	niezidentyfikowany
15	Braniewo	8. 6. 60	87 rzepakowy
16	Kętrzyn	15. 8. 60	60 koniczynowy
17	Reszel	11. 8. 60	niezidentyfikowany
18	Reszel	13. 8. 60	niezidentyfikowany

Na podstawie ilościowej analizy pyłkowej poszczególnych prób (wg metody Maurizio, cytowanej przez Serwatkę (1958), a udoskonalonej przez Demianowiczów (1957), wydzielono spośród wszystkich miodów 5 odmian tj. z koniczyny białej, rzepakowy, lipowy, wrzosowy i gryczany (tab. 1). Sześć próbek nie zdołano zidentyfikować, dwie próbki okazały się miodem wielokwiatowym, a pozostałe w większości wypadków były zgodne co do ich jakości odmianowej z przypuszczeniami pszczelarzy.

2. Odcukrzanie miodu

Do analiz pobierano 10 g miodu i rozpuszczano w wodzie podwójnie destylowanej w stosunku 1 : 1. Ponieważ miód zawierał bardzo mało wolnych aminokwasów w stosunku do przeważającej ilości cukrowców, badane próbki przed rozdziałem elektroforetycznym poddawano odcukrzaniu i zagęszczeniu. Postępowano w ten sposób, że arkusz bibuły Whatman Nr 3, o wymiarach 35×30 cm przemywano dokładnie roztworem 8-oksychinoliny, metanolem a następnie wodą, celem pozbycia się jonów Fe^{+3} i Cu^{+2} oraz innych związków zanieczyszczających. Po wysuszeniu bibuły zwilżano ją roztworem buforowym o pH 1,9 (150 ml kwas octowy lodowaty + 50 ml kwas mrówkowy + 800 ml wody) i umieszczano na płycie chłodzącej komory elektroforetycznej. Roztwory badanych aminokwasów w ilości 1 ml nanoszono w odległości 4 cm od anodowego końca bibuły w postaci paska o długości 26 cm. Elektroforegram rozwijano w powyższym buforze przy różnicy potencjałów 75 V/cm długości bibuły w czasie 90 minut. Cukrowce niewędrujące w polu elektrycznym, pozostawały na linii startu. Aminokwasy zaś przemieszczały się na koniec bibuły w kierunku katody. Po wysuszeniu elektroforegramu w temperaturze pokojowej odcinano 10 cm pasek bibuły zawierający cukrowce, z pozostałej zaś części bibuły eluowano aminokwasy wodą destylowaną. Proces odcukrzania dla każdej próby powtarzano pięciokrotnie. Eluaty łączono i zagęszczano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40° C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml redestylowanej wody z dodatkiem kropli toluenu.

3. Rozdział aminokwasów

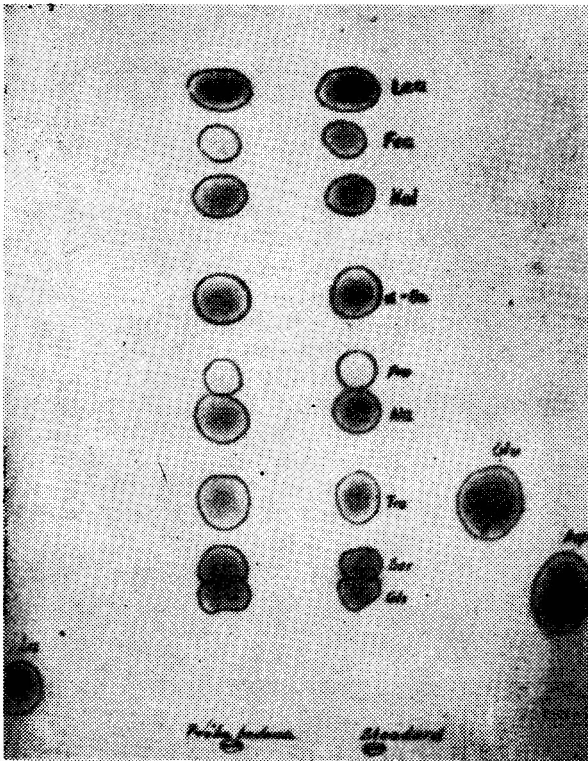
Otrzymane w powyższy sposób pięciokrotnie wzbogacone i odcukrzane roztwory wolnych aminokwasów miodu rozwijano elektroforetycznie. W tym celu na środek arkuszy bibuły Whatman Nr 3 nasyconej buforem pirydynowym o pH 6,5 (100 ml pirydyny + 10 ml kwasu octowego lodowatego + 890 ml wody) nanoszono 20 μ l badanego roztworu. Obok zaś, w odległości 4 cm tyleż mikrolitrów roztworu wzorcowego aminokwa-

sów obojętnych o stężeniu $2 \cdot 10^{-7}M$ każdego składnika. Aminokwasy te rozwijano elektroforetycznie w buforze pirydynowym o pH 6,5, przy różnicy potencjałów 70 V/cm długości bibuły w czasie 120 minut. Aminokwasy kwaśne i zasadowe uległy rozdzielaniu, natomiast obojętne pozostawały na linii startu. Elektroforegram suszono w temperaturze pokojowej a następnie rozwijano go powtórnie, prostopadle do kierunku elektroforetycznego, metodą chromatograficzną, techniką wstępującą w n-butanolu — kwasie octowym — wodzie (4 : 1 : 1) w czasie 24 godzin. Elektrochromatogram suszono w temperaturze $80^{\circ}C$, aminokwasy wywoływano roztworem ninhydryny o składzie: 500 mg ninhydryny + 300 ml metanolu + 175 ml n-butanolu + 15 ml 2 n kwasu solnego.

W ten sposób ulegały także rozdzielaniu aminokwasy obojętne, które identyfikowano przez porównanie wartości ich R_f z wartościami R_f równoległe rozwiniętych aminokwasów standardowych. Uzyskany elektrochromatograficzny rozdział aminokwasów (ryc. 1) nie tylko skracał czas rozwijania, lecz pozwalał na uzyskanie plamek zwartych o dużych różnicach R_f , co ułatwia ich identyfikację oraz ma duże znaczenie w analizie ilościowej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W analizowanych miodach naturalnych stwierdzono we wszystkich wypadkach 12 tych samych wolnych aminokwasów: leucynę, fenyloalaninę, walinę, kwas α -aminomasłowy, alaninę, prolinę, treoninę, glicynę, serynę, lizynę, kwas glutaminowy i asparaginowy (ryc. 1). Nasuwa się więc pytanie, jakie jest źródło oznaczonych aminokwasów — jakiego są one pochodzenia: nektarowego, pyłkowego, czy zwierzęcego (tj. pszczelego)? Curyło (Bornus 1957) podaje, że związki azotowe znajdujące się w miodzie naturalnym mogą pochodzić przede wszystkim z organizmu pszczelego, poza tym z pyłku kwiatowego a wreszcie w minimalnej ilości z nektaru. Ma je w s k i (1959) natomiast za źródło związków białkowych w miodzie naturalnym przyjmuje pyłki, pierzęgę i tzw. młeczko pszczele. W celu potwierdzenia wniosków wspomnianych autorów przeprowadzono analizę miodu sztucznego (stanowiącego zapas zimowy dla pszczół) pobranego z plastra od rodziny pszczelej całkowicie pozbawionej miodu naturalnego. W efekcie przeprowadzonej analizy stwierdzono skład jakościowy wolnych aminokwasów identyczny jak w wymienionych miodach naturalnych. Fakt ten wskazywałby więc na pochodzenie aminokwasów z organizmu pszczelego. Jednakże nie tłumaczy to roli wolnych aminokwasów występujących w nektarze, jako podstawowym surowcu miodu naturalnego. Szczególnie, że B a u m g a r t e n i M ö c k e s c h (1956) w miodach niemieckich stwierdzili dużą różnorodność w składzie jakościowym wolnych aminokwasów. Nie jest jednak



Ryc. 1. Elektrochromatogram wolnych aminokwasów miodu pszczelego.
The electrochromatogram of free aminoacids from honey.

pewne, czy aminokwasy te nie powstały w wyniku proteolizy białek występujących w miodzie. Być może, że zapoczątkowane i prowadzone przez nas dalsze badania w tym zakresie przyczynią się w pewnym stopniu do rozstrzygnięcia tego zagadnienia.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono elektrochromatograficzną analizę wolnych aminokwasów pięciu odmian miodu naturalnego oraz uzyskanego z czystej sacharozy. Zarówno w badanych próbkach miodu naturalnego jak i w miodzie sztucznym nie stwierdzono różnic w składzie jakościowym aminokwasów. We wszystkich przypadkach rozdzielono i zidentyfikowano 12 wolnych aminokwasów tj.: leucynę, fenyloalaninę, walinę, treoninę, lizynę, kwas glutaminowy, kwas α -aminomasłowy, prolinę, alaninę, kwas asparaginowy, glicynę i serynę.

LITERATURA

Baumgarten F., Möckesch I. (1956) Über die papierchromatographische Auffindung Freier Aminosäuren im Bienenhonig. *Z. Bienenforsch.*, 3, 181.

Bornus L. i inni (1957) Hodowla pszczół (praca zbior. pod red. A. Demianowicz) W-wa, s. 624.

Demianowicz Z. i A. (1957) No-

we podstawy analizy pyłkowej miodów, *Pszczelnicze Zesz. Nauk.* 2, 69.

Langer J. (1910) Beurteilung des Bienenhonigs und seiner Verfälschungen mittels biologischer Eiweissdifferenzierung, *Arch. Hyg.* 71, 308 (*Chem. Abstr.* 4, 332).

Lothrop R., Gertler S. (1933) Determination of amino acids and related compounds in honey, *Industr. Engn. Chem.* 5, 103.

Lund R. (1909) Albuminate im Naturhonig und Kunsthonig, *Z. Untersuch. Nahr.- u. Genussm.* 17, 128.

Lund R. (1910) Über die Untersuchung des Bienenhonigs unter spezieller Berücksichtigung der stickstoffhaltigen Bestandteile, *Mitt. Lebensm. Hyg.* 1, 38.

Majewski T. (1959) Miód pszczeleli, W-wa, s. 93.

Masłowski P. (1960) Wysokonaściowa elektrochromatografia bibu-

łowa aminokwasów w różnych okresach kiełkowania *Hordeum sativum*, *Roczn. Nauk. Roln.*, 81-A-3, 561.

Moreau E. (1911) Identification et dosage des substances proteiques dans les miels, *Ann. Falsif.* 4, 36 (*Chem. Abstr.* 5).

Schuetz H., Baldwin C. (1944) Proteins, amino acids and related compounds, *Food Res.* 9, 376.

Serwatka J. (1958) Wyniki analizy pyłkowej miodów wrzosowych z 1956 r., *Pszczelnicze Zesz. Nauk.* 2, 55.

Tillmans J., Kiesgen J. (1927) Die Formoltitration als Mittel zur Unterscheidung von künstlichen und natürlichen Lebensmitteln, *Z. Untersuch. Lebensmitt.* 53, 131.

White J. W. (1957) The composition of honey, *Beer World* 38, 57.

Vavruch J. (1952) Chromatograficke studie vcelego medu, *Chem. Listy* 42, 116.

ЕЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКВАСОВ В НЕКОТОРЫХ РАЗНОВИДНОСТЯХ МЕДОВ

Пиотр Масловски и Ирена Мостовска

Резюме

Проведено электрохроматографический анализ аминоквасов в пяти натуральных медах разного происхождения и в меде полученной путем подкормки пчел з етой сахарозой.

Между этими шестью медами не обнаружено качественных различий в содержании аминоквасов. Во всех случаях отделено и распознано 12 аминоквасов: Лейцин, Фенил-аланин, Валин, Треонин, Лизин, Кислота глутаминовая, Кислота аминок-масляная, Пролин, Аланин, Кислота аспарагиновая, Глицин и Серин.

ELECTROCHROMATOGRAPHIC ESTIMATION OF FREE AMINOACIDS IN DIFFERENT HONEYS

Piotr Masłowski and Irena Mostowska

Summary

The method of electrochromatography was employed for analysis of free aminoacids in five honeys from various plants and of one made by bees from sugar. No qualitative differences were found between the aminoacids of these honeys. In all honeys the same 12 aminoacids were separated and identified: leucine, phenylalanine, valine, treonine, lysine, glutamic acid, α -amino butyric acid, proline, alanine, asparaginic acid, glycine and serine.