



Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Chemii Podstawowych, Wydział Farmaceutyczny
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK, Jerzy ISKIERKO, Irena BŁAZIAK
Marian JEŃDRYCH, Sławomir WAWRZYCKI

Spektrofotometryczne oznaczanie DNS-aminokwasów

Спектрофотометрическое определение DNS-аминокислот

Spectrophotometric Determination of DNS Amino Acids

Do ilościowego oznaczania DNS-aminokwasów używa się różnych fluorescencyjnych sposobów na nośnikach bibułowych lub żelowych (1, 6, 13), w eluatach (2, 5, 12) oraz w wyciekach kolumny (9, 10, 14). Wszystkie przedstawione metody opierają się na cennej i nie zawsze dostępnej aparaturze. Wobec faktu, że dansylacja (4) znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniach struktury I-rzędowej peptydów i białek, zachodzi praktyczna potrzeba uproszczenia oznaczeń DNS-aminokwasów. Temu celowi służą wysiłki podjęte w kierunku opracowania takiego sposobu, który byłby oparty na podstawowym wyposażeniu i jednocześnie dawał gwarancję otrzymywania poprawnych wyników. Daliśmy już temu wyraz poprzez opracowanie techniki planimetrycznej (7, 8).

Przedstawiona praca jest kontynuacją tych badań i stanowi próbę rozszerzenia ich o spektrofotometrię w ultrafiolecie.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki i wzorce pochodziły z Centrali Chemicznej w Gliwicach.

Chlorek wapnia bezw. — chlorek wapnia cz.d.a. prażono na palniku gazowym w tyglu porcelanowym przez 6 godzin. Metanol bezw. — metanol cz.d.a. z chlorku wapnia bezw. Zestaw osiemnastu standardów DNS-aminokwasów firmy Sigma.

Dla każdego wzorca sporządzano metanolowe roztwory o koncentracji: 10×, 20×, 30×, 40×, 50×10⁻⁹ mola/ml. Roztwory przechowywano w probówkach ze szklanymi szlifami MF 24/1/5 firmy Quickfit.

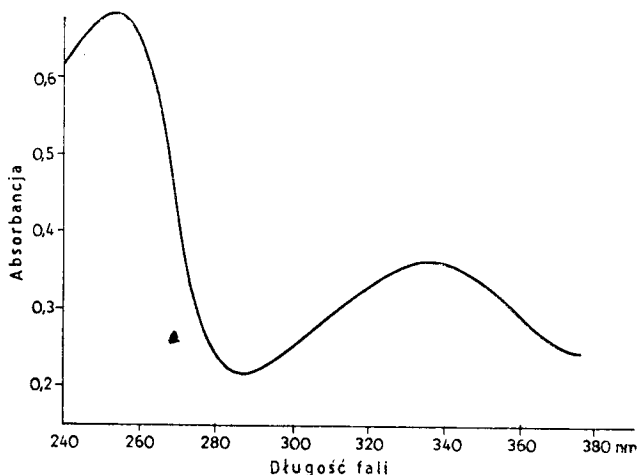
Pomiarów absorbancji dokonano w zakresie 240—380 nm w kwarcowych naczyńkach o 1 cm warstwie przepuszczającej i przy użyciu spektrofotometru VSU-2P.

Wartość proponowanej techniki oznaczeń DNS-aminokwasów oceniono poprzez analizę statystyczną uwzględniając: współczynniki korelacji, równania prostych regresji oraz test F do sprawdzenia hipotezy zerowej H₀ (3, 11).

BADANIA WŁASNE

Wyznaczanie widma UV DNS-aminokwasów

Przedmiotem badania było osiemnaście wymienionych standardów w metanowych roztworach o stężeniu 50×10^{-9} mola/ml. Dokonano pomiarów absorbancji co dwie jednostki w zakresie 240—380 nm. Rycina przedstawia na przykładzie DNS-proliny typowe dla wszystkich DNS-aminokwasów widmo o charakterystycznym maksimum przy 252 nm.



Ryc. 1. Widmo absorpcyjne DNS-proliny
The absorptive spectrum of DNS-proline

Absorbancja przy 252 nm dla różnych stężeń
DNS-aminokwasów

Odczytane absorbancje (A_D) przy 252 nm dla wszystkich wzorców i stężeń zamieszczono w tab. 2.

Statystyczne opracowanie wyników

Na wstępie określano zależność liniową między absorbancją i stężeniem w układzie współrzędnych, a dopiero następnie potwierdzono ją przez wyznaczenie współczynników korelacji (r) oraz równań prostych regresji dla wszystkich DNS-aminokwasów. Współczynniki kierunkowe a i b równań regresji o ogólnej postaci (wzór 1) obliczano za pomocą wzorów 2 i 3.

$$y = a + bx \text{ ————— 1.}$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \text{ ————— 2.}$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \text{ ————— 3.}$$

gdzie: x — stężenie DNS-aminokwasów w molach/ml, y — absorbancja przy 252 nm,
 n — ilość prób odpowiadająca stosowanym stężeniom DNS-aminokwasów.

Wstawiając do wzoru 1 stosowane stężenia DNS-aminokwasów (c) obliczano absorbancję teoretyczną A_T . Uwzględniając powyższe otrzymano zależność (wzór 4):

$$A_T = a + bc \text{ ————— 4.}$$

Następnie we wzorach 1, 2 i 3 dokonywano odwrotnej operacji, wstawiając absorbancję zamiast x oraz stężenie DNS-aminokwasów w miejsce y. W ten sposób doprowadzono wzór 1 do postaci przedstawionej wzorem 5 z nowymi współczynnikami kierunkowymi a' i b' :

$$c_T = a' + b'A_D \text{ ————— 5.}$$

gdzie: c_T — stężenie teoretyczne DNS-aminokwasów w molach/ml, A_D — absorbancja doświadczalna przy 252 nm.

Współczynniki korelacji, równania 4 i 5 badanych DNS-aminokwasów zestawiono w tab. 1. Dalszą stosowaną czynnością było sprawdzenie hipotezy zerowej przy wykorzystaniu testu F:

$$\sqrt{H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_{18} \text{ i } \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{18}}$$

Tab. 1. Współczynniki korelacji (r), równania prostych regresji przedstawiające zależność absorbancji teoretycznej (A_T) i stężenia (c) oraz stężenia teoretycznego (c_T) i absorbancji doświadczalnej (A_D) poszczególnych DNS-aminokwasów (DNS-AK). The coefficients of correlation (r) the equation of the straight lines of the regression showing the dependence of the theoretical absorbance (A_T) and concentration (c) and theoretical concentration (c_T) and experimental absorbance (A_D) of individual DNS-amino acids (DNS-AK)

Lp.	DNS-AK	r	$A_T = a + bc$	$c_T = a + b A_D$
1	DNS-Ala	0,990	$A_T = 0,4 + 11,56 c$	$c_T = -0,027 + 0,087 A_D$
2	DNS-Arg	0,990	$A_T = -0,7 + 10,09 c$	$c_T = 0,102 + 0,099 A_D$
3	DNS-Asp	0,999	$A_T = -8,4 + 12,32 c$	$c_T = 0,705 + 0,081 A_D$
4	DNS-Asp-NH ₂	0,990	$A_T = -3,1 + 12,51 c$	$c_T = 0,261 + 0,080 A_D$
5	DNS-Cys-SH	0,990	$A_T = 6,9 + 11,90 c$	$c_T = -0,558 + 0,084 A_D$
6	DNS-Fen	0,998	$A_T = 13,0 + 9,62 c$	$c_T = -1,340 + 0,104 A_D$
7	DNS-Glu	0,990	$A_T = -3,7 + 10,59 c$	$c_T = 0,358 + 0,094 A_D$
8	DNS-Glu-NH ₂	0,990	$A_T = 0,0 + 8,98 c$	$c_T = 0,016 + 0,111 A_D$
9	DNS-Ileu	0,999	$A_T = +2,2 + 9,50 c$	$c_T = -0,082 + 0,105 A_D$
10	DNS-Liz	0,990	$A_T = 2,7 + 11,93 c$	$c_T = -0,218 + 0,084 A_D$
11	DNS-Met	0,999	$A_T = 13,7 + 9,27 c$	$c_T = -1,449 + 0,108 A_D$
12	DNS-Pro	0,999	$A_T = -3,6 + 10,76 c$	$c_T = 0,342 + 0,093 A_D$
13	DNS-Pro-OH	0,990	$A_T = 0,4 + 12,68 c$	$c_T = -0,290 + 0,079 A_D$
14	DNS-Ser	0,990	$A_T = 3,8 + 13,52 c$	$c_T = -0,440 + 0,074 A_D$
15	DNS-Tre	0,999	$A_T = -5,2 + 8,50 c$	$c_T = 0,624 + 0,118 A_D$
16	DNS-Try	0,998	$A_T = 2,1 + 12,23 c$	$c_T = -0,161 + 0,082 A_D$
17	DNS-Tyr	0,998	$A_T = 19,1 + 25,01 c$	$c_T = -0,691 + 0,040 A_D$
18	DNS-Wal	0,999	$A_T = 16,0 + 8,02 c$	$c_T = 2,008 + 0,125 A_D$

Wreszcie w oparciu o wzór 4 obliczono absorbancje teoretyczne (A_T) i umieszczono je w tab. 2 obok absorbancji doświadczalnych (A_D). Ostatecznie dokonano oceny błędu (B) przy pomocy stosunku odchyłeń A_T i A_D do A_D według:

$$B = \frac{(A_D - A_T)}{A_D} 100\% \text{ ——— 6.}$$

Obliczone (na podstawie wzoru 6) wartości zamieszczono w tab. 2.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Na podstawie cytowanego piśmiennictwa wykazano, że do oznaczeń DNS-aminokwasów można stosować szereg sposobów polegających na

Tab. 2. Absorbancje doświadczalne (A_D) i teoretyczne (A_T) wraz z oceną względnego błędu w procentach (B) dla stężeń: 10X, 20X, 30X, 40X i 50×10^{-9} mola/ml DNS-aminokwasów wg kolejności tab. 1
 Experimental (A_D) and theoretical (A_T) absorbance along with relative error expressed in percentage (B) for the concentration: 10X, 20X, 30X, 40X and 50×10^{-9} mole/ml DNS-amino according to the succession of tab. 1

Lp.	$A_D \times 10^{-3}$	$A_T \times 10^{-3}$	B	Lp.	$A_D \times 10^{-3}$	$A_T \times 10^{-3}$	B	Lp.	$A_D \times 10^{-3}$	$A_T \times 10^{-3}$	B
118	116,0	103	1,7	103	102,2	128	0,8	128	127,2	127,2	0,6
228	231,6	210	1,6	210	208,1	253	0,9	253	254,0	254,0	0,4
350	347,2	312	0,8	7	314,0	382	0,6	13	380,8	380,8	0,3
460	462,8	415	0,6	415	419,9	505	1,2	505	507,6	507,6	0,5
580	578,4	530	0,3	530	525,8	636	0,8	636	634,4	634,4	0,2
99	100,2	91	1,2	91	90,0	140	1,1	140	139,0	139,0	0,7
200	201,1	180	0,5	180	180,0	278	0,0	278	274,2	274,2	1,4
304	302,0	266	0,7	8	270,0	410	1,5	14	409,4	409,4	0,2
407	402,9	360	1,1	360	360,0	550	0,0	550	544,6	544,6	1,0
500	503,8	450	0,8	450	450,0	680	0,0	680	679,8	679,8	0,1
117	114,8	100	1,9	100	97,2	81	2,9	81	79,8	79,8	1,6
232	238,0	190	2,4	190	192,2	162	1,2	162	164,8	164,8	1,7
362	361,2	281	0,2	281	287,2	250	2,2	15	249,8	249,8	0,8
492	484,4	390	1,5	390	382,2	330	2,0	330	334,8	334,8	1,4
603	607,6	475	0,8	475	477,2	420	0,5	420	419,8	419,8	0,1
123	122,0	122	0,8	122	121,7	122	0,2	122	124,4	124,4	1,9
248	247,1	242	0,4	242	240,7	252	0,5	252	246,7	246,7	2,1
370	372,2	357	0,6	10	359,7	365	0,7	16	369,0	369,0	1,1
495	497,3	485	0,5	485	478,7	493	0,7	493	491,3	491,3	0,3
625	622,4	597	0,4	597	597,7	613	0,1	613	613,6	613,6	0,1
120	126,0	112	4,7	112	106,4	262	5,3	262	269,2	269,2	2,7
250	245,1	193	2,0	193	199,1	525	3,1	525	519,3	519,3	1,1
368	364,2	290	1,1	290	291,8	760	0,6	17	769,4	769,4	1,1
485	483,3	384	0,4	11	384,5	1050	0,1	1050	1019,5	1019,5	2,9
598	602,4	480	0,7	480	477,2	1250	0,6	1250	1269,6	1269,6	1,5
107	109,2	102	2,1	102	104,4	67	2,3	67	64,0	64,0	4,7
216	205,4	216	4,9	216	212,4	140	1,7	140	144,0	144,0	2,8
292	301,6	317	3,2	12	320,4	225	1,1	18	224,0	224,0	0,4
400	397,8	426	0,5	426	428,4	306	0,6	306	304,0	304,0	0,7
496	494,0	535	0,4	535	536,4	385	0,3	385	384,0	384,0	0,2

określeniu intensywności fluorescencji. Znane są trzy rodzaje pomiarów: pierwszy, bezpośredni, na nośniku zarówno bibułowym jak i żelowym, oparty na specjalnych konstrukcjach zaopatrzonych w optykę kwarcową z przystosowanym systemem automatycznego zapisu; drugi dotyczy eluatów pochodzących z chromatogramów i trzeci — z wycieków kolumny. W każdym przypadku do ilościowego oznaczenia DNS-aminokwasów wymagany jest fluorometr, który jest przyrządem drogim i nie zawsze dostępnym.

W naszym Zakładzie podjęto badania nad ilościowym oznaczeniem DNS-aminokwasów techniką planimetrywania bibułowych elektroferogramów (7) oraz cienkowarstwowych chromatogramów (8). Obecna praca jest kontynuacją metodycznych rozważań nad ilościowym oznaczaniem DNS-aminokwasów. Punktem wyjścia było stwierdzenie, że wszystkie DNS-aminokwasy wykazują to samo maksimum absorpcji przy 252 nm. Na podstawie tej obserwacji wyłonił się pomysł spektrofotometrycznych oznaczeń DNS-aminokwasów przy powyższej długości fali.

W związku z tym sprawdzono założenie wstępne, które oparto na metanolowych roztworach osiemnastu standardów w pięciu różnych koncentracjach i określono absorbancję dla stosowanych stężeń wszystkich badanych substratów. Zauważono zależność liniową między absorbancją a stężeniem, gdy rozważano ten problem na płaszczyźnie w układzie współrzędnych w interpretacji graficznej. Celem zbadania stopnia zależności wyliczono współczynniki korelacji. Otrzymane wartości we wszystkich przypadkach były zbliżone do jedności, co jednoznacznie wskazywało na liniową funkcję absorbancji i stężenia. W dalszej kolejności wyznaczono równania 4 i 5 i zebrano je wraz ze współczynnikami korelacji w tab. 1. Opisane wyrażenia pozwalają na wyznaczenie absorbancji przy podanym stężeniu i odwrotnie. Ze względów praktycznych na uwagę zasługuje zależność liniowa przedstawiona wzorem 5, dającym możliwość wyliczenia stężenia ze znanej absorbancji.

Za pomocą testu F sprawdzono hipotezę zerową: $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_{18}$ i $\beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{18}$ na poziomie istotności 0,01 i stwierdzono, że jest nieuzasadnione poprowadzenie jednej wspólnej prostej regresji. Z drugiej strony współczynniki otrzymane dla prostych regresji na podstawie pięciu stężeń mogą być obciążone błędem, ale jest on niewielki przy współczynniku korelacji bliskim jedności. Dokonano oceny popełnionych błędów na podstawie odchyłeń względnych wyliczonych na podstawie wzoru 6 i zestawionych w tab. 2. W większości przypadków są one mniejsze od 1%, gdy pominie się najniższe rozcieńczenie badanych substratów. W konsekwencji prowadzi to do założenia, że opracowana spektrofotometryczna metoda oznaczeń DNS-aminokwasów jest pełnowartościową techniką ilościowego określania tych substratów.

PIŚMIENNICTWO

1. Boulton A., Chard N., Grant L.: *Biochem. J.* **96**, 69p—69p, 1965.
 2. Briert G., Neuhoff V.: *Z. Physiol. Chem.* **353**, 540—553, 1972.
 3. Elandt R.: *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń rolniczego*. PWN, Warszawa 1964.
 4. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.* **89**, 59 p—59p, 1963.
 5. Gros C., Labouesse B.: *Europ. J. Biochem.* **7**, 463—470, 1969.
 6. Hartley B., Massey V.: *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 58—70, 1956.
 7. Klimek J., Błaziak I., Jędrych M., Wawrzycki S.: *Annal. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin sect. D* **31**, 95—102, 1976.
 8. Klimek J., Błaziak I.: *Chem. Annal.* **19**, 539—544, 1974.
 9. Morse D., Horecker L.: *Annal. Biochem.* **14**, 429—433, 1966.
 10. Nota G., Marino G., Buonocore V., Ballio A.: *J. Chromatog.* **46**, 103—106, 1970.
 11. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczeń*. PWN, Warszawa 1962.
 12. Seiler N., Werner G., Weichmann M.: *Naturwiss.* **50**, 643, 1963.
 13. Seiler N.: *Angew. Chem.* **77**, 684, 1965.
 14. Seiler N., Weichmann M.: *Annal. Chem.* **220**, 109—127, 1966.
- Otrzymano 2 XII 1975.

РЕЗЮМЕ

Определено, что метаноловые растворы DNS-аминокислот имеют максимальную адсорбцию при 252 миллимикронах. Используя восемнадцать эталонов и статистическое исчисление, установлено, что DNS-аминокислоты могут быть определены в диапазоне 10^{-9} моль/мл.

SUMMARY

It was confirmed that methanol solutions of DNS-amino acids have a maximum absorption at 252 nm. Using eighteen standards and the mathematical method it has been shown that DNS-amino acids can be determined in the range of 10^{-9} mol/ml at this length.