

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK, Irena BŁAZIAK, Marian JĘDRYCH,
Jolanta WROŃSKA, Sławomir WAWRZYCKI

Oznaczanie DNS-aminokwasów wynikające z maksimum i minimum absorpcji w nadfiolecie

Определение DNS-аминокислот, возникающих из максимума и минимума
абсорпции в ультрафиолете

The Determination of DNS-amino Acids Depending on the Maximum and the
Minimum of Absorption in Ultra-Violet

Do oznaczania DNS-aminokwasów opracowano trzy metody. Dwie pierwsze wynikają z założenia, że logarytm stężenia DNS-aminokwasów jest proporcjonalny do powierzchni zalegania tych substratów na chromatograficznych nośnikach (3—6, 8). Trzecia dotyczy wykorzystania spektrofotometrii przy 252 nm jako analitycznej długości (7, 13). Prezentowana praca jest kontynuacją tego i zmierza do takiego rozwiązania, które nie wymagałoby przygotowania zestawu wzorców o zmieniającym się gradiencie stężenia i równocześnie dawałoby gwarancję wykorzystania łatwo dostępnej aparatury. Podstawę realizacji tego zamiaru stanowiło spostrzeżenie, że różnice absorbancji odniesione do maksimum i minimum przy 252 i 288 nm zmieniają się wraz ze stężeniem DNS-aminokwasów. W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy wspomniane różnice absorbancji są proporcjonalne do stężeń DNS-aminokwasów i czy mogą być wykorzystane do analizy powyższych substratów.

MATERIAŁY I METODY

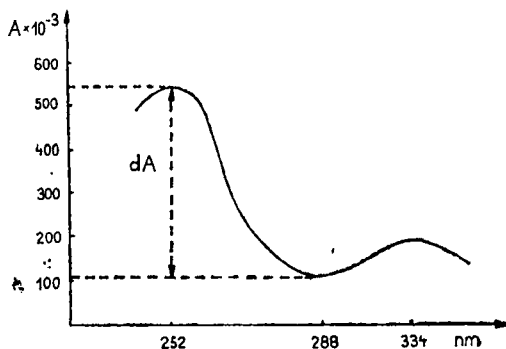
Odczynniki i wzorce — POCH-Gliwice. Chlorek wapnia bezw. — chlorek wapnia cz.d.a. prażono na palniku gazowym w tyglu porcelanowym przez 6 godz. Metanol bezw. — metanol cz.d.a. znad chlorku wapnia bezw. Zestaw 18 standardów DNS-

-aminokwasów — firmy Sigma. Dla każdego wzorca sporządzano metanolowe roztwory o koncentracji: 10×, 20×, 30×, 40× i 50×10⁻⁹ mola/ml. Roztwory przechowywano w probówkach ze szlifami firmy Quickfit w temp. 4°C. Pomiarów absorbancji powyższych roztworów dokonano przy użyciu spektrofotometru VSU-2P i kwarcowych kiuwet o warstwie przepuszczającej 1 cm. Do oceny proponowanej metody wykorzystano statystyczny rachunek (2, 10). Wyliczono współczynnik korelacji i równania prostych regresji. Zastosowano testy *F* i *t*-Studenta do sprawdzenia hipotez — $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_{18}, \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{18}$ oraz $H: \alpha = 0$.

BADANIA WIASNE

Wyznaczanie różnicy absorbancji dA

Dokonano pomiarów absorbancji w zakresie 240—380 nm i otrzymano widma o identycznym kształcie w odniesieniu do wszystkich przebadanych osiemnastu dansylowych pochodnych aminokwasów (ryc. 1). W następnej kolejności obliczono różnicę absorbancji dA , odejmując od absorbancji przy 252 absorbancję przy 288 nm oddzielnie dla każdego ze stosowanych standardów. Różnice absorbancji dA po uwzględnieniu stosowanych koncentracji DNS-aminokwasów zestawiono w tab. 1.



Ryc. 1. Charakterystyczny przebieg widm absorpcji DNS-aminokwasów w zakresie nadfioletu z zaznaczoną różnicą absorbancji dA występującą między maksimum 252 nm a minimum 288 nm

The characteristic course of the absorptive spectrum of the DNS-amino acids in ultraviolet with the difference of the absorbance dA marked between maximum 252 nm and minimum 288 nm

Określenie stężenia DNS-aminokwasów na podstawie różnicy absorbancji

Wyznaczone różnice absorbancji dA czterech pierwszych koncentracji porównywano za pomocą wzoru 1 z różnicą absorbancji dA_{50} , odpowiadają-

Tab. 1. Różnice absorbancji dA pomiędzy maksimum 252 nm i minimum 288 nm, odpowiadające 10X, 20X, 30X, 40X i 50×10^{-9} mola/ml osiemnastu DNS-aminokwasom — DNS-AK, zestawione ze stężeniami c obliczonymi na podstawie wzoru 1. The differences of the absorbance — dA between maximum 252 nm and minimum 288 nm adequate for 10X, 20X, 30X, 40X and 50×10^{-9} mol/ml of eighteen DNS-amino acids compared with concentration c calculated on the basis of formula 1

DNS-AK	$dA \times 10^{-3}$	$c \times 10^{-9}$	DNS-AK	$dA \times 10^{-3}$	$c \times 10^{-9}$	DNS-AK	$dA \times 10^{-3}$	$c \times 10^{-9}$
-Ala	105	10,2	-Glu	98	10,3	-Pro-OH	64	5,7
	211	20,5		190	19,8		221	19,8
	318	30,9		284	29,9		338	30,3
	420	40,8		374	39,1		442	39,6
	514	50,0		478	50,0		557	50,0
-Arg	90	9,8	-Glu-NH ₂	90	11,0		124	10,1
	158	17,3		178	21,8		242	19,7
	274	29,9		244	29,9	-Ser	367	30,0
	371	40,6		320	39,3		489	39,9
	457	50,0		407	50,0		612	50,0
-Asp	114	10,6	-Ile	83	9,6		69	9,4
	212	19,7		171	19,8		147	19,8
	327	30,3		261	30,1		225	30,4
	442	41,0		353	40,8		293	39,6
	539	50,0		433	50,0		370	50,0
-Asp-NH ₂	111	9,9		106	10,0		74	9,9
	221	19,8		199	18,7		152	20,5
	332	29,7		323	30,4		219	29,5
	439	39,2		433	40,8		299	40,3
	539	50,0		530	50,0		371	50,0
-Cys	102	9,8	-Lys	84	9,8		223	10,5
	203	19,6		169	19,7		445	21,0
	302	29,5		234	27,2		631	29,8
	397	38,8		332	38,6		887	41,9
	511	50,0		430	50,0		1059	50,0
-Phe	105	11,7	-Met	97	10,3		65	9,4
	204	22,7		187	19,7		128	18,5
	273	30,3		283	30,1		206	29,8
	348	42,7		380	40,4		275	39,7
	450	50,0		470	50,0		346	50,0
			-Pro					

jącą koncentracji 50×10^{-9} mola/ml — c_{50} i obliczano poszukiwane stężenie c . Różnice absorbancji dA porównano z otrzymanymi stężeniami DNS-aminokwasów — c i zestawiono w tab. 1.

$$c = \frac{c_{50} \times dA}{dA_{50}} \quad (1)$$

Statystyczne opracowanie wyników

Wstępne zestawienie wyników pozwoliło założyć, że istnieje liniowa zależność stężenia i różnicy absorbancji dla 18 badanych DNS-aminokwasów. Aby to potwierdzić określono za pomocą rachunku statystycznego współczynnik korelacji r , jako miarę współzależności liniowej między badanymi cechami (tab. 2). Tą drogą uzasadniono przypuszczenie o zależności stężenia i różnicy absorbancji, ponieważ otrzymane współczynniki korelacji były bliskie jedności. Następnie, wykorzystując rachunek wyrównawczy, otrzymano równania prostych regresji:

$$dA = a + bc \quad (2)$$

$$c' = a' + b'dA \quad (3)$$

gdzie: dA — różnica absorbancji, c i c' — stężenia DNS-aminokwasów w molach/ml, a i b oraz a' i b' — współczynniki kierunkowe równań regresji.

Do sprawdzenia hipotezy $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_{18}, \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{18}$ wykorzystano metodę statystyczną opartą na wnioskowaniu za pomocą testu istotności. Po weryfikacji hipotezy H_0 za pomocą testu F stwierdzono z ryzykiem 1%, że nie istnieje wspólna zależność liniowa dla wszystkich substancji i z tego powodu winna być ona określona oddzielnie dla każdego DNS-aminokwasu. Wzory 2 i 3 pozwalają przy znajomości jednej cechy wyliczyć wartości drugiej i odwrotnie. W tab. 2 zestawiono równania regresji 18 DNS-aminokwasów zgodnie ze wzorem 3. Przyjmując wartości stężeń opisane w materiałach i metodach jako c oraz obliczone ze wzoru 3 jako c' , określano względne błędy B za pomocą wyrażenia 4.

$$B = \frac{(c - c')}{c} 100\% \quad (4)$$

Otrzymane opisanym sposobem stężenia c' oraz błędy B zestawiono w tab. 3.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Dotychczasowe metody oznaczeń DNS-aminokwasów są trudne w realizacji ze względu na brak aparaturowego wyposażenia (1, 9, 11, 12). Wcześ-

Tab. 2. Współczynniki korelacji r oraz równania prostych regresji dla poszczególnych DNS-AKThe coefficients of correlation r and the regression equations for the particular DNS-amino acids

Lp.	DNS-AK	r	$c' = a' + b' dA$
1.	-Ala	0,9996	$c' = -0,520 + 0,097 dA$
2.	-Arg	0,9975	$c' = 1,623 + 0,105 dA$
3.	-Asp	0,9995	$c' = -0,229 + 0,092 dA$
4.	-Asp-NH ₂	0,9998	$c' = 0,184 + 0,089 dA$
5.	-Cys	0,9670	$c' = -6,993 + 0,115 dA$
6.	-Phe	0,9970	$c' = -2,933 + 0,119 dA$
7.	-Glu	0,9999	$c' = -0,762 + 0,108 dA$
8.	-Glu-NH ₂	0,9999	$c' = -1,966 + 0,129 dA$
9.	-Ile	0,9998	$c' = 0,519 + 0,113 dA$
10.	-Lys	0,9999	$c' = 0,662 + 0,092 dA$
11.	-Met	0,9973	$c' = 0,948 + 0,116 dA$
12.	-Pro	0,9999	$c' = -0,040 + 0,106 dA$
13.	-Pro-OH	0,9968	$c' = 3,399 + 0,082 dA$
14.	-Ser	0,9999	$c' = 0,010 + 0,082 dA$
15.	-Thr	0,9997	$c' = 0,497 + 0,134 dA$
16.	-Trp	0,9997	$c' = -0,078 + 0,135 dA$
17.	-Tyr	0,9986	$c' = -0,614 + 0,047 dA$
18.	-Val	0,9996	$c' = 1,440 + 0,140 dA$

niejsze próby oznaczeń tych substratów pozwoliły ustalić, że można dokonać wielu uproszczeń w tym zakresie, jednak najistotniejsza jest rezygnacja z kosztownych urządzeń. Dano temu wyraz poprzez opracowanie techniki planimetrycznej i spektrofotometrycznej w nadfiolecie. Jednak i w tym przypadku nie uniknięto potrzeby sporządzenia szeregu roztworów wzorcowych, których przygotowanie sprawia zawsze dużo kłopotu, zarówno ze względu na liczne pracochłonne czynności, jak też na ryzyko popełnienia błędu przy tak niskich stężeniach, rzędu 10^{-9} mola/ml. W związku z powyższym nasunęła się myśl opracowania takiego sposobu, który pozwoliłby zrezygnować z roztworów wzorcowych o różnych koncentracjach. Pomocne w tym względzie okazało się spostrzeżenie, że wszystkie DNS-aminokwasy mają wspólne dwa pasy na absorpcji: maksymalne — 252 nm i minimalne — 288 nm. W konsekwencji postanowiono sprawdzić, czy różnice absorbancji występujące przy tych długościach nie będą mogły być miarą ilości DNS-aminokwasów. Na wstępie przygotowano roztwory wzorcowe 18 DNS-aminokwasów, każdy w 5 koncentracjach. Zmierzone absorbancje dla stosowanych stężeń przedstawiono jako różnicę dA i zestawiono w tab. 1. Za pomocą wzoru 1, przyjmując koncentrację 50×10^{-9} mola/ml — c_{50} oraz różnicę absorbancji dla tego roztworu dA_{50} , określano stężenie c dla pozostałych DNS-aminokwasów na podstawie różnicy absorbancji dA odpowiadającej tym koncentracjom. Porównanie koncentracji obliczonych ze stosowanymi w doświadczeniach pozwoliło wyznaczyć średni względny błąd — 2,96%. Niewielka wartość tego błędu zachęciła do dalszych opracowań statystycznych. Wstępne usta-

Tab. 3. Obliczone stężenia c' DNS-aminokwasów na podstawie równań regresji i zestawione z wyznaczonymi błędami B w procentach
 The calculated concentration c' of DNS-amino acids on the basis of regression equation compared with the appointed errors B in percents

DNS-AK	$c' \times 10^3$	B	DNS-AK	$c' \times 10^3$	B	DNS-AK	$c' \times 10^3$	B
-Ala	9,70	3,00	-Glu	9,82	1,78	-Pro-OH	8,65	1,34
	20,01	0,07		19,76	1,20		21,52	7,60
	30,43	1,40		29,91	0,30		31,12	3,70
	40,35	0,88		39,63	0,93		39,64	0,90
	49,50	1,00		50,86	1,72		49,07	1,80
-Arg	11,07	10,70	-Glu-NH ₂	9,64	3,56	-Ser	10,18	1,80
	18,21	8,94		20,98	4,98		19,95	0,26
	30,39	1,31		29,51	1,63		30,10	0,35
	40,58	1,45		39,31	1,72		40,10	0,30
	49,61	0,78		50,54	1,05		50,20	0,40
-Asp	10,32	3,16	-Ile	9,90	1,02	-Thr	9,74	2,60
	19,38	3,10		19,84	0,80		20,19	0,98
	30,02	0,06		30,01	0,04		30,65	2,20
	40,88	1,64		40,41	1,02		39,76	0,60
	49,63	0,74		49,45	1,10		50,08	0,15
-Asp-NH ₂	10,14	1,40	-Lys	10,41	4,10	-Trp	9,91	0,90
	20,01	0,04		18,97	5,20		20,44	2,20
	29,96	0,12		30,38	1,30		29,49	0,20
	39,56	1,10		40,50	1,30		40,29	0,72
	50,33	0,66		49,42	1,20		50,00	—
-Cys-SH	10,24	2,40	-Met	10,69	6,90	-Tyr	9,87	1,30
	16,01	19,97		20,55	2,70		20,30	1,50
	27,74	7,50		28,09	6,40		29,04	3,20
	45,66	14,11		39,46	1,40		41,07	2,70
	51,77	3,54		50,83	1,70		49,16	1,70
-Phe	9,56	4,38	-Pro	10,24	2,40	-Val	10,54	5,40
	21,34	6,72		19,78	1,00		19,36	3,20
	29,55	1,50		29,95	0,14		30,28	0,93
	38,48	3,80		40,24	0,60		39,94	0,15
	50,62	1,20		49,78	0,40		49,88	0,24

lenia wykazały zależność liniową potwierdzoną przez współczynniki korelacji r , których wartości w każdym przypadku są bliskie jedności (tab. 2).

W celu uzasadnienia, czy poprawnie zostały wyznaczone zależności oraz ich ocena, obliczono błędy względne i zestawiono w tab. 3. Wskazują one, że w każdym przypadku poza DNS-cysteiną dokładność oznaczeń jest dobra. Prezentowane równania regresji mają małe współczynniki, co dowodzi, że w celach praktycznych istnieje możliwość określenia stężenia przy podanej różnicy absorbancji na podstawie wzoru 1. Stwierdzenie to wynika także z wniosków pochodzących ze sprawdzenia hipotezy $H:\alpha=0$ dla każdego DNS-aminokwasu w oparciu o test t-Studenta na poziomie istotności 0,01. Porównanie dwu różnych sposobów obliczania stężeń przy znajomości różnicy absorbancji: pierwszego na podstawie proporcji (wzór 1) i drugiego za pomocą równań prostych regresji, pozwala dostrzec, iż w pierwszym przypadku spełniony jest warunek, przy stężeniu równym 0 różnica absorbancji wynosi 0. Wynika więc stąd, że można przyjąć metodę opartą na proporcji (wzór 1) jako podstawę do wyliczenia nie znanej ilości DNS-aminokwasów.

Ostatecznie można postulować, że praktyczne oznaczenie nie znanego stężenia DNS-aminokwasu sprowadza się do określenia jego różnicy absorbancji przy długościach 252 i 288 nm i porównania jej za pomocą wzoru 1 z różnicą absorbancji w tym samym zakresie częstotliwości jednego wzorcowego DNS-aminokwasu.

PIŚMIENNICTWO

1. Brierl G., Neuhoff V.: *Z. Physiol. Chem.* **353**, 540—553, 1972.
2. Elandt R.: *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczałnictwa rolniczego*. PWN, Warszawa 1964.
3. Klimek J., Błaziak I.: *Biuletyn XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego*, 228—228, 1973.
4. Klimek J., Błaziak I.: *Biuletyn II Krajowej Konferencji Naukowej Chemii Aminokwasów i Peptydów*, 36—36, 1973.
5. Klimek J., Błaziak I.: *Chemia anal.* **19**, 539—544, 1974.
6. Klimek J., Błaziak I., Jędrzych M., Wawrzycki S.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sectio D* **31**, 95—102, 1976.
7. Klimek J., Iskierko J., Błaziak I., Jędrzych M., Wawrzycki S.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sectio D* **31**, 307—312, 1976.
8. Mierzejewski J.: *Chemia anal.* **17**, 297—305, 1972.
9. Nota G., Marino G., Buonocore V., Ballio A.: *J. Chromatog.* **46**, 103—106, 1970.
10. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczałnictwa*. PWN, Warszawa 1962.
11. Seiler N., Werner G., Weichmann M.: *Naturwiss.* **50**, 643—643, 1963.
12. Seiler N.: *Angew. Chem.* **77**, 684—684, 1965.

13. Wawrzycki S., Klimek J., Iskierko J., Błaziak I.: Biuletyn XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 121—122, 1974.

Otrzymano 25 V 1977.

РЕЗЮМЕ

Определено, что все DNS-аминокислоты имеют общее минимум и максимум абсорбции при 252 и 288 nm. Показано, что разницы абсорбации выступающие на этих длинах являются пропорциональные к концентрации и могут быть использованы при количественном определении DNS-аминокислот.

SUMMARY

It has been confirmed that all DNS-amino acids have the maximum and the minimum of absorption common at 252 and 288 nm. It has been shown that the differences of absorbancy appearing at these lengths are proportional to concentration and can be used to the quantitative determination of DNS-amino acids.