

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Janina Opieńska-Blauth

J. OPIEŃSKA-BLAUTH, H. KOWALSKA,
M. PIETRUSIEWICZ

Czułość próby ninhydrynowej dla aminokwasów w różnych warunkach doświadczalnych

**Чувствительность нингидриновой пробы
в хроматографическом анализе**

Sensitivity of the Ninhydrin Test in Chromatographic Analysis

W naszych poprzednich badaniach, wykazaliśmy, że szybkość występowania plam w próbie ninhydrynowej dla niektórych aminokwasów nie zawsze jest proporcjonalna do czułości próby dla tychże aminokwasów (4).

Jako typowe przykłady braku proporcjonalności mogą służyć histydyna i metionina, które zaliczyliśmy do pierwszej grupy aminokwasów pod względem szybkości występowania zabarwienia, a których czułość według niektórych autorów jest stosunkowo bardzo nieznaczna. Wyniki naszych poprzednich badań nasuwały jednakowoż wątpliwości odnośnie danych z piśmiennictwa w zakresie czułości, a w szczególności dla wyżej wymienionych aminokwasów: metioniny i histydyny. Dlatego też, uznaliśmy za wskazane przeprowadzić dodatkowe oznaczenia czułości próby ninhydrynowej dla aminokwasów w różnych warunkach doświadczalnych. Większość autorów przeprowadzała oznaczenia czułości po rozwinięciu chromatogramów dwukierunkowych stosując wywoływanie ninhydryną na gorąco w temperaturze 100°. Ponieważ w poprzednich naszych badaniach wykazaliśmy wyższość zimnego wywoływania ninhydryną interesowało nas obecnie, czy 1) ogrzewanie plam ninhydrynowych do 100°, 2) składniki faz rozwijających chromatogram i 3) stężenie roztworu ninhydryny wpływają w wyraźny sposób na zmianę czułości próby ninhydrynowej dla aminokwasów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do badań stosowano 28 wzorcowych aminokwasów o najwyższym gatunku czystości, przeważnie w oryginalnych, handlowych opakowaniach.

Czułość próby definiowano jako najmniejszą ilość danego aminokwasu, która w dokładnie określonych warunkach doświadczalnych daje wyraźne jeszcze zabarwienie w zimnej próbie ninhydrynowej po 24 godzinach, a po ogrzaniu do 100° w czasie 10 min.

Doświadczalne warunki badań:

Bibuła Whatmana Nr 1.

Średnica miejsca nanoszenia roztworu aminokwasu — 8 mm.

Objętość nanoszonego płynu — 2,6 μ l.

Ninhydryna — 0,2% roztwór acetonowy, a do badań porównawczych roztwory 0,05 i 1%.

Izatyna — 0,2% roztwór w acetonie + 4% kwasu octowego lodowatego.

Temperatura wywoływania: pokojowa (16—20°) odczyt po 24 godz.

Temperatura wywoływania: 100° w czasie 10 min.

Rozwijanie chromatogramów przeprowadzano w układach: propanol — woda (7 : 3), fenol — woda (7 : 3).

Pomiary powierzchni plam na chromatogramach przeprowadzono planimetrem.

Wpływ stężenia roztworu ninhydryny na czułość reakcji:

Do badań stosowano 3 różne stężenia roztworu ninhydryny 1%, 0,2% i 0,05%. Próby porównawcze przeprowadzano bezpośrednio na bibule bez rozwijania chromatogramów. Za podstawę do porównania przyjęto ze względów praktycznych czułość oznaczoną przy użyciu 0,2% roztworu ninhydryny.

Wszystkie badane aminokwasy dawały z 1% roztworem ninhydryny zabarwienie silniejsze niż z roztworami słabszymi 0,2 i 0,05%. Przy wywoływaniu rozcieńczonym roztworem ninhydryny (0,05%), plamy występowały później i natężenie barwy plam było słabsze niż przy wywoływaniu mocniejszym roztworem 0,2%. Przy zachowaniu granicznych stężeń aminokwasów dla roztworu ninhydryny 0,2% — roztwór 0,05% nie dawał zabarwienia po 24 godz. w 20° z wyjątkiem: histydyny, argininy, glicyny, seryny i kwasu glutaminowego, które dały w tych warunkach słabe zabarwienia.

Niekorzystną stroną wywoływania silniejszymi roztworami ninhydryny stanowi zabarwienie tła bibuły, które występuje już po kilku godzinach.

W niniejszej pracy nie przeprowadzono badań nad wpływem zmian w stężeniu jonów wodorowych roztworów aminokwasów

na czułość reakcji ninhydrynowej. Wszystkie badania przeprowadzono w roztworach obojętnych, albo słabo kwaśnych dla aminokwasów trudno rozpuszczalnych.

WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH

Tabela I

Czułość reakcji barwnej aminokwasów z ninhydryną (16—20°, 24 h) określana bezpośrednio na bibule bez rozwijania chromatogramów.

		Nleu														
		Thr														
		Lys														
		Asp														
		Orn														
		(CyS) ₂														
	Leu	Ala	GluNH ₂													
	Glu	Ileu	Tyr													
	Val	Phe	Nval													
	Ser	Try	Arg		Pro											α NH ₂ lbut ac
Gly	CySH	Met	His	AspNH ₂	Tau	DiJTyr										β-Ala
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII					XII > x

I. — 0,026 µg, II. — 0,032 µg, III. — 0,065, IV. — 0,130 µg, V. — 0,260 µg, VI. — 0,520 µg, VII. — 0,780 µg, VIII. — 1,040 µg, IX. — 1,300 µg, X. — 1,560 µg, XI. — 1,820 µg, XII. — 2,600 µg, XII > x; x > 2,600 µg.

Do wywoływania stosowano 0,2% roztwór acetonowy ninhydryny.

O b j a ś n i e n i a s k r ó t ó w:

Ala — Alanina, β-Ala — β-Alanina, α-NH₂ izobut. — Kwas α-amino-izomasłowy, Arg — Arginina, Asp — Kwas asparaginowy, Asp. NH₂ — Asparagina, CySH — Cysteina, Glu — Kwas glutaminowy, Glu. NH₂ — Glutamina, Gly — Glicyna, His — Histydyna, Ileu — Izoleucyna, Leu — Leucyna, Lys — Lizyna, Met — Metionina, Nleu — Norleucyna, Nval — Norwalina, Orn — Ornityna, Phe — Fenylalanina, Pro — Prolina, Ser — Seryna, Tau — Tauryna, Thr — Treonina, Try — Tryptofan, Tyr — Tyrozyna, Val — Walina, DiJTyr — Dwujodotyrozyna.

Tabela II

Czułość reakcji barwnej aminokwasów z ninhydryną (100°, 10 min.)
określana bezpośrednio na bibule bez rozwijania chromatogramu.

			Glu NH ₂																	
			Tyr																	
			Nval																	
			His																	
			Nleu																	
			Thr																	
		Ala	Lys																	
		β-Ala	Asp																	
		Leu	Orn																	
		Glu	Ileu	α-NH ₂ lbut.ac																
		Val	Phe	Pro					Tau											
		Ser	Try	Arg					AspNH ₂											
		Gly	Met	(CyS) ₂ *					CySH	DiJTyr										
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XII	>x							

Tabela III

Czułość reakcji barwnej aminokwasów z izatyną (110°, 10 min.)
określana bezpośrednio na bibule bez rozwijania chromatogramu.

			Ala																	
			(CyS) ₂	GluNH ₂																
			β-Ala	His																
			Leu	Lys	Tyr															
			Glu	Ileu	Nval				αNH ₂ lbut.ac											
			Val	Phe	Nleu				Tau											
			Ser	Try	Orn	Arg			AspNH ₂											
		Pro	Gly	Met	CySH	Asp			Thr	DiJTyr										
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XII	>x							

Tabela VI

Czułość reakcji barwnej aminokwasów z ninhydryną (16—20°, 24 h)
określana po rozwinięciu chromatogramu w układzie fenol-woda
(7 : 3)

					Lys												
					GluNH ₂				Tyr								
				(CyS) ₂	Nval			Met									
				Orn	Asp	Nleu	Pro		Try								DiJTyr
			Glu	Ala	AspNH ₂	Arg	Tau		Ileu								α-NH ₂ but. ac.
			Gly	Ser	CySH	His	Thr	Val	Leu	Phe							β-Ala
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XII > x					

Tabela VII

Czułość reakcji barwnej aminokwasów z ninhydryną (100°, 10 min)
określana po rozwinięciu chromatogramu w układzie fenol-woda
(7 : 3)

					α-NH ₂ but. ac.												
					Lys				Tyr								
				(CyS) ₂	Nval			Met									
			β-Ala	Orn	Asp	Nleu	Pro		Try								
			Glu	Ala	AspNH ₂	Arg	Tau		Ileu								
			Gly	Ser	CySH	His	Thr	Val	Leu	Phe							DiJTyr
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XII > x					

Tabela X
Czułość reakcji ninhydrynowej.

L. p.	Aminokwas	S Dent(1)	S Pratt(5) i Auclair	S Kirby(3) — Berry	S Saifer (6) i Oreskes	S Opieńska i wsp. Tabl. XI
		Technika dwukierunkowa fenol — woda Kollidyna— lutydyna		xx	bez rozwinięcia chromatogramu. Znormalizowane warunki x	bez rozwijania chromatogramu. Znormalizowane warunki. 0,2% ninhydryna, 20°, 24 h.
		μg	μg	μg	μg	μg
1.	Ala	2	0,2	0,5	0,2	0,065
2.	β-Ala	5	0,2	—	0,4	0,065*
3.	α-NH ₂ izobutyryl.ac.	4	—	—	—	0,26*
4.	Arg	15	4	1	0,2	0,13
5.	Asp	5	0,4	0,5	0,3	0,065
6.	Asp. NH ₂	5	1	0,7	1	0,26
7.	CySH	—	—	—	2,7	0,03
8.	(CyS) ₂	—	—	1	0,5	0,065
9.	Glu	3	0,1	0,5	0,3	0,03
10.	Glu.NH ₂	5	2	—	1,5	0,13
11.	Gly	1	0,1	0,25	0,2	0,02
12.	His	20	25	3,0	0,4	0,13
13.	Ileu	10	0,5	—	0,1	0,065
14.	Leu	10	0,5	2,0	0,1	0,03
15.	Lys	15	3	0,25	0,4	0,065
16.	Met	10	1	1	0,1	0,03
17.	Nleu	10	0,5	—	0,1	0,065
18.	Nval	5	0,5	—	0,1	0,13
19.	Orn	10	3	—	0,3	0,065
20.	Phe	10	5	2,5	0,7	0,065
21.	Pro	8	1	2,5	0,5	0,52
22.	Ser	2	0,3	0,5	0,2	0,03
23.	Tau	3	1	—	0,6	0,52
24.	Thr	10	2	1	0,1	0,065
25.	Try	20	3	3	0,2	0,065
26.	Tyr	15	3	3	0,2	0,13
27.	Val	3	0,2	2	0,1	0,03
28.	DijTyr	—	—	—	—	0,78

S = najmniejsza ilość aminokwasu, która daje zabarwienie w określonych warunkach doświadczalnych.

xx = brak danych o warunkach doświadczalnych.

x = wywoływano ninhydryną w 100°.

Tabela XI

Czułość reakcji ninhydrynowej (w 20° i 100°) i izatynowej.

L. p.	Aminokwas	S _A	S _B	K _t	S _c	K _{iz}
		μg	μg		μg	
1.	α-Ala	0,065	0,065	1	0,13	2
2.	β-Ala	—	0,065	—	0,13	2
3.	α-NH ₂ izobut. ac.	—	0,26	—	1,04	4
4.	Arg	0,13	0,26	2	0,78	3
5.	Asp	0,065	0,13	2	0,78	6
6.	Asp.NH ₂	0,26	0,52	2	1,04	2
7.	CySH	0,03	0,52	16	0,52	1
8.	(CyS) ₂	0,065	0,26	4	0,13	0,5
9.	Glu	0,03	0,065	2	0,13	2
10.	Glu.NH ₂	0,13	0,13	1	0,26	2
11.	Gly	0,02	0,065	3	0,13	2
12.	His	0,13	0,13	1	0,26	2
13.	Ileu	0,065	0,13	2	0,26	2
14.	Leu	0,03	0,065	2	0,13	2
15.	Lys	0,065	0,13	2	0,26	2
16.	Met	0,03	0,13	10	0,26	2
17.	Nleu	0,065	0,13	2	0,52	4
18.	Nval	0,13	0,13	1	0,52	4
19.	Orn	0,065	0,13	2	0,52	4
20.	Phe	0,065	0,13	2	0,26	2
21.	Pro	0,52	0,26	0,5	0,03	0,11
22.	Ser	0,03	0,065	2	0,13	2
23.	Tau	0,52	0,78	1,5	1,04	1,5
24.	Thr	0,065	0,13	2	1,04	8
25.	Try	0,065	0,13	2	0,26	2
26.	Tyr	0,13	0,13	1	0,52	4
27.	Val	0,03	0,065	2	0,13	2
28.	DiJTyr	0,78	0,78	1	1,56	2

S_A = czułość właściwa (bez rozwijania chromatogramu) ninhydryna 0,2%, 20°, 24 h.

S_B = czułość (bez rozwijania chromatogramu) ninhydryna 0,2%, 100°, 10 min.

$K_t = \frac{S_B}{S_A}$ = współczynnik temperatury

S_c = czułość (bez rozwijania chromatogramu) izatyna 0,2%, 100°, 10 min.

$K_{iz} = \frac{S_c}{S_B}$ = współczynnik czułości reakcji: izatyna do ninhydryny.

Tabela! XII

Czułość reakcji ninhydrynowej w chromatogramach jednokierunkowych: propanol — woda

L. p.	Aminokwas	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		S _A	S _D	P _D	S _{R1}	K _{P1}	K ₁	K _I
		µg	µg	mm ²	µg			
1.	Ala	0,065	0,52	175	0,43	3,5	8	2,5
2.	β-Ala	0,065	0,13	150	0,04	3	2	0,7
3.	α-NH ₂ izobut. ac.	0,26	0,52	130	0,20	2,6	2	0,8
4.	Arg	0,13	0,52	135	0,15	2,7	4	1,1
5.	Asp	0,065	0,52	95	0,27	1,9	8	4,5
6.	Asp.NH ₂	0,26	0,52	180	0,14	3,6	2	0,54
7.	CySH	0,03	0,26	120	0,11	2,2	6,7	3,7
8.	(CyS) ₂	0,065	0,26	90	0,14	1,8	4	2,1
9.	Glu	0,03	0,13	65	0,10	1,3	4,3	3,3
10.	Glu.NH ₂	0,13	0,26	140	0,10	2,8	2	0,8
11.	Gly	0,026	0,13	160	0,04	3,2	6,5	2,5
12.	His	0,13	0,26	80	0,16	1,6	2	1,2
13.	Ileu	0,065	1,56	130	0,56	2,6	26	9,3
14.	Leu	0,03	1,30	100	0,65	2	43	21,6
15.	Lys	0,065	0,26	120	0,19	2,4	5,8	3,1
16.	Met	0,03	1,04	120	0,43	2,4	34	14
17.	Nleu	0,065						
18.	Nval	0,13	0,52	150	0,17	3	4	1,3
19.	Orn	0,065	6,52	150	0,17	3	8,7	2,8
20.	Phe	0,065	1,56	130	0,60	2,6	26	10
21.	Pro	0,52	0,52	180	0,014	3,6	1	0,026
22.	Ser	0,03	0,26	160	0,08	3,2	8,6	2,6
23.	Tau	0,52	0,78	110	0,36	2,2	1,5	0,7
24.	Thr	0,065	1,04	120	0,43	2,4	17	7
25.	Try	0,065	1,82	120	0,76	2,4	30,3	12,7
26.	Tyr	0,13	0,78	250	0,16	5,0	6	1,2
27.	Val	0,03	1,5	120	0,54	2,4	50	18
28.	DijTyr	0,78						

1. S_A = czułość właściwa

2. S_D = czułość po rozwinięciu chromatogramu w propanolu

3. P_D = powierzchnia płamy chromatogramu w propanolu

4. S_{R1} = czułość zredukowana do powierzchni startowej

$$S_{R1} = \frac{S_D \cdot p}{P}, \quad p = 50.24 \text{ mm}^2 \text{ powierzchnia nakropienia.}$$

$$5. K_{p1} = \frac{P_D}{P}$$

$$6. K_1 = \frac{S_D}{S_A}$$

$$7. K_I = \frac{S_{R1}}{S_A}$$

Tabela XIII

Czułość reakcji ninhydrynowej w chromatogramach jednokierunkowych: fenol — woda

L. p.	Aminokwas	1. S _A	2 S _F	3. P _F	4. S _{R₂}	5. K _p	6. K ₂	7. K _{II}
		μg	μg	mm ₂	μg			
1.	Ala	0,065	0,26	60	0,22	1,2	4	3,4
2.	β-Ala	0,065	0,13	160	0,04	3,2	2	0,61
3.	α-NH ₂ izobut. ac.	0,26	0,52	160	0,16	3,2	2	0,61
4.	Arg	0,13	0,78	190	0,21	3,8	6	1,6
5.	Asp	0,065	0,52	180	0,14	3,6	8	2,1
6.	CySH	0,03	0,52	180	0,14	3,6	17	4,6
7.	(CyS) ₂	0,065	0,26	85	0,15	1,7	4	2,3
8.	AspNH ₂	0,26	0,52	200	0,13	4,0	2	0,5
9.	Glu	0,03	0,13	120	0,05	2,4	4,3	1,7
10.	Glu.NH ₂	0,10	0,52	280	0,09	5,6	5,2	0,9
11.	Gly	0,02	0,13	170	0,04	3,5	6,5	2
12.	His	0,13	0,78	250	0,16	5	6	1,2
13.	Ileu	0,065	1,56	160	0,49	3,2	9,3	7,8
14.	Leu	0,03	1,56	110	0,67	2,4	52	22
15.	Lys	0,065	0,52	140	0,19	2,8	8,7	3
16.	Met	0,065	1,04	130	0,41	2,6	17	6,8
17.	Nleu							
18.	Nval	0,03	0,52	230	0,11	4,6	17	3,7
19.	Orn	0,065	0,26	260	0,05	5,2	4,3	0,83
20.	Phe	0,065	1,82	180	0,51	3,6	30	8,5
21.	Pro	0,52	1,04	220	0,24	4,4	2	0,46
22.	Ser	0,03	0,26	170	0,07	3,5	8,6	2,3
23.	Tau	0,52	1,04	140	0,37	2,8	2	0,7
24.	Thr	0,065	1,04	170	0,31	3,5	16	4,7
25.	Try	0,065	1,56	170	0,46	3,5	24	7
26.	Tyr	0,13	1,04	280	0,19	5,6	8	1,4
27.	Val	0,03	1,30	140	0,47	2,8	43	16
28.	DijTyr							

1. S_A = czułość właściwa2. S_F = czułość po rozwinięciu chromatogramu w fenolu3. P_F = powierzchnia po rozwinięciu chromatogramu w fenolu4. S_{R₂} = czułość zredukowana do powierzchni startowej5. K_p = $\frac{P_F}{p}$, p = 50.24 mm² powierzchnia nakroplenia6. K₂ = $\frac{S_F}{S_A}$ 7. K_{II} = $\frac{S_{R_2}}{S_A}$

Tabela XIV

Czułość reakcji ninhydrynowej w chromatogramach dwukierunkowych: propanol — woda, fenol — woda.

L. p.	Aminokwas	1. S _A	2. S _H	3. P _H	4. S _{R3}	5. K _{p3}	6. K ₃	7. K _{III}
		μg	μg	mm ₂	μg			
1.	Ala	0,065	0,78	150	0,24	3	12	3,7
2.	β-Ala	0,065	0,26	200	0,06	4	4	0,9
3.	α-NH ₂ izobut. ac.	0,26	1,04	150	0,26	3	4	1
4.	Arg	0,13	0,78	180	0,22	3,6	6	1,7
5.	Asp	0,065	1,04	160	0,33	3,2	16	5
6.	Asp.NH ₂	0,26	1,04	120	0,43	2,4	4	1,6
7.	CySH	0,03	0,52	260	0,1	5,2	17	3,3
8.	(CyS) ₂	0,065	0,52	260	0,1	5,2	8	1,5
9.	Glu	0,03	0,52	140	0,19	2,8	17	6,3
10.	Glu.NH ₂	0,13	1,04	160	0,33	3,2	8	2,5
11.	Gly	0,026	0,52	180	0,14	3,6	20	5,3
12.	His	0,13	0,78	180	0,22	3,6	6	1,7
13.	Ileu	0,065	1,56	140	0,56	2,8	24	8,6
14.	Leu	0,03	1,30	140	0,46	2,8	43	15
15.	Lys	0,065	0,78	150	0,26	3	12	4
16.	Met	0,03	1,30	140	0,47	2,8	43	16
17.	Nleu	0,065						
18.	Nval	0,13	1,04	180	0,29	3,6	8	2,2
19.	Orn	0,065	0,78	180	0,22	3,6	12	3,4
20.	Phe	0,065	1,56	130	0,6	2,6	24	9
21.	Pro	0,52	1,04	340	0,15	10,7	2	0,2
22.	Ser	0,03	0,52	300	0,07	6,0	17	2,3
23.	Tau	0,52	1,04	140	0,37	2,8	2	0,7
24.	Thr	0,065	0,78	160	0,24	3,9	12	3,9
25.	Try	0,065						
26.	Tyr	0,13	1,04	150	0,35	3,0	8	2,8
27.	Val	0,03	1,30	140	0,29	2,8	43	9,6

1. S_A = czułość właściwa

2. S_H = czułość po rozwinięciu chromatogramu dwukierunkowego propanol, fenol

3. P_H = powierzchnia plamy na chromatogramie

4. S_{R3} = czułość zredukowana do powierzchni startowej nakroplenia

$$5. K_p = \frac{P_H}{p}$$

$$6. K_3 = \frac{S_H}{S_A}$$

$$7. K_{III} = \frac{S_{R3}}{S_A}$$

Tabela XV

Wpływ rozwijania chromatogramu na czułość reakcji ninhydrynowej.

L. p.	Aminokwas*	R _F dropanol	R _F fenol	K _I	K _{II}	K _{III}
1.	Asp	,28	,19	4,5	2,1	5,0
2.	CySH			3,7	4,6	3,3
3.	(CyS) ₂	,14		2,1	2,3	2,5
4.	Glu	,33	,31	3,3	1,7	6,3
5.	Ser	,27	,36	2,6	2,3	2,3
6.	Asp.NH ₂	,17	,40	0,54	0,5	1,6
7.	Gly	,31	,41	2,5	2,0	5,3
8.	Tau	,33	,41	0,7	0,7	0,7
9.	Lys	,11	,49	3	3,1	4,0
10.	Orn	,40	,50	2,8	0,83	3,4
11.	Tyr	,44	,51	1,2	1,4	2,8
12.	GluNH ₂	,22	,57	0,8	0,9	2,5
13.	Ala	,42	,60	2,5	3,4	3,7
14.	β-Ala		,66	0,7	0,6	0,9
15.	His	,24	,69	1,2	1,2	2,7
16.	α-NH ₂ izobut. ac.		,74	0,8	0,6	1,0
17.	Try	,41	,75	12,7	7,0	10,0
18.	Val	,55	,78	18,0	16,0	9,8
19.	Thr		,79	7,0	4,7	3,9
20.	Met	,55	,81	14,0	6,8	16,0
21.	Leu	,65	,84	21,6	22,0	15,0
22.	Ileu	,65	,84	9,3	7,8	8,6
23.	Phe	,57	,85	10,0	8,5	9,0
24.	Pro	,48	,88	0,03	0,46	0,2
25.	Arg	,12	,89	1,1	1,6	1,7

* Kolejność aminokwasów według wzrastającego R_F w fenolu.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Dane liczbowe odnośnie czułości reakcji ninhydrynowej dla poszczególnych aminokwasów podawane w piśmiennictwie przez różnych autorów, nie są między sobą zgodne. Uderzające są niezgodności, szczególnie w wynikach Denta w porównaniu z danymi innych autorów. (Tab. X). Dla wielu aminokwasów różnice są nawet

dziesięciokrotne. Dent wykazuje w swoich oznaczeniach znacznie mniejszą czułość dla aminokwasów niż Pratt i Auclair, Kirby-Berry, Saifer i Oreskes. Na podkreślenie zasługuje fakt, że autorzy przeprowadzali swoje badania w różnych warunkach doświadczalnych. Wiele obserwacji przemawia za tym, że na przebieg reakcji ninhydrynowej mogą mieć wpływ, nie tylko swoistość odczynu w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów, ale i warunki doświadczalne stosowane przy rozwijaniu i wywoływaniu chromatogramu, jak np. składniki fazy rozwijającej, stężenie roztworu ninhydryny, temperatura, czas wywoływania i inne. Ponadto podkreślić należy, że różnice w czułości są spowodowane przede wszystkim niejednakową powierzchnią plam. Zarówno Dent jak Pratt i Auclair, Kirby-Berry nie uwzględniali w swoich oznaczeniach różnic w wielkości powierzchni plam.

Powierzchnie plam dla poszczególnych aminokwasów nie wykazują wyraźnej liniowej zależności od stężeń. Nawet przy zachowaniu dokładnie takich samych warunków doświadczalnych przy tych samych stężeniach użytych aminokwasów powierzchnie plam nie są jednakowe. Zdaniem naszym oznaczenia czułości reakcji barwnej dla aminokwasów po rozwinięciu chromatogramu bez uwzględnienia wielkości powierzchni nie mogą być miarodajne. Nasze obserwacje wykazują wyraźnie, że czułość reakcji ninhydrynowej zmienia się niejednakowo dla poszczególnych aminokwasów po rozwinięciu chromatogramu. Podjęliśmy zadanie porównania wpływu zmieniających się warunków doświadczalnych podczas rozwijania i wywoływania chromatogramu, a mianowicie składników fazy rozwijającej, stężenia roztworu ninhydryny, temperatury wywoływania, wymiarów powierzchni plam, na czułość 28 aminokwasów wzorcowych. Do porównania służyły czułości reakcji ninhydrynowej dla tychże aminokwasów oznaczone bezpośrednio bez rozwijania chromatogramu, („czułości właściwe”) w znormalizowanych warunkach. W zakres znormalizowanych warunków wchodziły: gatunek bibuły, powierzchnia naniesienia roztworu aminokwasu, objętość badanego roztworu, stężenie roztworu ninhydryny, temperatura i czas wywoływania.

Istotną różnicę między warunkami naszych badań i analogicznych Saifera i Oreskesa stanowiła temperatura wywoływania. Saifer i Oreskes oznaczali czułość aminokwasów również bezpośrednio na bibule w znormalizowanych warunkach bez rozwijania chromatogramu. Dla większości aminokwasów czułości

właściwe uzyskane w naszych badaniach były wyższe od analogicznych Saifera i Oreskesa. (Tab. X.). Największe różnice wykazały aminokwasy: cysteina i fenyloalanina, a najmniejsze: ornityna, alanina, asparagina, kwas asparaginowy, histydyna, leucyna, metionina, tauryna, tryptofan i walina.

Nasze badania porównawcze czułości właściwej oznaczanej bezpośrednio w różnych temperaturach wywoływania ninhydryną, wykazały dla większości aminokwasów wyższość tak zwanego przez nas zimnego testu ninhydrynowego. Wyjątek stanowiły tylko trzy aminokwasy: β -alanina, kwas α -aminoizomasłowy i prolina, dla których czułość uzyskana w 100° wywoływania była wyższa w porównaniu z testem zimnym. Dla cysteiny i metioniny czułość znacznie maleje wraz z wzrostem temperatury. Wpływem temperatury na reakcję ninhydrynową zajmowali się K a y i wsp. (2). Autorzy opierając się na swych badaniach zalecają wywoływanie ninhydryną w temperaturze nie wyższej od 60°, ponieważ produkty barwne reakcji ulegają w wyższej temperaturze rozkładowi.

Oprócz reakcji ninhydrynowej stosuje się jeszcze dla identyfikacji aminokwasów i inne testy barwne, jak próby z izatyną lub alloxanem. Według badań porównawczych Saifera i Oreskesa test ninhydrynowy jest wielokrotnie czulszy od izatynowego i alloxanowego. Z naszych badań (Tab. XI) wynika również, że test izatynowy jest mniej czuły od ninhydrynowego. Różnice są tylko dwukrotne dla większości aminokwasów na niekorzyść testu izatynowego. Dla niektórych tylko aminokwasów test izatynowy jest czulszy od ninhydrynowego. Czułość próby izatynowej dla proliny jest wiele razy wyższa od ninhydrynowej. Dla ornityny, treoniny, kwasu asparaginowego, tyrozyny, norwaliny i norleucyny współczynniki K wyrażające stosunek czułości testu izatynowego do ninhydryny są wyższe od 4.

Wpływ stężenia ninhydryny, w roztworach wywołujących, na czułość reakcji nie był dotychczas przedmiotem systematycznych badań. Najczęściej stosuje się do prób roztwory 0,2—0,5%. W naszych badaniach stosowano wyłącznie roztwory 0,2%. Badania porównawcze przeprowadzone z roztworami ninhydryny o wyższym i niższym stężeniu od 0,2% wykazały, że czułość testu ninhydrynowego zmienia się proporcjonalnie wraz z stężeniem. Przy użyciu roztworu 1% uzyskuje się bezsprzecznie większą czułość dla wszystkich aminokwasów w porównaniu z 0,2%. I odwrotnie przy zastosowaniu roztworu

0,05% ninhydryny nie uzyskano już zabarwienia dla większości aminokwasów użytych w tych samych stężeniach, które stanowiły o ich czułości przy wywoływaniu ninhydryną 0,2%. Mimo pozornych korzyści, które daje 1% ninhydryna wskazane jest stosowanie roztworów słabszych 0,2—0,5%, bowiem roztwory mocniejsze dają już po kilku godzinach silnie zabarwione tło bibuły, na skutek czego plamy zacierają się i są trudne do identyfikacji. Natomiast 0,05% roztwór ninhydryny, jakkolwiek nie daje zabarwienia bibuły nawet po kilku dniach jest mniej dogodny do wywoływania, ponieważ czułość próby przy tym stężeniu jest zbyt mała.

Większość autorów zajmujących się określaniem czułości reakcji ninhydrynowej określonej na rozwiniętych chromatogramach nie uwzględniała różnic w powierzchni plam. Stanowi to poważny błąd, ponieważ, jak wiadomo, powierzchnie plam różnych aminokwasów nie są w liniowej zależności od ich stężenia. Prawdopodobnie i inne jeszcze czynniki, jak adsorbcja i szybkość migracji po bibule wpływają na wielkość plam. Trudności w ocenie czułości reakcji ninhydrynowej dla poszczególnych aminokwasów określonych na podstawie plam na rozwiniętych chromatogramach potęgował jeszcze i ten fakt, że powierzchnie plam poszczególnych aminokwasów, mimo jednakowych warunków doświadczalnych, nie były równe. Nasze zestawienia czułości aminokwasów oznaczanych na chromatogramach jedno i dwukierunkowych w układach: propanol-woda i fenol-woda (Tab. XII—XIV) wykazują rolę wielkości powierzchni. Dla celów porównawczych służyć mogą właściwie tylko „czułości zredukowane”, czyli te najmniejsze ilości aminokwasów, które dają jeszcze zabarwienia z ninhydryną, jeżeli plamy na rozwiniętych chromatogramach odpowiadają powierzchni startowej. Gdyby czułość reakcji po zredukowaniu jej do powierzchni startowej była zależna wyłącznie tylko od stężenia aminokwasu i powierzchni plamy, czułość właściwa równałaby się czułości zredukowanej. Dla niektórych tylko aminokwasów współczynnik będący ilorazem czułości zredukowanej przez czułość właściwą zbliża się do jedności. Wyższe współczynniki K dla większości aminokwasów wskazują na wpływ jeszcze i innych czynników działających podczas rozwijania chromatogramu. Mogłyby to być: zarówno wpływ śladów rozpuszczalnika, w naszym przypadku propanolu lub fenolu, względnie adsorbcja na bibule.

Zestawienie współczynników K pozwala wyprowadzić następujące wnioski:

1) Niema większych różnic między czułością zredukowaną w propanolu i fenolu.

2) Powierzchnie plam w chromatogramach rozwijanych fenolem są większe od analogicznych rozwijanych w propanolu.

3) Między czułością zredukowaną oznaczoną z chromatogramu dwukierunkowego (fenol i propanol) a czułościami oznaczonymi w chromatogramach jednokierunkowych fenolu, bądź propanolu, niema wyraźnych i jednakowych zależności.

Dla niektórych aminokwasów współczynnik K_{III} z chromatogramu dwukierunkowego, będący ilorazem czułości zredukowanej do czułości właściwej, jest sumą współczynników K_I (propanol) i K_{II} (fenol), dla innych dominujący jest wpływ fenolu lub propanolu.

Przegląd współczynników K będących wskaźnikami zmian w czułości przy rozwijaniu chromatogramów w propanolu i fenolu uzasadnia podział aminokwasów na 3 grupy;

I grupa: β -alanina, kw. α -aminoizomasłowy, prolina, tauryna, (Współczynniki K są mniejsze od jednośc. Wpływ rozwijania chromatogramu jest korzystny dla czułości reakcji ninhydrynowej).

II grupa: kwas asparaginowy, cysteina, cystyna, kwas glutaminowy, seryna, asparagina, glicyna, ornityna, tyrozyna, glutamina, alanina, histydyna, treonina, lizyna, arginina. (Współczynniki K wahają się w granicach 1—5. Rozwijanie chromatogramów wpływa nieznacznie na zmniejszenie czułości).

III grupa: tryptofan, walina, metionina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina. (Współczynniki K są wyższe od 10. Rozwijanie chromatogramu wpływa w znacznym stopniu na zmniejszenie czułości reakcji ninhydrynowej).

Widoczne jest, że dla aminokwasów o małych współczynnikach R_F , wpływ rozpuszczalnika, i adsorbcji bibuły podczas migracji jest nieznaczny. Współczynniki K zbliżone do jednośc wskazują, że czułości aminokwasów oznaczone na rozwiniętych chromatogramach, po eliminowaniu czynnika powierzchni, odpowiadają czułości właściwej oznaczanej bezpośrednio na bibule. Wysokie współczynniki K , powyżej 10, znaleziono wyłącznie dla aminokwasów o najwyższym współczynniku R_F w fenolu: jak np: fenyloalaniny, leucyny, izoleucyny, tryptofanu i waliny. Dla tych aminokwasów straty podczas rozwijania chromatogramu są najwyższe.

Interpretacja wyników badań nad czułością histydyny i metioniny budzi szczególne zainteresowanie. W stosunku do obu tych

aminokwasów panuje duża rozbieżność i charakteryzuje je niezgodność wyników podawanych przez różnych autorów. I tak, Dent, Kirby-Berry, Pratt i Auclair zaliczają histydynę i metioninę do najmniej czułych aminokwasów. Należy jednak przypomnieć, że autorzy ci opierali swoje oznaczenia czułości na rozwiniętych chromatogramach bez uwzględnienia wymiarów powierzchni plam. Według Denta czułość dla histydyny jest dwudziestokrotnie mniejsza niż dla glicyny, dla której czułość w reakcji ninhydrynowej jest uznana, przez większość autorów, za najwyższą. Dla metioniny czułość jest dziesięciokrotnie niższa od glicyny. Według Pratta czułość histydyny jest aż 250 razy niższa od czułości dla glicyny, a dla metioniny różnica jest taka sama, jak u Denta. Wyniki badań Saifera i Oreskesa przeprowadzonych bez rozwijania chromatogramu znacznie odbiegają od poprzednio podanych. Czułość dla histydyny jest już tylko dwukrotnie niższa od czułości dla glicyny, a metionina należy według nich do grupy najczulszych dla testu ninhydrynowego. Otrzymane przez nas wyniki dotyczące obu tych aminokwasów stanowią potwierdzenie naszych przypuszczeń podanych w założeniach pracy o doniosłym wpływie na czułość próby ninhydrynowej wielu czynników: temperatury wywoływania, stężenia odczynnika wywołującego, oraz tych warunków, które wynikają z samego rozwijania chromatogramu (skład fazy rozwijającej, wpływ śladów rozpuszczalnika organicznego, wielkość powierzchni plam, adsorbcja bibuły i inne bliżej nieokreślone).

Tabela XVI

Zestawienie danych liczbowych czułości reakcji ninhydrynowej dla histydyny i metioniny

Aminokwas	S _A	S _D	S _{R1}	S _F	S _{R2}	S _H	S _{R3}	K _I	K _{II}	K _{III}
	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg			
Histydyna	0,13	0,26	0,16	0,78	0,16	0,78	0,22	1,2	1,2	2,7
Metionina	0,03	1,04	0,43	1,04	0,41	1,3	0,47	14	6,8	16

Z naszych danych liczbowych wynika wyraźnie, że histydyna należy do najmniej czułych na ninhydrynę aminokwasów, chociaż pod względem szybkości występowania plamy w zimnym teście ninhydrynowym należy do grupy pierwszej. Stanowi to potwierdzenie

naszego przypuszczenia, że szybkość występowania zabarwienia w próbie ninhydrynowej jest cechą właściwą dla aminokwasów w pewnym stopniu niezależną od czułości. Wpływ rozwijania chromatogramu na histydynę po wyeliminowaniu czynnika wielkości powierzchni jest właściwie niewielki. Współczynniki K zbliżają się do jedności.

Zupełnie inaczej przedstawia się zagadnienie dotyczące metioniny. Metionina należy zarówno pod względem szybkości występowania plamy, jak i czułości, do grupy pierwszej. Dla metioniny zaznacza się duży wpływ rozwijania chromatogramu. Nawet po wyeliminowaniu czynnika powierzchni różnica między czułością właściwą a zredukowaną jest znacznie wyższa niż dla histydyny. Świadczą o tym wysokie współczynniki K wahające się w granicach od 7 do 16.

Interpretacja chromatograficzna tych obu aminokwasów musi być szczególnie ostrożnie przeprowadzona w oparciu o znajomość ich swoistego zachowania w próbie ninhydrynowej. Z naszych doświadczeń wynika, że reakcja ninhydrynowa stosowana ogólnie dla wykrywania aminokwasów jest szczególnie trudna dla interpretacji w analizie chromatograficznej. W pierwszym rzędzie podkreślić należy jej swoistość w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów, zarówno pod względem barwy, jak i natężenia.

W poprzednich naszych badaniach wykazaliśmy jeszcze jedną cechę swoistą związaną z reakcją ninhydrynową, a mianowicie szybkość występowania plam w określonych warunkach doświadczalnych. Różnice szybkości występowania plam poszczególnych aminokwasów w tak zwanym zimnym teście ninhydrynowym stały się podstawą dla podziału aminokwasów na kilka grup: szybkich, średnich i wolnych.

Z naszych terażniejszych badań wynika, że czułość reakcji ninhydrynowej dla poszczególnych aminokwasów jest swoista, ale mają na nią wpływ zarówno temperatura wywoływania, stężenie roztworu ninhydryny, powierzchnie plam, składnik fazy rozwijającej, adsorbcja na bibule i inne jeszcze bliżej nieznanne czynniki.

Nasze dane liczbowe odnoszące się do zmian czułości w różnych warunkach doświadczalnych zebrane w tabelach XII—XV nie stanowią bynajmniej wartości bezwzględnych, stałych, charakterystycznych i dokładnie powtarzalnych. Stanowią one zestawienia robocze, które posłużyły nam do wyprowadzenia pewnych zależności potrzebnych dla oceny reakcji ninhydrynowej i określenia jej stosowności.

Rozważania analityczne i cała dyskusja mają dla nas również znaczenie praktyczne. Wskazują bowiem na konieczność ostrożnej i krytycznej interpretacji chromatogramów aminokwasowych. Jeśli nawet w badanych przez nas mieszaninach, o nieznanym składzie jakościowym i ilościowym, wszystkie aminokwasy będą się znajdowały w rzędzie tych samych stężeń, nie zawsze uda się nam je wykryć. Nie wykryjemy bowiem tych, których czułość właściwa jest wybitnie mała, jak i tych, których czułość znacznie się zmniejsza w czasie rozwijania chromatogramu. Dlatego też każdorazowa ocena chromatogramu aminokwasowego wymaga dokładnej znajomości swoistego zachowania się poszczególnych aminokwasów w różnych warunkach rozwijania i wywoływania chromatogramu.

PIŚMIENNICTWO

1. Dent L. E.: *Biochem. J.*, 43, 168, 1948.
2. Kay R. E., Harries C., Enteman C.: *Arch. Biochem., Biophys.* 64, 14 (1956).
3. Kirby-Berry H., Saton H. E., Cain L., Berry Y. S.: *Univ. Texas. Publ.*, 5109, 22, 1951.
4. Opińska-Blauth, Kowalska H., Pietrusiewicz M.: *Acta Biochim. Polon.* 1956. (w druku).
5. Pratt J. J., Auclair J. L.: *Science* 108, 213, 1948.
6. Saifer A., Oreskes J.: *Anal. Chem.*, 28, 501, 1956

РЕЗЮМЕ

Автором приведены исследования над чувствительностью нингидриновой пробы для 28 стандартных аминокислот, так как данные о чувствительности разных аминокислот, опубликованные Дентом, Преттом и Оклером, Кирбы-Берры, Зайфером и Орескесом несогласны между собой. Кроме того, автором произведены еще сравнительные исследования над чувствительностью проб нингидриновой и изатиновой, над чувствительностью получаемой при горячем (100°) и при холодном (16° — 20°) проявлении, в условиях различных концентраций реактива, над влиянием разниц в величине пятен после развития хроматограммы и наконец, над влиянием органического растворителя и адсорбции бумаги. Для упорядочения экспериментального материала введены понятия: подлинной чувствительности определяемой в тесно нормализованных условиях без развития хроматограммы и редуцированной чувствительности после развития хроматограммы с элиминацией поверхности пятна. Коэффициенты „K“ т. е. частные полученные от деления редуцированной чувствительности через чувствительность подлинную ясно показывают влияние этих других еще факторов, играющих роль при развертывании хроматограммы, как, напр. влияния составных элементов развертывающей фазы, адсорбции бумаги и пр. Величина поверхности пятен определялась планиметром. Результаты, полученные автором, составляют основу для характеристики аминокислот и сопоставления своеобразных признаков в отношении чувствительности нингидриновой пробы и влияния, какое оказывают экспериментальные условия на развертывание и проявление хроматограммы. Изатиновый тест является для всех аминокислот за исключением пролина менее чувствительным, чем нингидриновый тест. Сопоставление чувствительности нингидриновой реакции, совершаемой при температуре 100° , с чувствительностью, получаемой при применении холодного нингидринового теста (при комнатной температуре), указывает на меньшую чувствитель-

ность у большинства аминокислот при температуре 100°. Чем большая концентрация нингидрина в проявляющем реактиве, тем выше чувствительность. Это относится ко всем аминокислотам. Однако, так как окраска фона бумаги затемняет пятна аминокислот, не рекомендуется применять растворы выше 0,5% нингидрина. Значительные различия в поверхностях пятен аминокислот, получаемых после развертывания хроматограммы, являются, по всей вероятности, настоящей причиной разногласий. Поэтому элиминирование влияния величины поверхности пятен дает возможность оценить еще, хотя приблизительно, влияние и других факторов, выступающих во время развертывания хроматограммы, как влияние составных элементов развертывающей фазы, роли адсорбции бумаги и т. п. Из сопоставлений видно, что те аминокислоты, у которых выступают самые высокие коэффициенты R_f в феноле терпят наибольшие потери в чувствительности во время развертывания хроматограммы. Коэффициенты „ K' “ для этих аминокислот высокие (10—16). Много внимания посвящено гистидину и метионину, так как имеющиеся данные относительно чувствительности обеих этих аминокислот весьма несогласны. Метионин может служить как пример аминокислоты, обладающей наибольшей подлинной чувствительностью, но чувствительность метионина изменяется в значительной степени в условиях развертывания хроматограммы. Иначе дело обстоит с гистидином, который представляет собой пример аминокислоты, характеризующейся слабой подлинной чувствительностью, но лишь в незначительной степени изменяющий свою чувствительность во время развертывания хроматограммы интерпретация аминокислотных хроматограмм требует основательного изучения условий развертывания и проявления хроматограмм и сопоставления ее с хроматограммами стандартных аминокислот.

SUMMARY

Since reports on the sensitivity of various amino-acids, as given by Dent, Pratt and Auclair, Kirby-Berry, Saifer, and Oreskes, differ from each other in certain points, the author investigated the sensitivity of the ninhydrin test for 28 standard amino-acids. Investigations consisted in comparing the sensitivity of the ninhydrin and isatin tests, in determining the sensitivity obtained with the hot (100°) and cold development, with different concentrations of the developing factor; they concerned also the influence of differences of size of spots in the developed chromatogram, as well as the influence of the organic solvent and of the adsorption of paper.

To facilitate the arrangement of the experimental material, the terms: specific sensitivity and reduced sensitivity were introduced, the former being determined in strictly normalized conditions without chromatographic partition, the latter — after partition and irrespectively of the size of the spot. Coefficients K , being quotients obtained by dividing reduced sensitivity by specific sensitivity, show a clear influence of other factors operating during chromatographic partition, such as the influence of the components of the partitioning phase, of the adsorption of paper, and others. The size of the surface of spots was measured with planimeter.

Results thus obtained make it possible to characterize various amino-acids and to compare their specific properties as far as the sensitivity of the ninhydrin test and the influence of experimental conditions during partitioning and developing the chromatogram are concerned. The isatin test is less sensitive than the ninhydrin test for the majority of amino-acids, except proline. The comparison of the sensitivity of ninhydrin reaction carried out at 100° with the sensitivity obtained with the cold ninhydrin test (at room temperature) points to losses in the majority of amino-acids at 100°.

It was found that the degree of sensitivity is in direct relation to the concentration of ninhydrin in the developer, this observation being valid for all amino-acids. On the other hand, the use of ninhy-

drin solutions stronger than 0,5 per cent should be avoided because of the staining of paper which makes the amino-acid spots less clear. Great differences of the size of amino-acid spots obtained after the development of the chromatogram are probably the main reason for divergences in determinations of sensitivity. When the influence of the size of the surface has been eliminated it is possible to give a more or less exact evaluation of other factors appearing during chromatogram partition, such as the influence of the components of the partitioning phase, and the role of paper adsorption.

It results from comparison that those amino-acids which have highest coefficients R_F , show the greatest loss of their sensitivity in phenol during chromatographic partition. The coefficients K for those aminoacids are high (10—16).

Special attention was paid to the behaviour of histidine and methionine, since opinions on their sensitivity are divided. Methionine represents an amino-acid of highest specific sensitivity, but this changes during the process of partition. Not so histidine, which is an amino-acid of low specific sensitivity and little changes it during partition.

The interpretation of amino - acid chromatograms demands a thorough knowledge of the partition and development conditions and should be based on the comparison with chromatograms of standard amino-acids.