

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Stanisław SZCZEPANIAK

Zmodyfikowana metoda ilościowego oznaczania aminokwasów za pomocą reakcji ninhydrynowej w eluacie z kolumny chromatograficznej

Модифицированный метод количественного определения аминокислот в элюате из хроматографической колонки

A Modified Method for the Quantitative Determination of Amino Acids with Ninhydrin in Effluent from the Chromatographic Column

W roku 1948 Moore i Stein (2) przystosowali reakcję ninhydrynową do ilościowego oznaczania aminokwasów w wycieku z kolumny chromatograficznej. Dzięki zastosowaniu SnCl_2 jako środka redukującego oraz eteru monometylowego glikolu etylenowego (cellosolvu) jako rozpuszczalnika do zredukowanej ninhydryny uzyskali wyniki ilościowe i powtarzalne. Barwę wywoływali w temperaturze 100°C , w ciągu 20 minut w środowisku o $\text{pH} = 5$. Niedogodnością tej metody jest nietrwałość zredukowanej ninhydryny, spowodowana jej dużą podatnością na utlenianie oraz bardzo małą rozpuszczalnością nie tylko w wodzie, ale i w rozpuszczalnikach organicznych. Stąd wynika konieczność częstego sporządzania świeżego roztworu zredukowanej ninhydryny. Reakcję tę, jak wykazał Stegeman (6), należy przeprowadzać w warunkach standardowych, w przeciwnym razie nie można otrzymać wyników powtarzalnych.

W ostatnich latach ukazało się wiele prac mających na celu ulepszenie metody Moore'a i Steina. Troll i Cannan (7) redukowali ninhydryną dopiero w czasie wykonywania reakcji barwnej. Zaletą tej modyfikacji jest duża trwałość roztworu nie zredukowanej ninhydryny. Reakcję ninhydrynową prowadzili w środowisku pirydyny i fenolu rozpuszczonego w bezwodnym etanolu. Pirydyna jako rozpuszczalnik dla zredukowanej ninhydryny jest odpowiednikiem cellosolvu stosowanego w metodzie Moore'a i Steina (2). Troll i Cannan są zdania, że prowadzenie reakcji w ciągu 20 minut w temp. 100°C powoduje destrukcję niebieskiego barwnika i dlatego stosowali ogrzewanie w okresie 3—5 minut. W 1954 roku Moore i Stein (3) zmodyfikowali swą metodę, redukując ninhydrynę kwasem askorbinowym i rozpuszczając ją, łącznie z postacią niezredukowaną, w mieszaninie buforu cytrynianowego i cellosolvu. Yemm i Co-

king (9) redukowali ninhydrynę cyjankiem sodu i rozpuszczali ją w cellosolvie. Rosen (4) zmodyfikował tę metodę, przeprowadzając redukcję ninhydryny tuż przed wywołaniem barwy. Dzięki temu stosowane przez niego roztwory wykazywały trwałość przez okres 3 tygodni. Meyer (1) rozpuszczał ninhydrynę w 95,5% etanolu z dodatkiem E.D.T.A. Związek ten eliminował ujemny wpływ jonów metali ciężkich na powstawanie „Dyda”. Wiewiórowski i wsp. (8) do badanej próbki aminokwasu dodawali mieszaninę cyjanku potasu i ninhydryny rozpuszczonych w cellosolvie. Obydwa roztwory mieszano ze sobą na 12 godzin przed użyciem. Schwerdfeger (5) dodawał cyjanek potasu wprost do buforów eluujących aminokwasy z kolumny chromatograficznej. Ninhydrynę w formie nie zredukowanej rozpuszczał w mieszaninie cellosolwu i buforu octanowego.

Wszyscy wymienieni badacze podkreślają dodatni wpływ rozpuszczalników organicznych na czułość reakcji ninhydrynowej. Powszechnie stosowanym rozpuszczalnikiem jest cellosolv, jedynie Troll i Cannan prowadzą reakcję ninhydrynową w mieszaninie pirydyny i fenolu.

Cellosolv jest odczynnikiem importowanym i z tej racji u nas mało dostępnym, a praca w atmosferze skażonej pirydyną jest bardzo szkodliwa dla zdrowia. Z tych powodów wydawało się słuszne zmodyfikowanie wyżej podanych metod.

Nasza praca ma na celu uzyskanie metody ilościowego oznaczenia aminokwasów za pomocą ninhydryny przy użyciu rozpuszczalnika organicznego, zapewniającego dostatecznie dużą czułość reakcji, nieszkodliwość dla zdrowia oraz łatwą dostępność na rynku krajowym. Przeprowadzone badania wykazały, że warunkom tym odpowiada glikol dwuetylenowy łącznie z fenolem i alkoholem izopropylowym.

I MATERIAŁ I APARATURA

a) Odczynniki.

1. KCN w glikolu dwuetylenowym. 2 ml. 0,01 m KCN przenoszono do kolbki miarowej na 100 ml i dopełniano glikolem dwuetylenowym do kreski.

2. Fenol w alkoholu izopropylowym. 80, g fenolu cz.d.a. zadawano 20 ml izopropanolu cz.d.a. i ogrzewano łagodnie na łaźni wodnej aż do całkowitego rozpuszczenia fenolu.

3. Ninhydryna w izopropanolu, 5 g ninhydryny przenoszono do kolbki miarowej na 100 ml i dopełniano do kreski alkoholem izopropylowym cz.d.a. Zawartością kolbki kilkakrotnie wstrząsano i odstawiano na noc do całkowitego rozpuszczenia.

Wszystkie roztwory przechowywano w ciemnych butelkach w chłodnym miejscu.

b) Aparatura

1. 2 mikropipetki na 0,2 ml,
2. 2 mikropipetki na 1 ml,
3. wysokie (ca 16 mm) probówki z kołnierzem,
4. probówki wirówkowe o przekroju nieco większym od probówek wysokich,
5. łaźnia wodna ze statywem na probówki,
6. fotometr Pulfricha F-my Carl Zeiss-Jena.

II BADANIA WŁASNE

a) Wykonanie oznaczenia

1. Wywołanie barwy.

Do wysokiej probówki odpipetowano 0,2 ml analizowanego roztworu, zawierającego 0,35—2,8 azotu α -aminowego. Do analizy dodano 1 ml roztworu KCN w glikolu dwuetylenowym i po wymieszaniu płynów odmierzone 1 ml 80 % fenolu w alkoholu izopropylowym. Tak sporządzoną mieszaninę wytrząsano ręcznie aż do uzyskania jednorodnego roztworu. Następnie dodano 0,2 ml 5 % roztworu ninhydryny w izopropanolu i znowu lekko wstrząsano zawartością probówki. Do probówki wirówkowej wiano niewielką ilość zimnej wody i po wytarciu do sucha zewnętrznych ścianek umieszczano w wylocie probówki z badaną cieczą. Te same czynności wykonywano ze ślepą próbą, którą stanowiło 0,2 ml destylowanej wody. Probówki z analizą i ślepą próbą umieszczano w statywie i zanurzano we wrzącej łaźni wodnej. Po 2—3 minutach wywoływania barwy wyjęto statyw z probówkami i ostudzono w strumieniu zimnej wody.

2. Pomiar ekstynkcji.

Przy pomocy roztworów o stężeniach 0,125, 0,25, 0,50, 0,75 i 1,0 mM/l danego aminokwasu wyznaczono krzywą wzorcową. W tym celu w jednej z kiuwet o grubości 0,5 cm umieszczono ślepą próbę, a w drugiej barwny roztwór aminokwasu wzorcowego i wyznaczono ekstynkcję przy filtrze żółtym S 57. Zmierzone ekstynkcje dla wszystkich stężeń wzorcowego aminokwasu dały podstawę do wykreślenia krzywej kalibracji. Następnie dokonano pomiaru ekstynkcji analizowanej próbki i z krzywej wzorcowej odczytano stężenie aminokwasu.

b) Badanie optymalnych warunków reakcji

1. pH.

Do sześciu probówek odpipetowano po 0,2 ml roztworu L-leucyny o stężeniu 0,75 mM/l. Każdy roztwór posiadał inne pH, a mianowicie: 1,5, 3,0, 4,1, 6,0, 8,8 i 10,0. We wszystkich próbkach wywołano barwę w sposób opisany wyżej i zmierzono ekstynkcję. Otrzymane wyniki ilustruje tab. 1.

2. Czas reakcji.

Do ośmiu probówek wprowadzono po 0,2 ml 0,75 mM/l roztworu L-leucyny. W próbce pierwszej przeprowadzono reakcję ninhydrynową

w ciągu 1 minuty, a następnie ogrzewano odpowiednio przez 2, 3, 4, 5, 10, 15 i 20 minut. Po ostudzeniu dokonano pomiaru ekstynkcji i wyniki zestawiono w tab. 2.

Tab. 1. Wydajność reakcji ninhydrinowej, zachodzącej w środowisku glikolu dwuetylenowego w zależności od pH roztworu
Influence of pH of solution on the colour yield of ninhydrin reaction

| 0,75 m M/1 L-leucyny | |
|----------------------|------------|
| pH roztworu | Ekstynkcja |
| 1,5 | 0,00 |
| 3,0 | 0,51 |
| 4,1 | 0,61 |
| 6,0 | 0,66 |
| 8,8 | 0,63 |
| 10,0 | 0,81 |

Tab. 2. Zależność intensywności barwy, produktu reakcji L-leucyny z ninhydryną od czasu trwania wywoływania barwy
Effect of time of developing colour on the colour yield of ninhydrin reaction

| 0,75 m M/1 L-leucyny | |
|-------------------------|------------|
| Czas reakcji w minutach | Ekstynkcja |
| 1 | 0,64 |
| 2 | 0,66 |
| 3 | 0,66 |
| 4 | 0,63 |
| 5 | 0,57 |
| 10 | 0,48 |
| 15 | 0,30 |
| 20 | 0,16 |

3. Porównanie czułości metody własnej z wynikami uzyskanymi metodą Moore'a i Steina (2) oraz Trolla i Cannana.

Sporządzono cztery roztwory wzorcowe L-leucyny o stężeniach 0,125, 0,25, 0,50 i 0,75 mM/l. Z każdego roztworu odpipetowano po

0,2 ml do trzech probówek. W każdej z nich wywołano barwę inną metodą i dokonano pomiaru ekstynkcji. Uzyskane rezultaty umieszczono w tab. 3.

Tab. 3. Wartości ekstynkcji ślepej próby i różnych stężeń L-leucyny, otrzymane różnymi metodami
The density values of different concentrations of L-leucine obtained with different methods

| Metoda | Ekstynkcja | | | | |
|--------------------|----------------|--------------------------------------|------|------|------|
| | ślepej próby * | roztwór L-leucyny ** o stęż. w m M/l | | | |
| | | 0,125 | 0,25 | 0,50 | 0,75 |
| Moore i Stein (2) | 0,11 | 0,09 | 0,15 | 0,30 | 0,50 |
| Troll i Cannan (7) | 0,30 | 0,20 | 0,27 | 0,47 | 0,68 |
| Szczepaniak | 0,10 | 0,10 | 0,21 | 0,36 | 0,54 |

* wartości ekstynkcji mierzone względem destylowanej wody

** ekstynkcje mierzone względem ślepej próby.

III OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Czułość reakcji ninhydrynowej przeprowadzonej w środowisku glikolu dwuetylenowego jest dostatecznie duża i nawet nieco większa niż w metodzie Moore'a i Steina (2). 0,35 γ azotu α -aminowego daje wyraźną różnicę w intensywności barwy w porównaniu ze ślepą próbą. Największą czułość wykazuje metoda Trolła i Cannana, jednakże wadą jej, poza szkodliwym działaniem pirydyny na zdrowie, jest tworzenie się niejednorodnego roztworu po wywołaniu barwy i ochłodzeniu. Wydaje się, że jest to spowodowane stosunkowo małą rozpuszczalnością fenolu w pirydynie.

Zabarwienie wszystkich roztworów leucyny po przeprowadzeniu reakcji ninhydrynowej w środowisku glikolu było niebieskie, podczas gdy w metodzie Moore'a i Steina (2) roztwory o wyższej koncentracji przybierały odcień fioletowy. W postępowaniu wg Trolła i Cannana próbki o niższych stężeniach aminokwasu posiadały barwę żółto-czerwoną, a roztwory bardziej stężone przyjmowały kolor czerwono-fioletowy.

Ślepa próba w przedstawionej metodzie była dla oka bezbarwna, natomiast w środowisku pirydyny była wyraźnie zabarwiona na kolor żółto-czerwony. W metodzie Moore'a i Steina (2) uzyskiwano

tylko wówczas bezbarwne ślepe próby, jeśli stosowany był świeży roztwór zredukowanej ninhydryny.

Największą wydajność reakcji w środowisku glikolu dwuetylenowego otrzymuje się wówczas, gdy analizowana próbka posiada odczyn o $\text{pH} = 6$. Jednakże można oznaczać aminokwasy w roztworze o $\text{pH} = 4-9$, ponieważ w tym zakresie stężeń jonów wodorowych otrzymuje się niewiele słabsze zabarwienia produktu reakcji. W środowisku kwaśnym „Dyda” wogóle się nie tworzy, natomiast w roztworze bardzo alkalicznym prawdopodobnie mają miejsce jakies reakcje uboczne, ponieważ otrzymuje się produkt o barwie nietypowej (czerwonej, przechodzącej w czerwono-fioletową), wykazujący bardzo wysoką ekstynkcję.

Optymalnym czasem przeprowadzania reakcji ninhydrinowej w niniejszej metodzie jest okres 2—3 minut. Dłuższe ogrzewanie, stosowane przez Moore'a i Steina (2), powoduje niszczenie barwnika, co jest zgodne ze spostrzeżeniem Trolla i Cannana. Poza tym prowadzenie reakcji przez dłuższy okres czasu w temp. 100°C powoduje zmniejszanie się objętości roztworu na skutek parowania rozpuszczalnika. Ulatnianie się glikolu dwuetylenowego jest minimalne (temperatura wrzenia 230°C) natomiast cellosolv, a szczególnie pirydyna silnie parując, powodują zateżanie się próbki, co prowadzi do zwiększonych wartości ekstynkcji.

Trwałość otrzymanego w przedstawionej metodzie związku barwnego jest stosunkowo duża. Po 12 godzinach od chwili zakończenia reakcji ekstynkcja uległa zmniejszeniu tylko o 1%.

Badano również przydatność innych alkoholi do przeprowadzania reakcji ninhydrinowej, a mianowicie: metanolu, glikolu etylenowego i glicerolu. Z metanolem otrzymano barwy intersywniejsze, lecz ze względu na niską temp. wrzenia tego związku objętości próbek po przeprowadzeniu reakcji były niejednakowe, co prowadziło do niepowtarzalności wyników. Czułość reakcji z glikolem etylenowym była nieznacznie mniejsza, natomiast wywołanie barwy w środowisku glicerolu prowadziło do otrzymania roztworu intensywnie fioletowego, lecz o nieznacznej trwałości tego zabarwienia.

Wszystkie roztwory stosowane w niniejszej metodzie wykazywały trwałość nie mniejszą niż trzy tygodnie. Stosowanie dwa razy większego stężenia KCN nie dawało zwiększenia wydajności reakcji.

Przegląd otrzymanych wyników pozwala wnioskować, że reakcja aminokwasów z ninhydriną wykonana opisaną metodą daje wyniki lepsze od uzyskiwanych w metodach Moore'a i Steina (2) oraz Trolla i Cannana. Główne zalety metody, opracowanej przez autora są następujące: 1) dostatecznie duża czułość reakcji ninhydrin-

nowej, prowadzonej w środowisku glikolu dwuetylenowego, 2) dobra powtarzalność wyników, którą w głównej mierze zawdzięcza się małej lotności glikolu oraz krótkiemu okresowi wywoływania barwy, 3) łatwa dostępność na rynku krajowym odczynników stosowanych w tej metodzie, 4) nieszkodliwość dla zdrowia glikolu dwuetylenowego oraz 5) duża trwałość stosowanych roztworów.

PIŚMIENNICTWO

1. Meyer H.: *Biochem. J.*, **67**, 333—340, 1957.
2. Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 367—388, 1948.
3. Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 907—913, 1954.
4. Rosen H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 10—15, 1957.
5. Schwerdfeger E.: *J. of Chromatography*, **7**, 418—419, 1962.
6. Stegemann H.: *Hoppe — Seyler Z. Physiol. Chem.*, **319**, 192—109, 1960.
7. Troll W., Cannan R. K.: *J. Biol. Chem.*, **200**, 803—811, 1953.
8. Wiewiórowski M., Przybylska J., Kociałkowski Z.: *Roczn. Nauk Roln.*, **79**, 452—465, 1958.
9. Yemm E. W., Coking E. C.: *Analyst.*, **80**, 209—213, 1955.

РЕЗЮМЕ

Автором описана новая модификация методов Moore'a и Steina, а также Тrolля и Каннана для определения аминокислот в элюате из хроматографической колонки. Аминокислоты определялись при помощи нингидрина без метилцеллозольва и пиридина. Голубое вещество получалось при помощи нингидрина с применением диэтиленгликоля, фенола и изопропанола. Диэтиленгликоль применялся в качестве растворителя нингидрина, восстановленного с помощью KCN.

Проведено исследование оптимальных условий для этой реакции. Максимум интенсивности окраски получался тогда, когда реакция была проведена в среде рН 4—9 при 100°C через 2—3 минут.

Результаты полученные с помощью этого метода, были сопоставлены с эффектами, полученными по методу Moore'a и Steina, а также Тrolля и Каннана. Больше всего достоинств отмечено в системе растворителей: диэтиленгликоль-фенол-изопропанол.

Табл. 1. Влияние рН раствора на интенсивность окраски в реакции нингидрина и лейцина.

Табл. 2. Влияние времени протекания реакции на интенсивность окраски.

Табл. 3. Величины экстинкции различных концентраций лейцина, полученных при помощи различных методов.

SUMMARY

The author describes a new modification of the methods of Moore and Stein, and Troll and Cannan for the determination of amino acids in effluent fractions from the chromatographic column. The amino acids were determined with ninhydrin reagent without methyl Cellosolv and pyridin. The blue product was obtained by the use of ninhydrin with diethylene glycol, phenol and isopropyl alcohol. Diethylene glycol was used as a solvent for ninhydrin, reduced with KCN.

The best conditions for this reaction were examined. The highest yield of colour was obtained when the reaction was carried out at pH 4—9 and 100°C during 2—3 minutes.

The results obtained in this procedure were compared with the methods of Moore and Stein, and Troll and Cannan. The diethylene glycol-phenol-isopropyl alcohol system proved to have had the greatest advantage.

Pracę otrzymano 15 II 1964.