

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

Janina OPIEŃSKA-BLAUTH,
Jadwiga KARBOWNICKA i Olga SAKŁAWSKA-
SZYMONOWA

Sposoby identyfikacji aminokwasów o zbliżonych współczynnikach R_F

**Способы идентификации аминокислот
со сближенными коэффициентами R_F**

Methods of Identifying Amino-acids of Approximate R_F Coefficients

W analizie chromatograficznej mieszanin aminokwasowych, przeprowadzanej techniką dwukierunkową bibułową nie udaje się rozdzielić niektórych aminokwasów na jednym chromatogramie w żadnym z stosowanych przez nas i innych układów rozwijających.

Na chromatogramach bibułowych dwukierunkowych, rozwijanych w układach: propanol-woda i fenol-woda, otrzymanych z materiału biologicznego, jak np. moczu, surowicy i autolizatów bakteryjnych, występują po wywołaniu ninhydryną plamy zespolone nie rozdzielających się aminokwasów:

- I. Glicyny, seryny, asparaginy, tauryny,
- II. Metioniny, waliny, tryptofanu,
- III. Leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny,
- IV. Histydyny, citruliny, argininy, lizyny, ornityny.

Celem naszym było opracowanie sposobów dla identyfikacji poszczególnych aminokwasów, występujących w plamach zespolonych lub ich rozdzielania techniką rechromatografii.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do badań służyły: A. Czyste aminokwasy wzorcowe F-my Light, B. Próby moczu, C. Autolizaty z preparatów acetonowych *Mycobacterium phlei*.

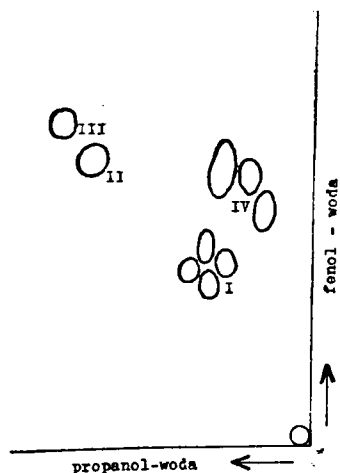
Chromatografię prowadzono na bibule Whatman Nr 1 i Nr 3. Chromatogramy rozwijano w układach: propanol-woda 7:3 i fenol-woda 7:3. Rechromatografię przeprowadzano w układach rozpuszczalników, odpowiednich dla poszczególnych grup aminokwasów. Stosowano technikę dwukierunkową, jednokierunkową i krążkową (1).

Do wywoływania stosowano 0,2% acetonowy roztwór ninhydryny, test fluorescencyjny U. V. (6) i swoisty dla tryptofanu i citruliny test z para-dwumetyloaminobenzaldehydem (PDAB). (3).

DOSWIADCZENIA WŁASNE I WNIOSKI

A. Badania na aminokwasach wzorcowych

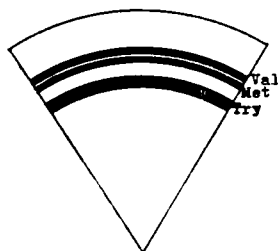
Grupa 1.



Ryc. 1. Schemat chromatogramu z plamami zespołowymi aminokwasów.
 Schema of chromatogram showing complex amino-acid spots.

Identyfikacja aminokwasów z plamy zespołowej „I” (glicyna, seryna, asparagina, tauryna) nie przedstawia większych trudności, ponieważ przy zastosowaniu zimnego testu ninhydrynowego (5) udaje się wykryć wszystkie cztery aminokwasy obok siebie nawet bez rozdzielenia plamy. Plamy glicyny i seryny występują znacznie szybciej od asparaginy i tauryny, nawet gdy te ostatnie znajdują się w dużych stężeniach. Glicyna i asparagina dają zabarwienie żółte, które przechodzi po kilkunastu godzinach w fioletkowe.

Grupa 2.



Butanol III rz. - $HCOOH-H_2O$

Ryc. 2. Schemat rechromatogramu krążkowego. Rozdzielenie plamy II: metionina, walina, tryptofan.

Schema of disk rechromatogram. The separation of the spot No. II: methionine, valine and tryptophan.

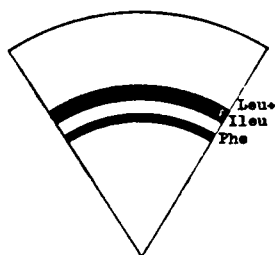
Rozdzielenie aminokwasów z plamy „II” obejmującej metioninę, walinę i tryptofan udaje się przeprowadzić następującymi sposobami:

a) na drodze wstępnego utlenienia metioniny do sulfotlenków przy pomocy par kwasu nadmanganowego. Nie rozdzielone pozostają walina i tryptofan.

b) tryptofan udaje się zidentyfikować w plamie zespolonej z metioniną i waliną testem barwnym z PDAB.

c) na drodze rechromatografii techniką krążkową plamy zespolonej zlokalizowanej na chromatogramie pierwotnym testem U.V. w układzie rozpuszczalników: butanol II rz-HCOOH-H₂O (15 : 3 : 2) lub pirydyna-alkohol amyłowy-H₂O (7 : 6 : 6) (4). Według tego ostatniego sposobu uzyskuje się rozdzielenie wszystkich trzech aminokwasów.

Grupa 3.



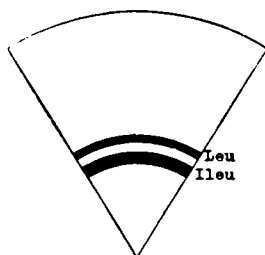
Butanol II rz.-etanol 77 %

Ryc. 3. Schemat rechromatogramu krążkowego. Rozdzielenie plamy III: leucyna, izoleucyna, fenyloalanina.

Schema of disk rechromatogram. The separation of the spot No. III: leucine, iso-leucine and phenylalanine.

Rozdzielenie aminokwasów zawartych w plamie „III” a mianowicie leucyny, izoleucyny i fenyloalaniny przeprowadzono przy pomocy rechromatografii krążkowej po wstępnym zlokalizowaniu plamy testem U.V. Dla rozdzielania fenyloalaniny od leucyny i izoleucyny stosowano układ: butanol II rz-etanol 77% (6 : 4), zaś dla rozdzielania izoleucyny od leucyny stosowano układ: butanol II rz-alkohol izoamyłowy-amoniak 3% (2 : 1 : 3) oraz bibułę zbuforowaną do pH 6,0. Bufor: 44,45cz 0,1N NaOH + 50cz 0,1N dwufluorku potasu.

Wymienione aminokwasy zostały rozdzielone techniką dwukierunkową w układach rozpuszczalników: butanol II rz-amoniak 3% (150 : 60) i butanol II rz-HCOOH-H₂O (150 : 30 : 20).



Butanol III rs. - alkohol
 izoamylowy - NH_3 3 %

Ryc. 4. Schemat rechromatogramu krążkowego. Rozdzielenie plamy III: leucyna, izoleucyna.

Schema of disk rechromatogram. The separation of the spot No. III: leucine and iso-leucine.

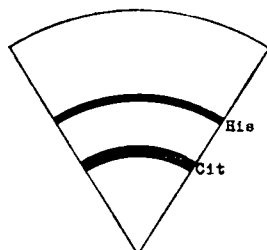
Grupa 4.

Grupa ta obejmuje aminokwasy zasadowe (plama „IV”): histydyne, citrulinę, argininę, lizynę i ornitynę. Największą trudność stanowi rozdzielanie histydy i citruliny tworzących jedną plamę. Pozostałe aminokwasy na chromatogramach, rozwijanych techniką dwukierunkową w układach propanolowo-fenolowych rozdzielają się na ogół wyraźnie.

Identyfikację i rozdzielanie citruliny i histydy udaje się przeprowadzić następująco:

a) testem barwnym z PDAB wykrywa się citrulinę obok histydy na chromatogramie pierwotnym sukcesywnie po ninhydrynie.

b) przy pomocy rechromatografii techniką krążkową, po zlokalizowaniu plamy testem U.V., w układzie: aceton- etanol-pirydyna- H_2O - dwuetyloamina (40 : 20 : 20 : 15 : 5). Ten sam układ może posłużyć do rozdzielania arginy od lizyny i ornityny.



Aceton - etanol - pirydyna -
 H_2O - dwuetyloamina

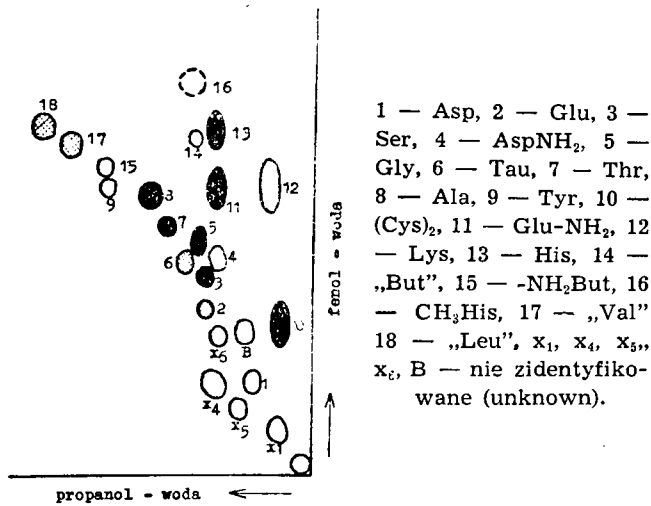
Ryc. 5. Schemat rechromatogramu krążkowego. Rozdzielenie plamy IV: histydy, citrulina.

Schema of disk rechromatogram. The separation of the spot No IV: histidine and citrulline.

B. Badania na próbach moczu fizjologicznego

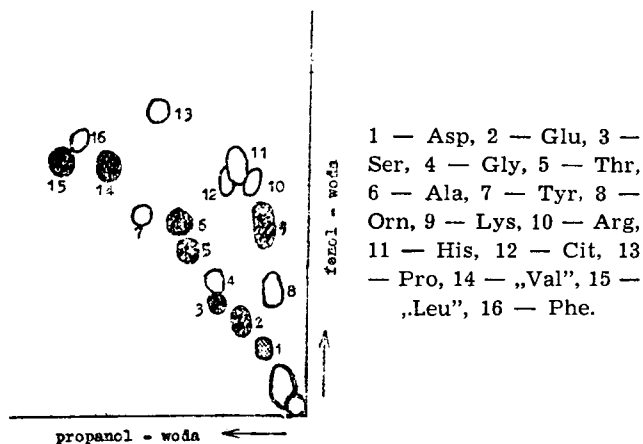
Sposoby opisane w części A zastosowano do rozdzielenia i identyfikacji aminokwasów w próbach moczu przygotowanego do analizy chromatograficznej (odsolenie) (2).

W celu potwierdzenia wyników przeprowadzono badania kontrolne na próbach moczu, do których dodawano czyste aminokwasy z nie rozdzielających się grup.



Ryc. 6. Schemat chromatogramu fizjologicznego moczu (odsolonego)
Schema of chromatogram of normal desalted urine.

C. Badania autolizatów bakteryjnych



Ryc. 7. Schemat chromatogramu autolizatu bakteryjnego (odsolonego)
Schema of chromatogram of desalted bacterial autolysate.

P I S M I E N N I C T W O

1. Borkowski T.: Acta Biochim. Pol. 3, 333—343, 1956. 2. Gąsior E., Pietrusiewicz M., Kowalska H., Opieńska-Blauth J.: Acta Biochim. Pol. 5, 333—342, 1958. 3. Hais M., Macek K.: Papirova Chromatografie, Praha 1954, 480. 4. Hausmann: J. Am. Chem. Soc. 74, 3181, 1952. 5. Linskens H. F.: Papierchromatographie in der Botanik, 159, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1959. 6. Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz M.: Acta Biochim. Pol. 3, 557—580, 1956. 7. Opieńska-Blauth J., Sanecka F., Charęziński M.: praca w druku.

Р Е З Ю М Е

Ввиду того, что полное разделение всех аминокислот в пробах из биологического материала, не удается произвести на одной первичной хроматограмме, авторы применили для идентификации отдельных аминокислот радиальную рехроматографию, а также специфические тесты: цветной и флуоросценционный.

На первичной двухмерной хроматограмме, проявляемой в смеси растворителей пропанол-вода и фенол-вода выделяются четыре комплексные пятна:

I. Глицин, серин, аспарагин, таурин.

Эти аминокислоты идентифицируются друг возле друга нингидриновым холодным тестом при учете рода окраски и скорости появления пятен.

II. Метионин, валин, триптофан.

Для разделения указанных выше аминокислот применяется радиальная рехроматография в смеси растворителей: бутанол трет. — $\text{НСООН—H}_2\text{O}$ (15 : 3 : 2) или пиридин-амиловый спирт-вода (7 : 6 : 6).

III. Лейцин, изолейцин, фенилаланин.

Для разделения этих аминокислот применяется радиальная хроматография при употреблении смеси растворителей: бутанол (втор.) — этанол 77%-ый (6 : 4) — для отделения лейцина и изолейцина от фенилаланина, а также бутанол (трет.)-изоамиловый спирт — NH_3 3%-ый — для отделения лейцина от изолейцина.

IV. Основные аминокислоты: гистидин, цитрулин, аргинин, лизин, орнитин. Разделяются в смеси растворителей: ацетон-этанол-пиридин-вода-диэтиламин (40 : 20 : 20 : 15 : 5).

Прежде чем приступить к рехроматографии, применялся тест U. V.

Применение изложенных выше способов для биологического материала дало вполне удовлетворительные результаты.

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Схема хроматограммы с комплексными пятнами аминокислот.

Рис. 2. Схема радиальной рехроматограммы. Разделение пятна II: метионин, валлин, триптофан.

Рис. 3. Схема радиальной рехроматограммы. Разделение пятна III: лейцин, изолейцин, фенил-аланин.

Рис. 4. Схема радиальной рехроматограммы. Разделение пятна III: лейцин, изолейцин.

Рис. 5. Схема радиальной рехроматограммы. Разделение пятна IV: гистидин, цитрулин.

Рис. 6. Схема физиологической хроматограммы мочи (обессоленной).

Рис. 7. Схема хроматограммы бактериального автолизата (обессоленного).

SUMMARY

Since the complete separation of all amino-acids occurring in biological material on a single, primary chromatogram results in failure, disk rechromatography and specific colour and fluorescent tests were used to identify particular amino-acids.

Four complex spots were found on a two-dimensional primary chromatogram developed by the following systems: propanol/water and phenol/water.

I. Glycine, serine, asparagine and taurine. These amino-acids were identified, one near the other, by the cold ninhydrin test, taking into consideration the colour intensity and the rate of appearance of the spots.

II. Methionine, valine and tryptophan. To separate these amino-acids disk rechromatography was used in the following systems: tertiary butanol-acetic acid-water (15:3:2) or pyridine-amyl alcohol-water (7:6:6).

III. Leucine, iso-leucine and phenylalanine. For the separation of phenylalanine from leucine and iso-leucine was used following systems: secondary butanol — 77 per cent alcohol (6:4), and for the separation of iso-leucine from leucine: tertiary butanol — iso amyl alcohol — 3 per cent ammonia (2:1:3).

IV. Alkaline amino-acids: histidine, citrulline, arginine, lysine and ornithine. These amino-acids were separated by the following system: acetone-ethanol-pyridine-water-diethylamine (40:20:20:15:5). To locate the spots before rechromatography the U. V. test was used.

Experiments carried out on biological material by means of these methods gave positive results.

