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

Janusz KLIMEK

Badania nad przemianą aminokwasową płynnej dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca (*Clostridium tetani*). V. Ilościowe oznaczanie aminokwasów rozdzielonych chromatograficznie na bibule, przy pomocy bezpośredniej rejestracji

Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*). V. Количественное определение аминокислот, разделенных посредством хроматографии на фильтровальной бумаге, при помощи непосредственной регистрации

An Examination of the Amino Acid Transformation of the Liquid Ten-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*. V. Quantitative Determination of the Amino Acids Separated Chromatographically on Paper with Direct Registration

Do rozdzielania badanych mieszanin oraz do ich identyfikacji służą różne techniki chromatograficzne. Z tego też względu są one chętnie stosowane w analizie jakościowej. W przypadku użycia chromatografii do ilościowych oznaczeń należy korzystać z dodatkowych urządzeń. Jedno z nich zostało zaprojektowane przez autora (6). W pracy starano się odpowiedzieć na pytanie czy wymieniony aparat, po wprowadzeniu pewnych zmian w konstrukcji, będzie mógł być wykorzystany do ilościowej analizy aminokwasów bezpośrednio z bibułowymi chromatogramów.

METODA BADAŃ I MATERIAŁY

Ilościowych oznaczeń aminokwasów dokonano przy pomocy bezpośredniej rejestracji, chromatogramów bibułowymi, używając do tego celu „przystawki” własnego pomysłu i konstrukcji (6). „Przystawka” ta w połączeniu ze stabilizatorem (typ 3TM-2 — Polska) oraz mikropolarografem (typ M 102 b — Czechosłowacja) pozwala na ilościowe oznaczanie aminokwasów uprzednio rozdzielanych chromato-

graficznie. Wartość przyrzędu sprawdzono na wzorcach aminokwasowych oraz rachunkowo poprzez wyznaczenie równań regresji, metodą najmniejszych kwadratów wg Niewiarowicza (10) i Kürsta (8). Stosowano bibułę chromatograficzną Whatman nr 3, wzorce aminokwasowe oraz odczynniki pochodzące z Chemicznej Hurtowni Odczynników w Gliwicach.

BADANIA WŁASNE

1. Aparat własnej konstrukcji do ilościowego oznaczania aminokwasów bezpośrednio z bibułowych chromatogramów.

Do ilościowego oznaczania aminokwasów użyto aparatu własnego pomysłu i wykonania Klimek (6), w którym zastosowano strumień powietrza do chłodzenia powierzchni komory z żarówką stykającą się z bibułowym chromatogramem. Wprowadzenie tej konstrukcyjnej zmiany zabezpieczało przed rozkładem, termolabilne aminokwasowe kompleksy DYDA + Cu. Ponadto ustalono, że szybkość przesuwania się paska = 3 cm/min., przed szczeliną o szerokości 2,5 mm daje najlepiej wykształcone krzywe.

2. Przykłady zastosowania aparatu oraz wyznaczenie błędu dla oznaczenia aminokwasów wzorcowych — a) nakraplanych na bibułę pojedynczo w różnych stężeniach, b) nakraplanych na bibułę w mieszaninie o różnym stężeniu i następnie rozdzielonych metodą chromatograficzną.

a) Do badań użyto 18 standardów aminokwasowych. Dla każdego z nich stosowano oddzielnie paski bibuły Whatman nr 3 o wymiarach $5,2 \times 46$ cm. Równe objętości czterech różnych stężeń aminokwasu wprowadzano na bibułę przy pomocy kalibrowanej pipetki, zachowując pomiędzy poszczególnymi punktami nakropień odległość 5 cm. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej paski wywoływano przez zanurzenie w 0,2% acetonowym roztworze ninhydryny, bezpośrednio po tym zawieszano je poziomo na specjalnej ramce. W tej pozycji pozostawały one w temperaturze pokojowej przez 12 godzin w pomieszczeniu dobrze wietrzonym. Następnie paski z barwnymi plamami DYDA ogrzewano w suszarce przez 3 min. w temperaturze 100°C oraz kompleksowano przez zanurzenie w 0,2% acetonowym roztworze chlorku miedziowego.

Przy pomocy wyżej podanego aparatu automatycznie rejestrowano na światłoczułym papierze zmiany natężenia światła przechodzącego przez pasek bibuły z barwnymi kompleksami DYDA + Cu. Na otrzymanych krzywych wyznaczano linię podstawy poprzez odcinki odpowiadające niezabarwionym miejscom na bibule. Powierzchnie pól ograniczone krzywą i linią podstawy mierzono przy pomocy planimetru. Wyniki zebrano w tab. 1. W kolumnach: 4, 5, 6 i 7 tab. 1 zestawiono stężenia użytych wzorcowych aminokwasów w μg oraz odpowiadające im powierzchnie pól w mm^2 , wyznaczone przez krzywe otrzymane metodą automatycznej

Tab. 1. Ilości aminokwasów w mikrogramach naniesione na bibułę oraz odpowiadające im powierzchnie wyznaczone przez krzywe w mm²
 Quantities of amino acids in micrograms introduced into the paper and the areas corresponding to them, marked by curves in mm²

Lp.	Nazwa aminokwasu					
1	Lizyna	A	3,72	4,97	7,45	14,91
		B	140	165	190	230
2	Histydyna	A	3,97	5,29	7,93	15,86
		B	205	230	270	330
3	Asparagina	A	3,38	4,51	6,76	13,52
		B	130	155	180	220
4	Arginina	A	4,46	5,95	8,92	17,85
		B	150	190	230	360
5	Kwas asparaginowy	A	3,40	4,40	6,80	13,60
		B	190	210	240	300
6	Seryna	A	2,72	3,63	5,44	10,89
		B	240	255	285	320
7	Glicyna	A	1,92	2,55	3,83	7,67
		B	100	130	170	230
8	Kwas glutaminowy	A	3,76	5,01	7,52	15,04
		B	200	225	260	320
9	Treonina	A	3,05	4,07	6,10	12,21
		B	60	80	110	150
10	α-Alanina	A	2,28	3,03	4,55	9,10
		B	170	195	215	260
11	β-Alanina	A	2,28	3,03	4,55	9,10
		B	210	230	260	320
12	Tyrozyna	A	4,64	9,28	13,92	18,56
		B	160	220	250	270
13	Tryptofan	A	5,23	6,97	10,46	20,93
		B	150	180	210	290
14	Metionina	A	3,82	5,10	7,64	15,29
		B	200	240	280	360
15	Walina	A	2,74	3,99	5,98	11,97
		B	205	235	270	325
16	Fenylalanina	A	4,22	5,93	8,44	16,88
		B	155	185	210	270
17	Izoleucyna	A	3,35	4,47	6,70	13,40
		B	160	180	210	280
18	Leucyna	A	3,35	4,47	6,70	13,40
		B	150	170	220	290

A Ilość aminokwasu w mikrogramach.
 B Powierzchnia wyznaczona przez krzywą w mm²

rejestracji. W trzeciej kolumnie podano symbole literowe, objaśniające znaczenie cyfr znajdujących się w odpowiednich wierszach kolumn: 4, 5, 6 i 7. W oparciu o dane tab. 1 wyznaczono równania prostych regresji dla każdego aminokwasu (3, 9 i 10). Wzór 1 przedstawia ogólną postać równania prostej regresji.

$$p = a + b \lg c \quad \dots \dots \dots 1$$

Przy pomocy wzorów: 2 i 3 wyznaczano metodą najmniejszych kwadratów współczynniki a i b do równania 1.

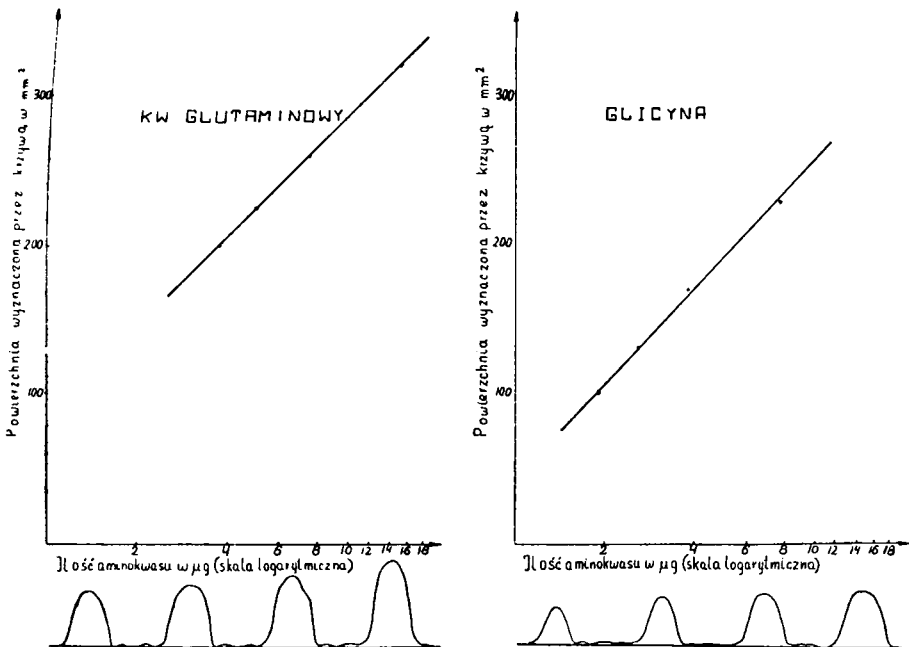
$$a = \frac{\sum x \sum xy - \sum x^2 \sum y}{(\sum x)^2 - n \sum x^2} \quad \dots \dots \dots 2$$

$$b = \frac{\sum x \sum xy - n \sum xy}{(\sum x)^2 - n \sum x^2} \quad \dots \dots \dots 3$$

gdzie: $x = \lg c$ — logarytm ilości aminokwasu w μg

$y = p$ — powierzchnia wyznaczona przez krzywą w mm^2

n — ilość prób.



Ryc. 1. Wykresy zależności pomiędzy logarytmem ilości aminokwasu w mikrogramach i powierzchnią pola zakreślonego przez krzywą automatycznej rejestracji, uwidocznioną w dolnej części ryciny

Diagrams of the correlation between the logarithm of the quantity of the amino acid in micrograms and the field area marked by automatic registration curve, at the bottom of the picture

Ryc. 1 przedstawia graficznie proste regresji poprowadzone zgodnie z dokonanyimi obliczeniami w oparciu o wzory: 1, 2 i 3, wraz z odpowiednimi krzywymi automatycznej rejestracji, przykładowo dla glicyny i kwasu glutaminowego. Punkty znajdujące się na prostej bądź wokół niej odpowiadają zmierzonym powierzchniom w mm^2 , wyznaczonym przez krzywe.

Wartość zastosowanego wyżej przyrządu sprawdzono, przeprowadzając obliczenia na podstawie wyznaczonych równań dla prostej regresji (wzór 1). W tym celu do równania (wzór 1) wstawiono kolejno ilości użytych wzorców aminokwasowych w μg i obliczano powierzchnię w mm^2 . Otrzymane wartości porównywano z wynikami bezpośrednich planimetrycznych pomiarów krzywych automatycznej rejestracji.

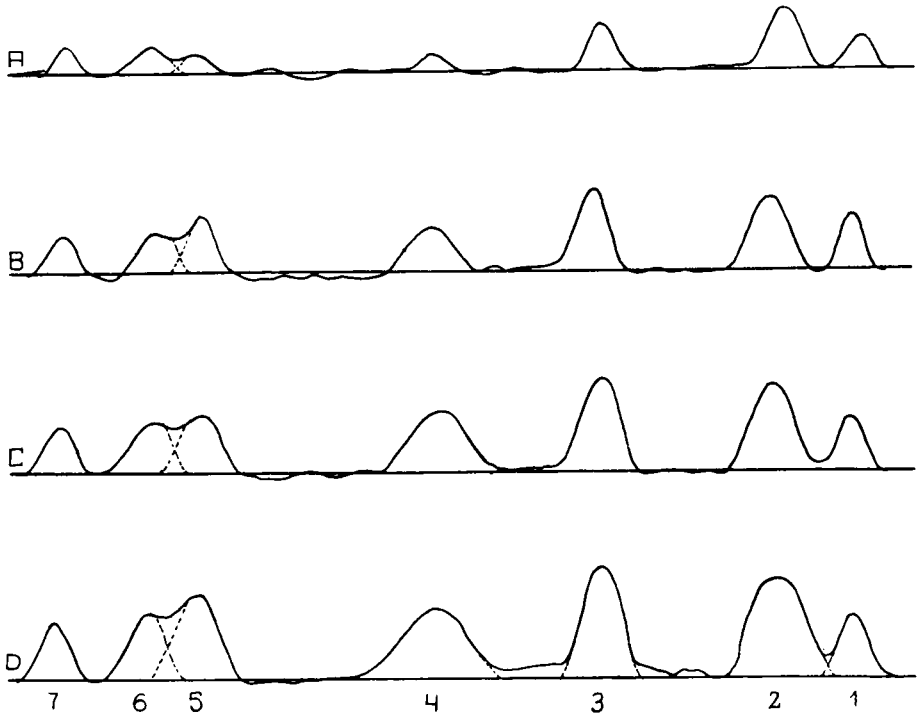
Tab. 2. Zestawienie powierzchni pól wyznaczonych doświadczalnie i rachunkowo w mm^2 oraz względne różnice między nimi w procentach
The juxtaposition of the areas, shown experimentally and arithmetically in mm^2 and the relative differences between them in percentage

Lp.	Nazwa aminokwasu	Powierzchnia w mm^2 wyznaczona		Względna różnica w %
		doświadczalnie	rachunkowo	
1	Lizyna	140,00	143,79	2,70
2	Histydyna	270,00	264,30	2,11
3	Asparagina	155,00	151,81	2,06
4	Arginina	230,00	247,98	7,81
5	Kwas asparaginowy	300,00	298,70	0,46
6	Seryna	255,00	257,67	1,04
7	Glicyna	170,00	166,96	1,80
8	Kwas glutaminowy	225,00	225,12	0,05
9	Treonina	110,00	106,58	3,10
10	α -Alanina	260,00	242,26	6,80
11	β -Alanina	230,00	230,59	0,25
12	Tyrozyna	250,00	248,82	0,48
13	Tryptofan	210,00	223,04	6,20
14	Metionina	240,00	231,45	3,57
15	Walina	205,00	204,99	0,01
16	Fenyloalanina	185,00	183,23	0,97
17	Izoleucyna	210,00	216,27	2,98
18	Leucyna	290,00	271,90	6,56

W tab. 2 ograniczono się do pokazania wyników otrzymanych dwoma sposobami dla stężeń aminokwasów, przy których występowały największe względne różnice pomiędzy powierzchniami pól. W trzeciej kolumnie tab. 2 podano powierzchnie pól wyznaczone planimetrem, w czwartej — powierzchnie wyliczone rachunkowo przy tym samym stężeniu amino-

kwasu. W ostatniej kolumnie podano względne różnice w procentach pomiędzy powierzchniami w kolumnach trzy i cztery.

b) Do badań zastosowano mieszaninę wzorcową złożoną z siedmiu aminokwasów.



Ryc. 2. Krzywe zmian natężenia światła przechodzącego przez paski bibuły chromatograficznej z barwnymi kompleksami Cu + DYDA oraz liniami podstaw
The change curves of the intensity of light penetrating the stripes of the chromatographic paper with dyed complexes of Cu + DYDA, together with the lines of the bases

Nakraplanie, rozwijanie i wywoływanie chromatogramów uskutecz-
niano sposobami opisanymi w części III pracy (5). Z uzyskanego chro-
matogramu wycinano paski bibuły o wymiarach $5,2 \times 46$ cm, które na-
stępnie służyły do wyznaczania natężenia światła przechodzącego przez
plamy, przy pomocy bezpośredniej rejestracji. Ryc. 2 przedstawia krzywe
optycznej rejestracji. Linie przerywane są rekonstrukcją krzywych przy
teoretycznym założeniu, że aminokwasy częściowo na siebie zachodzące
są całkowicie rozdzielone. Zabiegi te wykonywano sposobem podanym
przez Krügera (7), Ostrowskiego i wsp. (11) dla waliny i fe-
nyloalaniny oraz przy wyższych stężeniach dla lizyny i argininy. Linie
podstawy (kreska ciągła) prowadzono poprzez odcinki krzywych odpo-

wiadające pustym miejscom na bibule. Cyfry znajdujące się w dolnej części zdjęcia odnoszą się do poszczególnych aminokwasów mieszaniny wzorcowej: 1. lizyna, 2. arginina, 3. kwas glutaminowy, 4. α -alanina, 5. walina, 6. fenyloalanina i 7. leucyna. Litery: A, B, C i D wypisane w porządku alfabetycznym po lewej stronie ryciny odpowiadają wzorcom o wzrastającym stężeniu.

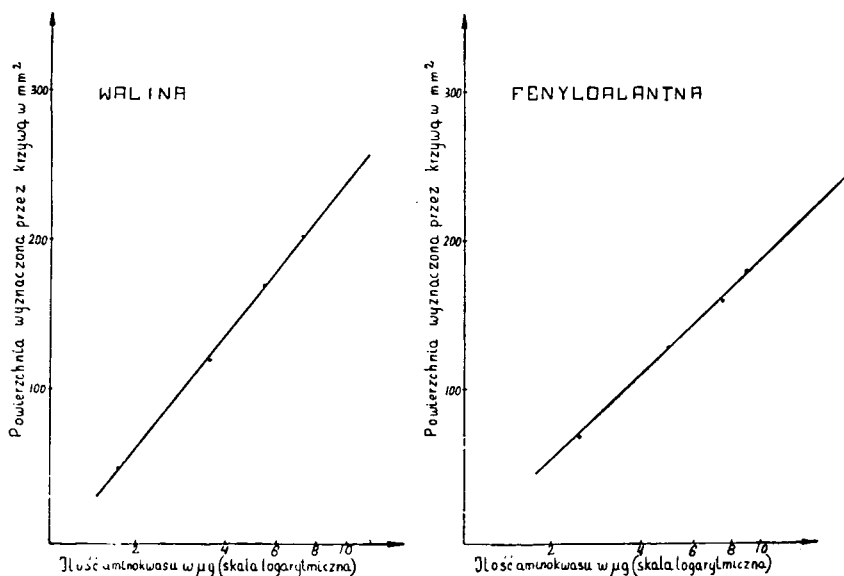
Tab. 3. Ilości aminokwasów w mikrogramach naniesione na bibułę oraz odpowiadające im powierzchnie wyznaczone przez krzywe w mm^2
Quantities of amino acids in micrograms introduced into the paper and the areas corresponding to them, marked by curves in mm^2

Lp.	Nazwa aminokwasu					
1	Lizyna	A	2,13	4,26	6,39	8,52
		B	60	90	110	120
2	Arginina	A	2,55	5,10	7,65	10,20
		B	140	220	280	330
3	Kwas glutaminowy	A	2,15	4,30	6,45	8,60
		B	100	200	260	310
4	α -Alanina	A	1,30	2,60	3,90	5,20
		B	30	160	250	300
5	Walina	A	1,71	3,42	5,13	6,84
		B	50	120	170	200
6	Fenyloalanina	A	2,41	4,82	7,23	8,64
		B	70	130	160	180
7	Leucyna	A	1,91	3,82	5,73	7,64
		B	40	70	100	120

A Ilość aminokwasu w mikrogramach.
B Powierzchnia wyznaczona przez krzywą w mm^2 .

Krzywe pokazane na ryc. 2 planimetrowano. Otrzymane powierzchnie w mm^2 wraz z odpowiadającymi im stężeniami użytych aminokwasów w μg podaje tab. 3 w kolumnach: 4, 5, 6 i 7. W oparciu o dane tab. 3 wyznaczano, posługując się wzorami 1, 2 i 3, równania prostych regresji oddzielnie dla każdego aminokwasu. Ryc. 3 przedstawia na przykładzie waliny i fenyloalaniny wykresy prostych regresji, poprowadzone zgodnie z dokonanymi obliczeniami. Punkty znajdujące się na prostej bądź wokół niej odpowiadają zmierzonym powierzchniom w mm^2 , wyznaczonym przez krzywe przedstawione na ryc. 2.

Wartość wyników uzyskanych w oparciu o wzorcową mieszaninę aminokwasów i podanych w tab. 3 sprawdzono w taki sam sposób, jak w przypadku pojedynczych wzorców. W tym celu do równania (wzór 1)



Ryc. 3. Wykresy zależności pomiędzy logarytmem ilości aminokwasu w mikrogramach i powierzchnią pola zakreślonego przez krzywą automatycznej rejestracji
Diagrams of the correlation between the logarithm of the quantity of the amino acid in micrograms and the field area marked by the automatic registration curve

wstawiono kolejno ilości użytych aminokwasów w µg i obliczano powierzchnię w mm². Otrzymane liczby porównywano z wynikami bezpośrednich planimetrycznych pomiarów krzywych automatycznej rejestracji (tab. 4).

Tab. 4. Zestawienie powierzchni pól wyznaczonych doświadczalnie i rachunkowo w mm² oraz względne różnice między nimi w procentach

The combining of the areas, shown experimentally and arithmetically in mm² and the relative differences between them expressed as a percentage

Lp.	Nazwa aminokwasu	Powierzchnia w mm ² wyznaczona		Względna różnica w %
		doświadczalnie	rachunkowo	
1	Lizyna	120,00	122,99	2,50
2	Arginina	220,00	229,41	4,73
3	Kwas glutaminowy	200,00	203,40	1,70
4	α-Alanina	160,00	163,82	2,37
5	Walina	120,00	123,20	2,66
6	Fenyloalanina	160,00	165,00	3,12
7	Leucyna	70,00	76,53	9,33

W tab. 4 ograniczono się do pokazania wyników otrzymanych dwoma sposobami dla stężeń aminokwasów, przy których występowały największe względne różnice pomiędzy powierzchniami pól. W trzeciej kolumnie przedstawiono powierzchnie pól wyznaczone planimetrem, w czwartej wyliczone rachunkowo, przy tym samym stężeniu aminokwasu. W ostatniej kolumnie podano względne różnice w procentach pomiędzy powierzchniami podanymi w kolumnie trzeciej i czwartej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Oceny otrzymanych wyników dokonano przy pomocy standardów aminokwasowych oraz statystycznych rachunków sposobem podanym przez Küstera (8), Niewiarowicza (10), Roberts'a i wsp. (12). Podstawą wyliczeń było założenie, że między logarytmem stężenia a powierzchnią wyznaczoną przez krzywą istnieje prostolinijna zależność (Bulli i wsp. (1), Fosdick (4), Niewiarowicz (11)). Dla każdego aminokwasu wyznaczano równanie prostej regresji (wzór 1). Graficzną ilustrację tego pokazano na przykładach przedstawionych na ryc. 1 i 3. Dla wszystkich stężeń użytych wzorców wyliczono powierzchnię w oparciu o równanie (wzór 1). Otrzymane wyniki porównywano z powierzchniami plam, wynikłymi z planimetrycznych pomiarów. W tab. 2 i 4 pokazano w procentach odchylenia dla tych aminokwasów, przy których występują największe względne różnice. Z tabel tych wynika również, że przeciętny rozrzut pomiędzy powierzchniami wyznaczonymi dwoma sposobami nie przekracza 10 mm². Biorąc pod uwagę, że przy pomocy planimetru odczytuje się powierzchnię z dokładnością do 10 mm² można podkreślić dużą precyzję wskazań stosowanego aparatu. Wyższe odchylenia niż 10 mm² otrzymano jedynie dla: argininy, α -alaniny, tryptofanu i leucyny. Należy zaznaczyć, że wymienione aminokwasy analizowane innymi metodami wykazują również znaczne błędy. (Fischer (2), Niewiarowicz (10), Wiewiórowski i wsp. (13)).

FIŚMIENNICTWO

1. Bull B. H., Hahn J. W., Baptist V. H.: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 550—553, 1949.
2. Fischer F. G., Dörfer H.: Biochem. Z. **324**, 544—546, 1953.
3. Fischer R. B., Parson D. S.: Nature (London). **161**, 764—765, 1948.
4. Fosdick L. S., Blackwell R. Q.: Science **109**, 314—315, 1949.
5. Klimek J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 75—82, 1965.
6. Klimek J., Krzeczowska I.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D. **15**, 117—122, 1960.
7. Krüger-Thimer E., Reif W.: Klin. Wschr. **34**, 205—207, 1956.

8. Küster F.: Logarytmiczne tablice analityczne. PWN, Warszawa 1952, ss. 206—209.
9. Lundquist F., Galatius-Jensen H.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, 342—352, 1960.
10. Niewiarowicz A.: Przem. Spoż. 9, 501—505, 1955.
11. Ostrowski W., Mikucki A.: Acta Physiol. Pol. 3, 277—297, 1952.
12. Roberts H. R., Kolor N. G.: Anal. Chem. 29, 1800—1802, 1957.
13. Wiewiórowski M., Przybylska J., Kociałkowski Z.: Roczniki Nauk Roln. 79, 453—465, 1958.

Pracę otrzymano 30 III 1965.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе был использован прибор собственного проекта, который после небольших конструктивных изменений, делает возможным определение количества аминокислот на основании непосредственной регистрации бумажных хроматограмм.

При помощи аминокислотных стандартов определялась ошибка, которая для большинства исследуемых образцов была менее чем 3% или же равнялась 3%. Наибольшие величины получены исключительно для: аргинина, альфа-аланина, триптофана и лейцина.

Табл. 1. Количества аминокислот в микрограммах отмеченные на фильтровальной бумаге, а также соответствующие им поверхности назначенные кривыми в мм².

Табл. 2. Сопоставление поверхности площадей назначенных экспериментально и счётно в мм², а также относительные разницы между ними в процентах.

Табл. 3. Количества аминокислот в микрограммах отмеченные на фильтровальной бумаге, а также соответствующие им поверхности назначенные кривыми в мм².

Табл. 4. Сопоставление поверхности площадей назначенных экспериментально и счётно в мм², а также относительные разницы между ними в процентах.

Рис. 1. Графики зависимости между логарифмом количества аминокислоты в микрограммах и поверхностью площади очерченной кривой автоматической регистрации, показанной в нижней части рисунка.

Рис. 2. Кривые изменений напряжения света проходящего через пояски хроматографической бумаги с цветными комплексами Cu + DYDA, совместно с линиями основ.

Рис. 3. Графики зависимости между логарифмом количества аминокислоты в микрограммах и поверхностью площади очерченной кривой автоматической регистрации.

S U M M A R Y

The author described the apparatus of his own invention which after slight modifications enables the quantitative determination of amino acids on the basis of a direct registration of the paper chromatograms. Using the amino acid standards the error for the majority of the patterns examined was calculated to be 3% or lower. Higher values were obtained only for arginine, α -alanine, tryptophan, and leucine.

