

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK i Jolanta WRÓŃSKA

Ilościowe oznaczanie PTH-Gli drogą trawienia żelu krzemionkowego

Количественное определение PTH-Gli путем травления силикагеля

Quantitative Determination of PTH-Gli by the Etching of Silica Gel

W toku badań nad oznaczaniem N-końcowych aminokwasów białka toksoidu tężcowego (2), zauważono, że odczynnik azydkowy trawi żel ze szklanej płytki w miejscu, w którym znajduje się PTH-Gli. W związku z tym spostrzeżeniem postanowiono sprawdzić, czy powyższe zjawisko może być wykorzystane do ilościowego oznaczania tego aminokwasu.

MATERIAŁY

Żel krzemionkowy —G do chromatografii cienkowarstwowej —Merck. Wodny roztwór 0,5 M NaN_3 , wodny roztwór 0,01 M J_2 w 0,5 M KJ, PTH-Gli Nutritional Biochemicals Corporation. Powlekacz do chromatografii cienkowarstwowej — Warsztaty Konstrukcyjne, Akademia Medyczna, Lublin, Planimetr wg Reiss —NRD.

BADANIA WŁASNE

Przygotowanie płytek i rozwijanie chromatogramu :

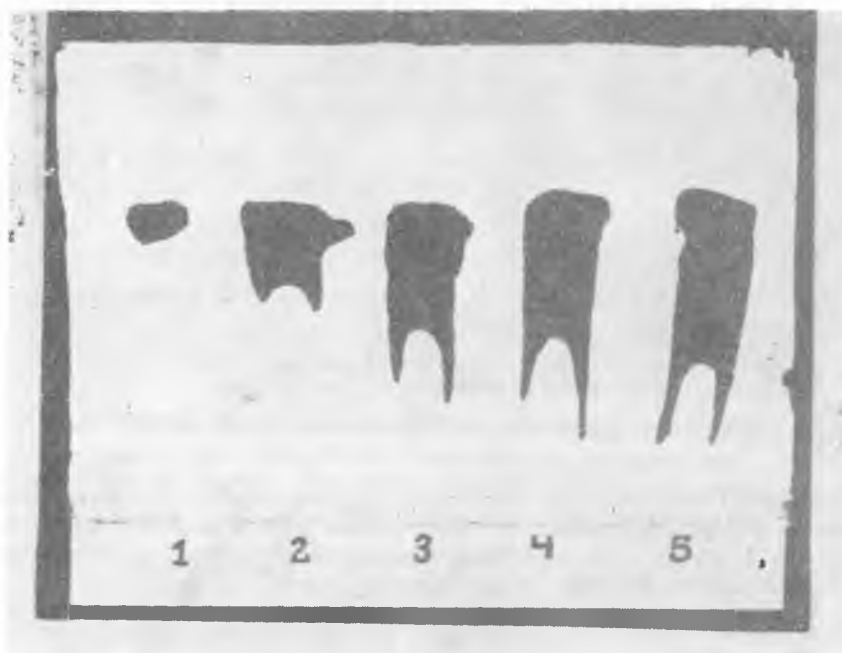
8 g Kieselgur —G wprowadzono do 17 ml wody destylowanej i po dokładnym wymieszaniu pokrywano płytki o wymiarach 12×11 cm warstwą od 0,2 mm do 0,3 mm, po czym suszono na powietrzu przez 20 minut. Bezpośrednio przed użyciem aktywowano żel w temperaturze 120° przez 30 minut i w odległości 1,5 cm od dolnej krawędzi punktowo nanoszono wzorce PTH-Gli w zakresie $59-295 \times 10^{-4}$ μM rozpuszczone w metanolu (tab. 1).

Do rozwijania chromatogramu zastosowano n-heptan, chloroform 1 : 1. Gdy rozpuszczalnik osiągnął wysokość poniżej 1 cm w stosunku do górnej krawędzi płytki (około 20 min), wyjmowano je ostrożnie z komory i suszono na powietrzu przez 15 min.

Wywoływanie chromatogramu :

Bezpośrednio przed użyciem łączono w stosunku 1 : 1 roztwór 0,5 M NaN_3 z roztworem 0,01 M J_2 w 0,5 M KJ. W otrzymanej mieszaninie zanurzano na kilka sekund płytkę z rozwiniętym chroma-

togramem. W miejscu, w którym znajdowała się PTH-Gli, następowało trawienie żelu przez odczynnik azydkowy. Otrzymany w ten sposób chromatogram ilustruje ryc. 1. Ciemne plamy na tle białego żelu odpowiadają PTH-Gli. Cyfry od 1 do 5 określają położenie naniesionego wzorca.



Ryc. 1. Chromatogram cienkowarstwowy. Cyfry od 1 do 5 określają położenie wzorcowej PTH-Gli
Thin-layer chromatogram. Numbers from 1 to 5 define the situation of the standard PTH-Gli

Planimetrowanie i ilościowa interpretacja wyników:

Po wysuszeniu płytkę z wytrawionym żelem odwracano i ustawiano na czterech gumowych korkach oraz planimetrowano powierzchnię. Przyjmując zależność logarytmiczną stężenia do powierzchni (1), wyznaczano równanie 1 metodą najmniejszych kwadratów (3).

$$y = a + blgx \dots \dots \dots l$$

gdzie: y — powierzchnia wytrawionego żelu w mm^2 x — stężenie w μM PTH-Gli, a i b — współczynniki. W oparciu o powyższą zależność, określano teoretyczną powierzchnię (tab. 1). W ostatniej kolumnie przedstawiono rozrzut pomiędzy powierzchnią wyznaczoną planimetrycznie a teoretyczną w mm^2 .

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Stosując metodę Edmana do ilościowej interpretacji N-końcowych aminokwasów w formie PTH — pochodnych napotkano na trudności. Wiąże się one z nietrwałością testu azydkowego (5) oraz z przechodzeniem żelu do roztworu utrudniającego

fotometrowanie (4). Proponowana technika omija powyższe niedogodności, nie wymaga kosztownego wyposażenia, a rezultaty są zachęcające, tym bardziej że dokładność planimetrowania wynosi 10 mm². Mimo tego tylko w jednym wypadku stwierdzono większą różnicę między powierzchnią planimetrowaną a teoretyczną, przy 3% względnym błędzie. Niewątpliwą zaletą metody jest także duża czułość, bowiem można określać stężenia od $59 \times 10^{-4} \mu\text{M}$. Trzeba jednak pamiętać, że zbyt duże zmniejszenie stężenia substratu prowadzi do znacznego obniżenia powierzchni plam, których planimetrowanie jest utrudnione i prowadzi do dodatkowych błędów.

Tab. 1. Ilościowe oznaczenie PTH-Gli metodą trawienia żelu
Quantitative determination of PTH-Gli by the method of silica geletching

$x 10^{-4} \mu\text{M}$	Powierzchnia w mm ²		Odchylenie pow. dośw. względem teoret. w mm ²
	Doświadcz.	Teoretycz.	
59	80	76,05	3,95
118	250	250,07	0,07
177	340	351,86	11,86
236	420	423,36	3,36
295	490	480,11	9,89

Wykorzystując przedstawioną technikę, należy podkreślić, że przylepność żelu do szkła jest niewielka. W związku z tym wszelkie operacje zanurzania płytek w odczynniku azydowym, a następnie planimetrowanie wymaga wprawy. Jednak nie stanowi to poważniejszej przeszkody, ponieważ pokonuje się ją stosunkowo łatwo. Wstępne badania, będące jeszcze w toku, wskazują, że proponowana metoda może być wykorzystana do oznaczeń innych aminokwasów w formie PTH-pochodnych. Dotyczy to zarówno materiału biologicznego, jak i wzorców. Po opracowaniu otrzymanych wyników będą one przedstawione w oddzielnej publikacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Fischer F., Parsons D.: *Nature*, **161**, 764–765, 1948.
2. Klimek J., Wrońska J.: *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, **23**, 235–239, 1971.
3. Niewiarowicz A.: *Przemysł spoż.* **9**, 501–505, 1955.
4. Sjöquist J.: *Biochem. et Biophys. Acta*, **41**, 20–30, 1960.
5. Toczko K., Szweđa Z.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol.* **14**, 757–758, 1966. Otrzymano 3. IX 1971.

РЕЗЮМЕ

Применяя тонкослойную хроматографию, установили, что азидовый реактив травит Kieselgur-G в том месте, в котором находится PTH-Gli. Кон-

статировали, что поверхность травленного силикагеля пропорциональна логарифму концентрации PTH-Gli и может служить основой для количественного определения PTH-Gli.

SUMMARY

Using thin-layer chromatography, it was found that Kieselgur-G is etched by azide reagent in the place of PTH-Gli spot. It was demonstrated that the area of etched gel is proportional to the logarithm of PTH-Gli concentration and may be the basis for the quantitative determination of PTH-Gli.